ICS 67.120.10
CCS X 22

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4148—2022

动物源弯曲杆菌分离与鉴定技术规程

Technical code of practice for isolation and identification of *Campylobacter* from animals

正版纸质文本对照
参考件

2022-07-11 发布　　2022-10-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

NY/T 4148—2022

NY/T 4148—2022

中国农业出版社出版
购买正版纸质文本请联系
中国农业出版社标准质量分社
冀编辑，电话 010－59194426

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：中国动物卫生与流行病学中心、中国兽医药品监察所。

本文件主要起草人：王娟、张纯萍、曲志娜、赵琪、刘俊辉、黄秀梅、宋立、李雪莲、张青青、李月华、刘娜、王琳、崔明全、王君玮、王鹤佳、徐士新。

动物源弯曲杆菌分离与鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了动物源弯曲杆菌(*Campylobacter*)的分离与鉴定方法。

本文件适用于动物直肠/泄殖腔拭子、新鲜粪便、肠道内容物等样品中空肠弯曲杆菌、结肠弯曲杆菌的分离和鉴定。

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

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 配制或用商品化产品。

4.2 试剂

4.2.1 四甲基对苯二胺盐酸盐。

4.2.2 30%过氧化氢。

4.2.3 聚合酶链式反应预混液(2×PCR Master Mix)。

4.2.4 琼脂糖。

4.2.5 50×TAE 缓冲液。

4.2.6 α-氰-4-羟基肉硅酸(HCCA):色谱纯。

4.3 溶液配制

4.3.1 氧化酶溶液:取四甲基对苯二胺盐酸盐 1.0 g,加水适量使溶解,并稀释至 100 mL。

4.3.2 3%过氧化氢溶液:取 30%过氧化氢 100 mL、水 900 mL,混匀。

4.3.3 马尿酸钠水解试剂:按照附录 A 中 A.1 的规定执行。

4.3.4 1×TAE 缓冲液:取 50×TAE 缓冲液 20 mL,加水定容至 1 000 mL。

4.3.5 1.2%琼脂糖凝胶:取琼脂糖 1.2 g 于 100 mL 1×TAE 缓冲液中加热,充分溶解。

4.3.6 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。

4.4 培养基制备

4.4.1 Cary-Blair 氏运送培养基:按照 A.2 的规定执行。

4.4.2 Bolton 肉汤:按照 A.3 的规定执行。

4.4.3 改良 CCD 琼脂:按照 A.4 的规定执行。

4.4.4 Skirrow 血琼脂:按照 A.5 的规定执行。

4.4.5 弯曲杆菌显色培养基：按说明书配制。

4.4.6 哥伦比亚血琼脂：按照 A.6 的规定执行。

4.4.7 布氏肉汤：按照 A.7 的规定执行。

4.4.8 5%蔗糖脱脂乳保护剂：按照 A.8 的规定执行。

4.5 标准菌株

空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*，ATCC 33560)、结肠弯曲杆菌(*Campylobacter coli*，ATCC 43478)。

4.6 材料

4.6.1 吲哚乙酸酯纸片。

4.6.2 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。

4.6.3 磁珠保藏管。

5 器材设备

5.1 二级生物安全柜。

5.2 恒温培养箱。

5.3 冰箱：2 ℃～5 ℃，－20 ℃或以下。

5.4 恒温振荡培养箱。

5.5 分析天平：感量 0.01 g。

5.6 高压灭菌器。

5.7 振荡器。

5.9 微需氧培养装置：提供微需氧条件(5%氧气、10%二氧化碳和 85%氮气)。

5.10 显微镜：10×～100×。

5.11 高速冷冻离心机。

5.12 麦氏比浊仪。

5.13 微生物生化鉴定系统。

5.14 PCR 仪。

5.15 核酸电泳仪。

5.16 电泳凝胶成像分析系统。

5.17 微生物质谱仪(MALDI-TOF MS)。

5.18 涡旋混合器。

5.19 冷冻干燥机。

6 样品采集与保存运输

取灭菌棉签，插入直肠 3 cm～4 cm(泄殖腔 1.5 cm～2 cm)，旋转数次，取出，置于 Cary-Blair 氏运送培养基中；采集肠道内容物或粪便，置于无菌塑封袋或其他密闭容器中。0 ℃～4 ℃保存运输，不宜超过 24 h。

