

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4658—2025

动物源副猪嗜血杆菌分离与 鉴定技术规程

Technical code of practice for isolation and identification of
Haemophilus parasuis from animals

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国兽药残留与耐药性控制专家委员会归口。

本文件起草单位：华中农业大学、中国兽医药品监察所、中国动物卫生流行病学中心、湖北省疾病预防控制中心、吉林大学、山东省滨州畜牧兽医研究院。

本文件起草人：郝海红、张纯萍、徐士新、何启盖、王鹤佳、黄安雄、赵琪、余波、黄玲利、蔡旭旺、徐晓娟、曲志娜、韩文瑜、顾敬敏、苗立中、王娟、张朋、阮紫涵、邹紫莹、张志浩、于学祥、孙琪、田野、杜鹏飞、陈玲、蒋颖。



动物源副猪嗜血杆菌分离与鉴定技术规程

1 范围

本文件确立了副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)分离与鉴定的程序,规定了样品采集与保存运输、分离纯化、筛查与鉴定、菌种保藏、生物安全要求的操作指示,描述了相应的试验方法。

本文件适用于动物源细菌耐药性监测对猪鼻腔拭子、肺脏、心包液、胸腔积液、腹腔积液、关节液和脑脊液等样品中副猪嗜血杆菌的分离与鉴定。

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

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 34750 副猪嗜血杆菌检测方法

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

NY/T 4141 动物源细菌耐药性监测样品采集技术规程

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂或材料

4.1 要求

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的三级水,培养基按附录 A 的规定配制或用商品化产品。

4.2 试剂

4.2.1 胎牛血清。

4.2.2 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)。

4.2.3 50×TAE 缓冲液。

4.2.4 琼脂糖。

4.2.5 PCR 预混液(2×PCR Master Mix)。

4.2.6 荧光定量 PCR 预混液(2×SYBR Real-Time PCR Master Mix)。

4.2.7 甘油。

4.3 溶液制备

4.3.1 NAD 溶液:取 NAD 0.1 g,加水适量使溶解并稀释至 100 mL,0.22 μm 无菌滤膜过滤。

4.3.2 1×TAE 缓冲液:取 50×TAE 缓冲液 20 mL,加水至 1 000 mL。

4.3.3 1.2%琼脂糖凝胶:取琼脂糖 1.2 g,于 100 mL 1×TAE 中加热,充分溶解。

4.3.4 基质溶液:取 α-氰-4-羟基肉硅酸(HCCA),按说明书配制,或用市售商品。

4.3.5 灭菌甘油:取甘油适量,121℃高压灭菌 20 min。

4.4 培养基制备

- 4.4.1 Cary-Blair 氏运送培养基:按照附录 A 中 A.1 的规定执行。
- 4.4.2 TSA 培养基(含 0.1%NAD+胎牛血清):按照 A.2 的规定执行。
- 4.4.3 TSB 培养基(含 0.1%NAD+胎牛血清):按照 A.3 的规定执行。
- 4.4.4 5%蔗糖脱脂乳保护剂:按照 A.4 的规定执行。

4.5 标准菌株

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)[CVCC 3894 /CVCC 3721/ATCC 19417]。

4.6 材料

- 4.6.1 生化鉴定试剂盒或鉴定。
- 4.6.2 细菌 DNA 提取试剂盒。
- 4.6.3 卡磁珠保藏管。
- 4.6.4 脱脂牛奶。
- 4.6.5 0.22 μm 无菌滤膜。

5 仪器设备

- 5.1 二级生物安全柜。
- 5.2 冰箱:2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$, -20 $^{\circ}\text{C}$ 或以下。
- 5.3 分析天平:感量 0.01 g。
- 5.4 移液器:0.5 μL ~1 000 μL 。
- 5.5 恒温培养箱。
- 5.6 微生物生化鉴定系统。
- 5.7 PCR 仪。
- 5.8 高速冷冻离心机:离心速度 $\geq 12\,000\text{ r/min}$ 。
- 5.9 核酸电泳仪。
- 5.10 电泳凝胶成像分析系统。
- 5.11 荧光定量 PCR 仪。
- 5.12 微生物质谱仪(MALDI-TOF MS)。
- 5.13 显微镜:10 $\times$ ~100 $\times$ 。

