

ICS 65.020.30

B 43

团体标准

T/SDAA 019—2021

禽源细菌药物敏感性试验技术规程

Code of practice for antimicrobial drug susceptibility tests for
bacteria isolated from poultry

2021—06—22 发布

2021—07—23 实施

山东省畜牧协会 发布

全国团体标准信息平台

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2020 给出的规则起草。

本标准由山东省畜牧协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院饲料研究所、山东益生种畜禽股份有限公司、青岛农业大学。

本文件主要起草人：徐飞、陈孝杰、张靖菊、刘静、郭龙宗、尹燕博、张向阳。

本文件为首次发布。

全国团体标准信息平台

禽源细菌药物敏感性试验技术规程

1 范围

本文件提供了禽源细菌的抗菌药物敏感性试验技术规程。

本文件适用于养殖场禽源大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌的抗菌药物体外敏感性试验。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
中华人民共和国兽药典（2020版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

敏感 Susceptible; S

当抗菌药物对分离株的MIC值或抑菌圈直径处于敏感范围时，使用推荐剂量进行治疗，该药在感染部位通常达到的浓度可抑制被测菌的生长，临床治疗可能有效。

3.2

中介 Intermediate; I

当菌株的MIC值或抑菌圈直径处于中介时，该数值接近药物在血液和组织中达到的浓度，从而治疗反应率低于敏感菌群。

3.3

耐药 Resistant; R

当抗菌药物对分离株的MIC值或抑菌圈直径处于该分类范围时，使用常规治疗方案，该药在感染部位所达到的药物浓度不能抑制细菌的生长，和（或）被测菌株获得特殊耐药机制，且治疗性研究显示该药临床疗效不确切。

