ICS 11.220
CCS B 41

DB53

云　南　省　地　方　标　准

DB53/T 1059.1—2021

滇金丝猴检疫技术　第1部分：产气荚膜梭菌实验室检测技术规范

Quarantine technique for *Rhinopithecus bieti*
—Part 1: Technical specifications for laboratory examination of *Clostridium perfringens*

2021－09－30发布　　2021－10－14实施

云南省市场监督管理局　发布

目　　次

前言 III
引言 V
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　缩略语 2
5　总则 2
6　产气荚膜梭菌分型 3
7　仪器设备和试剂 3
7.1　采样用品 3
7.2　实验材料 3
7.3　实验设备 3
8　样品 3
8.1　采样要求 4
8.2　采样程序 4
8.3　样品保存与运输 4
9　试验步骤 4
9.1　细菌分离培养及培养特性观察 4
9.2　革兰染色和芽孢染色镜检 4
9.3　细菌生化试验 4
9.4　小鼠接种试验 4
9.5　16S　rRNA 基因与 4 种毒素基因的 PCR 扩增及测序分析 5
10　试验数据处理 5
10.1　细菌培养结果判定 5
10.2　染色镜检结果判读 5
10.3　生化试验结果判定 6
10.4　小鼠毒性试验结果判定 6
10.5　毒素中和试验结果判定 6
10.6　核酸检测结果判定 6
附录 A（规范性）　引物和 16S　rRNA 基因 PCR 扩增体系 7
附录 B（规范性）　采样记录表 8
附录 C（规范性）　革兰染色和雪-浮染色方法 9
附录 D（规范性）　TA 克隆程序 10

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。

本文件是DB53/T 1059《滇金丝猴检疫技术》的第1部分。DB53/T 1059已经发布了以下部分：

——第 1 部分：产气荚膜梭菌实验室检测技术规范；

——第 2 部分：毛首线虫实验室检测技术规范；

——第 3 部分：隐孢子虫实验室检测技术规范；

——第 4 部分：志贺杆菌实验室检测技术规范。

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。

本文件由云南省林业与草原局、云南省市场监督管理局共同提出。

本文件由云南省林业标准化技术委员会（YNTC02）归口。

本文件主要起草单位：云南农业大学、云南省标准化研究院。

本文件起草人：陈培富、黄艳梅、卓娜、朱勋程、胡世享、李宁、何依蓉、钱丽敏、邹丰才、杨建发。

引　言

滇金丝猴（*Rhinopithecus bieti*）是中国特有珍稀濒危灵长类动物，属于国家Ⅰ级重点保护野生动物，列入《世界自然保护联盟》（IUCN）濒危物种红色名录。编制并发布DB53/T 1059《滇金丝猴检疫技术》地方标准，推进滇金丝猴疫病诊断的标准化和规范化，指导从事野生动物保护相关的专业人员按规范程序实施对滇金丝猴相关病原的实验室检测，为滇金丝猴的科学研究和保护工作提供病原或疫病调查的基础数据，为滇金丝猴检疫、疫病监测和防治提供重要的参考依据，促进滇金丝猴繁育和扩群，维护地区物种与生态平衡，提升生物多样性保护成效。

本文件已发布4个部分：

——第 1 部分：产气荚膜梭菌实验室检测技术规范。本部分从产气荚膜梭菌实验室检测技术的总则、产气荚膜梭菌分型、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 2 部分：毛首线虫实验室检测技术规范。本部分从毛首线虫实验室检测技术规范的试验原理、试验条件、仪器设备和试剂、样品采集与保存、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 3 部分：隐孢子虫实验室检测技术规范。本部分从隐孢子虫实验室检测技术的试验原理、试验条件、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 4 部分：志贺杆菌实验室检测技术规范。本部分从志贺杆菌实验室检测技术涉及的总则、志贺杆菌分类、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范。

