

ICS 65. 150
B50

DB46

海 南 省 地 方 标 准

DB 46/ T 280—2014

罗非鱼链球菌病检测技术规程

The detection technical regulations for Streptococcosis in Tilapia

2014 - 02 - 13 发布

2014 - 03 - 01 实施

海南省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由海南省海洋与渔业厅提出并归口。

本标准起草单位：海南省海洋与渔业科学院、中国水产科学研究院珠江水产研究所。

本标准主要起草人：王德强、可小丽、刘志刚、佟延南、李芳远、卢迈新、高风英、朱华平。

罗非鱼链球菌病检测技术规程

1 范围

本标准规定了罗非鱼链球菌病病原体与流行情况、检测链球菌所用试剂、染色液和培养基、仪器设备、采样、临床诊断、实验室诊断、细菌致病性实验和结果判定等方法。

本标准适用于罗非鱼链球菌病的检测与诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。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 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

SC/T 7014 水生动物检疫实验技术规范

SC/T 7201.1 鱼类细菌病检疫技术规程 第1部分：通用技术

3 病原体与流行情况

3.1 主要病原体

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*)。

3.2 流行情况

在我国南方罗非鱼养殖区，一年四季均有发生，水温30℃以上为爆发高峰期，对各种规格罗非鱼均可造成危害。

4 试剂、染色液和培养基

除非另有说明，检测中所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水或去离子水。实验中所需常规试剂、染色液和培养基均按SC/T 7201.1 和附录A的规定执行，其他分子生物学试验试剂按附录B的规定执行。

5 仪器设备

除下列仪器设备外，其余仪器设备按SC/T 7201.1 的规定执行。

- a) PCR 扩增仪。
- b) 核酸电泳仪和水平电泳槽。
- c) 凝胶成像仪。
- d) 微量移液器。

6 采样

病鱼样品采集按SC/T 7014的规定执行。

7 临床诊断

7.1 活动情况

患病鱼活动缓慢，反应迟钝，食欲减退，离群独游；病情严重时，常在水面翻滚或打转。

7.2 外部检查

体色发黑，眼球肿大突出，眼角膜发白浑浊，虹膜充血，严重者眼球脱落；下颌、鳃盖边缘、鳍条基部不同程度的充血、出血，伴有肛门红肿、外突的现象；部分急性患病个体有时无上述症状。

7.3 解剖检查

肝脏充血、肿大，颜色不均，呈花肝状，质地脆弱；脾充血肿大；胆囊充盈、充满蓝黑色的胆汁；部分患病鱼体出现腹水，肠道有轻度炎症，肠腔内有少量黄色的粘液。

8 实验室诊断

8.1 病原菌分离

8.1.1 平板划线分离

以无菌操作分别从病鱼眼、肝脏、脾脏、肾脏和脑组织中取少量组织划线接种于血琼脂平板，28℃倒置培养24~48 h。

8.1.2 纯培养

用无菌接种环挑取单个菌落，接种于新的血琼脂平板上，28℃倒置培养24 h。

8.2 菌落形态

在血平板上培养24 h后，无乳链球菌菌落圆形，直径1 mm~2 mm，呈乳白色、不透明，菌落表面湿润光滑、微隆起、边缘整齐；海豚链球菌菌落圆形，直径1.5 mm~3 mm，呈灰白色、不透明，表面光滑、湿润。

8.3 革兰氏染色

按GB/T 4789.28 执行。

无乳链球菌革兰氏染色呈阳性，菌体为球形或卵形，无鞭毛，无芽孢，菌体呈单个、成对或长链状排列。海豚链球菌革兰氏染色呈阳性，球形，单个或成对排列，少数3~4个排成短链状，无鞭毛，无芽孢。

