

斑点叉尾鮰嗜麦芽寡养单胞菌病诊断方法

2017-05-19 发布

2017-07-01 实施

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） 16S rRNA基因参考序列	9

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。
本标准起草人：陈德芳、耿毅、汪开毓、黄小丽、朱劫垚。

斑点叉尾鮰嗜麦芽寡养单胞菌病诊断方法

1 范围

本标准规定了斑点叉尾鮰嗜麦芽寡养单胞菌病 (*Stenotrophomonas maltophilia* disease of channel catfish) 的临床症状指标、病原鉴定方法与结果判定指标。

本标准适用于斑点叉尾鮰嗜麦芽寡养单胞菌病的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所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 4789.28-2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 18652-2003 致病性嗜水气单胞菌检测方法

SC/T 7014-2006 水生动物检疫实验技术规范

SC/T 7103-2008 水生动物产地检疫采样技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于此文件。

3.1

斑点叉尾鮰嗜麦芽寡养单胞菌病 *Stenotrophomonas maltophilia* disease of channel catfish
指由嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 感染引起的斑点叉尾鮰发病或死亡的一种细菌性疾病。

4 试剂和材料

4.1 试剂、染色液与培养基

按GB/T 4789.28-2003、GB/T 18652-2003或SC/T 7014-2006中规定执行，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、且用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水 (A. 1)。

4.3 引物

16S rRNA基因 DNA序列扩增引物，P1: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', P2: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG 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、铂耳丝、酒精灯、普通光学显微镜、电子天平、高压灭菌锅、超净工作台、普通冰箱和高速冷冻离心机、微量移液器、PCR扩增仪、离心管、PCR管、水平电泳系统与凝胶成像系统。

6 临床检查

6.1 活动情况

病鱼离群独游，活动缓慢，摄食减少或不摄食。

6.2 外部检查

病鱼体表出现圆形或椭圆形的褪色斑，病程稍长者在褪色斑处着生水霉，鳍条基部充血。

6.3 剖检

病鱼腹腔积液，肠道充血发炎，严重者中后肠有1~2个肠套叠，部分病鱼肠道坏死断裂，伴有脱肛现象；肝脏、脾脏肿大。

7 实验室样品采集

样品采集按SC/T 7103-2008 执行。

8 细菌分离与纯化

在无菌的环境中，从鱼的肝、肾及病灶组织中直接分离接种，或将样品置于无菌离心管中，用无菌盐水冲洗并捣碎。取样按常规法划线接种在普通营养琼脂或大豆胰蛋白胨琼脂平板（按GB/T 4789.28-2003中4.6规定的方法配制），28℃培养24h~48h。从中挑取平板中挑取黄灰色或淡黄色的单个菌落划线接种普通营养琼脂平板（按GB/T 4789.28-2003中4.7规定的方法配制）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 葡萄糖氧化发酵试验（O/F 试验）

按GB/T 4789.28-2003中3.1的规定执行。若封口管与开口管的培养基均变黄色为阳性；不变黄色则为阴性。

9.2.2 葡萄糖酸盐试验

将待检菌接种于1%葡萄糖酸盐液体培养基中(A. 2、A. 3)，置于28℃静置24h，加入斐林试剂0.5mL(A. 4)，于100℃水浴10min后迅速冷却，待观察。试管液体出现黄绿色、绿橙色或红色沉淀为阳性；不变色（仍为蓝色）为阴性。

9.2.3 肌醇发酵试验

将待检菌穿刺接种于肌醇发酵试验培养基(A. 5)，28℃培养，分别在24h、72h、120h时观察。培养基变黄色为阳性；不变黄色为阴性。

9.2.4 硫化氢试验

按GB/T 4789.28-2003中3.14的规定执行。培养基黑色为阳性、不变黑色为阴性。

9.2.5 吲哚试验

按SC/T 7014-2006表2的吲哚试验的规定执行。培养基变红色为阳性；不变红色为阴性。

9.2.6 甲基红(M·R)试验

按SC/T 7014-2006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 乙酰甲基甲醇(V-P)试验

按SC/T 7014-2006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。

9.2.8 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。

9.2.9 过氧化氢酶(接触酶)试验

按SC/T 7014-2006表2的接触酶试验的规定执行。有气泡产生为阳性；不产生气泡为阴性。

9.2.10 淀粉水解试验

按SC/T 7014-2006表2的淀粉水解试验的规定执行。菌落周围有透明环为阳性；无透明环为阴性。

9.2.11 液化明胶试验

按GB/T 4789.28-2003中3.10的规定执行。培养基液化为阳性；不液化为阴性。

9.2.12 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. 6)，28℃培养7d。在细菌生长的周围有模糊晕圈者为阳性；无模糊晕圈者为阴性。