7 分离鉴定程序

弯曲杆菌分离与鉴定流程见图 1。

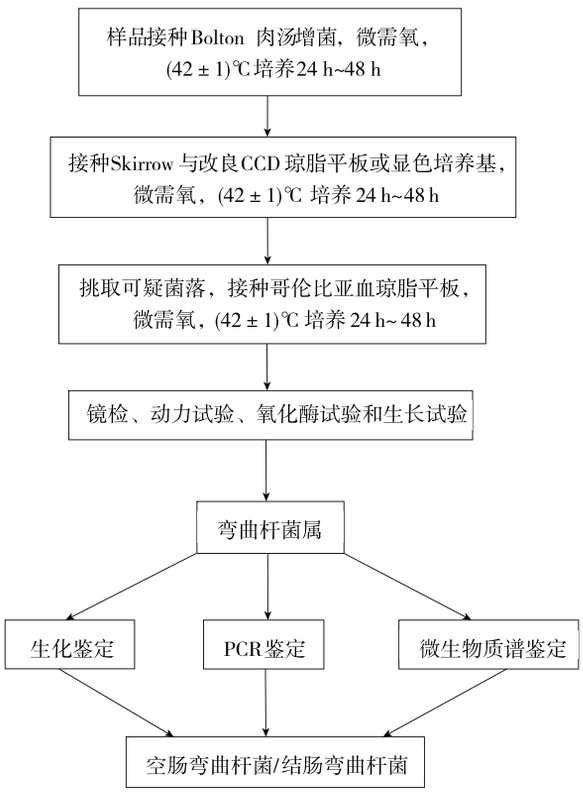


图 1　弯曲杆菌分离与鉴定流程

8　增菌

8.1　动物直肠/泄殖腔拭子

取单个动物直肠/泄殖腔拭子，置于 2 mL～3 mL Bolton 肉汤中，在微需氧条件下(42±1)℃培养 24 h～48 h。

8.2　肠道内容物/粪便

取 5 g 样品，置于 45 mL Bolton 肉汤中(1∶10 稀释)，混匀，在微需氧条件下(42±1)℃培养 24 h～48 h。

9　分离纯化

9.1　分离

取增菌液，划线接种 Skirrow 血琼脂、改良 CCD 琼脂平板或弯曲杆菌显色培养基。在微需氧条件下，(42±1)℃培养 24 h～48 h。

9.2　纯化

取出平板，观察菌落形态。Skirrow 血琼脂平板上可疑菌落为灰色、扁平、湿润有光泽、呈沿接种线向外扩散生长的倾向；或呈分散凸起的单个菌落，边缘整齐、发亮。改良 CCD 琼脂平板上的可疑菌落为淡灰色，有金属光泽、潮湿、扁平，呈扩散生长的倾向。弯曲杆菌显色培养基上的菌落形态参见商品说明书。挑取可疑菌落，接种哥伦比亚血平板，在微需氧条件下，(42±1)℃培养 24 h～48 h。

