

团体标准

T/SDAA 0046—2021

动物粪便中产气荚膜梭菌的检测

Detection of *Clostridium perfringens* in animal feces

2021—11—30 发布

2021—12—31 实施

T/SDAA 0046—2021

全国团体标准信息平台

前言

本文件按照GB/T 1.1—2020的规定起草。

本文件由山东省畜牧协会提出并归口。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件起草单位：青岛农业大学、南京农业大学、青岛农业大学海都学院、山东省农业科学院家禽研究所。

本文件主要起草人：陈甫，邱慧玲，费荣梅，韩先杰，李福伟，朱连勤，高善颂，孙京新，于忠娜。

T/SDAA 0046—2021

全国团体标准信息平台

动物粪便中产气荚膜梭菌的检测

1 范围

本文件规定了动物产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 的检测方法。
本方法适用于畜禽粪便和胃肠内容物中产气荚膜梭菌的分离鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 原理

根据产气荚膜梭菌能分泌 α 毒素和 θ 毒素使血琼脂培养基产生溶血现象，初步筛选可疑菌；根据产气荚膜梭菌为革兰氏阳性杆菌、 α 毒素能分解卵黄中的卵磷脂在卵黄琼脂培养基上产生卵磷脂酶乳白色浑浊圈和最为突出的生化特性：发酵牛乳中的乳糖使牛乳酸凝并产生大量气体使凝块破裂成多孔海绵状“暴裂发酵”现象，初步鉴定产气荚膜梭菌；根据本菌 16s rDNA 基因序列设计一对特异性引物，以 DNA 核酸为模板扩增一段特异的目的基因片段，经琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 产物大小为 220 bp，确定产气荚膜梭菌。

4 试剂或材料

除非另有规定，所用试剂均为分析纯。

- 4.1 水：GB/T 6682 一级。
- 4.2 哥伦比亚血琼脂培养基。
- 4.3 甘露醇卵黄琼脂培养基。
- 4.4 含铁牛乳培养基。
- 4.5 革兰氏染色液。
- 4.6 30%甘油磷酸盐缓冲液。
- 4.7 PCR MIX (Taq、dNTP、MgCl₂、10×PCR buffer)。
- 4.8 DNA Marker DL 5000。
- 4.9 琼脂糖。
- 4.10 电泳缓冲液。

T/SDAA 0046—2021

4.11 1.0%琼脂糖凝胶。

5 仪器设备

- 5.1 冰箱：-20℃~10℃。
- 5.2 天平：感量 0.01 g。
- 5.3 显微镜：10×~100×。
- 5.4 无菌试管：18 mm×180 mm。
- 5.5 无菌培养皿：直径 90 mm。
- 5.6 一次性塑料注射器：10 mL。
- 5.7 恒温培养箱：37℃±1℃。
- 5.8 厌氧培养装置。
- 5.9 旋涡混合器。
- 5.10 超声波清洗器。
- 5.11 气浴摇床。
- 5.12 PCR 仪。
- 5.13 电泳仪。
- 5.14 凝胶成像系统。
- 5.15 高速台式离心机，转速不低于 13 000 rpm/min。
- 5.16 电热恒温鼓风干燥箱。
- 5.17 压蒸汽灭菌器。

6 样品

样品采集按照 NY/T 541 规定执行，4℃下保存和运输，24 h 内送检。粪便样品应选新鲜粪便至少 10.0 g，使用带螺帽容器或灭菌塑料袋运送。肛拭子样品应取无菌棉拭子插入肛门或泄殖腔中，旋转 2~3 圈，刮取直肠黏液或粪便，放入装有 30%甘油磷酸盐缓冲液中送检。肠道内容物样品应在烧烙肠壁表面，用移液器或一次性注射器扎穿肠壁，从肠腔内吸取内容物放入装有 30%甘油磷酸盐缓冲液中送检，或将带有粪便的肠管两端结扎，从两端剪短送检。

7 试验步骤

7.1 取样

棉拭子样品旋涡混匀 30 s，静置 1 min。粪便或肠道内容物样品经无菌操作称取 5.0 g±0.02 g 试样于含 20 mL 生理盐水灭菌 50 mL 离心管中，旋涡混匀 30 s，静置 1 min。

7.2 分离培养

吸取上层稀释液 0.05 mL，加入哥伦比亚血琼脂培养基平皿内均匀涂布。置于厌氧培养装置内，37℃±1℃培养 20 h~24 h。典型的产气荚膜梭菌为带有溶血环的灰色磨面粗糙菌落，菌落形态图参见附录图 A.1。

