



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—201X
代替 GB/T 18653-2002

胎儿弯曲杆菌的分离鉴定方法

Method for the isolation and identification of *Campylobacter fetus*

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

(注：征求意见时必须保留这句话)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照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。

本文件代替GB/T 18653-2002《胎儿弯曲杆菌的分离鉴定方法》，与GB/T 18653-2002相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了PCR鉴定方法；
- 增加了实时荧光PCR鉴定方法；
- 增加了质谱鉴定方法；
- 修改了范围；
- 修改了设备和材料、培养基和试剂；
- 修改了检验程序和操作步骤；
- 修改了附录A；
- 增加了附录B、附录C和附录D。

本标准参考了WOAH《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2021)第3.4.4章内容。

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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC181）归口。

本文件起草单位：南京农业大学、上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、中国动物卫生与流行病学中心。

本文件主要起草人：薛峰、申进玲、李超、曲志娜、朱琳、曹钰莹、戴建君、汤芳、任建鸾、王娟、王琳。

本文件的历次版本发布情况为：

- 2002年首次发布为GB/T 18653-2002；
- 本次为第一次修订。

胎儿弯曲杆菌的分离鉴定方法

1 范围

本文件规定了胎儿弯曲杆菌 (*Campylobacter fetus*) 的分离鉴定方法。

本文件适用于公牛包皮垢及精液、母牛阴道粘液、流产胎盘及胎儿的肝、肺和胃内容物等样品中胎儿弯曲杆菌的分离与鉴定，其他动物也可参照使用。

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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction）

实时荧光 PCR：实时荧光聚合酶链式反应（Real-time polymerase chain reaction）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

rRNA：核糖体核糖核酸（Ribosomal ribonucleic acid）

Ct 值：循环阈值（Cycle Threshold value）

5 器材设备

5.1 荧光定量 PCR 仪。

5.2 PCR 仪。

5.3 电泳设备。

5.4 高速冷冻离心机（可控温至 4 °C、离心速度可达 12 000g 以上）。

5.5 高压灭菌器。

5.6 天平（感量 0.01 g，感量 0.0001g）。

- 5.7 冰箱 (2 °C~8 °C、-20 °C或以下)。
- 5.8 涡旋混合器。
- 5.9 微量移液器 (0.2 μL~2 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL, 并配备与移液器匹配的吸头)。
- 5.10 二级生物安全柜。
- 5.11 微需氧培养装置 (提供微需氧条件: 5%氧气、10%二氧化碳、85%氮气)。
- 5.12 显微镜 (10×~100×)
- 5.13 微生物生化鉴定系统。
- 5.14 分光光度计或核酸蛋白测定仪。
- 5.15 麦氏比浊仪
- 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 水浴装置: 36 °C±1 °C、100 °C。
- 5.19 恒温培养箱。

6 试剂和材料

6.1 要求

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,分子生物学试验用水符合 GB/T 6682 规定的一级水,其它试验用水符合 GB/T 6682 规定的二级水。培养基按附录 A 配制或用商品化产品。

6.2 培养基和试剂

- 6.2.1 增菌运输培养基 (transport enrichment medium, TEM): 按照附录 A 的 A.1 执行。
- 6.2.2 Skirrow 血琼脂: 按照附录 A 中 A.2 的规定执行。
- 6.2.3 哥伦比亚血琼脂: 按照附录 A 中 A.3 的规定执行。
- 6.2.4 布氏肉汤: 按照附录 A 中 A.4 的规定执行。
- 6.2.5 氧化酶溶液: 按照附录 A 中 A.5 的规定执行。
- 6.2.6 3%过氧化氢溶液: 按照附录 A 中 A.6 的规定执行。
- 6.2.7 巯基乙酸盐肉汤: 按照附录 A 中 A.7 的规定执行。
- 6.2.8 马尿酸钠水解试剂: 按照附录 A 中 A.8 的规定执行。
- 6.2.9 5%来苏尔。
- 6.2.10 无菌 PBS。
- 6.2.11 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。
- 6.2.12 琼脂糖。
- 6.2.13 50×TAE 电泳缓冲液。
- 6.2.14 实时荧光 PCR 预混液。
- 6.2.15 α-氰-4-羟基肉硅酸 (HCCA): 色谱纯。