9.2.13 DNA酶试验

将待检菌接种于DNA酶培养基平板(A. 7)上，28℃培养48h。菌落周围培养基出现粉红色晕圈为阳性；无模糊晕圈者为阴性。

9.2.14 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.8），空白对照采用不含精氨酸的培养基。用灭菌的凡士林油封管，置于28℃培养24h。培养基变红色为阳性；不变红色为阴性。

9.2.15 鸟氨酸脱羧酶试验

按GB/T 4789.28-2003中3.12的规定执行。培养基变紫色为阳性；对照管培养基为黄色。

9.2.16 运动性试验

半固体琼脂按GB/T 4789.28-2003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24h。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。

9.3 16S rRNA 基因 DNA 的序列测定和同源性分析实验

9.3.1 DNA 提取

9.3.1.1 将分离纯化的待检菌接种于普通营养液体培养基中，28℃震荡培养24h；

9.3.1.2 取2mL待检菌培养液，12000 r/min离心1min，收集菌体；

9.3.1.3 菌体悬浮于500μL TE缓冲液（pH8.0）（A.9），震荡悬浮，加入50μL 10%的SDS溶液（A.10），10μL 20mg/mL的蛋白酶K（A.11），混匀，37℃温育1h；

9.3.1.4 加入100μL 5mol/L的NaCl溶液（A.12），充分混匀，再加入100μL CTAB/NaCl溶液（A.13）混匀，65℃温育20min；

9.3.1.5 加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25:24:1）（A.14），混匀，12000 r/min离心5min；

9.3.1.6 取上清液加入等体积的氯仿：异戊醇（24:1）（A.15），混匀，12000 r/min离心5min；

9.3.1.7 取上清液，加入1倍体积异丙醇，颠倒混合，室温下静置10min，10000 r/min离心10min，沉淀用70%酒精洗涤2次，室温晾干；

9.3.1.8 加入50μL的TE缓冲液溶解，-20℃贮存，备用。

9.3.2 16S rRNA 基因序列扩增

9.3.2.1 在PCR管中加入10×PCR缓冲液（无Mg²⁺）5.0μL，MgCl₂（25mmol/L）5.0μL，dNTPs（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35.5μL。设空白对照，空白对照取等体积的双蒸水代替DNA模板。混匀后，3000 r/min离心30s。

9.3.2.2 将PCR管置于PCR仪，按下列程序进行PCR扩增：94℃预变性2min；94℃变性45s；52℃退火1min；72℃延伸1min；35次循环；72℃延伸7min；4℃保温。

9.3.3 琼脂糖凝胶电泳

用TAE电泳缓冲液（A.16）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.17）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20min，当溴酚蓝到达底部时停止，于紫外光下观察约1500bp的目的条带。

9.3.4 PCR 扩增产物纯化、测序及序列比对

9.3.4.1 在长波紫外灯下用刀片切下含目的条带（约1500bp）的胶块，放入无菌离心管中称重；

9.3.4.2 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，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；

- 9.3.4.3 37℃水浴将冻结的凝胶融化后，在漩涡振荡仪上震荡 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.14)，混匀，12000r/min 离心 5min；
- 9.3.4.4 取上清液加入等体积的氯仿：异戊醇（24:1）（A.15），混匀，12000r/min 离心 5min；
- 9.3.4.5 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，-20℃过夜或-70℃放置 1h~2h；
- 9.3.4.6 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.9）中，置-20℃保存，待测。
- 9.3.4.7 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24h~48h，形成圆形、有光泽、边缘整齐，呈黄、灰或淡黄色的菌落。

10.2 细菌染色

革兰氏染色为阴性，杆状，约0.5μm×1.5μm。

10.3 生理生化试验

生理生化反应试验结果见表1。

表1 嗜麦芽寡养单胞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	反应项目	结果
硫化氢	-	吲哚	-	酯酶	+	V-P	-
运动性	+	甲基红	-	葡萄糖酸盐	+	液化明胶	+
氧化酶	-	过氧化氢酶	+	肌醇	-	精氨酸双水解酶	-
葡萄糖氧化发酵	-	DNA酶	+	淀粉水解	-	鸟氨酸脱羧酶	-

注：“+”为阳性，“-”为阴性。

10.4 16S rRNA 基因 DNA 的序列测定和同源性分析试验

测定的16S rRNA基因DNA序列与附录B所列的基因序列进行blast比较，同源性达98%以上。

11 综合判定

符合以下所有特征者判定为斑点叉尾鮰嗜麦芽寡养单胞菌病：

- 临床症状与6相符或相似；
- 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；
- 16S rRNA基因DNA的序列测定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 焦炭酸二乙酯 (DEPC) 处理水

