

裂腹鱼无乳链球菌病诊断技术规程

地方标准信息服务平台

2018 - 04 - 18 发布

2018 - 05 - 01 实施

四川省质量技术监督局 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 试剂和材料	1
5 设备和器械	2
6 临床检查	2
7 实验室样品采集	2
8 细菌分离与纯化	2
9 细菌鉴定	2
10 结果判定	5
11 综合判定	5
附录 A（规范性附录） 试 剂 配 方	6
附录 B（资料性附录） 无乳链球菌 cfb 基因参考序列（639 bp）	9

地方标准信息服务平台

前 言

本标准依据 GB/T 1.1-2009 给出的规定进行编写。

本标准中附录A为规范性附录、附录B为资料性附录。

本标准由四川省农业厅提出并归口。

本标准由四川省质量技术监督局批准。

本标准起草单位：四川农业大学、雅砻江水电凉山有限公司。

本标准起草人：耿毅、邓龙军、甘维熊、黄小丽、陈德芳、李亚军、张雨薇。

地方标准信息服务平台

裂腹鱼无乳链球菌病诊断技术规程

1 范围

本标准规定了裂腹鱼无乳链球菌病诊断的术语与定义、试剂和材料、设备和器械、临床检查、实验室样品采集、细菌分离与纯化、细菌鉴定、结果判定和综合判定等技术规程。

本标准适用于齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)、重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)、短须裂腹鱼(*Schizothorax wangchiachii*)、长丝裂腹鱼(*Schizothorax dolichonema*)和黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi Kesskr*)无乳链球菌病的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于文件的应用时必不可少的。凡是注日期的应用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 4789.28 食品卫生微生物学检测 染色法、培养基和试剂
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法
- GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检测方法
- SC/T 7014 水生动物检疫实验技术规范
- SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范
- SC/T 7201.1 鱼类细菌病检疫技术规程 第1部分：通用技术

3 术语和定义

下列术语和定义适用于此文件。

3.1

裂腹鱼无乳链球菌病

指由无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)感染引起的齐口裂腹鱼、重口裂腹鱼、短须裂腹鱼、长丝裂腹鱼和黄河裸裂尻鱼等裂腹鱼类发病或死亡的一种细菌性疾病。

3.2

BHI Brain Heart Infusion

脑心浸液琼脂培养基

3.3

Cfb Complement Factor B 基因

补体因子B基因

4 试剂和材料

4.1 试剂、染色液与培养基

按 GB/T 4789.28、GB/T 18652 与 SC/T 7014 规定执行，Taq酶、dNTPs、Mix-reaction buffer、DNA分子量标准参照物与核酸提取试剂盒选用专业试剂公司提供的商品化试剂，上述未提及的见附录A。

4.2 水

应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.3 引物

*cfb*基因PCR扩增引物，P2-F：5'- AAG TAC ATG CTG ATC AAG T -3'，P2-R：5'- TCT TGA TCA ACT TGT TGT AC -3'，-20℃保存。

5 设备和器械

主要设备与器械如下：

解剖盘、剪刀、镊子、手术刀、培养皿、铂耳、酒精灯、普通光学显微镜、电子天平、高压灭菌锅、恒温培养箱、超净工作台、普通冰箱、高速冷冻离心机、微量移液器、PCR扩增仪、离心管和PCR管、水平电泳系统和凝胶成像系统等。

6 临床检查

6.1 临床症状

病鱼摄食减少，甚至停止摄食，反应迟钝，离群独游，或间隙性兴奋狂游与阵发性身体痉挛而变弯曲。

6.2 外部检查

病鱼眼球单侧或双侧性突出，眼球周围充血、出血；下颌、鳃盖边缘、鳍条基部不同程度的充血、出血；部分病鱼无明显外部病变而死亡。

6.3 剖检

胃肠道空虚，肠壁变薄，肠腔内有少量淡黄色的粘液；肝肿大充血，出血，呈斑驳状，质地变脆，脾肿大，呈紫色；脑膜充血、出血；部分病鱼无明显的剖解变化。

7 实验室样品采集

样品采集按 SC/T 7103 执行。

8 细菌分离与纯化

在无菌的环境中，从病鱼的肝、肾或脑中直接取样常规划线接种BHI培养基(A.1)，28℃培养36h-48h。从中挑取表面光滑、微隆起、边缘整齐的乳白色圆形优势菌落划线接种BHI平板进行纯化培养。