6.2.16 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。

6.3 标准菌株

胎儿弯曲杆菌胎儿亚种 ATCC27374 或胎儿弯曲菌性病亚种 ATCC19438。

6.4 材料

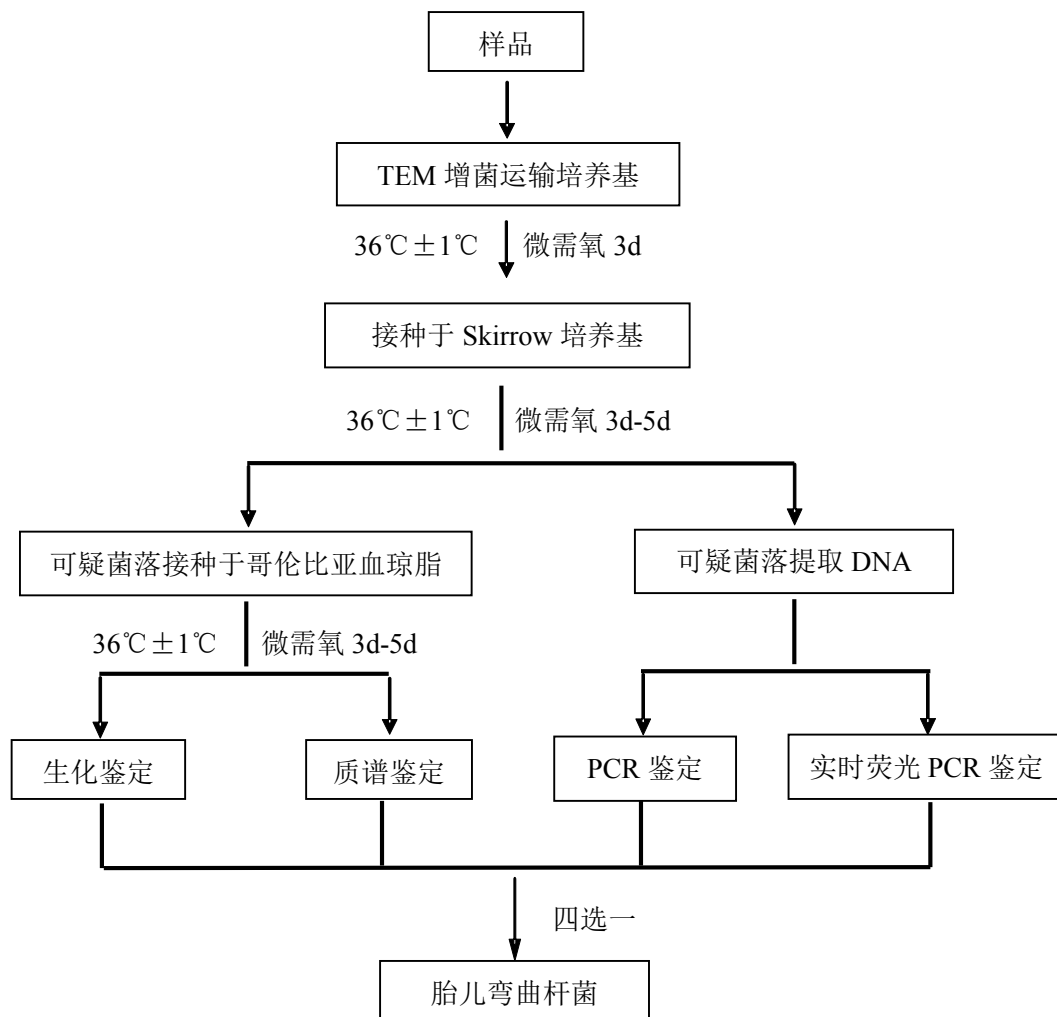
6.4.1 细菌 DNA 提取试剂盒（商品化）。

6.4.2 人工授精（AI）吸管或卡苏吸管。

6.4.3 2 mL 灭菌注射器，5 号针头，20 号针头。

6.4.4 无菌离心管。

7 检验程序



8 操作步骤

8.1 样品采集

8.1.1 动物包皮垢

8.1.1.1 抽吸法

将动物用六柱栏保定，用绳子固定采样侧的后肢，剪短阴筒外部的阴毛，用 5% 的来苏儿消毒尿道口，将人工授精吸管或卡苏吸管插入阴筒内，轻轻地来回抽动吸管，吸取包皮液。取出吸管，插入盛有 3 mL 灭菌生理盐水的适宜离心管中吹吸数次，再将吸管放入消毒液中进行消毒处理。