6 分离鉴定程序

分离与鉴定程序见图 1。

7 样品采集与保存运输

按照 NY/T 4141 的规定执行。

8 分离纯化

无菌取鼻腔拭子、肺脏等样品涂布 TSA 培养基(含 0.1%NAD+胎牛血清)1/4 范围,用接种环划线,36 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)培养 24 h~48 h;用接种环蘸取心包液、胸腔积液、腹腔积液、关节液、脑脊液等样品划线接种于 TSA 培养基(含 0.1%NAD+胎牛血清),36 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)培养 24 h~48 h。

挑取单个圆形、光滑湿润、颜色灰白、边缘整齐、透明或半透明的针尖大小可疑菌落,接种 TSA 培养基(含 0.1%NAD+胎牛血清),36 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)培养 24 h~48 h,纯化,备用。

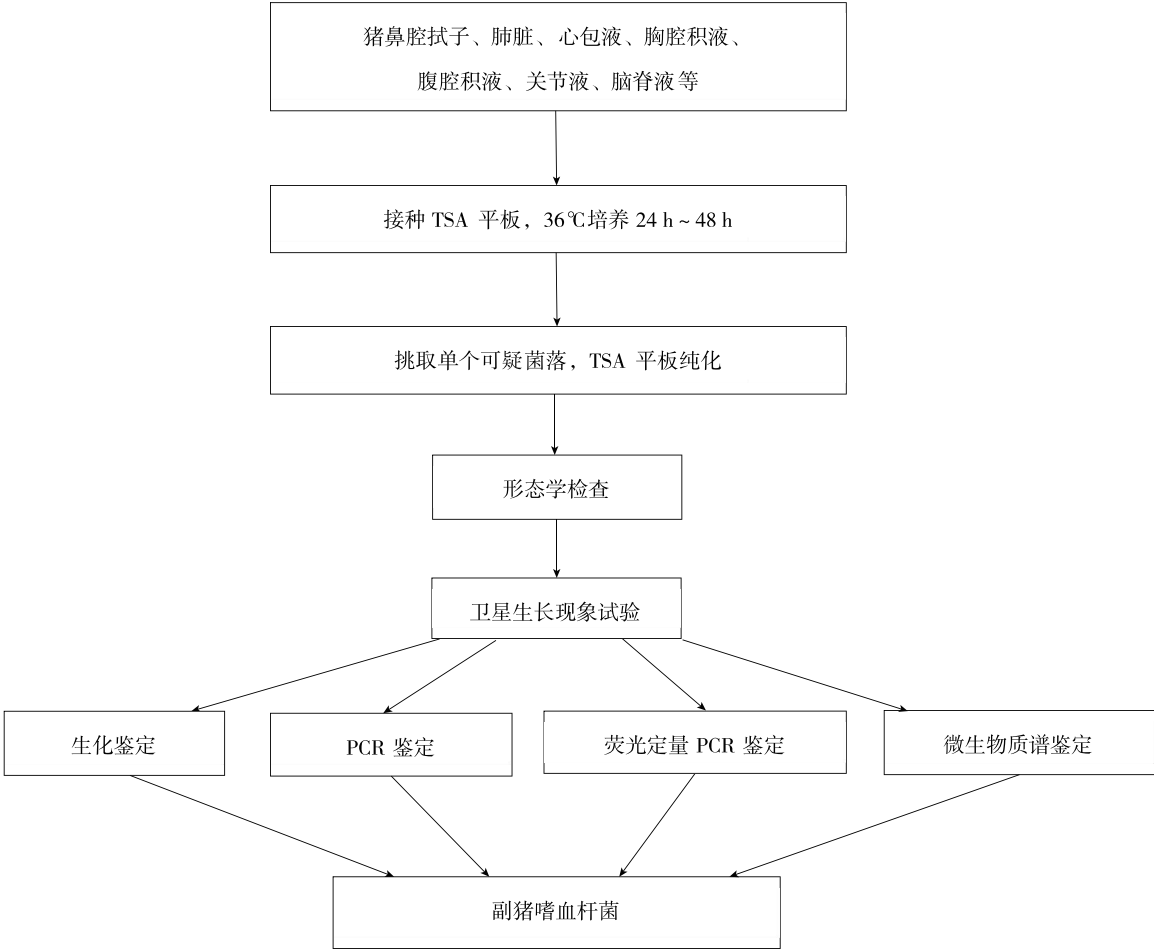


图 1 副猪嗜血杆菌分离与鉴定程序

9 筛查与鉴定

9.1 筛查

9.1.1 形态学检查

取纯化菌落,按照 GB/T 34750 的规定执行。

9.1.2 卫星生长现象试验

取纯化菌落,按照 GB/T 34750 的规定执行。

9.2 鉴定

9.2.1 通则

生化鉴定、PCR 鉴定、荧光定量 PCR 鉴定和质谱鉴定 4 种方法任选其一。

9.2.2 生化鉴定

按照 GB/T 34750 的规定执行,也可以使用生化鉴定试剂盒、鉴定卡或微生物生化鉴定系统鉴定。

9.2.3 PCR 鉴定

9.2.3.1 模板制备

取新鲜的纯化菌落,加灭菌水 0.5 mL,煮沸 10 min,冰浴冷却,12 000 r/min 离心 2 min。取上清液,备用。或使用细菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA 作为模板。副猪嗜血杆菌标准菌株作为阳性对照,水为阴性对照。

9.2.3.2 引物

引物序列及扩增片段长度见表 1。

表 1 副猪嗜血杆菌的 PCR 引物序列及扩增片段长度

细菌	引物序列	扩增片段长, bp