9 细菌鉴定

9.1 革兰氏染色

按 GB/T 4789.28-2003 中2.2的规定执行。

9.2 生理生化试验

9.2.1 运动性试验

半固体琼脂按GB/T 4789.28中4.30的方法配制。把待检菌穿刺接种于半固体琼脂，28℃培养36h-48h。若待检菌由穿刺线向四周扩散，其边缘呈云雾状，为运动性阳性；若待检菌只生长在穿刺线上，边缘十分清晰，为运动性阴性。

9.2.2 吲哚试验

按 SC/T 7014 表2的吲哚（靛基质）试验的规定执行。培养基变红为阳性；不变红为阴性。

9.2.3 DNA 酶试验

将待检菌接种于DNA酶培养基平板（A.2）上，28℃培养48h。菌落周围培养基出现粉红色晕圈为阳性；无晕圈为阴性。

9.2.4 氧化酶试验

以毛细管吸取四甲基对二苯胺的1%水溶液滴在细菌的菌落上。菌落呈玫瑰红色、深紫色为阳性；不变色为阴性。

9.2.5 硫化氢（H₂S）试验

按 GB/T 4789.28 中3.14的规定执行。培养基黑色为阳性、不变黑色为阴性。

9.2.6 甲基红（M·R）试验

按 SC/T 7014 表2的甲基红（M·R）试验的规定执行。培养基变红色为阳性；不变红色为阴性。

9.2.7 过氧化氢酶（接触酶）试验

按 SC/T 7014 表2的接触酶试验的规定执行。有气泡产生为阳性；无气泡产生为阴性。

9.2.8 酯酶（Tween 80）试验

将待检菌接种于酯酶（Tween 80）测定培养基平板（A.3），28℃培养7d在细菌生长的周围有模糊晕圈为阳性；无模糊晕圈为阴性。

9.2.9 葡萄糖氧化发酵试验（O/F 试验）

按 GB/T 4789.28 中3.1的规定执行。若封口管与开口管的培养基均变黄为阳性，不变黄为阴性。

9.2.10 乙酰甲基甲醇（V-P）试验

按 SC/T 7014 表2的乙酰甲基甲醇（V-P）试验的规定执行。培养基下层出现红色为阳性，不出现红色为阴性。

9.2.11 精氨酸双水解酶试验

将幼龄待检菌穿刺接种在精氨酸双水解酶培养基（A.4）上。28℃培养48h。菌落周围培养基出现粉红色晕圈为阳性，无粉红色晕圈为阴性。

9.2.12 鸟氨酸脱羧酶试验

按 GB/T 4789.28 中3.12的规定执行。培养基呈紫色为阳性，对照管培养基为黄色。

9.3 cfb 基因 PCR 扩增与同源性分析

9.3.1 细菌基因组 DNA 提取

取2ml待检菌培养液，12000r/min离心1min，收集菌体。菌体悬浮于500μl TE缓冲液（pH8.0）（A.5），震荡悬浮，加入50μl 10%的SDS溶液（A.6），10μL 20mg/ml的蛋白酶K（A.7），混匀，37℃温育1h。加入100μL 5mol/L的NaCl溶液（A.8），充分混匀，再加入100μL CTAB/NaCl溶液（A.9）混匀，65℃温育20min。加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）（A.10），混匀，12000r/min离心5min。取上清液加入等体积的氯仿：异戊醇（24：1）（A.11），混匀，12000r/min离心5min。取上清液，加入1倍体积异丙醇，颠倒混合，室温下静置10min，10000r/min离心10min；沉淀用70%酒精洗涤2次，室温晾干。加入50μL的TE缓冲液溶解，-20℃贮存，备用。

9.3.2 cfb 基因 PCR 扩增

PCR反应体系：10×PCR缓冲液（无Mg²⁺）5.0μL，MgCl₂（25mmol/L）5.0μL，dNTP_s（10mmol/L）1.0μL，引物（20μmol/L）P1和P2各1.0μL，Taq DNA酶（5U/μL）0.5μL，DNA模板1.0μL，无菌双蒸水补足致50μL。混匀后，3000r/min离心30s。设空白对照，空白对照取等体积的双蒸水代替DNA模板。