4 试剂和材料

T/SDAA 019-2021

4.1 培养基

4.1.1 Mueller-Hinton 琼脂培养基：配置方法见附录 A.1。

4.1.2 普通肉汤培养基：配置方法见附录 A.2。

4.2 质控菌株

大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC®25922

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC®25923

-20℃以下保存。

4.3 药敏纸片

-20℃条件下密封干燥处贮藏。

5 仪器设备

5.1 冰箱：-40℃、-20℃、2℃~8℃。

5.2 恒温培养箱：36℃±1℃。

5.3 超净工作台。

5.4 恒温摇床培养箱：36℃±1℃。

5.5 高压灭菌锅：103.4 Kpa、121.3℃。

5.6 麦氏比浊管：0.5号。

5.8 微量移液器：0.5 μL~10 μL、10 μL~200 μL、100 μL~1000 μL。

5.9 灭菌试管：Φ13×100 mm。

5.10 无菌培养皿：Φ100 mm、Φ150 mm。

5.11 游标卡尺：精度 0.05 mm。

6 药敏试验步骤

试验步骤详见图 1 所示。

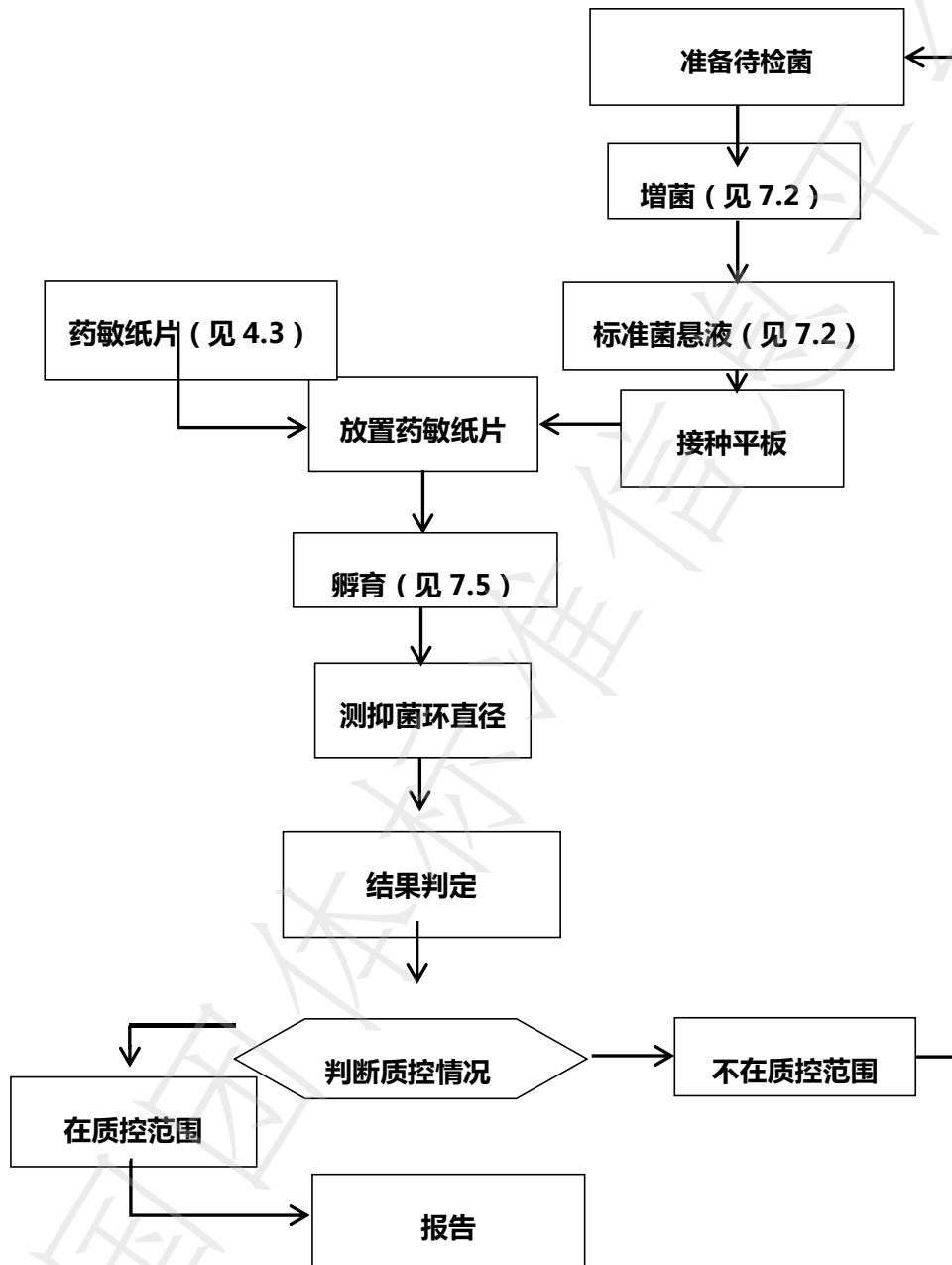


图 1 抗菌药物敏感性试验步骤流程图

7 操作步骤

7.1 药敏纸片准备

根据细菌种类选择合适的商品化药敏纸片，参考依据见附录 B.2~B.4。
将药敏纸片从冰箱中拿出，室温放置 1 h~2 h 再进行使用。

T/SDAA 019-2021

7.2 菌悬液制备

7.2.1 增菌

用无菌接种环在琼脂培养基上挑取至少 4~5 个分离良好、形态相似的单克隆菌落，分别接种到含有 2 mL~3 mL 普通肉汤培养基的试管中增菌。

肉汤培养物在 200 r/min、36 °C ± 1 °C 的恒温摇床中培养 2 h~6 h 直至其到达或超过 0.5 号麦氏比浊管的混浊标准（见 5.9）。

7.2.2 标准菌悬液

用无菌生理盐水或肉汤调节菌悬液的混浊度，使其达到 0.5 麦氏浊度标准，此时菌悬液浓度约为 1.5×10^8 CFU/mL。

7.3 平板接种

菌悬液制备后 15 min 内，用无菌棉棒蘸取菌悬液，并在试管内壁挤压，去除棉棒上多余的液体。接种时用棉棒在整个无菌 Mueller-Hinton 琼脂表面划线，重复此次操作两次以上，每次旋转培养皿大约 60°，以保证接种物的分布均匀，最终的抑菌圈为统一圆形。