滇金丝猴检疫技术
第1部分：产气荚膜梭菌实验室检测技术规范

重要提示：本文件涉及人兽共患病原体的操作，应在符合国家相关生物安全规定（GB 19489和NY/T 541）的条件下进行。本文件遵循3R原则开展动物试验。

1 范围

本文件规定了滇金丝猴（*Rhinopithecus bieti*）检疫技术中产气荚膜梭菌实验室检测技术的总则、产气荚膜梭菌分型、仪器设备和试剂、样品、试验步骤和试验数据处理。

本文件适用于滇金丝猴检疫技术中产气荚膜梭菌实验室检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*

产气荚膜梭菌旧称魏氏梭菌，为梭状芽孢杆菌属中的一种厌氧革兰阳性杆菌，属于条件性致病菌，主要分布于动物胃肠道，通过分泌外毒素发生致病作用。

3.2

3R 原则 the 3R principles

开展涉及实验动物的科学研究，对实验动物采取减少（Reduction）、优化（Refinement）和替代（Replacement）的动物福利保障措施。

3.3

细菌生化试验 biochemical tests for bacteria

根据不同种类细菌产生的酶系统及其可分解底物的种类的差异，测定代谢产物种类用来区别和鉴定细菌。

3.4

外毒素 exotoxin

病原细菌分泌、释放于其生存环境或动物体内的毒性蛋白质或多肽，能结合并破坏宿主细胞的正常结构与功能。

3.5

小鼠接种试验 inoculation test in mice

小鼠接种试验包括小鼠毒性试验和毒素中和试验，用于鉴定产气荚膜梭菌及其外毒素类型。

3.6

保定 physical restraint

采用化学或物理方式，让动物固定保持某种姿势或某个体位，以便于救护人员进行检查、采样或治疗。可用麻醉药物或镇静剂保定，也用特制笼具、平台、布袋、绳索以及其它方式保定。

3.7

TA 克隆 TA cloning

使用*Taq* DNA聚合酶做PCR扩增得到的产物，凭借其DNA链的3′-端碱基A与质粒载体（如pMD18-T或pMD19-T）的5′-端碱基T互补配对，将PCR产物插入质粒载体。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Amp：氨苄青霉素 Ampecillin

bp：碱基对 Base pair

BHI：脑心浸液 Brain heart infusion

BLAST：基于局部序列比对算法的搜索工具 Basic local alignment search tool

ddH_2O：双蒸水 Double distilled water

CPA：产气荚膜梭菌α毒素 Clostridium perfringens α toxin

CPB：产气荚膜梭菌β毒素 Clostridium perfringens β toxin

CW：魏氏梭菌 *Clostridium welchii*

DNA：脱氧核糖核酸 Deoxyribonucleic acid

ETX：ε毒素ε toxin

ITX：ι毒素ι toxin

PCR：聚合酶链式反应 Polymerase chain reaction

SPS：亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶 Sulfite-Polymyxin-Sulphadiazine

TAE：三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸钠 Tris-Acetate-EDTA

Tris：三羟甲基氨基甲烷 Tris(hydroxymethyl)aminomethane

TSC：胰蛋白胨-亚硫酸盐-环丝氨酸 Tryptose-Sulphite-Cycloserine

5 总则

5.1 培养特性：对滇金丝猴开展产气荚膜梭菌检测，采集新鲜的腹泻粪便样品，经增菌厌氧培养，转种细菌于选择性琼脂培养基继续做厌氧培养，获得具有溶血能力、暴烈发酵含铁牛乳特性，并在 SPS 或 TSC 琼脂形成黑色菌落的分离菌株。

5.2 形态观察：对分离菌株做革兰染色和芽孢染色镜检，排除不符合产气荚膜梭菌基本形态学特征的其他杆菌，减少得出假阳性结果的可能。

5.3 生化试验：做细菌生化试验，将符合气荚膜梭菌生化特性的分离菌株基本确定为产气荚膜梭菌，进一步排除非目标菌种。

5.4 动物试验：取符合产气荚膜梭菌生化特性的分离菌株，制备培养物上清滤过液，做小鼠毒性试验和毒素中和试验，从致病性角度对分离菌株做出产气荚膜梭菌菌种及毒素型的常规判定。

