

ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2962—2016

左端为试基 机生烈良谷西江市八基

前 言

本标准等同采用TC 161—2009《猪瘟病毒检测》。
本标准由中华人民共和国农业部提出。
本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 161)归口。
本标准起草单位：中国兽医药品监察所、中国兽医药品监察所兽药研究所。

奶牛乳房炎乳汁中金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌的分离与鉴定方法

1 范围

本标准规定了奶牛乳房炎乳汁中病原性金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌的分离和鉴定方法。

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。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*
一种血浆凝固酶试验为阳性、革兰氏染色为阳性的葡萄球菌，是引起奶牛乳房炎的主要病原菌。

3.2

凝固酶阴性葡萄球菌 *Coagulase negative Staphylococcus*
一类不产生凝固酶的葡萄球菌，革兰氏染色为阳性，是动物体正常菌群成员，常存在于皮肤、黏膜和分泌物中，可引起奶牛乳房炎。

3.3

无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*
一种 CAMP 试验为阳性、革兰氏染色为阳性的链球菌，是引起奶牛乳房炎的主要病原菌之一。

3.4

CAMP 试验
一种用于鉴定链球菌的试验，其原理是利用链球菌产生的 CAMP 因子与金黄色葡萄球菌产生的凝固酶共同作用，使血浆凝固酶水解，产生透明圈。

基因 surface immunogenic protein gene

sia 蛋白是无乳链球菌的一种表面的膜相关蛋白,是存在于菌体表面的一种具有吸附和凝集作用

蛋白,其基因是 ssa, ssa 的变异类型,其型别不同,在血清凝集试验中结果需要采用不同的 PCR 鉴定。

4 采样前检查

4.1 总则

牛乳房外观和乳汁性状进行观察。

牛乳房外观和乳汁性状

检查

4.2 乳房外观的检查

检查至少应涵盖以下 3 个方面:

临床型乳房炎的检查

颜色、对称性和硬度;

a) 乳房的大小、形状

乳房肿胀和发热;触摸时奶牛是否有疼痛反应及有无外伤或炎症;

b) 乳房是否有炎症

乳房颜色;

c) 乳汁的气味

絮片、凝块;

d) 乳汁有无凝块

变化。

e) 奶产品的性状

检查判定

4.3 临床型乳房炎判定

检查判定

如果乳房也出现上述变化,有乳汁性状改变或乳汁颜色改变,或乳样品中检出白细胞或血乳等性状,则可判定为临床型乳房炎。

4.4 隐性乳房炎的检查与判定

检查判定

检查判定

牛乳样的采集

5 奶牛乳房炎病

采样方法见 A.1;生物冰袋或冰块。

5.1 试剂与材料

乳样采集管

5.2 操作方法

7.8.2 试验试剂

3% H_2O_2 溶液,配制方法见 A.3。

7.8.3 接触酶试验操作方法

将 H_2O_2 溶液 1 滴加入置于洁净载玻片上,然后加 1 接种环被检细菌悬液,与 H_2O_2 溶液混

取菌

7.8.4 结果判定

G^+ 球菌,且接触酶试验阳性(+)、初步判定为葡萄球菌属;

G^+ 杆菌,且接触酶试验阳性(+)、初步判定为链球菌属。

8 定性鉴定

8.1 凝固酶阴性葡萄球菌的定性鉴定

8.1.1 总则

将鉴定结果与表 1 中鉴定为凝固酶阴性葡萄球菌的细菌特征进行比对,鉴定菌株。

8.1.2 器材和设备

恒温培养箱(37°C)、洁净工作台、冰箱(4°C)。

8.1.3 试剂与材料

8.1.3.1 兔血浆

配制方法见 A.4。兔血浆也可用商品化的试剂,按说明书操作。

8.1.3.2 凝固酶试验试剂

细菌菌株。

8.1.3.3 凝固酶试验试剂

兔血浆凝固酶阳性葡萄球菌。

8.1.3.3 阴性对照

空白兔血浆。

8.1.4 兔血浆凝固酶试验操作

将鉴定为凝固酶阴性的菌株接种于兔血浆凝固酶试验管(0.5 mL)中,于 37°C 恒温培养箱中培养,同时设立阳性对照和阴性对照。每 0.5 h 观察一次,观察管倾斜或倒置时,出现凝块或凝固体积大于总体积(0.5 mL)的一半,则判定为

凝固酶阳性葡萄球菌。

0.5 mL,轻轻摇匀,置 37°C

6 h,如呈现凝固(即将试

管倾斜或倒置时,出现凝块或凝固体积大于总体积(0.5 mL)的一半,则判定为

凝固酶阳性葡萄球菌。

8.1.5 结果判定

凝固酶阴性葡萄球菌,且符合兔血浆凝固酶试验阴性(-),则判定为凝固酶阴性葡萄球菌;

凝固酶阳性葡萄球菌,且符合兔血浆凝固酶试验阳性(+),则判定为凝固酶阳性葡萄球菌。

金黄色葡萄球菌的定性鉴定

8.2

8.2.1

8.2.1.1 总则

将鉴定结果与表 1 中鉴定为凝固酶阳性葡萄球菌的细菌特征进行比对,鉴定菌株。

8.2.1.2 器材和设备

恒温培养箱(37°C)、洁净工作台、冰箱(4°C)。

8.2.1.3 试剂与材料

凝固酶试验试剂,配制方法见 A.4。

8.2.1.4 凝固酶试验试剂

凝固酶阳性葡萄球菌。

凝固酶

8.2.1.5 Baird-Parker 琼脂平板筛选结果判定

混浊带:在其外层有一透

如果菌落直径为2 mm—4 mm,颜色呈灰色到黑色,边缘为淡色,周围透明圈,某些菌落混浊带和透明圈不明显,则初步判定为金黄色葡萄球菌。

模板 DNA

4.0 μ L (DNA 总量为 50 ng~120 ng)

总体积

50.0 μ L

8.2.2.4.2 PCR 试剂

8.2.2.4.2.1 试剂

中的加样顺序全部加完后,充分混匀,瞬时离心,使液体落到管底。在每
个反应管中加入一滴

按照 8.2.2.4.2

个 PCR 管中加入一滴

用 8.2.2.4.2.1

的酶和底物进行 DNA 扩增及 PCR 扩增。

葡萄球菌 *nuc* 基因的扩增条件

8.2.2.4.4 全黄色

1.6. PCR 扩增产物的鉴定和琼脂糖凝胶电泳

8.3.2.2 器材和设备

8.2.2.2.