7.4 药敏纸片放置

放置合适的药敏纸片于琼脂表面。用消毒的镊子或是针尖轻轻压，确保其与琼脂表面完全接触。各纸片间中心距离 > 24 mm。一个 150 mm 的培养皿上不超过 12 个纸片，或 100 mm 的培养皿上不超过 5 个纸片。

7.5 孵育

平板放置药敏纸片 15 min 内，于 36 °C ± 1 °C 的培养箱中倒置孵育 16 h~18 h。

7.6 抑菌圈测量

用游标卡尺在黑色、不反光背景下测量抑菌圈直径。

7.7 结果判定

判定标准参见附录 B。

若质控菌株不在质控范围内则需要重新试验。

附录 A
(规范性)
培养基和试剂

A.1 Mueller-Hinton 琼脂基础培养基

A.1.1 成分

| | |
|--------|---------|
| 牛肉粉 | 6.0 g |
| 可溶性淀粉 | 1.5 g |
| 酸水解酪蛋白 | 17.5 g |
| 琼脂 | 17.0 g |
| 水 | 1000 mL |

A.1.2 配制

取基础培养基成分，加热溶解于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH 值至 7.3 ± 0.1 ；或取商品化培养基，按说明书进行配制。配制好培养基于 121°C 高压灭菌 15 分钟，冷至 50°C ，倾入无菌平皿，备用。于 4°C 条件保存，有效期 7 天。

A.2 普通肉汤培养基

A.2.1 成分

| | |
|-----|---------|
| 蛋白胨 | 20g |
| 牛肉膏 | 5g |
| 氯化钠 | 5g |
| 水 | 1000 mL |

A.2.2 配制

称取基础培养基成分或商品化培养基，加入蒸馏水或去离子水 1000 mL，搅拌加热煮沸至完全溶解，调节 pH 值至 7.5 ± 0.2 后分装试管。将试管放入灭菌锅中， 121°C 高压灭菌 20min，冷却至室温，备用。

附录 A

(规范性)
培养基和试剂

A.1 Mueller-Hinton 琼脂基础培养基

A.1.1 成分

| | |
|--------|---------|
| 牛肉粉 | 6.0 g |
| 可溶性淀粉 | 1.5 g |
| 酸水解酪蛋白 | 17.5 g |
| 琼脂 | 17.0 g |
| 水 | 1000 mL |

A.1.2 配制

取基础培养基成分，加热溶解于 1000 mL 蒸馏水中，调节 pH 值至 7.3 ± 0.1 ；或取商品化培养基，按说明书进行配制。配制好培养基于 121°C 高压灭菌 15 分钟，冷至 50°C ，倾入无菌平皿，备用。于 4°C 条件保存，有效期 7 天。

A.2 普通肉汤培养基

A.2.1 成分

| | |
|-----|---------|
| 蛋白胨 | 20g |
| 牛肉膏 | 5g |
| 氯化钠 | 5g |
| 水 | 1000 mL |

A.2.2 配制

称取基础培养基成分或商品化培养基，加入蒸馏水或去离子水 1000 mL，搅拌加热煮沸至完全溶解，调节 pH 值至 7.5 ± 0.2 后分装试管。将试管放入灭菌锅中， 121°C 高压灭菌 20min，冷却至室温，备用。

附录 B
(资料性)
判定标准

B.1 质控菌株的质控范围标准

参考依据:美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)发布标准CLSI 2020 VET01-A4、CLSI 2017 M100S 27th。