8.4 生理生化检验

8.4.1 常规检测方法

8.4.1.1 运动性试验

用灭菌牙签或接种针将纯培养的细菌穿刺垂直接种于半固体BHI培养基中央，28℃培养24 h。通过细菌由中央向周边迁移形成游动圈大小来检测其运动性强弱。

再用0.85%生理盐水将细菌制成轻度混浊的菌悬液（约 1×10^6 CFU/mL），滴于载玻片上，盖上盖玻片，显微镜观察其运动情况。

8.4.1.2 生长试验

将细菌接种于血平板，于10℃和45℃培养过夜，观察其是否生长；再将细菌分别接种于6.5% NaCl、pH 9.6的BHI液体培养基和添加0.1%美蓝牛奶BHI液体培养基中，37℃孵育48 h，观察其生长情况。

8.4.1.3 溶血试验

用无菌接种环将细菌接种于新鲜的血琼脂平板上，28℃倒置培养24 h。在血平板上形成明显的透明环为 β 溶血，形成狭窄的灰绿色溶血环为 α 溶血，不形成溶血环为 γ 溶血。

8.4.1.4 马尿酸钠水解试验

用无菌接种环将待检菌接种于1 mL含1%马尿酸钠的BHI液体培养基中，37℃孵育48 h，1500 g离心3 min，取上清液0.8 mL，加入三氯化铁试剂0.2 mL，立即混匀，10 min~15 min后观察结果；出现恒定沉淀物为阳性。

8.4.1.5 接触酶试验

按SC/T 7014规定执行。

8.4.1.6 淀粉水解试验

按SC/T 7014规定执行。

8.4.1.7 吲哚试验

按SC/T 7014规定执行。

8.4.1.8 V-P 试验

按SC/T 7014规定执行。

8.4.1.9 糖类分解试验

按SC/T 7014规定执行。

8.4.1.10 试剂盒检测方法

8.4.1.10.1 API 20 STREP 检测

8.4.1.10.1.1 革兰氏染色

按GB/T 4789.28 执行。

8.4.1.10.1.2 接触酶试验

按8.4.1.5的规定执行。

8.4.1.10.1.3 溶血试验

按8.4.1.3的规定执行。

8.4.1.10.1.4 生化指标检测

按API 20 STREP试剂盒说明书进行。

8.4.1.10.1.5 结果判读

根据试剂盒说明书的判读表判读。

8.4.1.10.2 Rapid ID 32 STREP 检测

8.4.1.10.2.1 革兰氏染色

按GB/T 4789.28 执行。

8.4.1.10.2.2 接触酶试验

按8.4.1.4的规定执行。

8.4.1.10.2.3 溶血试验

按8.4.1.3的规定执行。

8.4.1.10.2.4 生化指标检测

按Rapid ID 32 STREP试剂盒说明书执行。

8.4.1.10.2.5 结果判读

用ATB TM Expression仪或mini API或人工判读。

8.5 聚合酶链式反应（PCR）检测

8.5.1 细菌 16S rRNA 基因序列检测

8.5.1.1 样品处理

取细菌纯培养液2 mL 置于离心管中，12000 rpm离心10 min，收集菌体，用1 mL TE缓冲液（pH 8.0）重悬菌体；加入50 mg/mL溶菌酶溶液6 μ L，37 °C水浴2 h；再加入2 mol/L NaCl 50 μ L，10% SDS 110 μ L，20 mg/mL蛋白酶K 3 μ L，37 °C水浴过夜。

8.5.1.2 细菌基因组 DNA 提取

细菌DNA抽提按照SC/T 7014中8.2.7.2的规定进行。

8.5.1.3 PCR 扩增 16S rRNA 基因片段

8.5.1.3.1 PCR 反应体系

10 \times PCR buffer（含Mg²⁺）5 μ L，10 mmol/L dNTP 1 μ L，5 U/ μ L Taq酶0.5 μ L，引物P_{1S}和P_{1A}（20 μ mol/L）各1 μ L，DNA模板2 μ L，用无菌双蒸水补至50 μ L。

