

ICS 11.220

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—2021

三类常见细菌性病原检测技术规范

Technical specifications for the detection of three common bacterial pathogens

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

2021 - 04 - 21 发布

2021 - 05 - 07 实施

中国兽医协会 发布

目 次

前 言.....	II
三类常见细菌性病原检测技术规范.....	1
1.范围.....	1
2.规范性引用文件.....	1
3.术语和定义.....	1
4.设备和材料.....	1
5 样品采集、保存与运送.....	2
6 细菌分离与鉴定.....	2
7 药敏试验.....	3
8 生物安全.....	3
附录 A（规范性）抗菌药物储备液和工作液的制备与保存.....	1
附录 B（规范性）培养基.....	2
附录 C（资料性）采样记录表.....	3
附录 D（资料性）大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌分离鉴定.....	4

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、青岛农业大学。

本文件主要起草人：赵莉、刘志海、刘旭东、郝智慧、王莘莘

中国兽医协会
CVMA

三类常见细菌性病原检测技术规范

1 范围

本文规定了畜禽养殖过程中细菌耐药性检测的设备材料、试剂和培养基、样品采集保存、细菌分离鉴定、药物敏感性实验和生物安全措施的要求。

适用于畜禽源的大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的分离鉴定和药物敏感性试验。

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 4789.1 食品安全国家标准食品微生物学检验总则

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 最低抑菌浓度 minimal inhibitory concentration, MIC

在琼脂或肉汤稀释法药物敏感性检测试验中能抑制肉眼可见的微生物生长的最低抗菌药物浓度。

3.2 折点 breakpoint

用于判定测试菌株敏感（Susceptible, S）、中介（Intermediate, I）和耐药（Resistant, R）的最低抑菌浓度。

3.3 微量肉汤稀释法 broth microdilution method

定量检测某种抗菌药物对细菌的体外抑菌活性的一种标准方法。在药敏板上设置一系列的浓度梯度的抗菌药物，加入待测菌的菌悬液，经过一段时间孵育对药敏板进行读数，分析得到 MIC 值，经过 CLSI 的相应标准来判定待测菌对抗菌药的表型。

3.4 敏感 Susceptible

使用推荐剂量的抗菌药物时，菌株可被达到抗菌活性浓度水平所抑制。

3.5 中介 Intermediate

分离菌株的 MIC 接近抗菌药物在血液和组织中的水平，对药物治疗的反应低于敏感菌株。

3.6 耐药 Resistant

按常规给药不能抑制该生长的菌株，MIC 值落在存在微生物耐药机制范围内，且临床疗效不可靠。

4 设备和材料

4.1 设备

4.1.1 微量移液器（0.5 ul~1000ul）

4.1.2 冰箱（4℃、-20℃和-80℃）

4.1.3 电子天平（最小称量 0.1mg）

4.1.4 生化培养箱

- 4.1.5 涡旋仪
- 4.1.6 生物安全柜
- 4.1.7 微生物生化鉴定系统
- 4.1.8 PCR 仪
- 4.2 培养基
 - 4.2.1 缓冲胨蛋白水
 - 4.2.2 大肠杆菌显色培养基（伊红美蓝和麦康凯）
 - 4.2.3 RV 肉汤
 - 4.2.4 SC 肉汤
 - 4.2.5 沙门氏菌显色培养基
 - 4.2.6 7.5%氯化钠肉汤
 - 4.2.7 甘露醇高盐琼脂
 - 4.2.8 B-P 琼脂
 - 4.2.9 LB 肉汤
 - 4.2.10 MH 肉汤
- 4.3 质控菌株
 - 4.3.1 大肠杆菌 ATCC25922
 - 4.3.2 沙门氏菌 ATCC35218
 - 4.3.3 金黄色葡萄球菌 ATCC29213

5 样品采集、保存与运送

5.1 泄殖腔/肛拭子及鼻腔拭子采集

用无菌生理盐水或运送培养基浸润灭菌棉拭子，伸入家畜直肠或家禽泄殖腔 1.5 cm~2.0 cm，旋转 2 圈~3 圈，立即将棉拭子置于 10 mL 缓冲胨蛋白水培养基中。对于家畜同时进行鼻腔拭子采集，将无菌生理盐水或运送培养基浸润灭菌棉拭子伸入家畜（猪等）鼻腔，旋转 2 圈~3 圈，迅速取出，后续处理同上。

