

T/ZNZ

浙江省农产品质量安全学会团体标准

T/ZNZ 080—2021

畜禽源和养殖环境中沙门氏菌的分离及药敏试验方法

Isolation of *Salmonella* from livestock and poultry sources and breeding environment and its antimicrobial susceptibility testing

2021 - 09 - 17 发布

2021 - 10 - 17 实施

浙江省农产品质量安全学会 发布

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。

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省农产品质量安全学会提出并归口。

本文件起草单位：浙江省农业科学院、浙江省动物疫病预防控制中心、浙江国正检测技术有限公司。

本文件主要起草人：唐标、杨华、陈洁、代兵、吴静、马剑钢、周炜、汪行舟、王小骊、吉小凤、肖英平、汪雯、肖兴宁。

畜禽源和养殖环境中沙门氏菌的分离及药敏试验方法

1 范围

本文件规定了畜禽源和养殖环境中沙门氏菌分离及药敏试验的术语和定义、设备和材料、试剂、培养基和质控菌株、试验程序、样品处理、沙门氏菌分离及确证、微量肉汤稀释法药敏试验和生物安全的要求。

本文件适用于畜禽源和养殖环境中沙门氏菌的分离及药敏试验。

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 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.9 食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验
- GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求
- 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
- GB/T 28642 饲料中沙门氏菌的快速检测方法聚合酶链式反应（PCR）法
- WS/T 639 抗菌药物敏感性试验的技术要求
- T/ZNZ 044 畜禽养殖过程中细菌耐药性监测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

畜禽源 livestock and poultry source

源于猪、牛、羊、家禽等食品动物相关的组织、内容物、排泄物、分泌物等。

3.2

药敏试验 antimicrobial susceptibility testing

检测微生物（本文件特指细菌）对抗微生物药物（本文件特指抗菌药物）的体外敏感性，以指导临床合理选用药物的微生物学试验。

3.3

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。

3.4

折点 breakpoint

能预测临床治疗效果,用以判断测试菌株敏感 (Susceptible, S)、中介 (Intermediate, I) 和耐药 (Resistant, R) 的最低抑菌浓度 (MIC) 或抑菌圈直径 (mm) 的数值。

4 设备和材料

4.1 设备

开展细菌分离的微生物实验室应符合 GB 19489 生物安全二级实验室 (BSL-2) 要求,灭菌、培养和鉴定设备按 GB 4789.1 和 GB 4789.9 执行,其他设备如下:

- 微量移液器: 0.1 μL ~2.5 μL 、1 μL ~10 μL 、10 μL ~100 μL 、100 μL ~1 000 μL ;
- 电子天平: 感量 0.001 g;
- 自动加样仪或多通道微量加样器: 1 μL ~100 μL ;
- 核酸电泳仪;
- 凝胶成像系统;
- 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增仪;
- 恒温培养箱: $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- 冰箱: 2°C ~ 8°C 、 -20°C 、 -80°C ;
- 麦氏比浊管和浊度仪: 可测量范围 0.01 麦氏单位~4.00 麦氏单位;
- 质谱鉴定仪: 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪,含常见病原菌数据库。

4.2 材料

需要用到的相关实验材料如下:

- 无菌培养皿: 直径 60 mm、90 mm;
- 96 孔透明无菌微孔板: 每孔体积超过 100 μL ;
- 1 μL 一次性无菌接种环、10 μL 一次性无菌接种环;
- 一次性无菌采样拭子;
- 无菌水样采集袋、无菌棉棒、标准比浊管、冰袋;
- 商品化药敏试验板。

5 试剂、培养基和质控菌株

5.1 实验用水

培养基配制用水应符合 GB 4789.28 的规定,试剂配制用水应符合 GB/T 6682 的规定。

5.2 无菌生理盐水

无菌生理盐水的制备按 GB 4789.1 执行。

5.3 培养基

- 5.3.1 运送培养基：按 GB 4789.28 执行。
- 5.3.2 缓冲蛋白胨水（BPW）增菌液：按 GB 4789.4 执行。
- 5.3.3 亚硒酸盐胱氨酸（SC）增菌液：按 GB 4789.4 执行。
- 5.3.4 LB 琼脂培养基：按 T/ZNZ 044 执行。
- 5.3.5 XLT4 培养基：按附录 A 中表 A.1 执行。
- 5.3.6 MH 肉汤（Mueller-Hinton broth）：按 WS/T 639 执行。