8.5.1.3.2 PCR 反应程序

94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 30 次; 72 °C 再延伸 10 min。

8.5.1.4 电泳检测及胶回收

PCR 产物经 1.0 % 的琼脂糖凝胶电泳检测, 预期扩增片段大小为 1471 bp。切胶回收并纯化目的条带。

8.5.1.5 克隆测序

参照试剂盒说明书的操作步骤将纯化的目的片段连接于 pMD18-T 克隆载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选挑取阳性克隆进行 PCR 检测, 并进行测序分析。

8.5.1.6 测序结果分析

采用序列拼接软件 ContigExpress 对测序结果进行拼接, 采用 Vector NTI suite 8.0 软件和 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行序列同源性分析。分离菌株与 GeneBank 中已登录的无乳链球菌或海豚链球菌 16S rRNA 基因序列同源性为 99 % 以上。

8.5.2 双重 PCR 快速鉴别无乳链球菌和海豚链球菌

8.5.2.1 双重 PCR 反应体系

10 μ L 2 \times GC-rich buffer I (含 Mg²⁺), dNTP 0.4 μ L (10 mmol), 两对引物 (P1 和 P2; P3 和 P4) 各 0.5 μ L (20 μ mol/L), DNA 模板 2 μ L, 5 U/ μ L Ex Taq 酶 0.2 μ L, 加无菌双蒸水至 20 μ L。

8.5.2.2 双重 PCR 反应程序

96 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 35 s, 循环 32 次; 72 °C 再延伸 10 min。

8.5.2.3 电泳检测

阳性对照 (模板为无乳链球菌和海豚链球菌 DNA 混合物) 的 PCR 产物经 1.0 % 的琼脂糖凝胶电泳结果应同时显 474 bp 和 296 bp 两条带, 阴性对照 (无 DNA 模板) 的 PCR 产物电泳结果不显示任何条带, 则认定检测结果成立, 否则检测结果不成立。

在实验结果成立条件下, 若扩增产物为 474 bp 的唯一一条带, 菌株为无乳链球菌; 若扩增产物为 296 bp 的唯一一条带, 菌株为海豚链球菌。

9 细菌致病性实验

9.1 感染对象和条件

应选择与被检样品同龄、同规格、同品种 (系) 无患病史的健康罗非鱼; 感染水温与原始发病水温一致。

9.2 感染方式

用无菌生理盐水或蒸馏水稀释菌落, 制成菌悬液, 通过注射 (肌肉或腹腔注射) 或浸泡方式对鱼体进行人工感染, 连续 7 d 观察实验鱼的反应。

9.3 感染结果

根据科赫法则, 人工感染患病的罗非鱼出现与自然患病罗非鱼相同的症状, 且从人工感染患病的罗非鱼中分离出与人工感染细菌菌落形态相同的细菌, 可确定为病原菌。

10 结果判定

符合以下所有特征性者可判定为链球菌病：

- a) 临床检验结果符合 7 中规定。
- b) 菌落形态符合 8.2 的规定，革兰氏染色结果符合 8.3 规定。
- c) 生理生化检测结果符合附录 C 中规定。
- d) 或 API 20 STREP 或 Rapid ID 32 STREP 试剂盒的检测结果为无乳链球菌。
- e) 或细菌 16S rRNA 基因序列同源性分析结果符合 8.5.1.6 规定。
- f) 或双重 PCR 结果符合 8.5.2.3 规定。
- g) 致病性实验结果符合 9.3 规定。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制方法

A.1 1×TAE Buffer (pH 8.5)

Tris碱242 g, Na₂EDTA·H₂O 37.2 g, 加约800 mL去离子水, 充分搅拌溶解, 加入冰乙酸57.1 mL, 充分搅拌后加去离子水定容至1000 mL, 使用时50倍稀释。

A.2 TE Buffer (Ph 8.0):

1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 100 mL, 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 20 mL, 混合后加去离子水定容至1 L, 高温高压灭菌, 室温保存。

A.3 10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus):

100 mmol/L KCl, 160 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 20 mmol/L MgSO₄, 200 mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 1% Triton X-100, 1 mg/mL BSA。