8.1.1.2 冲洗法

将动物用六柱栏保定，用绳子固定采样侧的后肢，剪短阴筒外部的阴毛，用 5% 的来苏儿消毒尿道口，将无菌注射器连接无菌人工授精 (AI) 管，将 20 mL~30 mL 无菌 PBS 注入包皮囊，用力按摩 15 s~20 s，收集液体置于适宜离心管中。

8.1.2 动物精液

将动物用六柱栏保定，用绳子固定采样侧的后肢，剪短阴筒外部的阴毛，用 5% 的来苏儿消毒尿道口，用假阴道挤压阴茎或人工刺激的方法采集动物精液。精液样品必须用无菌 PBS 稀释。

8.1.3 动物阴道粘液

8.1.3.1 抽吸法

将动物用六柱栏保定，用 5% 来苏儿消毒牛的外阴部，将 AI 吸管或卡苏吸管插入阴道腔，直至吸管前端触及子宫颈，轻轻地前后移动吸管，吸取阴道粘液。取出吸管，插入盛有 3 mL 灭菌生理盐水的离心管中吹吸数次，再将吸管放入消毒液中进行消毒处理。

8.1.3.2 冲洗法

将动物用六柱栏保定，用 5% 来苏儿消毒牛的外阴部，将无菌注射器连接无菌 AI 管，将 20 mL~30 mL 无菌 PBS 注入阴道腔，反复抽出和注入液体 4~5 次，收集液体置于适宜离心管中。

8.1.4 流产胎儿与胎盘

无菌采集流产胎儿的肝、肺和胃内容物及胎盘，置于无菌塑封袋或其它密闭容器中。

8.2 样品保存运输

低温 (4°C~8°C 保存，避免直接接触冰块) 微需氧环境下保存样品，尽快送至实验室检测。若样品不能在采样当天送达实验室，可将样品液静置 1 min~2 min，用灭菌注射器吸取上清液 1 mL，注入增菌运送培养基 (TEM) 中送检。

8.3 分离纯化

8.3.1 分离

8.3.1.1 生殖道样品

对于采用抽吸法采集的样品，用无菌枪头吸取 300 μ L，接种到于 Skirrow 血平板上，在微需氧条件下 36°C \pm 1°C 培养 3d~5d。

对于采用冲洗法采集的样品，将样品 3500 g 离心去除上清，加入 500 μL 无菌 PBS 重悬，接种到 Skirrow 血平板上，在微需氧条件下 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 3d~5d。

8.3.1.2 流产胎儿及胎盘样品

用接种环无菌蘸取胎儿的胃内容物，直接接种于 Skirrow 平板上；胎儿的肝脏和肺脏需先用火焰做表面灭菌，再接种于 Skirrow 平板上；胚胎膜用无菌 PBS 冲洗，去除表面大部分污染物，刮取绒毛并接种于 Skirrow 平板上。在微需氧条件下 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 3d~5d。

注：对于不能在采样当天送达实验室的样品，先将已接种样品的增菌运送培养基微需氧条件下 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 3d，再吸取 200 μL 增菌液于 Skirrow 血平板上，用接种环均匀划线，在微需氧条件下 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 3d~5d。

8.3.2 纯化

取出平板，观察菌落形态。胎儿弯曲杆菌在 Skirrow 平板上的菌落特征为：灰粉色、圆形，中间凸起，表面光滑而有光泽，边缘规则，直径为 1~3 mm。如无可疑菌落，可报告胎儿弯曲杆菌为阴性。如有，将可疑菌落划线于哥伦比亚血平板上，在微需氧条件下 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 3d~5d。挑取可疑菌落的纯培养物（不少于 3 个）进行后续鉴定。