5.2 新鲜粪便采集

用灭菌棉拭子蘸取新鲜粪便，不应沾有泥土或其他污染物，立即将棉拭子及样品置于 10 mL 运送培养基中。

5.3 盲肠内容物采集

用灭菌棉拭子蘸取盲肠内容物，立即置于 10 mL 运送培养基中。

5.4 羽毛及皮毛样品

用无菌剪刀剪取畜禽腿部和腹部的羽毛，转入无菌塑料瓶中。

5.5 样品采集记录

样品采集时填写采样登记表，明确样品类型和数量。

5.6 样品保存与运送

样品应在 4℃ 保存，使用冰袋等保温容器运输，粪便保存时间不超过 48h。

6 细菌分离与鉴定

6.1 大肠埃希氏菌分离鉴定

见附录 D1。

6.2 沙门氏菌分离鉴定

见附录 D2。

6.3 金黄色葡萄球菌分离鉴定

见附录 D3。

7 药敏试验

7.1 菌落培养

将质控菌与待测菌转入 MH 琼脂，35℃~37℃或 42℃培养 18-24h，得到单克隆菌落。

7.2 药敏板制备

将抗菌药物使用对应溶剂和稀释剂配制母液，按照倍比稀释法稀释至所用浓度梯度，应符合附录 A 的操作。按照顺序加入无菌微量培养板中，每孔 100ul，设置空白孔、阳性对照和阴性对照孔。

7.3 菌液制备

一次性接种环挑取单个菌落，接种到 MH 肉汤中，震荡培养，用浊度仪调整至 0.5 麦氏浊度，用 MH 肉汤稀释 100 倍，取 100ul 加入微孔板中。

7.4 孵育

将接种完毕的 96 孔板置于 35℃~37℃或 42℃生化培养箱中，孵育 16h-20h。

7.5 结果观察和记录

取出药敏板，在光线良好条件下用肉眼观察结果。以肉眼可见抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。

7.6 质量控制

质控菌株的 MIC 应符合规定。如质控菌株 MIC 不在规定范围内，则本次试验结果无效。

如阴性对照孔未见浑浊且阳性对照孔浑浊，则该药敏板结果有效，可继续判读菌株 MIC 出现其他现象的，则该药敏板结果无效。

7.7 结果判定

在试验结果有效的前提下，继续判读测试菌株的 MIC，判读完成后进行记录。

7.8 耐药性结果

根据测试菌株的 MIC 值，判定其耐药性，结果报告为敏感(S)、中敏(I)或耐药(R)。对于没有规定折点的药物，报告其 MIC 值。

8 生物安全

开展细菌分离鉴定与药敏试验等实验室管理应符合 GB 4789.1、GB 19489 生物安全要求，废弃物处理应严格按照 GB 19489 规定执行。菌株管理按照《动物病原微生物菌(毒)种保藏管理办法》执行。

附录 A

(规范性)

抗菌药物储备液和工作液的制备与保存

A.1 抗菌药物的种类

用于监测大肠杆菌和沙门氏菌耐药性的抗菌药物有：阿莫西林-克拉维酸、头孢他啶、头孢吡肟、头孢噻肟、氨曲南、亚胺培南、环丙沙星、氧氟沙星、美罗培南、粘菌素、磺胺甲恶唑。