表 1 质控菌株的质控范围标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 质控抑菌圈直径范围 (mm) | |
|-----------|---------------|--------------------|-----------------------|
| | | 大肠杆菌 ATCC®25922 | 金黄色葡萄球菌 ATCC®25923 |
| 青霉素 | 10 单位 | - | 26-37 |
| 头孢噻吩 | 30 µg | 26-31 | 27-31 |
| 阿莫西林-克拉维酸 | 20/10 µg | 18-24 | 28-36 |
| 新霉素 | 30 µg | 17-23 | 18-26 |
| 链霉素 | 10 µg | 12-20 | 14-22 |
| 卡那霉素 | 30 µg | 17-25 | 19-26 |
| 庆大霉素 | 10 µg | 19-26 | 19-27 |
| 阿米卡星 | 30 µg | 19-26 | 20-26 |
| 替米考星 | 15 µg | - | 17-21 |
| 多西环素 | 30 µg | 18-24 | 23-29 |
| 红霉素 | 15 µg | - | 22-30 |
| 泰乐菌素 | 60 µg | - | 19-25 |
| 恩诺沙星 | 5 µg | 32-40 | 27-31 |
| 环丙沙星 | 5 µg | 30-40 | 22-30 |
| 氟苯尼考 | 30 µg | 22-28 | 22-29 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 µg | 23-29 | 24-32 |

B.2 临床菌株的质控范围标准

表 B.2 大肠杆菌抑菌圈直径判定标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 抑菌圈直径 (mm) | | |
|-------|---------------|------------|-------|------|
| | | 敏感 S | 中介 I | 耐药 R |
| 头孢噻吩 | 30 µg | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| 链霉素 | 10 µg | ≥15 | 12-14 | ≤11 |
| 卡那霉素 | 30 µg | ≥18 | 14-17 | ≤13 |
| 庆大霉素 | 10 µg | ≥16 | 13-15 | ≤12 |
| 阿米卡星 | 30 µg | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| 多西环素 | 30 µg | ≥14 | 11-13 | ≤10 |
| 恩诺沙星 | 5 µg | ≥23 | 17-22 | ≤16 |
| 环丙沙星 | 5 µg | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 µg | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

表 B.3 沙门菌抑菌圈直径判定标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 抑菌圈直径 (mm) | | |
|-----------|---------------|------------|-------|------|
| | | 敏感 S | 中介 I | 耐药 R |
| 头孢噻吩 | 30 µg | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| 阿莫西林-克拉维酸 | 20/10 µg | ≥18 | 14-17 | ≤13 |
| 庆大霉素 | 10 µg | ≥16 | 13-15 | ≤12 |
| 阿米卡星 | 30 µg | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| 多西环素 | 30 µg | ≥14 | 11-13 | ≤10 |
| 恩诺沙星 | 5 µg | ≥23 | 17-22 | ≤16 |
| 环丙沙星 | 5 µg | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 µg | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

表 B.4 金黄色葡萄球菌抑菌圈直径判定标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 抑菌圈直径 (mm) | | |
|-----------|---------------|------------|-------|------|
| | | 敏感 S | 中介 I | 耐药 R |
| 青霉素 | 10 单位 | ≥29 | - | ≤28 |
| 阿莫西林-克拉维酸 | 20/10 μg | ≥20 | - | ≤19 |
| 卡那霉素 | 30 μg | ≥18 | 14-17 | ≤13 |
| 庆大霉素 | 10 μg | ≥15 | 13-14 | ≤12 |
| 红霉素 | 15 μg | ≥23 | 14-22 | ≤13 |
| 恩诺沙星 | 5 μg | ≥23 | 17-22 | ≤16 |
| 环丙沙星 | 5 μg | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 μg | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

附录 B

(资料性)

判定标准

B.1 质控菌株的质控范围标准

参考依据：美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)发布标准CLSI 2020 VET01-A4、CLSI 2017 M100S 27th。