10　筛查与鉴定

10.1　菌属鉴定

10.1.1　形态观察

取纯化菌，革兰氏染色，镜检。弯曲杆菌为革兰氏阴性，呈弯曲小逗点状或 S 形、螺旋状、海鸥展翅状。

10.1.2 动力观察

取纯化菌，悬浮于 1 mL 布氏肉汤中，用显微镜观察，弯曲杆菌呈螺旋状运动。

10.1.3 氧化酶试验

挑取纯化菌落，置于氧化酶试剂润湿的滤纸上，10 s 内弯曲杆菌出现紫红色、紫罗兰色或深蓝色。

10.1.4 生长试验

取纯化菌，接种哥伦比亚血平板，分别置于微需氧条件下(25±1)℃和有氧条件(42±1)℃培养(44±4)h，弯曲杆菌均不生长。

10.2 空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌的鉴定

10.2.1 通用要求

生化鉴定、PCR 鉴定、质谱鉴定 3 种方法任选其一。

10.2.2 生化鉴定

10.2.2.1 过氧化氢酶试验

取 3%过氧化氢溶液 1 滴～2 滴至玻片上，挑取菌落与之混合，30 s 内出现气泡则判定为阳性。

10.2.2.2 马尿酸钠水解试验

挑取菌落，加 1%马尿酸钠溶液 0.4 mL，混匀，制成菌悬液，置于(36±1)℃水浴中孵育 2 h 或培养箱孵育 4 h。沿试管壁缓缓加入茚三酮溶液 0.2 mL，避免振荡，置于(36±1)℃孵育 10 min。菌液呈深紫色为阳性，淡紫色或无颜色变化为阴性。

10.2.2.3 吲哚乙酸酯水解试验

挑取菌落至吲哚乙酸酯纸片，滴加灭菌水 1 滴，观察结果。5 min～10 min 内呈深蓝色为阳性，无颜色变化为阴性。

注：上述 3 项生化实验也可使用商品化试剂盒或鉴定卡。

10.2.2.4 结果判定

空肠弯曲杆菌与结肠弯曲杆菌的判定按表 1 进行。

表 1 空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌的生化特征

特征	空肠弯曲杆菌	结肠弯曲杆菌
过氧化氢酶试验	＋	＋
马尿酸盐水解试验	＋	－
吲哚乙酸酯水解试验	＋	＋
注：“＋”表示阳性；“－”表示阴性。		

10.2.3 PCR 鉴定

10.2.3.1 PCR 模板的制备

取新鲜菌落，重悬于 0.5 mL 灭菌水，煮沸 10 min，冷却，12 000 r/min 离心 2 min，取上清液，备用。以空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌标准菌株为阳性对照，以水为阴性对照。

10.2.3.2 PCR 引物

空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌的 PCR 引物序列及扩增片段长度见表 2。

表 2 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的 PCR 引物序列及扩增片段长度

细菌	引物序列	扩增片段长度，bp
空肠弯曲杆菌	上游：5′-CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT-3′ 下游：5′-AAG ATA TGG CAC TAG CAA GAC-3′	773
结肠弯曲杆菌	上游：5′-AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC-3′ 下游：5′-TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC-3′	364

10.2.3.3 PCR 反应体系

PCR 反应体系(25 μL)见表 3。

表 3 PCR 反应体系

试剂	体积,μL
2×PCR Master Mix	12.5
上游引物(10 nmol/L)	0.5
下游引物(10 nmol/L)	0.5
水	10.5
模板	1.0

10.2.3.4 PCR 反应条件

94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 1 min,60 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,72 ℃延伸 10 min。

10.2.3.5 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。

10.2.3.6 结果判定

电泳结果按照表 2 的扩增片段长度判定,必要时测序鉴定。PCR 产物电泳图见附录 B 中的图 B.1,片段测序结果见 B.2 和 B.3。

10.2.4 质谱鉴定

10.2.4.1 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(涂布厚度为薄薄一层),室温干燥。吸取 1 μL 基质溶液,滴于样品上,混匀,室温干燥。将空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌标准菌株的新鲜菌落同法操作。

10.2.4.2 仪器校准

检测样品前,应对微生物质谱仪进行校准。

10.2.4.3 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,进行谱图数据采集。

10.2.4.4 结果判定

微生物质谱仪自动完成谱的图比对和鉴定。以不同颜色、不同分值显示结果,菌株鉴定位点显示绿色,鉴定分值达到种水平可信即可。空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌标准菌株的质谱鉴定谱图见附录 C 中的图 C.1、图 C.2。