副猪嗜血杆菌	上游引物(16S RNA-F): 5'-GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT-3'	821
	下游引物(16S RNA-R): 5'-GGC TTC GTC ACC CTC TGT-3'	

9.2.3.3 反应体系

反应体系(20 μ L)见表 2。

表 2 PCR 反应体系

试剂	体积, μ L
2 $\times$ PCR Master Mix	10
上游引物(10 μ mol/L)	1
下游引物(10 μ mol/L)	1
水(ddH ₂ O)	7
模板	1

9.2.3.4 反应条件

94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

9.2.3.5 电泳

取 PCR 扩增产物, 于 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像分析。

9.2.3.6 结果判定

阳性菌扩增条带大小约 821 bp。阳性扩增产物需测序比对鉴定, 相似度不低于 98%。副猪嗜血杆菌标准菌的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果和正向引物测序结果见附录 B 中的 B.1 和 B.2。

9.2.4 荧光定量 PCR 鉴定

9.2.4.1 模板制备

按 9.2.3.1 的规定执行。

9.2.4.2 引物

荧光定量 PCR 引物序列见表 3。

表 3 副猪嗜血杆菌的荧光定量 PCR 引物序列

细菌	引物序列
副猪嗜血杆菌	上游引物(16S RNA-F): 5'-AGT AGC AGC TGA CGA TGG CGT AAT-3'
	下游引物(16S RNA-R): 5'-TCT ACA CGC TCT GGG TTT GCT TCT-3'

9.2.4.3 反应体系

荧光定量 PCR 反应体系(25 μ L)见表 4。避光条件下配置。

表 4 PCR 反应体系

试剂	体积, μ L
2 $\times$ SYBR Real-Time PCR Master Mix	12.5
上游引物(10 μ mol/L)	0.5
下游引物(10 μ mol/L)	0.5
水(ddH ₂ O)	10.5
模板	1.0