8.4 生化鉴定

8.4.1 形态观察

挑取纯化菌落，革兰氏染色、镜检。胎儿弯曲杆菌为革兰氏染色阴性，呈螺旋状或“S”状，一些老龄培养物可出现球状或球杆状，不形成芽胞和荚膜，在菌体的一端或两端有鞭毛。

8.4.2 动力观察

挑取纯化菌落，悬浮于 1 mL 布氏肉汤中，用相差显微镜观察，胎儿弯曲杆菌呈螺旋状运动。

8.4.3 氧化酶试验

用铂/铍接种环或玻璃棒挑取纯化菌落至氧化酶试剂润湿的滤纸上，如果在 10 s 内出现紫红色、紫罗兰或深蓝色为阳性。

8.4.4 过氧化氢酶试验

挑取纯化菌落，加到干净玻片上的 3% 过氧化氢溶液中，如果在 30 s 内出现气泡则判定结果为阳性。

8.4.5 硫化氢 (H_2S) 试验

纯化菌落接种于巯基乙酸肉汤中，试管口悬吊一条长 \times 宽为 20 mm \times 6 mm 的乙酸铅滤纸， $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 微需氧环境中培养，观察 72 h，如见滤纸变黑即为产生 H_2S ，即为硫化氢试验阳性。

8.4.6 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 42 $^{\circ}\text{C}$ 生长试验

挑取纯化菌落，接种到哥伦比亚血琼脂平板上，微需氧条件下 25 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 和 42 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d，观察细菌生长情况。

8.4.7 甘氨酸、氯化钠试验

纯化菌落分别接种于含 1%甘氨酸、3.5%氯化钠的巯基乙酸肉汤中，36℃±1℃微需氧环境培养 3 d，培养基近表面有云雾状生长为阳性。

8.4.8 马尿酸钠水解试验

纯化菌落接种于 0.4 mL 1%马尿酸钠液中制成浓厚菌悬液，36℃±1℃水浴 2 h，再加入 0.2 mL 茚三酮试剂，混匀后水浴 20 min 观察结果，变深紫色为阳性，淡紫色或不变色为阴性。

注：上述生化实验也可使用商品化生化鉴定试剂盒、生化鉴定卡、微生物生化鉴定系统进行。

8.4.9 结果判定

胎儿弯曲杆菌的判定按表 1 进行。符合胎儿弯曲杆菌生化特性的菌，判定为生化鉴定结果阳性，该菌株是胎儿弯曲杆菌。不符合胎儿弯曲杆菌生化特性的菌，判定为生化鉴定结果阴性，该菌株不是胎儿弯曲杆菌。

表 1 胎儿弯曲杆菌生化反应

菌名	氧化酶试验	过氧化氢酶试验	硫化氢试验	生长试验				马尿酸钠水解试验
				25℃	42℃	1%甘氨酸	3.5%氯化钠	
胎儿弯曲杆菌胎儿亚种 <i>C. fetus subsp. fetus</i>	+	+	+	V	V ^b	+	-	-
胎儿弯曲杆菌性病亚种 <i>C. fetus subsp. venerealis</i>	+	V	-	V	V ^b	-	-	-
空肠弯曲杆菌 <i>C. jejuni</i>	+	V ^a	+	-	V ^c	V	-	+
豚肠弯曲杆菌 <i>C. hyointestinalis</i>	+	+	n.d.	-	+	V	-	n.d.
唾液弯曲杆菌 <i>C. sputorum</i>	+	V	n.d.	-	+	+	+	n.d.

注：“+”——阳性反应；
“-”——阴性反应；
“V”反应不定；
“n.d.”未确定；
(a) 空肠弯曲杆菌空肠亚种阳性，空肠弯曲杆菌德莱亚种不确定；
(b) 虽然胎儿弯曲杆菌不属于嗜热弯曲菌，相当多的菌株可在 42℃ 生长；
(c) 空肠弯曲杆菌空肠亚种阳性，空肠弯曲杆菌德莱亚种阴性。

8.5 PCR 鉴定

8.5.1 DNA 模板的制备

从哥伦比亚血琼脂上挑取4~5个胎儿弯曲杆菌疑似单菌落于500 μL 无菌水中混匀，放置于干式恒温金属浴中 10 min，冷却后，12 000g离心2 min，上清液即为DNA模板。获得的DNA模板立即使用或放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

也可使用等效的商品化细菌DNA提取试剂盒并按其说明书制备DNA模板。

8.5.2 PCR 扩增

8.5.2.1 引物

胎儿弯曲杆菌引物信息见表2。

表2 胎儿弯曲杆菌 PCR 检测用引物探针信息

组分名称	序列	目的基因	片段长度
MG3F	GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT	<i>cstA</i>	764 bp
MG4R	TAGCTACAATAACGACAAC		