5.5 分子鉴定：通过 PCR 扩增分析分离菌株的 16S rRNA 基因和 4 种毒素基因，得出最终鉴定结果。

6 产气荚膜梭菌分型

根据产气荚膜梭菌产生的外毒素种类，传统上将该菌分为A、B、C、D、E五个毒素型：

a) A 型只产生α毒素；
b) B 型产生α、β、ε三种毒素；
c) C 型产生α、β两种毒素；
d) D 型产生α、ε两种毒素；
e) E 型产生α、ι两种毒素。

注：α、β、ε和ι毒素又称作CPA、CPB、ETX和ITX。

7 仪器设备和试剂

7.1 采样用品

7.1.1 个人防护装备：包括防护服、乳胶手套或聚乙烯手套、+/-N95 或 FFP2 面罩、护目镜、鞋套等。

7.1.2 样品采集及记录用品：包括装有保存介质的采样管或无菌空容器、动物检疫器械箱、医用棉签、剪刀、镊子、一次性注射器、酒精棉、碘伏棉、酒精灯、封口袋、标签纸、记号笔、记录表格等。

7.1.3 样品暂存运输装备：包括保温箱、冰盒或液氮容器、吸水填充材料、包装胶带、警示标识等。

7.1.4 样品保存装备：冰箱（4 ℃、–20 ℃）、液氮罐等。

7.1.5 保定用品：包括操作笼、防咬嘴套、眼罩和麻醉药物（如氯胺酮注射液）或镇静药物（如舒泰）。

7.2 实验材料

酒精棉球、厌氧试管（含硫代乙醇酸钠等还原剂）、厌氧肉肝汤培养基（或BHI培养基）、SPS 琼脂、TSC 琼脂、CW琼脂、含0.02 %叠氮钠的绵羊血琼脂、梭菌增菌培养基、含铁牛乳培养基、革兰染色液、雪-浮（Schaeffer-Fulton）染色液；细菌生化鉴定管；*Taq* DNA聚合酶、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、T载体（如pMD18-T或pMD19-T）、感受态大肠杆菌细胞（DH-5α菌株）；毒素分型血清、小鼠、产气荚膜梭菌毒素基因和16S rRNA基因特异性引物（见附录A.1）、PCR扩增试剂（见附录A.2）。

7.3 实验设备

厌氧罐（或厌氧培养箱）、低温冰箱、–80 ℃冰箱、保温箱、试管、离心管、离心机、一次性过滤器（滤膜孔径0.22 μm）、光学显微镜、恒温摇床、水浴锅、微量移液器、PCR仪、电泳仪、照胶仪等。

8 样品

8.1 采样要求

8.1.1 采样人员应为兽医或动物保护相关的专业技术人员。

8.1.2 开展采样工作前，应了解、掌握采样区域内滇金丝猴的种群数量、活动规律、生活习性及保定方法，制定样品采集、运输和保存等完整的技术方案，并办理样品采集和运输相关手续，确保采样过程的科学性、安全性以及样品的可溯源性。样品可采集动物园或饲养基地圈养的滇金丝猴，但应得到相应主管部门的许可。

8.1.3　采样安全与防护。采样人员应规范穿戴全套个人卫生安全防护装备做好自我防护。与样品直接接触的器具均应提前做灭菌处理以防样品被污染。应准备垃圾袋带回采样过程中产生的所有废弃物品，防止环境污染和造成疫病传播。

8.1.4　采样完成后，所使用的器械、容器、个人防护用品等均要进行无害化处理。

8.2　采样程序

8.2.1　采集滇金丝猴粪便时选取新鲜（未干涸变色变形）粪便，同一堆粪便只采集一份样品（可分装于多只采集管），采集粪便内部部分。

8.2.2　采集粪便时用棉签蘸取粪便放入对应采集管中，每采集一份样品更换一个棉签，并做好样品标记和采样记录。记录表包括样品编号、采集管数、种群、采集地名、采集日期、采集人、粪样新鲜程度、生境状况等采样信息。粪便样品采集应填写《滇金丝猴采样记录表》（见附录 B 中表 B.1）。