9.2.4.4 反应条件

95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环, 每个循环结束时收集荧光。

9.2.4.5 质控要求

质控应符合：

- a) 阳性对照 C_t 值 ≤ 29.0 ，且有特定扩增曲线；
- b) 阴性对照 C_t 值 > 32.0 或无，且无特定扩增曲线。

荧光定量 PCR 扩增曲线见附录 C。

9.2.4.6 结果判定

9.2.4.6.1 阳性

C_t 值 ≤ 29.0 ，有特定扩增曲线。

9.2.4.6.2 阴性

C_t 值 > 32.0 或无，无特定扩增曲线。

9.2.4.6.3 可疑

$29.0 < C_t$ 值 ≤ 32.0 ，有特定扩增曲线需复核，按复核结果判定。

9.2.5 质谱鉴定

9.2.5.1 菌样制备

挑取单个新鲜纯化菌落，均匀涂布于靶板样品孔中，室温干燥。吸取 $1\ \mu\text{L}$ 基质溶液滴于样品上，混匀，室温干燥。标准菌株的新鲜菌落同法操作。

9.2.5.2 仪器校准

检测样品前，应对微生物质谱仪进行校准。

9.2.5.3 测定

取制备好的样品靶板，置于质谱仪靶板槽中。编辑样品信息后，进行谱图的数据采集。

9.2.5.4 结果判定

微生物质谱仪自动完成谱图的比对和鉴定。以不同分值显示结果，鉴定分值达到种水平可信即可。副猪嗜血杆菌质谱鉴定谱图见附录 D。

10 菌株保藏

取新鲜纯化菌，加无菌生理盐水制成菌悬液，与灭菌甘油溶液混合，使甘油终浓度为 $20\% \sim 40\%$ ；或加入磁珠保藏管；或加入 5% 蔗糖脱脂乳保护剂，冻干。 $-20\ ^\circ\text{C}$ 或以下保藏。

11 生物安全要求

实验室设施设备、人员防护及实验的安全操作、实验废弃物和菌种的处理应符合 GB 19489 和 NY/T 1948 的要求。

附 录 A
(规范性)
培 养 基

A.1 Cary-Blair 氏运送培养基

A.1.1 成分

硫乙醇酸钠	1.5 g
磷酸氢二钠	1.1 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	5.0 g
氯化钙	0.09 g
水	1 000 mL

A.1.2 制法

将 A.1.1 中各成分加入水中,混匀,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 8.4 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.2 TSA 培养基(含 0.1% ONAD+胎牛血清)

A.2.1 基础液

胰蛋白胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

将 A.2.1 中各成分加入水中,混匀,调节 pH 值至 7.3 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 15 min。冷却至 $55\text{ °C} \sim 65\text{ °C}$,备用。

A.2.2 制法

基础液	1 000 mL
胎牛血清	50 mL
NAD 溶液	10 mL

将各成分混匀,倾注平板,备用。

A.3 TSB 培养基(含 0.1% NAD+胎牛血清)

A.3.1 基础液

胰蛋白胨	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
水	1 000 mL

将 A.3.1 中各成分加入水中,混匀,调节 pH 至 7.3 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

A.3.2 制法

基础液	1 000 mL
胎牛血清	50 mL
NAD 溶液	10 mL
将各成分混匀,备用。	

A.4 5%蔗糖脱脂乳保护剂

A.4.1 成分

脱脂乳	10.0 g
蔗糖	5.0 g
水	100 mL

A.4.2 制法

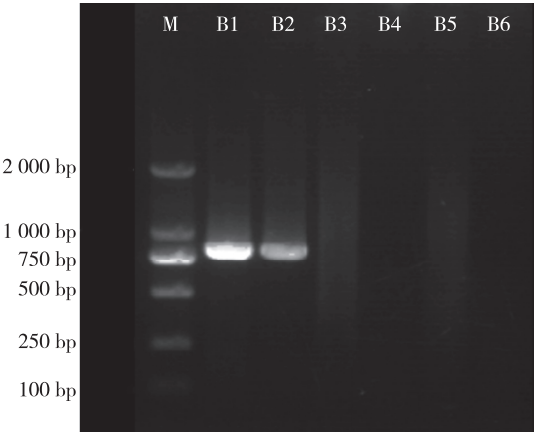
将 A.4.1 中各成分混匀,112 ℃ 高压灭菌 20 min,备用。

附 录 B
(资料性)