8.5.2.2 对照设置

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。使用胎儿弯曲杆菌胎儿亚种标准菌株 ATCC27374 或胎儿弯曲菌性病亚种标准菌株 ATCC19438 为阳性对照，使用除胎儿弯曲杆菌之外的其他弯曲杆菌标准菌株为阴性对照，以无菌双蒸水为空白对照。每个样品设3次重复。

8.5.2.3 PCR 反应体系

胎儿弯曲杆菌 PCR 检测，反应体系见表3。

表3 胎儿弯曲杆菌 PCR 反应体系

组分名称	体积 (μL)
PCR 预混液 (2 \times)	12.5
上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
DNA 模板 (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	2.0
无菌双蒸水	8.5
总量	25.0

8.5.2.4 PCR 反应程序

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，30 个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

8.5.3 电泳

取 PCR 扩增产物，于 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳，凝胶成像分析。

8.5.4 结果判定

质控系统：阳性对照出现预期大小（764 bp）的扩增条带，阴性对照和空白对照均未出现扩增条带，则检测系统正常。以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

阳性结果：在质控系统正常的情况下，待测样品出现预期大小（764 bp）的扩增条带，且经测序验证为目标条带，判定PCR结果为阳性，该菌株是胎儿弯曲杆菌。

阴性结果：

在质控系统正常的情况下，待测样品出现预期大小（764 bp）的扩增条带，且经测序验证为非目标条带，判定PCR结果为阴性，该菌株不是胎儿弯曲杆菌。

在质控系统正常的情况下，待测样品未出现预期大小（764 bp）的扩增条带，判定PCR结果为阴性，该菌株不是胎儿弯曲杆菌。

PCR产物电泳图见附录B的B.1，片段测序结果见附录B的B.2。

8.6 实时荧光 PCR 鉴定

8.6.1 DNA 模板的制备

同8.5.1.

8.6.2 实时荧光 PCR 扩增

8.6.2.1 引物探针

胎儿弯曲杆菌的引物探针信息见表 4。

表 4 胎儿弯曲杆菌实时荧光 PCR 检测用引物探针信息

组分名称	序列	目的基因	片段长度
16SFw	5'-GCACCTGTCTCAACTTTC-3'	16S rRNA	78 bp
16SRv	5'-CCTTACCT GGGCTTGAT-3'		
16SPb	5'-VIC-ATCTCTAAGAGATTAGTTG-MGB/NFQ-3'		

8.6.2.2 对照设置

同 8.5.2.2。

8.6.2.3 实时荧光 PCR 反应体系

胎儿弯曲杆菌实时荧光 PCR 反应体系见表 5。

表 5 胎儿弯曲杆菌实时荧光 PCR 反应体系

组分名称	体积 (μL)
实时荧光 PCR 预混液 (2×)	10.0
上游引物 (10 μmol/L)	0.4
下游引物 (10 μmol/L)	0.4
探针 (10 μmol/L)	0.2
DNA 模板 (20 ng/μL)	4.0

无菌双蒸水	5.0
总量	20.0

8.6.2.4 实时荧光 PCR 反应程序

95℃预变性 5min, 95℃变性 10 s, 60℃退火 30 s, 40 个循环, 70℃终延伸 5 min (60 ℃时设置采集荧光信号; PCR 反应参数可根据荧光定量 PCR 试剂以及仪器进行适当调整)。

8.6.3 结果判定

质控系统: 读取每个样品Ct值。阳性对照有特异性S型扩增曲线而且Ct值 ≤ 30 , 阴性对照和空白对照无特异性S型扩增曲线, 说明质控合格。以上要求需在同一实验中同时满足, 否则, 本次实验无效, 需重新进行。

阳性结果:

a) 在质控系统正常的情况下, 待测样品有特异性S型扩增曲线, 且Ct值 ≤ 35 , 则判定为实时荧光PCR结果阳性, 该菌株是胎儿弯曲杆菌。

b) 在质控系统正常的情况下, 待测样品有特异性S型扩增曲线, 且 $35 < \text{Ct值} \leq 40$, 则需要重复取样检测, 建议用同一样品模板量加倍 (相应减少加入无菌双蒸水量), 如重复检测的试验结果Ct值 ≤ 35 , 且出现特异性S型扩增曲线, 判定为实时荧光PCR结果阳性, 该菌株是胎儿弯曲杆菌; 否则, 判定阴性, 该菌株不是胎儿弯曲杆菌。