7.3 初步鉴定

将可疑菌落进行卵磷脂酶试验、牛乳发酵试验和革兰氏染色鉴定，表现有卵磷脂酶乳光浑浊圈、“暴烈发酵”现象和革兰氏阳性的菌落，可初步确定为产气荚膜梭菌。

7.3.1 卵磷脂酶试验

挑取单个菌落接种至甘露醇卵黄琼脂培养基中，37℃±1℃培养 12 h~24 h，典型菌落在卵黄琼脂培养基中呈现表面粗糙、边缘不整、圆形不透明的菌落，周围出现卵磷脂酶乳光浑浊圈，菌落呈现明显的外周低中部高内部低的“火山口”样外观，乳光浑浊带图参见附录图 A.2。

7.3.2 牛乳发酵试验

挑取单个菌落接种至含铁牛乳培养基中，37℃±1℃培养 12 h~24 h，出现“暴烈发酵”现象，牛乳凝固，产生大量气体使凝固的牛乳呈蜂窝状，并置于培养基上层，“暴烈发酵”现象图参见附录图 A.3。

7.3.3 革兰氏染色镜检

挑取单个菌落涂片，革兰氏染色镜检。产气荚膜梭菌为革兰氏阳性粗大的短杆菌，两端钝圆，呈短链状，无鞭毛，有芽孢，革兰氏染色图参见附录图 A.4。

7.4 PCR 鉴定

7.4.1 DNA 模板的制备

将样品取至 1.5 mL 塑料离心管中，12 000 rpm/min 离心去上清液，加入 100 μ L 灭菌水混匀，反复冻融 3 次，12 000 rpm/min 离心 10 min，取上清液作为 DNA 模板。

7.4.2 引物设计

根据产气荚膜梭菌 16s rDNA 基因序列 (AB045285.1) 设计 2 条引物，L: 5'-AGGTGGCGAGCGTTATCC-3', R: 5'-ATAACCCAACATCTCACGACAC-3'。

7.4.3 目的基因的扩增

以 7.4.1 中 DNA 模板进行 PCR 扩增。反应采用 25 μ L 反应体系，扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 16 $^{\circ}$ C 保持。PCR 反应体系如表 1。

表 1 PCR 反应体系

组 分	体 积/管
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
PCR MIX	12.5 μ L
DNA模版	2 μ L
ddH ₂ O	8.5 μ L
合计	25 μ L

7.4.4 PCR 产物鉴定

用 1 \times TAE 缓冲液配制 1%琼脂糖凝胶，在微波炉中融化，加入 GoldView (100 mL 琼脂糖凝胶溶液加入 5 μ L GoldView)，摇匀，待琼脂糖凝胶完全凝固后进行电泳。电泳时，取 5 μ L PCR 产物与 1 μ L 电泳上样缓冲液混合均匀，小心加到凝胶孔中，先用 100 V 电压进行电泳，待样品完全进入凝胶后，用 80 V 电压进行电泳。当片段到达理想位置后停止电泳，取凝胶在凝胶成像分析系统中观察结果并摄影。产物大小为 220 bp 的条带，凝胶电泳图参见附录图 A.5。

8 结果判定

全部符合以下特性者应判为产气荚膜梭菌，不符合者为其他菌。

- 8.1 在血琼脂平板上形成圆形、表面粗糙、边缘不整的菌落，菌落周围有溶血环；
- 8.2 在甘露醇卵黄琼脂培养基中菌落周围出现卵磷脂酶乳光浑浊圈。
- 8.3 在含铁牛乳培养基中呈现“暴烈发酵”现象，产生大量气体使凝固的牛乳呈蜂窝状。
- 8.4 革兰氏阳性粗大的短杆菌，两端钝圆，呈短链状，无鞭毛，有芽孢。
- 8.5 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测，参照 DNA Marker 中 DNA 条带，大小约为 220 bp。

9 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物，收集后高压灭菌处理。

附录 A

(资料性)