8.3.4.3 试验材料

3.3.2.3.1 无孔绿藻前 PCR 扩定的引物序列为, 商业合
上游引物: 5'-ATGAAAATGAAATAAAATCG
下游引物: 5'-TCAATGTTAAATGATACG

8.3.2.3.2 TCEB 电泳, 抑制方法见 A.9.

[illegible]

8.3.2.3.4 12-oxo-7aa 或者其衍生物化的 PCR 反应抑制剂

8.3.2.3.5 超纯水

DL 2006 Ladder.

8.3.2.3.6 DNA Ladder

8.3.2.3.7 琼脂糖电泳

8.3.2.3.8 1×TAE电泳

缓冲液: 配制方法见 A. 7.

酸电泳凝胶成像系统和国际的商品化核酸染料

tip 基因 PCR 扩增产物需要在浓度为 10.3 g/L 的琼脂糖凝胶上进行凝胶电泳。按 A.9 的方法制备琼脂糖凝胶。

8.3.2.4.6 电泳

将 10.3 g/L 琼脂糖凝胶放入电泳槽中,加入电泳缓冲液,在 100 V 电压下,以 100 mA 电流进行电泳。电泳时间根据 DNA 片段大小而定,一般为 1~2 h。

4.7 电泳结果判定

8.3.2

将电泳后的凝胶放入紫外灯下观察,若可见清晰的 DNA 条带,则为阳性结果。若未见清晰的 DNA 条带,则为阴性结果。若出现多条带,则为污染结果。

8.3.3 结果判定

将电泳后的凝胶放入紫外灯下观察,若可见清晰的 DNA 条带,则为阳性结果。若未见清晰的 DNA 条带,则为阴性结果。若出现多条带,则为污染结果。

附录 A

(规范性附录)

培养基和试剂

A.1 乳样采集管

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将 A.1.1 试剂放入烧杯中,搅拌加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.2~7.4,也可用商品化的脱脂培养基,按照说明来操作。

分装于 100 mL 无菌离心瓶或培养基管中,每管 5 mL,旋紧盖子但不能盖紧,121℃ 高压灭菌 20 min,灭菌完成后将培养基于 4℃ 冰箱冷藏保存,培养基凝固后即可使用。

注:培养基应尽快使用。

A.2 改良营养肉汤

A.2.1 成分

10.0 g	牛肉膏
20.0 g	胰蛋白胨
3.0 g	酵母浸出物
3.0 g	氯化钠
1 000 mL	蒸馏水

A.2.2 制法

A.3 3% H_2O_2 溶液

A.3.1 制法

吸取 1 mL 30% H_2O_2 溶液,溶于 9 mL 蒸馏水中,摇匀,即可使用。

A.4 兔血浆

将 15 min 离心 1500 g/min 30 min,使血浆与细胞分离,取上清液即为兔血浆。将血浆与 0.1% 苯酚溶液 1 份,加兔血浆 4 份,轻轻摇匀,置于 4℃ 冰箱保存,即可用于实验。兔血浆应尽快使用,如不能及时使用,可置于 -20℃ 冰箱保存,使用时需解冻。

A.5 Baird-Parker 琼脂平板

A.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	5.0 g
丙酮酸钠	10.0 g
甘露醇	12.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	950 mL

法
A.5.2 增菌剂的配制
1.0 mL 与经灭菌处理的 1% 亚硫酸钠 10 mL 混合, 保存于冰箱 23℃~28℃ 中。

A.5.3 制法
将各成分加入蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 调节 pH 至 7.0±0.2, 分装每瓶 25 mL, 121℃ 灭菌 15 min。
同时用加热融化琼脂, 冷至 47℃~50℃, 每 25 mL Baird-Parker 琼脂基础培养基加本预

c) 将加入佐剂供体的疫苗样品倒入灭菌好的注射瓶, 经消毒后, 送冷链冷链物流冷链。

10. 溶液按表 1 配制。

11. 将疫苗按表 1 配制。

A.9 TIB 培养基

A.9.1 成分

10.0 g

牛肉粉

20.0 g

胰蛋白胨

2.0 g

葡萄糖

2.0 g

磷酸二氢钾

2.0 g

氯化钠

0.4 g

磷酸氢二钠

A.9.2 用法

将粉末由 1.5% 浓度取 15 ml, 溶于 100 ml 水中, 加入 10 ml 灭菌水。

将粉末由 1.5% 浓度取 15 ml, 溶于 100 ml 水中, 加入 10 ml 灭菌水。

将粉末由 1.5% 浓度取 15 ml, 溶于 100 ml 水中, 加入 10 ml 灭菌水。

将粉末由 1.5% 浓度取 15 ml, 溶于 100 ml 水中, 加入 10 ml 灭菌水。

(规范性附录)

亦标准的细菌分离鉴定流程图

本标准的细菌分离鉴定流程图见图 B.1。

分离鉴定流程图

图 B.1 本标准的细菌

