

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 561—2015
代替 NY/T 561—2002

动物炭疽诊断技术

Diagnostic techniques for animal anthrax

2015-10-09 发布

2015-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 561—2002《动物炭疽诊断技术》，与 NY/T 561—2002 相比，主要技术变化如下：

- 增加了规范性引用文件(见 2)；
- 增加了生物安全要求(见 3)；
- 增加了炭疽细菌学检查操作流程(见 5)；
- 增加了病料标本运输(见 6.1.3)；
- 增加了 PCR 鉴定试验(见 6.6)；
- 增加了陈旧动物病料和环境标本的细菌学检查(见 7)；
- 修改了病料标本采集(见 6.1.1 和 6.1.2)；
- 修改了细菌学检查的综合报告(见 6.7)；
- 修改了皮张标本取样和皮张抗原的制备方法(见 8.1 和 8.3)；
- 删除了雷比格尔氏荚膜染色法和荧光抗体染色法；
- 删除了青霉素串珠试验；
- 删除了非皮张类标本的沉淀试验检查。

本标准与世界动物卫生组织 OIE 编著《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2012 年第 7 版)中有关炭疽的诊断技术基本一致。

本标准由农业部兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：军事医学科学院军事兽医研究所。

本标准主要起草人：冯书章、祝令伟、刘军、郭学军、孙洋、纪雪、周伟。

本标准的历次版本发布情况为：

- NY/T 561—2002。

动物炭疽诊断技术

1 范围

本标准规定了动物炭疽芽孢杆菌的分离、培养及鉴定方法。

本标准适用于动物炭疽的诊断和检疫以及环境标本中炭疽芽孢杆菌的检测。

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。

国务院〔2004〕424号 病原微生物实验室生物安全管理条例

农业部〔2003〕302号 兽医实验室生物安全管理规范

农医发〔2007〕12号 炭疽防治技术规范

3 生物安全要求

3.1 疑似炭疽病料标本的涂片、染色和镜检,以及灭活材料的PCR试验和沉淀试验操作应在BSL-2实验室进行。

3.2 病原分离培养操作应在BSL-3实验室进行。

3.3 采样过程中的个体防护按照农医发〔2007〕12号的规定执行,实验过程中的操作和个体防护按照农业部〔2003〕302号的规定执行,推荐长期从事炭疽诊断的专业人员接种炭疽疫苗。

3.4 所有可能受污染的物品应彻底灭菌处理,可能受污染的环境应消毒处理,灭菌及消毒方法按照农医发〔2007〕12号的规定执行。

4 材料准备

4.1 器材

恒温培养箱、恒温水浴锅、高压灭菌锅、Ⅱ级生物安全柜、光学显微镜、台式离心机、CO₂培养箱、PCR扩增仪、电泳系统、紫外凝胶成像仪或紫外分析仪。

4.2 培养基及试剂

普通营养肉汤、普通营养琼脂平板、5%绵羊血液琼脂平板(或5%马血液琼脂平板)、0.7%碳酸氢钠琼脂平板、PLET琼脂平板;碱性美蓝染色液、草酸铵结晶紫染色液、革兰氏碘液、沙黄复染液、TAE电泳缓冲液、2%琼脂糖凝胶、上样缓冲液、0.5%苯酚生理盐水。配制方法见附录A。