表 1 质控菌株的质控范围标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 质控抑菌圈直径范围 (mm) | |
|-----------|---------------|--------------------|-----------------------|
| | | 大肠杆菌 ATCC®25922 | 金黄色葡萄球菌 ATCC®25923 |
| 青霉素 | 10 单位 | - | 26-37 |
| 头孢噻吩 | 30 µg | 26-31 | 27-31 |
| 阿莫西林-克拉维酸 | 20/10 µg | 18-24 | 28-36 |
| 新霉素 | 30 µg | 17-23 | 18-26 |
| 链霉素 | 10 µg | 12-20 | 14-22 |
| 卡那霉素 | 30 µg | 17-25 | 19-26 |
| 庆大霉素 | 10 µg | 19-26 | 19-27 |
| 阿米卡星 | 30 µg | 19-26 | 20-26 |
| 替米考星 | 15 µg | - | 17-21 |
| 多西环素 | 30 µg | 18-24 | 23-29 |
| 红霉素 | 15 µg | - | 22-30 |
| 泰乐菌素 | 60 µg | - | 19-25 |
| 恩诺沙星 | 5 µg | 32-40 | 27-31 |
| 环丙沙星 | 5 µg | 30-40 | 22-30 |
| 氟苯尼考 | 30 µg | 22-28 | 22-29 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 µg | 23-29 | 24-32 |

B.2 临床菌株的质控范围标准

表 B.2 大肠杆菌抑菌圈直径判定标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 抑菌圈直径 (mm) | | |
|------|-------|------------|-------|------|
| | | 敏感 S | 中介 I | 耐药 R |
| 头孢噻吩 | 30 µg | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| 链霉素 | 10 µg | ≥15 | 12-14 | ≤11 |
| 卡那霉素 | 30 µg | ≥18 | 14-17 | ≤13 |
| 庆大霉素 | 10 µg | ≥16 | 13-15 | ≤12 |

| | | | | |
|-------|---------------|-----|-------|-----|
| 阿米卡星 | 30 µg | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| 多西环素 | 30 µg | ≥14 | 11-13 | ≤10 |
| 恩诺沙星 | 5 µg | ≥23 | 17-22 | ≤16 |
| 环丙沙星 | 5 µg | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 µg | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

表 B.3 沙门菌抑菌圈直径判定标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 抑菌圈直径 (mm) | | |
|-----------|---------------|------------|-------|------|
| | | 敏感 S | 中介 I | 耐药 R |
| 头孢噻吩 | 30 µg | ≥21 | 18-20 | ≤17 |
| 阿莫西林-克拉维酸 | 20/10 µg | ≥18 | 14-17 | ≤13 |
| 庆大霉素 | 10 µg | ≥16 | 13-15 | ≤12 |
| 阿米卡星 | 30 µg | ≥17 | 15-16 | ≤14 |
| 多西环素 | 30 µg | ≥14 | 11-13 | ≤10 |
| 恩诺沙星 | 5 µg | ≥23 | 17-22 | ≤16 |
| 环丙沙星 | 5 µg | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 µg | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

表 B.4 金黄色葡萄球菌抑菌圈直径判定标准

| 抗菌药物 | 纸片含量 | 抑菌圈直径 (mm) | | |
|-----------|---------------|------------|-------|------|
| | | 敏感 S | 中介 I | 耐药 R |
| 青霉素 | 10 单位 | ≥29 | - | ≤28 |
| 阿莫西林-克拉维酸 | 20/10 µg | ≥20 | - | ≤19 |
| 卡那霉素 | 30 µg | ≥18 | 14-17 | ≤13 |
| 庆大霉素 | 10 µg | ≥15 | 13-14 | ≤12 |
| 红霉素 | 15 µg | ≥23 | 14-22 | ≤13 |
| 恩诺沙星 | 5 µg | ≥23 | 17-22 | ≤16 |
| 环丙沙星 | 5 µg | ≥21 | 16-20 | ≤15 |
| 复方新诺明 | 1.25/23.75 µg | ≥16 | 11-15 | ≤10 |

全国团体标准信息平台