0.1%DEPC处理一级水 (GT/T 6682), 剧烈震荡后, 放置数小时, 121℃, 30min灭菌除去DEPC, 分装。

A.2 pH7.2 的磷酸盐缓冲液

1/15mol/磷酸二氢钾 KH_2PO_4 (9.078g/L)	300mL
1/15mol/磷酸氢二钠 Na_2HPO_4 (23.876g/L)	300mL

两种溶液分别调pH至7.2, 再混合后备用。

A.3 1%葡萄糖酸盐液体培养基

用pH7.2的磷酸盐缓冲液配制含1%葡萄糖酸盐的溶液。分装试管, 每管2mL, 112℃灭菌30min。

A.4 斐林试剂

I液: 结晶硫酸铜	34.64g
蒸馏水加至	500mL
II液: 酒石酸钾钠	173g
氢氧化钠	125g
蒸馏水加至	500mL

使用时, I液和II液等量混合, 当日使用。

A.5 肌醇发酵培养基

蛋白胨	2g
NaCl	5g
K_2HPO_4	0.2g
肌醇	10g
琼脂	6g
溴百里酚蓝 1%水溶液	3mL

(溴百里酚蓝先用少量95%乙醇溶解后, 再加水配制成1%的水溶液)

蒸馏水 1000mL

pH7.0-7.2, 分装试管, 培养基高度约4.5cm, 115℃灭菌20min。

A.6 酯酶 (Tween80) 试验测定培养基

基础培养基:

蛋白胨 10g
NaCl 5g
CaCl₂·7H₂O 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.7 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.8 精氨酸双水解酶培养基

蛋白胨 1g
NaCl 5g
K₂HPO₄ 0.3g
琼脂 6g
酚红 0.01g
L-精氨酸盐 10g
蒸馏水 1000mL

pH7.0-7.2, 分装试管, 培养基高度为4cm-5cm, 121℃灭菌15min。

A.9 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.10 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.11 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. 12 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. 13 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. 14 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. 15 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. 16 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. 17 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。

附 录 B
(资料性附录)
16S rRNA 基因参考序列

1 agtgaacgct ggcggtagc ctaacacatg caagtcgaac ggcagcacag gagagcttgc
61 tctctgggtg gcgagtgcg gacgggtgag gaatacatcg gaatctactt tttcgtgggg
121 gataacgtag ggaaacttac gctaataccg catacgacct acgggtgaaa gcaggggatc
181 ttcggacctt gcgcgattga atgagccgat gtcggattag ctagttagcg gggtaaaggc
241 ccaccaaggc gacgatccgt agctggtctg agaggatgat cagccacact ggaactgaga
301 cacggtccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat tggacaatgg gcgcaagcct
361 gatccagcca taccgcgtgg gtgaagaagg ccttcgggtt gtaaagcctt tttgttggga
421 aagaaatcca gctgtttaat acccggttgg gatgacggta ccaaagaat aagcaccggc
481 taacttcgtg ccagcagccg cggtaatacg aagggtgcaa gcgttactcg gaattactgg
541 gegttaaagc tgcgtaggtg gtcgtttaag tccgttga aagccctggg ctcaacctgg
601 gaactgcagt ggatactgga cgactagagt gtggtagagg gtacggaat tcctgtgta
661 gcagtgaat gcgtagagat caggaggaac atccatggcg aaggcagcta cctggaccaa
721 cactgacact gaggcacgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca
781 cgcctaacc gatgcgaact ggatgttggg tgcaatttgg cacgcagtat cgaagctaac
841 ggttaagtt cggccctgg ggagtacgt cgcaagactg aaactcaaag gaattgacgg
901 gggcccgcac aagcgggtga gtatgtggtt taattcgatg caacgcaag aaccttacct
961 ggcttgaca tgtcgagaac tttccagaga tggattggtg ccttcgggaa ctcgaacaca
1021 ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatggt gggtaagtc cgcgaacgag
1081 cgcaaccctt gtccttagtt gccagcacgt aatggtggga actctaagga gaccgccggt
1141 gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat ggcccttacg gccagggcta
1201 cacacgtact acaatgtag ggacagaggg ctgcaagccg gcgacggtaa gccaatcca
1261 gaaacctat ctcagtccgg attggagtct gcaactcgac tccatgaagt cggaatcgct
1321 agtaatcgca gatcagcatt gctgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc
1381 gtcacacat gggagtttgt tgcaccagaa gcaggtagct taacctcgg gagggcgctt
1441 gccacggtgt ggccgatgac tgggggtg