4.3 诊断试剂

国家标准炭疽沉淀素血清、炭疽皮张抗原、健康皮张抗原、炭疽诊断用标准噬菌体和Ⅱ号炭疽疫苗菌株。

4.4 实验动物

体重18g~22g清洁级实验用小鼠。

5 操作流程

炭疽细菌学检查操作流程见图1。

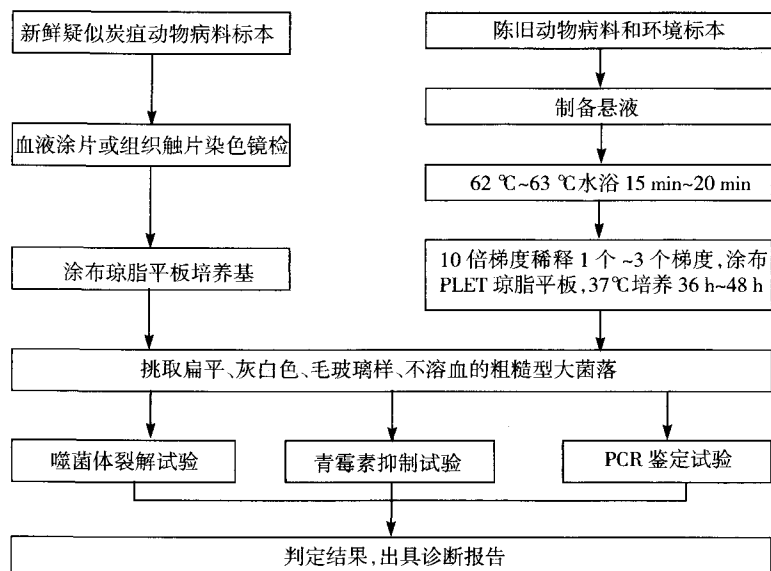


图1 炭疽细菌学检查操作流程

6 新鲜疑似炭疽动物病料标本的细菌学检查

6.1 病料标本采集和运输

6.1.1 疑似炭疽患病动物病料标本采集

疑似炭疽患病动物,自消毒的耳部或尾根部静脉采血 1 mL~3 mL,或者抽取病变部水肿液或渗出液以及天然孔流出的血性物,放置于无菌采样管中。取少许血液或组织液直接涂于载玻片上,自然干燥后火焰固定,放置于载玻片盒中。

6.1.2 疑似炭疽死亡动物病料标本采集

疑似炭疽死亡动物,针刺鼻腔或尾根部静脉抽取血液。已经剖杀的疑似炭疽动物尸体,应立即停止解剖活动,可抽取 1 mL~3 mL 血液或血性物,或者用无菌棉拭子蘸取组织切面采样,并做血液涂片或组织触片,然后立即按照农医发〔2007〕12号的规定处理现场。

6.1.3 病料标本运输

病料标本的包装和运输应符合国务院〔2004〕424号的要求,运输时间超过 1 h,应在 2℃~8℃条件下运输。

6.2 细菌染色法

6.2.1 碱性美蓝荚膜染色法

6.2.1.1 操作方法

滴加碱性美蓝染色液于载玻片涂抹面上,染色 2 min~3 min(如荚膜不清楚,染色时间可稍延长),水洗、干燥、镜检。冲洗后的废水以及吸水纸经高压灭菌处理或者用 10%次氯酸钠溶液处理过夜。

6.2.1.2 结果观察

镜下观察可见,炭疽芽孢杆菌菌体粗大,呈深蓝色,菌体外围荚膜呈粉红色。病料标本染色,菌体单在、成对或呈短链条排列;培养物染色,菌体呈长链条排列。

6.2.2 革兰氏染色法

6.2.2.1 操作方法

滴加草酸铵结晶紫染色液于载玻片涂抹面上,染色 1 min,水洗。滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗。滴加 95%乙醇,脱色约 30 s,水洗。滴加沙黄复染液,复染 1 min,水洗,干燥,镜检。废水以及吸水

纸如 6.2.1.1 处理。

6.2.2.2 结果观察

镜下观察可见,炭疽芽孢杆菌呈蓝紫色,为革兰氏阳性的粗大杆菌,长 $3\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$,宽 $0.8\ \mu\text{m}\sim 1.2\ \mu\text{m}$,有时可见椭圆形、小于菌体未着色的中央芽孢。病料标本染色,菌体单在、成对或呈短链条排列;培养物染色,菌体呈长链条排列,两菌接触端平直。

6.3 细菌分离培养

6.3.1 操作方法

用接种环钩取血液、水肿液、渗出液等,划线接种于琼脂平板培养基表面;棉拭子标本直接涂于琼脂平板培养基表面。置 37°C 培养 $18\ \text{h}\sim 24\ \text{h}$ 。挑取可疑菌落,接种于普通营养肉汤中, 37°C 培养 $4\ \text{h}\sim 5\ \text{h}$,涂片进行革兰氏染色镜检,并进行后续检测试验。