副猪嗜血杆菌 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图和目标片段测序结果

B.1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

见图 B.1。



标引序号说明：
M——2 000 bp DNA Marker；
B1——阳性对照(副猪嗜血杆菌 CVCC 3894)；
B2——副猪嗜血杆菌分离株；
B3——胸膜肺炎放线杆菌(ATCC 27090)；
B4——巴氏杆菌(CVCC 2083)；
B5——肺炎链球菌(ATCC 49619)；
B6——为空白对照(水)。

图 B.1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

B.2 目标片段测序结果

CACTTACTTGACGTTAGTCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCACGCAGGCGGTGACT
TAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTTTCATACTGGGTTGCTAGA
GTATTTTAGGGAGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
TACCGAAGGCGAAGGCAGCCCCTTGGGAAAATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGCTGTCGATTTGGGGATTGGGCT
TAGAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGTGATAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATG
CAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCTAAGAAGAACTCAGAGATGAGTTTGTGCC
TTCGGGAACCTTAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCGGTTCGGGAACCTCAAAG
GAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACG
AGTAGGGCTACACACGTGCTACATGGTCTACAGGGGGGGGGGGGGGGCCACAAACCCAACAAG
CCGGGGGGGGGAGCCGGGGGGCCCCAGAGGCCCGGAGGGGGGCAAAACCCACCATGGGGAGTT

TTTTTTTGGGGAGGGCAAGGGGAGGGTAGGGGTCTTTCGGGGTGGAAACGGAATTAAAACCCC
ATGGCTCCCCCGGGCTGGGGGGGGGCCCCGTCAATTCATTTGGAGTTTAAACCTTGGGGGGC
GGACTCCCCCAGGGGGGCGGATTTATCACGGTAGGCTACCGGG

附 录 C
(资料性)