用于监测金黄色葡萄球菌耐药性的抗菌药物有：万古霉素、庆大霉素、克拉霉素、四环素、环丙沙星、利福平、苯唑西林、头孢西丁、恩诺沙星、头孢噻唑、红霉素。

A.2 抗菌药物贮备液的保存

精密称量抗菌药物标准品或对照品，按照使用说明或根据 EUCAST 上的溶剂及稀释剂配制成最高浓度 10 倍的储备液，储存在-20℃冰箱。

A.3 抗菌药物工作液的制备

测试的浓度取决于抗菌药物和细菌种类，选择的范围应该覆盖 MIC 终点，具体浓度范围见表 A.1。

表 A.1 抗菌药物制备浓度范围

单位：ug/mL

大肠杆菌		沙门氏菌		金黄色葡萄球菌	
抗菌药物	浓度范围	抗菌药物	浓度范围	抗菌药物	浓度范围
阿莫西林-克拉维酸	512-0.5	阿莫西林-克拉维酸	512-0.5	万古霉素	256-0.5
头孢他啶	256-0.5	头孢他啶	256-0.5	庆大霉素	512-1
头孢吡肟	512-0.06	头孢吡肟	512-0.06	克拉霉素	128-0.25
头孢噻肟	512-0.06	头孢噻肟	512-0.06	四环素	512--0.5
氨曲南	256-0.5	氨曲南	256-0.5	环丙沙星	256-0.25
亚胺培南	64-0.006	亚胺培南	64-0.006	利福平	64-0.06
环丙沙星	64-0.01	环丙沙星	64-0.01	苯唑西林	4-0.12
氧氟沙星	128-0.03	氧氟沙星	128-0.03	头孢西丁	128-0.25
美罗培南	64-0.006	美罗培南	64-0.006	恩诺沙星	128-0.03
粘菌素	256-0.12	粘菌素	256-0.12	头孢噻唑	256-0.12
磺胺甲恶唑	512-0.12	磺胺甲恶唑	512-0.12	红霉素	256-0.12

附录 B

(规范性)

培养基

B.1 麦康凯琼脂培养基

麦康凯琼脂培养基成分表

成分	重量 (g/L)
蛋白胨	20.0
乳糖	10.0
牛胆盐	5.0
氯化钠	5.0
中性红	0.075
琼脂	12.0
pH 值 7.4±0.2	25℃

用法:

称取本品 52.0g, 加热溶解于 1000ml 蒸馏水中, 121℃ 高压灭菌 15 min, 备用。

B.2 MH 肉汤培养基

MH 肉汤培养基成分表

成分	重量 (g/L)
牛肉粉	2.0
可溶性淀粉	1.5
酸水解酪蛋白	17.5
pH 值 7.4±0.2	25℃
牛肉粉	2.0
可溶性淀粉	1.5
酸水解酪蛋白	17.5

用法:

称取本品 21 克, 加热溶解 1000ml 蒸馏水中, 121℃ 高压灭菌 15 min, 备用。。

B.3 MH 琼脂培养基

MH 琼脂培养基成分表

成分	重量 (g/L)
牛肉粉	6.0
可溶性淀粉	1.5
酸水解酪蛋白	17.5
琼脂	17.0
pH 值 7.3 ± 0.1	25℃

用法:

称取本品 42.0g, 加热溶解于 1000ml 蒸馏水中, 121℃ 高压灭菌 15 min, 待冷至 50℃, 倾入无菌平皿, 备用。

附录 C
(资料性)
采样记录表

C.1 采样记录表见表 C.1。

表 C.1 采样记录表

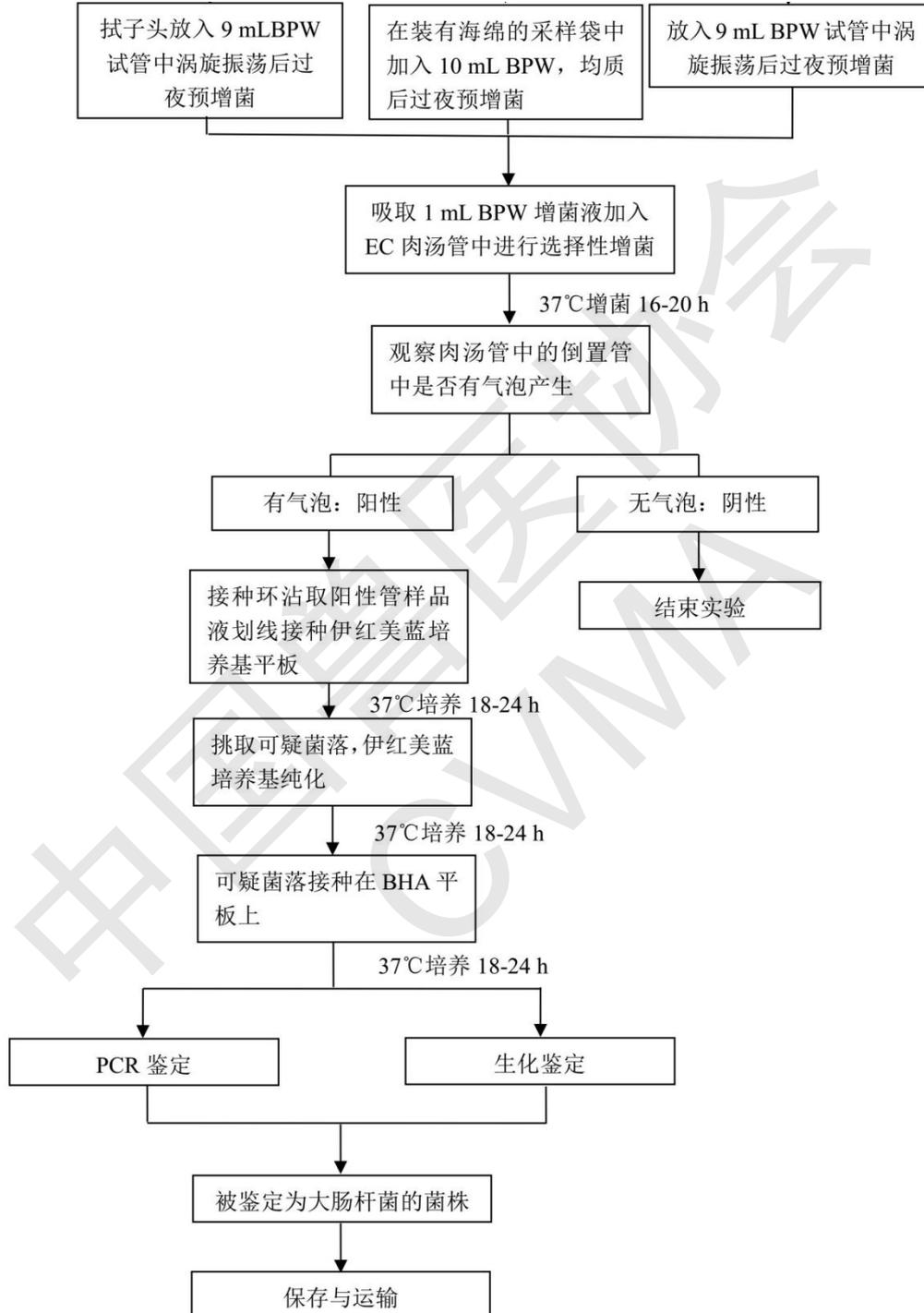
被采样单位		单位名称			
		采样地点		地址经纬度	
		联系人		联系电话	
采样单位		采样人员			
		联系电话			
被采样单位签章：			采样单位签章：		
采样日期： 年 月 日			采样日期： 年 月 日		
样品来源		样品类型	数量	编号	
	猪： 日龄	泄殖腔拭子			
	鸡： 日龄	粪便			
	牛： 日龄	盲肠排泄物			
	羊： 日龄	羽毛			
	其他： 日龄				
拟分离细菌类型			样品编号规则		
大肠杆菌： 沙门氏菌： 金黄色葡萄球菌： 其他：			采样编号按照“采样地-日期-动物种类-样品类型-菌株编号”的格式进行。例如山东省 2021 年 4 月鸡粪便 01 号，编写为 SD202104JF-01。分离菌类型在编号后加入 EC、S 和 STA 代表三种菌属。		
养殖信息	养殖量		品种		
	用药情况		饲料品牌		

附录 D

(资料性)