阴性结果: 在质控系统正常的情况下, 被检样品无特异性S型扩增曲线, 判定为实时荧光PCR结果阴性, 该菌株不是胎儿弯曲杆菌。

胎儿弯曲杆菌标准菌株实时荧光PCR扩增曲线见附录C的C.1。

8.7 质谱鉴定

8.7.1 菌样制备

分别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。将胎儿弯曲杆菌标准菌株的新鲜菌落同法操作。

8.7.2 仪器校准

检测样品前, 应对微生物质谱仪进行校准。

8.7.3 测定

取制备好的样品靶板置质谱仪靶板槽中。编辑样品信息后, 进行谱图数据采集。

8.7.4 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。胎儿弯曲杆菌标准菌株的质谱鉴定谱图见附录D的D.1。

8.8 综合判定

生化鉴定、PCR鉴定、实时荧光PCR鉴定和质谱鉴定四种方法任选其一。

9 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GB19489的要求。

附 录 A
(规范性)
培养基和试剂

A.1 增菌运输培养基(transport enrichment medium, TEM)

A.1.1 成分

成牛血清	1 000 mL
5-氟尿嘧啶	0.3 g
放线菌酮	0.1 g
萘啶酮酸	3 mg
多粘菌 B	100 000 IU
1%煌绿	5 mL

A.1.2 制法

将 A.1.1 各成分无菌操作加入到成牛血清中,充分混合后分装于 20 mL 带胶皮塞(能密闭)的玻璃瓶中,每瓶 8 mL,然后水浴或在蒸气中加热 2 min--3 min(无压力),使血清凝固,冷却后用灭菌玻璃棒将血清凝块捣碎。最后无菌操作充入混合气体[5%氧气(O₂)、10%二氧化碳(CO₂),85%氮气(N₂)]。将制备好的 TEM 培养基保存在 4℃冰箱中,可使用 4 个月。

A.2 Skirrow血琼脂 (Skirrow blood agar)

A.2.1 基础培养基

A.2.1.1 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
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.1.2 制法

将 A.2.1.1 中各成分溶于蒸馏水中,121 °C 灭菌 15 min,备用。

A.2.2 FBP溶液

A.2.2.1 成分

丙酮酸钠	0.25 g
焦亚硫酸钠	0.25 g

硫酸亚铁	0.25 g
蒸馏水	100.0 mL

A. 2. 2. 2 制法

将A.2.2.1中各成分溶于蒸馏水中，经0.22 μm滤膜过滤除菌。FBP根据需要量现用现配，在-70 °C储存不超过3个月或-20 °C储存不超过1个月。

A. 2. 3 抗生素溶液

A. 2. 3. 1 成分

万古霉素 (vancomycin)	0.0075 g
三甲氧苄二氨嘧啶 (trimethoprim)	0.0038 g
多粘菌素 B (polymyxin B)	1900 IU
放线菌酮 (actidione)	0.0375 g
两性霉素 B (amphotericin B)	5.0 g
乙醇 / 灭菌水 (50 / 50, 体积分数)	5.0 mL

A. 2. 3. 2 制法

将A.2.3.1中各成分溶解于乙醇/灭菌水混合溶液中。

A. 2. 4 无菌脱纤维绵羊血

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. 2. 5 完全培养基

A. 2. 5. 1 成分

基础培养基	1 000.0mL
FBP 溶液	5.0mL
抗生素溶液	5.0mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0mL

A. 2. 5. 2 制法

当基础培养基的温度约为45 °C左右时，加入FBP溶液、抗生素溶液与冻融的无菌脱纤维绵羊血，混匀。校正pH至7.4±0.2 (25°C)。倾注15 mL于无菌平皿中，静置至培养基凝固。预先制备的平板未干燥时在室温放置不得超过4 h，或在4 °C左右冷藏不得超过7 d。

A. 3 哥伦比亚血琼脂

A. 3.1 基础培养基

A. 3.1.1 成分

动物组织酶解物	15.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	8.0~18.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 3.1.2 制法

将 A.3.1.1 中各成分溶于蒸馏水中，121 °C 灭菌 15 min，备用。

A. 3.2 无菌脱纤维绵羊血

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. 3.3 完全培养基

A. 3.3.1 成分

基础培养基	1 000.0mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0mL

A. 3.3.2 制法

当基础培养基的温度为45 °C左右时，无菌加入绵羊血，混匀。校正pH至 7.3 ± 0.2 （25 °C）。倾注15 mL 完全培养基于无菌平皿中，静置至培养基凝固。制备的平板未干燥时在室温放置不得超过4 h，或在4 °C左右冷藏不得超过7 d。