副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 扩增曲线

副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 扩增曲线见图 C. 1。

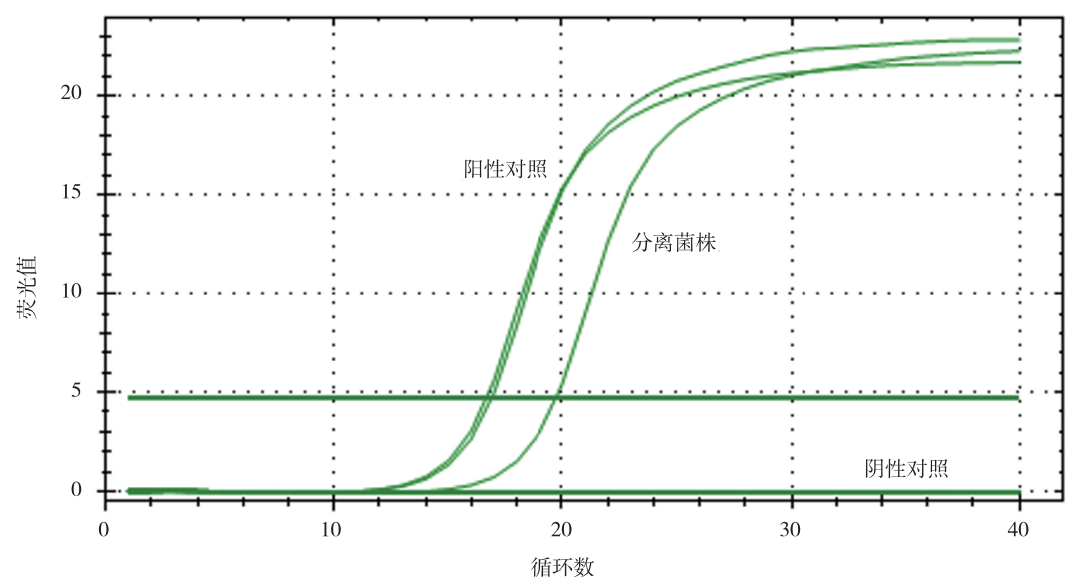


图 C. 1 副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 扩增曲线

附 录 D

(资料性)

副猪嗜血杆菌标准菌株质谱鉴定谱图

副猪嗜血杆菌标准菌株质谱鉴定谱图见图 D.1。

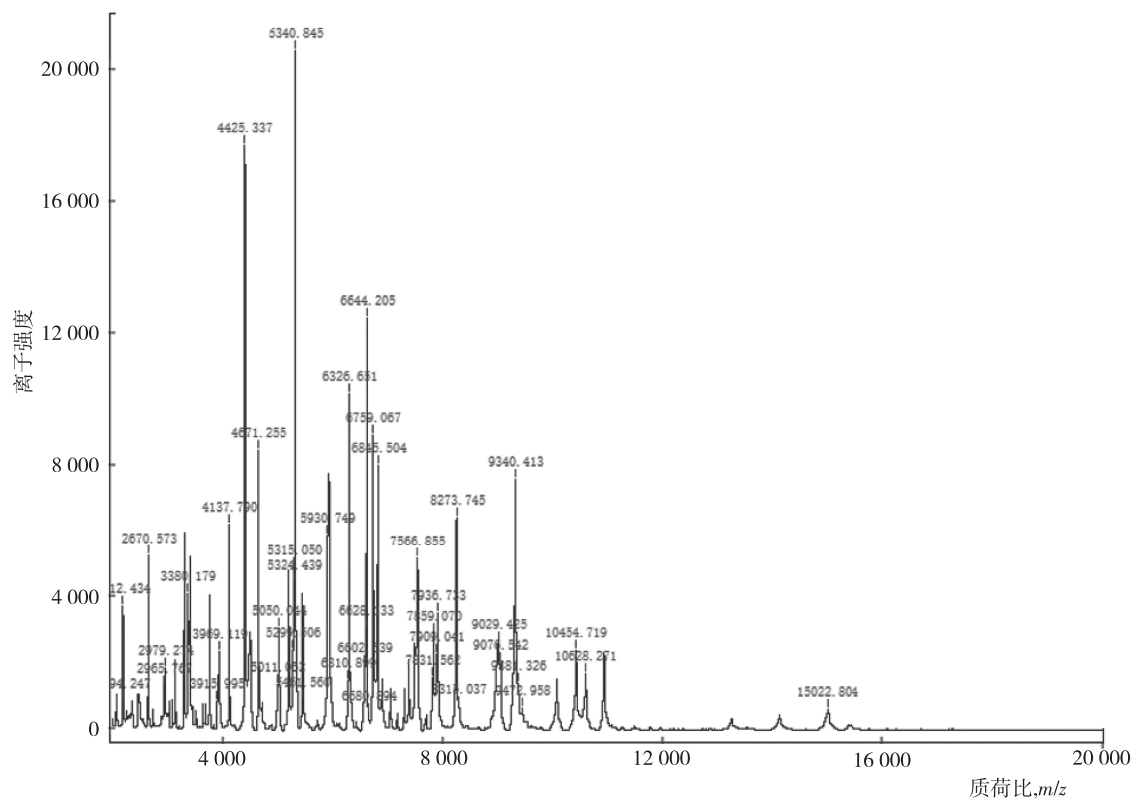


图 D.1 副猪嗜血杆菌标准菌株质谱鉴定谱图