8.3　样品保存与运输

8.3.1　粪便置于无菌的螺盖厌氧试管或含硫代乙醇酸钠的封口塑料袋中保存。

8.3.2　采集或处理的样品在 4 ℃条件下保存不超过 24 h；若长期保存，应置于–80 ℃冰箱。

8.3.3　样品应放入预先加入冰袋的保温箱内并及时送实验室检查。

9　试验步骤

9.1　细菌分离培养及培养特性观察

9.1.1　将所采每份样品振荡混匀，接种于厌氧肉肝汤培养基中，37 ℃厌氧培养 18 h～24 h。

9.1.2　用接种环蘸取少量菌液涂布于 SPS 平板、TSC 平板、CW 平板（需加约 10%卵黄液）和绵羊血琼脂平板，置于厌氧罐（箱），37 ℃厌氧培养 18 h～24 h；在含铁牛乳培养基（装于试管内）于 46 ℃厌氧培养 2 h～5 h，观察细菌生长情况。

9.1.3　把平板上形成有明显溶血环的单菌落挑取加入梭菌增菌培养基中厌氧培养 24 h，获得分离菌株，用于进一步的鉴定。

9.2　革兰染色和芽孢染色镜检

取细菌纯培养物或粪样做革兰染色和雪-浮染色（见附录 C），镜检细菌个体及芽孢形态。

9.3　细菌生化试验

按生化鉴定管说明书操作，将 9.1.3 培养得到的菌液接种于分别含酪蛋白、卵磷脂酶、吲哚、脂酶、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、硝酸盐、明胶和水杨苷的生化鉴定管，观察细菌生长及发酵情况。

9.4　小鼠接种试验

9.4.1　小鼠毒性试验

将产气荚膜梭菌分离菌株接种于绵羊血平板，37 ℃厌氧培养24 h后挑取具有典型溶血环的单菌落，转接至厌氧肉肝汤培养基中厌氧培养14 h～16 h。按照5%的体积比转接到厌氧肉肝汤培养基或BHI培养基，于43 ℃厌氧振荡（250 r/min）培养6 h，12 000 r/min离心15min取上清，用0.22 μm滤膜过滤，获得外毒素。取外毒素做2倍连续稀释，每个稀释度接种一组实验小鼠，5只实验小鼠为一组，每只腹腔内注射0.3 mL。对照组小鼠腹腔内注射经60 ℃/30 min处理的滤过上清。连续观察48 h，记录小鼠发病及死亡情况。

9.4.2 毒素中和试验

在灭菌试管内，用已知α、β、ε和ι毒素特异性的抗毒素（毒素分型血清），分别与未经加热处理的产气荚膜梭菌培养物上清轻轻搅拌混合，放置于室温孵育 30min，再腹腔注射 5 只实验小鼠。

9.5 16S rRNA 基因与 4 种毒素基因的 PCR 扩增及测序分析

9.5.1 细菌基因组 DNA 提取

按照细菌DNA提取试剂盒说明书提取产气荚膜梭菌基因组（包括染色体和质粒）DNA，保存于–20 ℃冰箱备用。

9.5.2 PCR 扩增

16S rRNA 基因 PCR 扩增体系见附录 A.2，扩增程序：95 ℃预变性 5min，95 ℃变性 30s，54 ℃退火 30s，72 ℃延伸 45s，进行 35 个变性-退火-延伸循环，然后再 72 ℃延伸 10min；α、β、ε和 ι 四种毒素基因（*cpa*、*cpb*、*etx* 和 *itx*）的 PCR 扩增程序，除退火温度分别设置为 50 ℃、50 ℃、50 ℃和 52 ℃，其他条件不变。

9.5.3 凝胶电泳检查

用天平称取 0.3 g 琼脂糖，加入到 100 mL 规格的锥形瓶中，量取 30 mL 1 × TAE 加入其中，置于微波炉加热至琼脂糖完全融化；待琼脂糖凝胶略降温后加入 3 μL 核酸染料，摇晃混匀，倒入制胶模具中，室温静置 20min，待其完全凝固；将胶放入电泳槽内进行点样和加入 DL2 000 DNA Maker。加样后进行电泳，电压 100 V（8～10 V/cm 凝胶长度），持续时间约 30min。将电泳后的凝胶放入凝胶成像仪器中，在紫外光照射下观察条带是否符合预期的扩增片段大小（见附录 A.1）。