6.3.2 结果观察

炭疽芽孢杆菌的菌落具有如下特征。

- 在普通营养琼脂平板上,形成扁平、灰白色、毛玻璃样、边缘不整齐、直径 $3\ \text{mm}\sim 5\ \text{mm}$ 的粗糙型大菌落。用低倍显微镜观察,菌落呈卷发状,有的菌落可见拖尾现象。
- 在 5% 绵羊或马血液琼脂平板上,形成粗糙型大菌落,菌落周围不溶血。
- 在 PLET 琼脂平板上,生长受轻度抑制,需培养 $36\ \text{h}\sim 48\ \text{h}$,形成较小的毛玻璃样粗糙型菌落。

6.4 噬菌体裂解试验和青霉素抑制试验

6.4.1 操作方法

吸取 $100\ \mu\text{L}$ 待检菌液均匀涂布于普通营养琼脂平板表面,自然干燥 $15\ \text{min}$ 。用接种环钩取炭疽诊断用标准噬菌体悬液一满环,点种于平板的一侧或划一短直线;在平板的另一侧贴 1 片含 $10\ \text{U}$ 青霉素的药敏纸片。同时,以 II 号炭疽疫苗菌株培养的菌液作为阳性对照。 37°C 培养 $3\ \text{h}\sim 5\ \text{h}$ 。

6.4.2 结果观察

噬菌体悬液滴加处细菌不生长,出现明显而清亮的噬菌斑(带),为噬菌体裂解阳性反应。青霉素纸片周围细菌不生长,出现明显的抑菌环,为青霉素敏感菌株。如在培养平板上不出现或只出现不明显的噬菌斑(带)和抑菌环,应将培养时间延长到 $12\ \text{h}\sim 18\ \text{h}$,再观察结果如前,应判为阴性反应;如出现明显的噬菌斑(带)和抑菌环,判为阳性反应。

6.5 荚膜形成试验

6.5.1 操作方法

用接种环钩取待检菌液划线接种于 0.7% 碳酸氢钠琼脂平板上,置 20% 二氧化碳条件下,于 37°C 培养 $18\ \text{h}\sim 24\ \text{h}$ 。同时,以 II 号炭疽疫苗菌株作为阳性对照。挑取菌落,涂片,碱性美蓝染色,镜检。

6.5.2 结果观察

见 6.2.1.2。

6.6 PCR 鉴定试验

6.6.1 PCR 引物

炭疽芽孢杆菌 PCR 鉴定所使用的引物参见附录 B。

6.6.2 模板制备

吸取 $100\ \mu\text{L}$ 待检菌液于带螺口盖的离心管中, $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 $1\ \text{min}$,菌体沉淀用 $25\ \mu\text{L}$ 无菌去离子水重悬;或者用接种环钩取可疑菌落于 $25\ \mu\text{L}$ 无菌去离子水中混匀。 95°C 加热处理 $20\ \text{min}$,冷却到 4°C 后 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 $1\ \text{min}$ 取上清作为 PCR 反应的模板 DNA。阳性对照为 II 号炭疽疫苗菌株制备的模板 DNA,阴性对照为不加菌的无菌去离子水。

6.6.3 PCR 反应

6.6.3.1 PCR 反应体系

PCR 反应总体系 50 μ L, 依次加入以下试剂:

无菌去离子水	27.5 μ L
不含镁离子 10 \times Taq 缓冲液	5 μ L
15 mmol/L 氯化镁	5 μ L
dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)	5 μ L
上游引物(PAF, 50 μ mol/L; CAF 或 SAF, 10 μ mol/L)	1 μ L
下游引物(PAR, 50 μ mol/L; CAR 或 SAR, 10 μ mol/L)	1 μ L
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	0.5 μ L
模板 DNA	5 μ L

6.6.3.2 PCR 扩增条件

95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min, 冷却至 4 $^{\circ}$ C。

6.6.4 电泳

将 PCR 扩增产物与上样缓冲液(5 \times)混合, 取 10 μ L 点样于 2% 琼脂糖凝胶孔中, 5 V/cm 电压, 电泳 30 min, 紫外凝胶成像仪或紫外分析仪下观察结果。