11 菌株保存

取新鲜纯化菌,置于磁珠保藏管,−70 ℃或以下保藏;或加入 5%蔗糖脱脂乳保护剂,冻干,−20 ℃或以下保藏。

12 生物安全措施

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 的要求。

附 录 A
（规范性）
培养基与试液

A.1 马尿酸钠水解试剂

A.1.1 马尿酸钠溶液

A.1.1.1 成分

马尿酸钠	10.0 g
磷酸盐缓冲液(PBS)组分：	
氯化钠	8.5 g
磷酸氢二钠	9.0 g
磷酸二氢钠	2.7 g
水	1 000 mL

A.1.1.2 制法

将马尿酸钠溶于磷酸盐缓冲溶液中，过滤除菌。无菌分装，每管 0.4 mL。−20 ℃或以下保存。

A.1.2 茚三酮溶液

A.1.2.1 成分

水合茚三酮	1.8 g
丙酮	25 mL
丁醇	25 mL

A.1.2.2 制备

将水合茚三酮溶解于丙酮/丁醇混合液中。该溶液在避光冷藏时不超过 7 d。

A.2 Cary-Blair 氏运送培养基

A.2.1 成分

硫乙醇酸钠	1.5 g
磷酸氢二钠	1.1 g
氯化钠	5 g
琼脂	5 g
氯化钙	0.09 g
水	1 000 mL

A.2.2 制法

将 A.2.1 中各成分溶于水中，混匀，调节 pH 至 8.4±0.2。121 ℃灭菌 15 min，分装备用。

A.3 Bolton 肉汤

A.3.1 基础培养基

A.3.1.1 成分

动物组织酶解物	10.0 g
乳白蛋白水解物	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g

氯化钠	5.0 g
丙酮酸钠	0.5 g
偏亚硫酸氢钠	0.5 g
碳酸钠	0.6 g
α-酮戊二酸	1.0 g
水	1 000 mL

A.3.1.2 制法

将 A.3.1.1 中各成分溶于水中，121 ℃灭菌 15 min，备用。

A.3.2 无菌裂解脱纤维绵羊或马血

取无菌脱纤维绵羊或马血，反复冻融，或使用皂角苷进行裂解。

A.3.3 抗生素溶液

A.3.3.1 成分

头孢哌酮(cefoperazone)	0.02 g
万古霉素(vancomycin)	0.02 g
三甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim)	0.02 g
放线菌酮(cycloheximide)	0.02 g
乙醇/灭菌水(50/50，体积分数)	5.0 mL

A.3.3.2 制法

将 A.3.3.1 中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.3.4 完全培养基

A.3.4.1 成分

基础培养基	1 000 mL
无菌裂解脱纤维绵羊或马血	50 mL
抗生素溶液	5 mL

A.3.4.2 制法

基础培养基冷却至约 45 ℃，加入无菌裂解脱纤维绵羊或马血、抗生素溶液，混匀，调节 pH 至 7.4±0.2。常温下放置不宜超过 4 h，4 ℃左右避光保存不宜超过 7 d。

A.4 改良 CCD 琼脂

A.4.1 基础培养基

A.4.1.1 成分

牛肉浸膏	10.0 g
动物组织酶解物	10.0 g
氯化钠	5.0 g
细菌炭	4.0 g
水解酪蛋白	3.0 g
脱氧胆酸钠	1.0 g
硫酸亚铁	0.25 g
丙酮酸钠	0.25 g
琼脂粉	15.0 g
酵母膏	2.0 g
水	1 000 mL

A.4.1.2 制法

将 A.4.1.1 中各成分溶于水中，调 pH 至 7.4±0.2，121 ℃灭菌 15 min，备用。

A.4.2 抗生素溶液

A.4.2.1 成分

头孢哌酮(cefoperazone)	0.03 g
两性霉素 B(amphotericin B)	0.01 g
乙醇/灭菌水(50/50,体积分数)	5.0 mL