A. 4 布氏肉汤

A. 4.1 基础培养基

A. 4.1.1 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
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 4. 1. 2 制法

将 A.4.1.1 中各成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 7.0 ± 0.2 ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min，备用。

A. 5 氧化酶试剂

1%盐酸二甲苯对苯二胺水溶液，置棕色瓶中现用现配， $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期一周。用于氧化酶试验。

A. 6 3%过氧化氢 (H_2O_2)

30% H_2O_2	10 mL
----------------------------	-------

蒸馏水	90 mL
-----	-------

装于棕色瓶中，有效期为一周。

A. 7 巯基乙酸盐肉汤

A. 7. 1 成分

L-胱氨酸	0.5 mg
-------	--------

氯化钠	2.5 mg
-----	--------

右旋糖	5.5 g
-----	-------

酵母浸膏	5.0 g
------	-------

酪蛋白胰消化物 (Pancreatic Digest of Casein)	15.0 g
---------------------------------------	--------

巯基乙酸钠	0.5 g
-------	-------

蒸馏水	1 000.0 mL
-----	------------

A. 7. 2 制法

将 A.6.1 各成分加热至溶解，调整 pH 7.2 ± 0.2 ，5m L 试管分装，107.9 kPa 高压灭菌 15 min，新制备的培养基均应做无菌检查，并用已知阳性菌和阴性菌进行测试，以保证培养基的质量。

A. 8 马尿酸钠水解试验

A. 8. 1 1%马尿酸钠

马尿酸钠	1 g
------	-----

蒸馏水	100 mL
-----	--------

A. 8. 2 水合茚三酮

茚三酮	3.5g
-----	------

丙酮	50 mL
----	-------

丁酮	50 mL
----	-------

附录B
(资料性)
胎儿弯曲杆菌 PCR 产物大小和测序结果对照

B.1 胎儿弯曲杆菌标准菌株 *cstA* PCR 产物电泳图
见图 B.1。

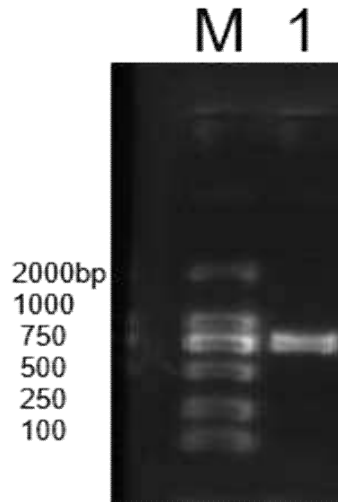


图 B.1 胎儿弯曲杆菌标准菌株 *cstA* PCR 产物电泳图
M: DL2000 DNA Marker; 1: 胎儿弯曲杆菌 ATCC27374

B.2 胎儿弯曲杆菌 *cstA* 目标片段测序结果

```
ggtagccgcagctgctaagataacagagcttggcttagcgtaacccctgaagagatcttagcactagcaaaaatgtaggtgaagagactatgatgagcaga  
acggtggtgccctacattgcagtaggtcttactttgctttccatgagctttagcggagtagaagctatgccgttttggtatcactttgcgatattttgaggcac  
tatttatattaaccgcggtgatgccgtactagaacaggacgatttatggtacaagatatactaggtaacgffcataaaccaataggtatacaaaaaactggtt  
tgggtattatagctactataaatatgcgttactggctgggatacctactatatacgggtgactgaccctatgggaggtatattcacactttggcctctatttggc  
gcggcaaatCaaatgctagccggcatcgtcttatgcttgaaccgtagtattatftaaatgggaaaagcaaaatactcatgggtactatagctcctcttgtttg  
ggtgcttataactacaatgtatgcagcatatcaaaaactcttccggcaatggagagagagttcatgacgccgtaagtcacatagctactgctcaaaactgggc  
gaaaaactagaaacttaaccgatccagcagccatagctaaagctgaagccgtatttagaataatataattgacgctgtgctttgtggatttttatgatagttgt  
cgtattgtagcta
```

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/937201131063006115>