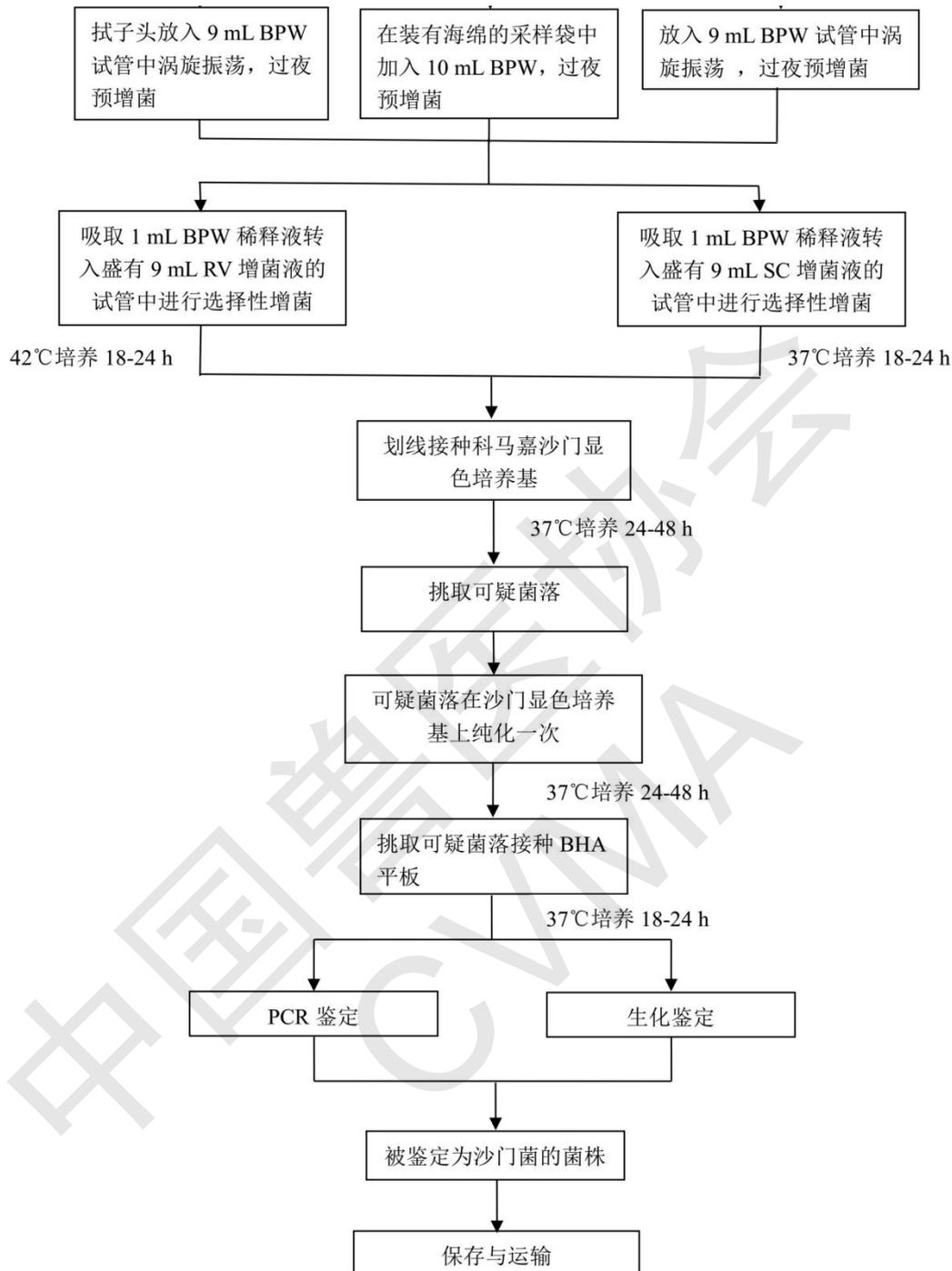
大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌分离鉴定