A.4.2.2 制法

将 A.4.2.1 中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.4.3 完全培养基

A.4.3.1 成分

基础培养基	1 000 mL
抗生物溶液	5 mL

A.4.3.2 制法

基础培养基冷却至 45 ℃,加入抗生素溶液混匀,调 pH 至 7.4±0.2。倾注无菌平皿中,静置至培养基凝固。使用前需预先干燥平板。制备的平板未干燥时在室温放置不宜超过 4 h,或在 4 ℃左右冷藏不宜超过 7 d。

A.5 Skirrow 血琼脂

A.5.1 基础培养基

A.5.1.1 成分

蛋白胨	15.0 g
胰蛋白胨	2.5 g
酵母浸膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A.5.1.2 制法

将 A.5.1.1 中各成分溶于蒸馏水中,121 ℃灭菌 15 min,备用。

A.5.2 FBP 溶液

A.5.2.1 成分

丙酮酸钠	0.25 g
焦亚硫酸钠	0.25 g
硫酸亚铁	0.25 g
水	100 mL

A.5.2.2 制法

将 A.5.2.1 中各成分溶于水中,经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。现用现配,−70 ℃储存不超过 3 个月或−20 ℃储存不超过 1 个月。

A.5.3 抗生素溶液

A.5.3.1 成分

万古霉素(vancomycin)	0.01 g
三甲氧苄胺嘧啶(trimethoprim)	0.005 g
多黏菌素 B(polymyxin B)	2 500 IU
乙醇/灭菌水(50/50,体积分数)	5.0 mL

A.5.3.2 制法

将 A.5.3.1 中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A.5.4 无菌脱纤维绵羊血

在无菌操作条件下，将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中，振摇约 10 min，静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

A.5.5 完全培养基

A.5.5.1 成分

基础培养基	1 000 mL
FBP 溶液	5 mL
抗生素溶液	5 mL
无菌脱纤维绵羊血	50 mL

A.5.5.2 制法

当基础培养基的温度为 45 ℃时，无菌加入 FBP 溶液、抗生素溶液与冻融的无菌脱纤维绵羊血，混匀。调 pH 至 7.4±0.2。倾注于无菌平皿中，静置至培养基凝固。

A.6 哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar)

A.6.1 基础培养基

A.6.1.1 成分

动物组织酶解物	23.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A.6.1.2 制法

将 A.6.1.1 成分溶于水中，121 ℃灭菌 15 min，备用。

A.6.2 无菌脱纤维绵羊血

在无菌操作条件下，将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中，振摇约 10 min，静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

A.6.3 完全培养基

A.6.3.1 成分

基础培养基	1 000.0 mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0 mL

A.6.3.2 制法

当基础培养基的温度为 45 ℃时，无菌加入绵羊血，混匀，调 pH 至 7.3±0.2。倾注于无菌平皿中，静置至培养基凝固。

A.7 布氏肉汤

A.7.1 成分

酪蛋白酶解物	10.0 g
动物组织酶解物	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
酵母浸膏	2.0 g
氯化钠	5.0 g
亚硫酸氢钠	0.1 g
水	1 000 mL

A.7.2 制法

将 A.7.1 中各成分溶于水中，调 pH 至 7.0±0.2，121 ℃灭菌 15 min，备用。

A.8 5%蔗糖脱脂乳保护剂

A.8.1 成分

脱脂乳	10.0 g
蔗糖	5.0 g
水	100 mL

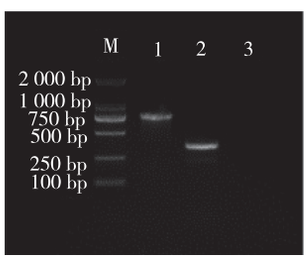
A.8.2 制法

将 A.8.1 中各成分混合，112 ℃高压灭菌 20 min，备用。

附 录 B
（资料性）
空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌 PCR 产物大小和测序结果对照