6.6.5 结果判定

在阳性对照和阴性对照成立的条件下, 被检样品出现特定的扩增带, 判定为对应基因 PCR 检测阳性; 被检样品未出现特定的扩增带, 判定为对应基因 PCR 检测阴性。

6.7 细菌学检查的综合报告

6.7.1 无菌采集的新鲜血液涂片或组织触片标本中观察到革兰氏阳性、有荚膜的单在、成对或呈短链条排列的粗大杆菌, 可初步报告为检出炭疽芽孢杆菌。

6.7.2 PCR 检测保护性抗原、荚膜和 S-层蛋白基因均为阳性; 或者 PCR 检测保护性抗原、荚膜基因其中一种为阳性, 可报告为检出炭疽芽孢杆菌。

6.7.3 噬菌体裂解试验阳性, 可报告为检出炭疽芽孢杆菌。

6.7.4 炭疽芽孢杆菌被青霉素抑制不生长, 可报告为检出炭疽芽孢杆菌青霉素敏感株。

7 陈旧动物病料和环境标本的细菌学检查

7.1 标本采集和运输

7.1.1 陈旧动物病料标本采集

肉、脏器、骨粉、皮张、鬃、毛等病料, 每份采集 5 g~10 g。

7.1.2 土壤标本采集

怀疑受炭疽芽孢杆菌污染的区域(疑似炭疽疫点等), 分散采集周围 50 m 内表层土壤(10 cm 内)5 份, 每份 20 g~50 g。

7.1.3 水体标本采集

怀疑受炭疽芽孢杆菌污染的水源, 如牲畜饮水槽、蓄水池、池塘和河流等, 分散采集水样 5 份, 每份 500 mL。蓄水池和池塘等, 自怀疑泄污口处周围 100 m 范围内分散采样, 河流自怀疑泄污口处下游 100 m~1 000 m 范围内分散采样。水深不足 1 m 时, 在 1/2 水深处采样; 水深超过 1 m 时, 在水面下 0.5 m 处采样。

7.1.4 标本运输

标本运输参照 6.1.3 执行。

7.2 细菌分离培养

7.2.1 陈旧动物病料和土壤标本剪碎或捣碎,加入 2 倍体积无菌去离子水充分研磨混匀。标本悬液 62℃~63℃水浴 15 min~20 min,1:10 或者 1:100 稀释(必要时可做 1:1000 稀释,以保证 PLET 琼脂平板上可见到适量的单菌落),分别涂布于 3 块 PLET 琼脂平板。每块平板加入液体 200 μL,涂匀,自然干燥 15 min~30 min。37℃培养 36 h~48 h。

7.2.2 土壤标本需设置阳性对照,每克土加入 1000 个~5000 个 II 号炭疽疫苗菌株芽孢作为阳性对照。

7.2.3 水样自然沉降或者用纱布滤除大块不溶物,3000 r/min 离心 30 min,弃上清,沉淀物加入 2 倍体积无菌去离子水,按照土壤标本方法处理,涂布于 PLET 琼脂平板。