PCR反应条件：94℃预变性5min；94℃变性1min；48℃退火1min；72℃延伸1min；30次循环；72℃延伸5min；4℃保温。

9.3.3 琼脂糖凝胶电泳

用TAE电泳缓冲液（A.12）配制1%的琼脂糖平板，凝固后放入水平电泳槽，使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将上述6μL样品和2μL溴酚蓝指示剂溶液（A.13）混合后加入样品孔，使用DNA分子量标准参照物作对照。120V电泳约20-40min，当溴酚蓝到达底部时停止。于紫外光下观察，并在长波紫外灯下用刀片切下含目的条带（约700bp）的胶块，放入无菌离心管中称重。

9.3.4 PCR 扩增产物纯化、测序及同源性分析

9.3.4.1 PCR 扩增产物纯化

9.3.4.1.1 在长波紫外灯下用刀片切下含目的条带（约700bp）的胶块，放入无菌离心管中称重；

9.3.4.1.2 按每0.1g琼脂糖凝胶加0.1mL酚，将酚加入9.3.3含有目的条带胶块的离心管中；经漩涡震荡仪震荡1min-2min，将离心管在-70℃放置1h，使凝胶完全冻结；

9.3.4.1.3 37℃水浴将冻结的凝胶融化后，在漩涡震荡仪上震荡1min-2min；14000r/min离心5min；取上层水相转入另一个离心管中，加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）（A.10），混匀，12000r/min离心5min；

9.3.4.1.4 取上清液加入等体积的氯仿：异戊醇（24：1）（A.11），混匀，12000r/min离心5min。

9.3.4.1.5 向收集的水溶液中加入1/10体积的3mol/L的乙酸钠和2倍体积的无水乙醇，置-20℃过夜或-70℃放置1h-2h。

9.3.4.1.6 14000r/min离心10min，弃上清；将沉淀的DNA溶于适当体积的TE缓冲液（A.4）中，置-20℃保存，待测。

9.3.4.2 PCR 扩增产物测序与同源性分析

将9.3.4.1纯化的PCR扩增产物进行序列测定，并与参考序列（附录B）进行比对分析。

10 结果判定

10.1 菌落形态

28℃培养36h-48h，形成表面光滑、微隆起、边缘整齐的乳白色圆形菌落。

10.2 细菌染色

革兰氏染色为阳性、成双或链状排列的球状细菌

10.3 生理生化试验

生理生化反应试验结果见表1。

表1 无乳链球菌的生理生化反应结果

反应项目	结果	反应项目	结果	反应项目	结果
硫化氢	-	吲哚	-	酯酶	-
运动性	-	甲基红	-	D-葡萄糖	+
氧化酶	+	DNA 酶	-	D-甘露醇	-
过氧化氢酶	-	精氨酸	+	V-P	+
注：“+”为阳性，“-”为阴性。					

10.4 *cfb* 基因 PCR 扩增与序列同源性分析

PCR扩增获得约770bp的*cfb*基因片段，其序列与附录所列的基因序列进行比对，同源性达98%以上。

11 综合判定

符合以下所有特征者判定为裂腹鱼无乳链球菌病：

- 临床症状与 6 相符；
- 菌落形态和染色观察与 10.1 和 10.2 相符；
- 生理生化反应结果与 10.3 相符；
- cfb* 基因 PCR 扩增和同源性分析结果与 10.4 相符。

附录 A
(规范性附录)
试剂配方

A.1 脑心浸液琼脂 (BHI)

蛋白胨	10.0g
脱水小牛脑浸粉	12.5g
脱水牛心浸粉	5.0g
氯化钠	5.0g
葡萄糖	2.0g
磷酸氢二钠	2.5g
琼脂粉	20g

加热搅拌溶解于1000ml蒸馏水中, 121℃灭菌15min, 倒平板。

A.2 DNA酶试验培养基

酪朊水解物	15g
大豆蛋白胨	5g
NaCl	5g
DNA	2g
甲苯胺蓝	0.1g
琼脂	15g
蒸馏水	1000mL

除DNA和甲苯胺蓝之外的成分, 加热熔化后调pH至7.2. 加入DNA和甲苯胺蓝, 混匀后分装, 121℃灭菌30min。

A.3 酯酶 (Tween80) 试验测定培养基

基础培养基:

蛋白胨	10g
NaCl	5g
CaCl ₂ ·7H ₂ O	0.1g
琼脂	9g
蒸馏水	1000mL

调pH至7.4, 于120℃灭菌20min

底物: Tween80, 于120℃灭菌20min

冷却基础培养基至40℃-50℃, 加Tween80至终浓度为1%, 倒平板。

A.4 精氨酸双水解酶培养基

蛋白胨	1g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	0.3g
酚红	0.01g
琼脂	6g
L-精氨酸盐	10g
蒸馏水	1000mL

pH7.0-7.2, 分装试管, 培养基高度约4.5cm, 121℃灭菌15min。

A.5 TE缓冲液 (pH8.0)

将0.121g Tris碱 (分子量121.1), 0.0372g乙二胺四乙酸二钠 (分子量372.24) 加入80mL双蒸水中, 加浓盐酸调节pH至8.0, 加双蒸水定容至100mL, 室温保存。

A.6 10%SDS溶液

将10g十二烷基硫酸钠加入80mL双蒸水中, 加热至68℃助溶, 再加入双蒸水定容至100mL, 室温保存。

A.7 蛋白酶K (20mg/mL)

将蛋白酶K溶解于双蒸水中, 至终浓度20mg/mL, 分装入小管, 置-20℃保存。

A.8 5mol/L的NaCl溶液

将29.22g NaCl (分子量58.44) 溶解于80mL双蒸水中, 再加双蒸水定容至100mL, 室温保存。

A.9 CTAB/NaCl溶液

4.1g NaCl溶解于80mL双蒸水中, 缓慢加入10g CTAB, 再加双蒸水定容至100mL, 室温保存。

A.10 酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1)

将25体积的酚、24体积的氯仿和1体积的异戊醇混合即可, 室温贮存于不透光的瓶中, 上面加上TE缓冲液, 4℃保存。

A.11 氯仿: 异戊醇 (24: 1)

将24体积的氯仿和1体积的异戊醇混合即可, 室温贮存于不透光的瓶中。

A.12 50×TAE电泳缓冲液

在400mL双蒸水中溶解121g Tris碱, 加入28.55mL冰乙酸和50ml 0.5/L EDTA。再加双蒸水定容至500mL, 室温保存。使用时, 配成1×TAE电泳缓冲液。

A.13 溴酚蓝指示剂溶液 6×上样缓冲液

将溴酚蓝100mg，加双蒸水5mL，在室温下过夜。待溶解后再称取蔗糖25g，加双蒸水溶解后移入溴酚蓝溶液中，摇匀后定容至50mL，加入NaOH溶液1滴，调至蓝色。

地方标准信息服务平台

附 录 B

(资料性附录)

无乳链球菌 cfb 基因参考序列 (639 bp)

```

1 gatcaagtga caactccaca agtggtaaat catgtaaata gtaataatca agcccagcaa
61 atggctcaaa agcttgatca agatagcatt cagttgagaa atatcaaaga taatgttcag
121 ggaacagatt atgaaaaacc ggttaatgag gctattacta gtgttgaaaa attaaagact
181 tcattgcgtg ccaaccctga gacagtttat gatttgaatt ctattggtag tcgtgtagaa
241 gccttaacag atgtgattga agcaatcact tttcaactc aacatttagc aaataaggtt
301 agtcaagcaa atattgatat gggatttggg ataactaagc tagttattcg cattttagat
361 ccatttgctt cagttgattc aattaaagct caagttaacg atgtaaaggc attagaacaa
421 aaggttttaa cttatcctga tttaaaacca actgatagag ctaccatcta taaaaatca
481 aaacttgata aggaaatctg gaatacacgc tttagtagag ataaaaaagt acttaacgtc
541 aaagaattta aagtttacia tactttaaat aaagcaatca cacatgctgt tggagttcag
601 ttgaatccaa atgttacggt acaacaagtt ggatcaaga

```

地方标准信息服务平台

地方标准信息服务平台