B.1 空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌 PCR 产物大小

见图 B.1。



标引序号说明：
M——Marker；
1——阳性对照（空肠弯曲杆菌标准菌株）；
2——阳性对照（结肠弯曲杆菌标准菌株）；
3——阴性对照（水）。

图 B.1 空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌 PCR 产物电泳图

B.2 空肠弯曲杆菌目标片段测序结果

CATCTTCCCTAGTCAAGCCTCTGTGCCTTCACCTGTGCTTGATTTTGTTGAAGTTGTGGT
TATAACTTTAGCATTAAGACTTAGGCTTAAAAATAAGCCTAAAAAAAGAATTTTAATTATT
TTCATCTTTTACCTTTAAAAATCATCCATGCTATTTACAACATTAGAGCTTCTTTGTATGCT
AGAAGATTTTTTAGCTTCATTTTTTGTTGCATTTGACTTTGAATTTAAAGCCTCATTTGTGT
TAGCTAAATTTTCATAAGAATAAAATCTCACAGCTCCTACATGTTCAATACCATTTTCACTT
GTATAGCTCCATTTTTTAAGAGTACGAATACCACGAATTTTACCGCTTGCGCTTGCTTTTAT
TTTACTATTTACTTTGTCAATAATATTTGTTATGTTTTGAGTTTGTTCTTGAGTGGAACTA
TCATTAACATTAATACTTTGTTTGATGATTTCCTCGTAAGTATCACCAGTTGTTCTTTCATC
TTTAAGACTTAAATTTGTATTAATAAACTCTATAATAGCAGCATCAGCCATAGTAAGTGCT
GTTTCTTTGGCTCTATCTTCTAAAATATTTGTTTTTTTAGCATTGCTAGGATCTGCTACATA
ACCCCAGTTTCCATAACTTAAAATAATAGGTGCACCATTTTCATCATAAACTAAGCGAATTC
CATATTCATTTAAAAAGCCTTTTGTATCTTTTGGCAGATACTCACTTATTGCCTTGCCTTTA
CCCTTAATAGCACTCTGTCTGAGGGGGGCCAAAATTTTTTAAAGATATGGCACTAGCAAGAC

B.3 结肠弯曲杆菌目标片段测序结果

AGGCAAGGGAGCCTTTAATCTTTAGGCAAGGGGAGCCTTTAATCCTAACAAGGTCAATG
AAATTTTAAAAGCAAAGTTGGGCTGATGAGCAAAATTGCAATCATCGGCGCAGGAAAATGG
GGCAGTGCTTTATACAGTGCTTTAAGTATTAATAATACTTGTTTTATGACTTCTCGCACACA
GCGAGATTTGCCTTATTTTGTGAGTTTAGAGCAGGCTTTGAATTGTGAATATTTGGTTTTT
GCTTTAAGCTCTCAAGGAATGTATTCTTGGCTTAAACAAAATTTTGTTAACAAGGGTCAAA
AAATTCTTATCGCTTCTAAGGGTATAGATACTTCAACTTGTAAGTTTTTAGATGAAATTTT
TAGCGAATTTGGGAATAGGGATAATATCCCTATCTACAAATTCGC