7.3 细菌鉴定

挑取可疑菌落,按照 6.4、6.5 和 6.6 进行鉴定。

7.4 小鼠滤过试验

在细菌学检查未检测到炭疽芽孢杆菌的情况下,采用小鼠滤过试验。

7.4.1 按照 7.2 处理标本制成悬液,给 3 只小鼠各皮下注射 62℃~63℃热处理后的悬液 0.05 mL~0.1 mL。

7.4.2 小鼠死亡后(一般 48 h~72 h),从尾部采血,制作涂片,碱性美蓝染色,镜检。

7.4.3 观察到有荚膜的粗大杆菌后,接种于 5%血液琼脂平板,挑取可疑菌落,按照 6.4 和 6.6 进行鉴定。

7.5 细菌学检查的报告

参照 6.7 的判定标准,出具细菌学检查的报告。

8 皮张标本炭疽的沉淀试验检查

8.1 标本采集和运输

8.1.1 在每张皮的腿根内侧剪取皮张标本一块约 2.0 g,并做好标记。复检时,仍在第一次取样的附近部位采取标本。

8.1.2 将皮张标本装入耐高压蒸汽灭菌的加盖塑料试管(10 mL~30 mL)中,以记号笔标号。

8.1.3 皮张的编号应与装皮张标本的试管号相一致。

8.1.4 在未收到检疫结果通知单前,取样完毕的皮张应保持原状,不得重新分类、包装、加工和移动。

8.1.5 皮张标本运输参照 6.1.3 执行。

8.2 灭菌

8.2.1 收到皮张标本后,应按送检单内容进行登记。

8.2.2 检查无误后,将试管放入高压蒸气灭菌器内,121℃高压灭菌 30 min。

8.3 被检皮张抗原的制备

8.3.1 每份标本加入浸泡液(0.5%苯酚生理盐水)10 mL~20 mL,在 10℃~25℃条件下,浸泡 16 h~25 h。

8.3.2 用双层滤纸将待检标本浸泡液滤过,透明滤过液即为待检抗原,其编号应与原始标本编号相符。

8.4 操作方法

8.4.1 本试验应在 15℃~25℃的条件下进行。

8.4.2 实施本试验前须按下列要求,设对照试验:

a) 炭疽沉淀素血清,与炭疽皮张抗原作用 15 min,应呈阳性反应。

- b) 炭疽沉淀素血清,与健康皮张抗原和0.5%苯酚生理盐水作用15 min,应呈阴性反应。
- c) 阴性血清,与炭疽皮张抗原作用15 min,应呈阴性反应。

8.4.3 将最小反应管按标本的编号顺序排好,向反应管内加注炭疽沉淀素血清0.1 mL~0.2 mL。然后吸取等量的待检抗原,沿反应管壁徐徐加入,并记录加完后的时间,待判。

8.4.4 血清与抗原的接触面,界限应清晰、明显可见。界限不清者应重做。

8.4.5 如为盐皮抗原,应在炭疽沉淀素血清中加入4%氯化钠后,方能做血清反应。

8.5 结果观察

判定时,将反应管置于水槽中蘸水取出,放于眼睛平行位置,在光线充足、黑色背景下观察与判定。按下列标准记录结果,对可疑和无结果者,须重做一次。

- a) 抗原与血清接触后,经15 min在两液接触面处,出现致密、清晰明显的白环为阳性反应。
- b) 白环模糊,不明显者为疑似反应。
- c) 两液接触面清晰,无白环者为阴性反应。
- d) 两液接触面界限不清,或其他原因不能判定者为无结果。

8.6 复检

8.6.1 初检呈阳性和疑似的标本应复检。复检的方法同初检。

8.6.2 复检再呈阳性反应时,判为炭疽沉淀试验阳性。复检再呈疑似反应时,按阳性处理。

8.6.3 经确定为阳性的标本,应将对应的阳性皮张及其相邻的皮张挑出,无害化焚烧处理。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 普通营养肉汤**A.1.1 成分**

蛋白胨	20 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,搅混均匀,必要时加热溶解,调节 pH 至 7.2~7.4,分装,121℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 普通营养琼脂平板**A.2.1 成分**

蛋白胨	20 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将除琼脂外的各成分加入蒸馏水中,搅混均匀,加热溶解,调节 pH 至 7.2~7.4,加入琼脂粉混匀,高压灭菌 121℃,15 min,待冷至 45℃~50℃时倾注无菌培养皿平板(直径 90 mm)。

A.3 5%绵羊血液或5%马血液琼脂平板**A.3.1 成分**

普通营养琼脂	100 mL
脱纤维绵羊血(或脱纤维马血)	5 mL

A.3.2 制法

将制备好的普通营养琼脂加热溶化后,冷至 45℃~50℃,加入无菌的脱纤维血,混匀,倾注无菌培养皿平板(直径 90 mm)。

A.4 0.7%碳酸氢钠琼脂平板**A.4.1 成分**

普通营养琼脂	100 mL
7%碳酸氢钠溶液	10 mL
马血清或绵羊血清	7 mL

A.4.2 制法

称取配制 100 mL 普通营养琼脂所需固体成分溶于 83 mL 蒸馏水中,121℃ 高压灭菌 15 min。冷至 45℃~50℃,加入过滤除菌的 7%碳酸氢钠溶液 10 mL 以及血清 7 mL,混匀,倾注无菌培养皿平板(直径 90 mm)。