A.4 BHI (脑心浸出液Brain Heart Infusion, BHI) 液体培养基**A.4.1 配方**

幼牛脑 (提取浸出粉)	200 g
牛心 (提取浸出粉)	250 g
葡萄糖	2 g
氯化钠	5 g
蛋白胨	10 g
磷酸氢二钠	2.5 g
蒸馏水	1 mL

A.4.2 配制

称取以上样品加热搅拌溶解于 1000 mL 蒸馏水中, 调节pH为7.0后分装于三角瓶中, 121℃高压灭菌 15 min, 备用。

A.5 半固体BHI (脑心浸出液Brain Heart Infusion, BHI) 培养基

在BHI液体培养基配方中添加0.5 %的琼脂粉, 将样品按说明书加水溶解后, 调节pH至7.0, 分装于试管中 (不超过试管总体积的1/3), 121 °C高压灭菌15 min, 垂直冷却后, 置4 °C冰箱保存备用。

A.6 三氧化铁试剂配制

称取三氧化铁 (FeCl₃·6H₂O) 12 g溶于2 %盐酸溶液100 mL中即可。

附 录 B
(规范性附录)
分子试剂

表 B.1 分子试剂

编号	试剂	浓度
1	Taq DNA 聚合酶	5 U/ μ L
2	Ex taq DNA 聚合酶	5 U/ μ L
3	2 \times GC-rich buffer I (Mg ²⁺ Plus)	5 mM
4	dNTP Mixture	2.5 mmol/L
5	细菌 16S rRNA 基因通用引物对 P _{LS} (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	20 μ mol/L
6	细菌 16S rRNA 基因通用引物对 P _{LA} (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')	20 μ mol/L
7	无乳链球菌的 <i>cfb</i> 特异基因引物对 P1 (5'-CTAGAGTACACATGTACTTAAG-3')	20 μ mol/L
8	无乳链球菌的 <i>cfb</i> 特异基因引物对 P2 (5'-CAGTAATCAAGCCCAGCAA-3')	20 μ mol/L
9	海豚链球菌 16SrRNA 基因的特异引物对 P3 (5'-CTAGAGTACACATGTACTTAAG-3')	20 μ mol/L
10	海豚链球菌 16SrRNA 基因的特异引物对 P4 (5'-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3')	20 μ mol/L
11	琼脂糖	/
12	溴化乙锭替代染料	/
13	2000 bp DNA 分子量标准 (marker)	/
14	PMD18-T 载体	/
15	DH5 α 感受态细胞	/
16	溶菌酶	50 mg/mL
17	蛋白酶 K	20 mg/mL
18	API 20 STREP (API 链球菌及相关微生物鉴定试剂条)	/
19	Rapid ID 32 STREP (ATB 鉴定系统链球菌快速鉴定试剂条)	/

附 录 C
(规范性附录)
生理生化试验结果

表 C.1 生理生化试验结果

项目 Items	无乳链球菌 <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	海豚链球菌 <i>Streptococcus</i> <i>iniae</i>	项目 Items	无乳链球菌 <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	海豚链球菌 <i>Streptococcus</i> <i>iniae</i>
革兰氏染色	+	+	麦芽糖	+	+
10℃下生长	—	—	阿拉伯糖	—	—
45℃下生长	—	—	棉子糖	—	—
6.5% NaCl	—	—	七叶灵	—	+
pH9.6	—	—	蔗糖	+	+
运动性	—	—	甘露醇	—	+
接触酶	—	—	淀粉	—	+
溶血类型	$\alpha/\beta/\gamma$	α/β	脲酶	—	—
马尿酸钠	+	—	水杨苷	+	—
精氨酸	+	+	海藻糖	+	+
MR试验	+	+	菊糖	—	—
VP试验	+	—	乳糖	—	—
山梨醇	—	—	木糖	—	—
核糖	+	+	蔗糖	+	+
葡萄糖	+	+			

注：“+”表示反应结果为阳性；“—”表示反应结果为阴性。

Note: “+”represents positive reaction; “—”represents negative reaction.