A.1 产气荚膜梭菌在血琼脂平板上形成的溶血现象见图A.1

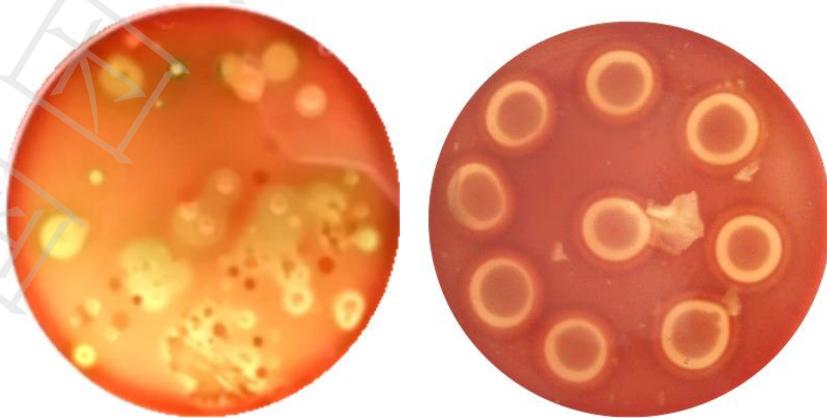


图 A.1 产气荚膜梭菌在血琼脂平板上形成的溶血环图

A.2 产气荚膜梭菌在甘露醇卵黄琼脂培养基上形成的卵磷脂酶乳光浑浊带见图 A.2



图 A.2 产气荚膜梭菌在甘露醇卵黄琼脂培养基上形成的卵磷脂酶乳光浑浊带图

A.3 产气荚膜梭菌在含铁牛乳培养基中出现“暴烈发酵”现象见图 A.3

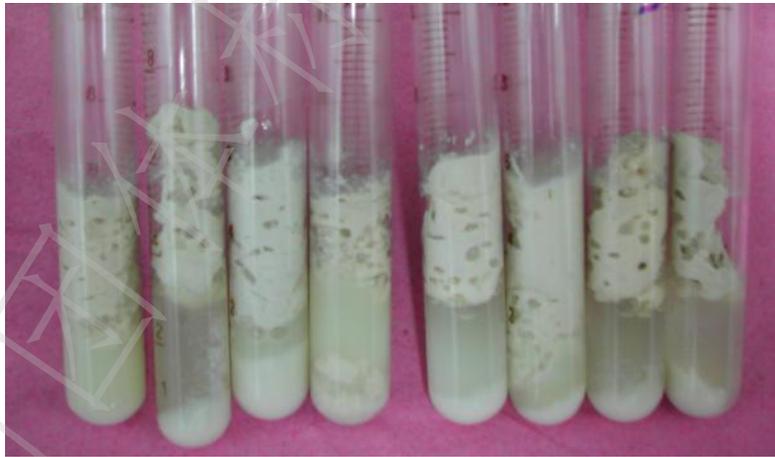


图 A.3 产气荚膜梭菌在含铁牛乳培养基中出现“暴烈发酵”现象图

A.4 产气荚膜梭菌革兰氏染色图见图 A.4



图 A.4 产气荚膜梭菌革兰氏染色图

A.5 产气荚膜梭菌 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳见图 A.5

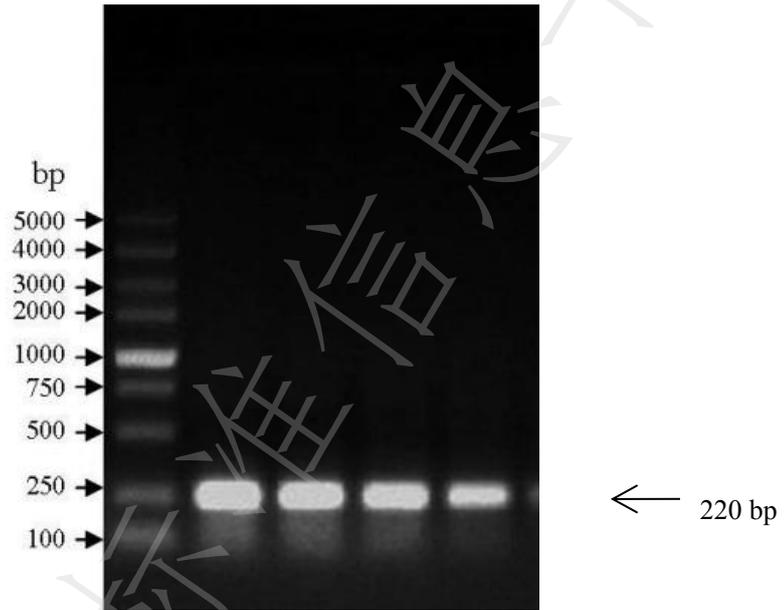


图 A.5 产气荚膜梭菌 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图