9.5.4 TA 克隆与测序分析

对16S rRNA基因扩增产物符合预期大小的条带，进行胶回收并按常规方法（见附录D）做TA克隆，选取阳性克隆（菌落）经液体培养而成的悬液送专业机构测序。与GenBank收录的基因序列进行在线BLAST 对比以确定分离菌株的种属地位及毒素类型。

10 试验数据处理

10.1 细菌培养结果判定

产气荚膜梭菌在SPS平板上多为黑色菌落；在TSC平板上多为黑色菌落，菌落周围有一层不透明的晕圈；在CW平板上多为近圆形、微隆起、表面有皱褶、中等大小、发出黄白色光泽的菌落，菌落周围有直径为 10 mm～14 mm的白浊环；在绵羊血琼脂培养基上可形成直径约2 mm～5 mm、表面光滑、半透明、圆顶型的菌落，菌落周围可见双层溶血环；在含铁牛乳培养基引起暴烈发酵，使乳凝块破裂形成多孔海绵状。观察到上述菌落形态，并暴烈发酵含铁牛乳培养基，则认为分离菌株符合产气荚膜梭菌的典型培养特性。

10.2 染色镜检结果判读

产气荚膜梭菌两端钝圆，呈单个或成双排列，偶见链状；芽胞为椭圆形，雪-浮染色呈绿色，位于菌体中央或次极端，在芽孢体即内含芽孢的细菌，芽胞直径不超过菌体宽度。镜检看到产生芽孢的革兰阳性短粗大杆菌，符合产气荚膜梭菌的形态学特征。

10.3 生化试验结果判定

根据发酵管（含 pH 值指示剂）颜色的变化，分离菌株若不能分解利用酪蛋白、吲哚、脂酶和水杨苷，但能分解利用卵磷脂酶、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、硝酸盐和明胶，则认为符合产气荚膜梭菌的典型生化特性。

10.4 小鼠毒性试验结果判定

若接种细菌培养上清滤过液的小鼠在 18 h 内出现死亡，而对照组未见死亡，则符合产气荚膜梭菌毒素的典型特征。否则判为产气荚膜梭菌毒素阴性。

10.5 毒素中和试验结果判定

基于抗原抗体反应的特异性，若接种经抗体处理的某型毒素的实验小鼠不再发病死亡，便可判定毒素类型，进而根据分离菌株所产生的毒素种类确定产气荚膜梭菌分型。

10.6 核酸检测结果判定

10.6.1 产气荚膜梭菌阳性判定标准

除染色镜检见到能产生芽孢的革兰阳性粗大杆菌，生化试验结果与 10.3 描述一致，还需满足下列 3 个条件之一：

a) 符合 10.1 所描述的细菌培养特性；
b) 小鼠毒性试验结果与 10.4 描述一致；
c) 分离菌株的 16S rRNA 基因扩增片段与预期相符，其序列与产气荚膜梭菌参考序列的同源性超过 97 %。

10.6.2 产气荚膜梭菌分型标准

根据毒素中和试验（见 10.5）或毒素基因 PCR 扩增（见 9.5）的结果判定：

a) 仅检测到α毒素或其基因 *cpa* 的菌株，判定为 A 型产气荚膜梭菌；
b) 同时检测到α、β、ε三种毒素或其基因 *cpa*、*cpb* 和 *etx* 的菌株，判定为 B 型产气荚膜梭菌；
c) 同时只检测到α、β两种毒素或其基因 *cpa* 和 *cpb* 的菌株判定为 C 型产气荚膜梭菌；
d) 同时只检测到α、ε两种毒素或其基因 *cpa* 和 *etx* 的菌株，判定为 D 型产气荚膜梭菌；
e) 同时只检测到α、ι两种毒素或其基因 *cpa* 和 *itx* 的菌株，判定为 E 型产气荚膜梭菌。