A.5 PLET 琼脂平板

A.5.1 成分

心浸液琼脂	1 000 mL
多黏菌素	30 000 U
溶菌酶	300 000 U
3%EDTA 溶液	10 mL
4%醋酸铊溶液	1 mL

A.5.2 制法

除心浸液琼脂外,其他成分制备成储存液,过滤除菌,分装保存。心浸液琼脂推荐使用 Difco 公司产品,按照说明书制备并高压灭菌后,冷至 45℃~50℃,加入各成分后混匀,倾注无菌培养皿平板(直径 90 mm)。

注:醋酸铊为剧毒化学品,称取时应做好个人防护,储存液应标注剧毒标识。

A.6 碱性美蓝染色液

A.6.1 成分

美蓝	0.3 g
95%乙醇	30 mL
0.01%氢氧化钾溶液	100 mL

A.6.2 制法

将 0.3 g 美蓝溶于 30 mL 95%酒精中,然后与氢氧化钾溶液充分混合均匀。

注:制备好的碱性美蓝染色液,需置于室温充分熟化达 1 年以上,方可使用。

A.7 草酸铵结晶紫染色液

A.7.1 成分

结晶紫	1 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

A.7.2 制法

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.8 革兰氏碘液

A.8.1 成分

碘	1 g
碘化钾	2 g
蒸馏水	300 mL

A.8.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.9 沙黄复染液

A.9.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

A. 9.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A. 10 TAE 电泳缓冲液(50×)**A. 10.1 成分**

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 8.0)	100 mL
蒸馏水	加至 1 000 mL

A. 10.2 制法

称取 242 g Tris 加入 500 mL 蒸馏水中,充分溶解后加入冰乙酸和 EDTA 溶液,定容至 1 000 mL。

A. 11 2%琼脂糖凝胶**A. 11.1 成分**

琼脂糖	4 g
TAE 电泳缓冲液(50×)	4 mL
蒸馏水	196 mL
1%溴化乙锭(EB)溶液	20 μ L

A. 11.2 制法

将琼脂糖和 TAE 电泳缓冲液加入蒸馏水中,微波炉中完全融化,加入 EB 溶液,混合均匀。

A. 12 上样缓冲液(5×)**A. 12.1 成分**

溴酚蓝	0.2 g
蔗糖	50 g
蒸馏水	100 mL

A. 12.2 制法

称取溴酚蓝 0.2 g,加蒸馏水 10 mL 过夜溶解。50 g 蔗糖加入 50 mL 蒸馏水中溶解后,移入已溶解的溴酚蓝溶液中,定容至 100 mL。

A. 13 0.5%苯酚生理盐水**A. 13.1 成分**

苯酚	5 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 13.2 制法

将苯酚 50℃~70℃水浴溶解后,称取 5 g,溶解于 500 mL~800 mL 的 38℃~45℃水中,另取 8.5 g 氯化钠溶解于少量蒸馏水并加入苯酚溶液中,定容至 1 000 mL。

附 录 B
(资料性附录)
炭疽芽孢杆菌 PCR 鉴定引物

炭疽芽孢杆菌 PCR 鉴定所使用的引物见表 B. 1。

表 B. 1 炭疽芽孢杆菌 PCR 鉴定引物

靶基因	定位	引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度 bp	使用浓度 mmol/L
保护性抗原基因 (<i>pag</i>)	质粒 pXO1	PAF	TCCTAACACTAACGAAGTCG	597	1
		PAR	GAGGTAGAAGGATATACGGT		
荚膜基因 (<i>cap</i>)	质粒 pXO2	CAF	CTGAGCCATTAATCGATATG	847	0.2
		CAR	TCCCACTTACGTAATCTGAG		
S-层蛋白基因 (<i>sap</i>)	染色体	SAF	CGCGTTTCTATGGCATCTCTTCT	639	0.2
		SAR	TTCTGCAGCTGGCGTTACAAAT		