D.1 大肠杆菌的分离与鉴定



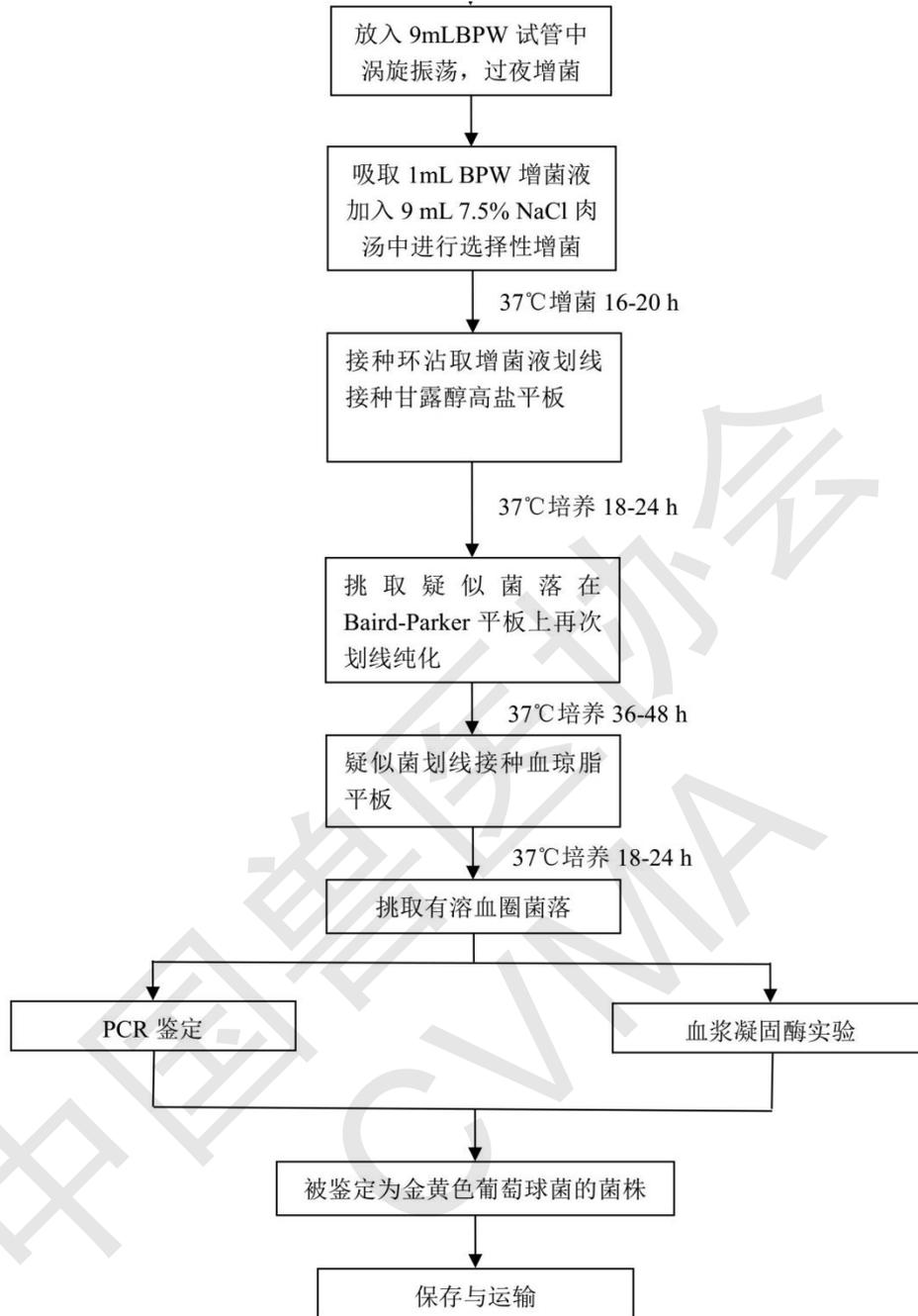
拭子和粪便样品先接种于选择性增菌培养液，37℃培养 16-20h，以是否产气为判定指标，产气的样品接种大肠杆菌显色培养基，经过 37℃孵育后，挑取可疑菌落，再一次纯化一代，对已经纯化的可疑菌落进行 PCR 鉴定或生化鉴定。

D.2 沙门氏菌的分离与鉴定



沙门氏菌的选择性增菌可以在 RV 增菌液或 SC 增菌液中进行，经过 42℃ 孵育后，根据管内细菌生长情况，接种于沙门显色培养基，转移到 37℃ 孵育，可疑菌落表现出紫色，并再次接种在显色平板上进行纯化一次，对已经纯化的菌落可以使用 PCR 鉴定或生化鉴定其菌属。

D.3 金黄色葡萄球菌的分离鉴定



取样品至氯化钠肉汤进行增菌培养，培养物接种于甘露醇高盐平板，可以菌落在此平板上为黄色不透明的小菌落，可疑菌落接种于 B-P 平板进行纯化，金黄色葡萄球菌在此平板上的形态为黑色不透明的小菌落，将黑色菌落接种于血琼脂平板，孵育后，挑取有溶血圈的菌落进行 PCR 鉴定或血浆凝固酶生化鉴定，鉴定得到的菌株进行保存。