附　录　A
（规范性）
引物和 16S rRNA 基因 PCR 扩增体系

毒素基因引物和16S rRNA基因引物见表A.1。

表 A.1　毒素基因引物和 16S rRNA 基因引物

基因	引物序列 5′→3′	扩增片段大小（bp）
cpa	上游引物：TCCTGCTAATGTTACTGC 下游引物：GTTCCTTTTTGAGAGTTAGC	288
cpb	上游引物：TTCTAACTGCTCCTAATGG 下游引物：TGACTATCTACATTTGGGG	151
etx	上游引物：AGTTTAGCAATCGCATCAG 下游引物：ACTTCCACTTACTTGTCCT	678
itx	上游引物：ACTACTCTCAGACAAGACAG 下游引物：CTTTCCTTCTATTACTATACG	443
16S rRNA	上游引物：TCATTCAACCAAAGGAGC 下游引物：GTTTACGGCGTGGACTAC	596

16S rRNA 基因 PCR 扩增体系见表 A.2。

表 A.2　16S rRNA 基因 PCR 扩增体系

反应体系各组分	使用量
Mix	10 μL
ddH_2O	8 μL
上游引物	0.5 μL
下游引物	0.5 μL
模板	1 μL
共计	20 μL

附　录　B
（规范性）
采样记录表

滇金丝猴采样记录表见表B.1。

表 B.1　滇金丝猴采样记录表

粪样编号	采集管数	种群	采集地名称	新鲜程度	采集日期	采集人

附　录　C
（规范性）
革兰染色和雪-浮染色方法

C.1　革兰染色程序

C.1.1　取细菌悬液或菌落样品少许做低密度涂片，风干。
C.1.2　用酒精灯适度加热做物理固定。
C.1.3　滴加草酸铵-结晶紫溶液进行初染3min～5min，轻轻用蒸馏水洗去染料。
C.1.4　滴加15%卢戈碘液进行媒染1min，轻轻用蒸馏水洗去染料。
C.1.5　滴加95%酒精脱色15 sec～30 sec，立即用蒸馏水洗去酒精。
C.1.6　滴加红色染料（0.34%沙黄溶液或0.1%碱性复红溶液）复染2min，用蒸馏水洗去染色液。
C.1.7　晾干玻片（可加盖盖玻片），置光镜下观察细菌个体形态。

C.2　雪-浮染色程序

C.2.1　取细菌悬液或菌落样品少许做低密度涂片，风干。
C.2.2　于细菌涂片上滴加5%孔雀绿水溶液。
C.2.3　加热（30 sec～60 sec）染色，轻轻用蒸馏水洗去染料。
C.2.4　滴加0.5%沙黄水溶液复染30 sec。
C.2.5　晾干玻片（可加盖盖玻片），置光镜下观察，菌体呈红色，芽孢呈绿色。

附　录　D
（规范性）
TA 克隆程序

D.1　TA克隆程序

D.1.1　将PCR扩增产物通过胶回收试剂盒纯化。

D.1.2　将纯化产物与T质粒载体（如pMD18-T或pMD19-T）连接，连接体系包含质粒载体1 μL、胶回收的PCR扩增产物4 μL和连接反应缓冲液5 μL，置于16 ℃环境孵育2 h。

D.1.3　将连接产物10 μL与100 mL大肠杆菌DH5a感受态细胞混合，随即冰浴30min。

D.1.4　转化大肠杆菌细胞，即42 ℃水浴做热应激处理90s。

D.1.5　将反应体系立即插入冰盒中，冰浴2min。

D.1.6　加入600 μL含氨苄青霉素（Amp）的LB液体培养基，于37 ℃轻轻振荡培养2 h。

D.1.7　取100 μL～300 μL细菌悬液涂布LB平板（含100 μg/mL的Amp），37 ℃培养过夜。

D.1.8　随机选取3～5个独立的白色菌落做阳性克隆鉴定。

云南省标准化行政主管部门
DB53
地方标准