附 录 C
（资料性）
微生物质谱仪鉴定谱图

C.1 空肠弯曲杆菌标准菌株质谱鉴定谱图

见图 C.1。

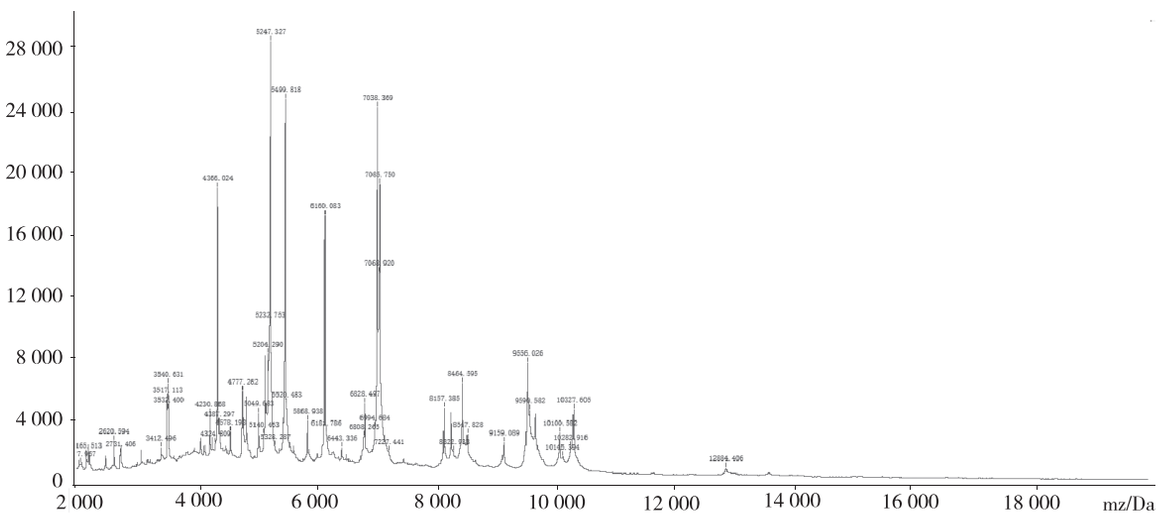


图 C.1 空肠弯曲杆菌标准菌株质谱鉴定谱图

C.2 结肠弯曲杆菌标准菌株质谱鉴定谱图

见图 C.2。

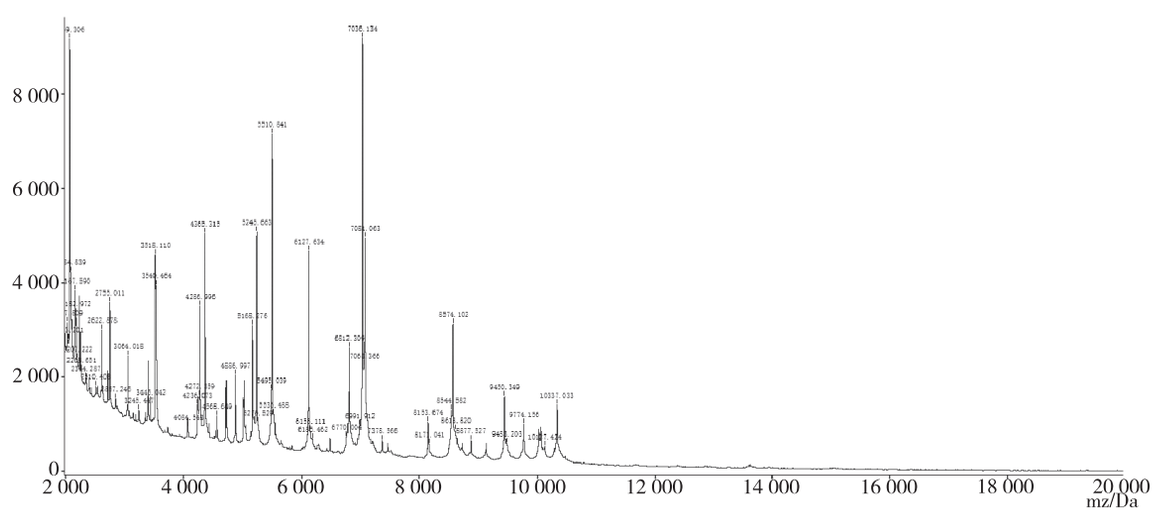


图 C.2 结肠弯曲杆菌标准菌株质谱鉴定谱图