5.4 试剂

- 5.4.1 沙门氏菌诊断血清试剂盒。
- 5.4.2 沙门氏菌显色培养基。
- 5.4.3 细菌 DNA 提取试剂盒。
- 5.4.4 沙门氏菌特异性 PCR 扩增引物。
- 5.4.5 PCR 扩增试剂盒。

5.5 质控菌株

沙门氏菌标准菌株 ATCC 14028 (*Salmonella typhimurium*, ATCC 14028)，保存、传代等要求应按照 GB 4789.28 的要求执行。

6 试验程序

沙门氏菌分离及药敏试验程序如图 1 所示。

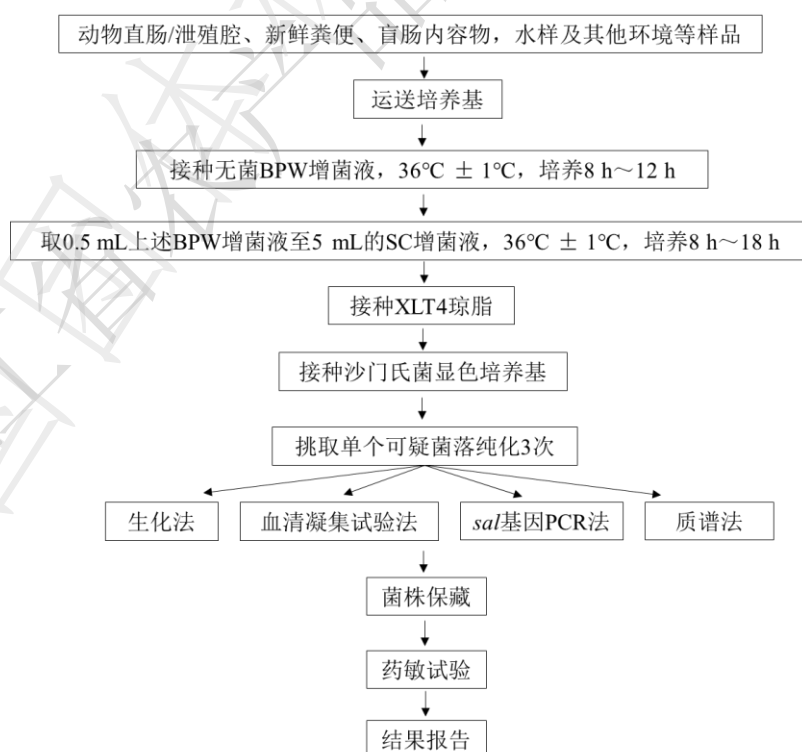


图1 沙门氏菌分离及药敏试验程序

7 样品处理

7.1 样品采集

7.1.1 直肠/泄殖腔拭子采集

用无菌生理盐水浸润一次性无菌采样拭子,伸入家畜直肠或家禽泄殖腔 1.5 cm~2.0 cm,旋转 2 圈~3 圈,立即将采样拭子置于 10 mL 运送培养基中冷藏。

7.1.2 新鲜粪便采集

用一次性采样拭子蘸取新鲜粪便,不应沾有泥土或其他污染物,立即将采样拭子及样品置于 10 mL 运送培养基中冷藏。

7.1.3 盲肠内容物采集

用一次性采样拭子蘸取盲肠内容物,立即置于 10 mL 运送培养基中冷藏。

7.1.4 环境水样采集

用无菌水样采集袋封口处直接接取 200 mL 左右环境水样,包括畜禽舍冲洗用水、降温用水以及养殖场生活污水等,避免带入外源污染物,密封后冷藏。

7.1.5 环境样本采集

用无菌棉棒擦拭各个养殖环境中物体表面,收集环境表面微生物,迅速置于无菌的含有 BPW 增菌液的密封袋中冷藏。

7.2 样品保存

样品采集后应密封保存,并加注样品标识,采样记录和样品编码应详尽。样品的保存应按照 GB 4789.1 的要求执行。

7.3 样品运输

采集的样品按 GB 4789.1 要求运达检验单位,运输时间不超过 24 h,运输工具应保持清洁,运输和装卸过程中应防止包装破损和样品渗漏。

7.4 样品接收

样品运至实验室时,应确认样品完好情况,应立即对样品进行增菌。

8 沙门氏菌分离及确证

8.1 增菌

8.1.1 BPW 增菌

8.1.1.1 采样拭子预增菌

在无菌环境下,将采样拭子从运送培养基中取出,置于 5 mL BPW 增菌液中搅动数次, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 180 rpm 培养 4 h~6 h。应将运送培养基中的蘸有样本的琼脂尽可能全部转移至增菌液中。

8.1.1.2 水样预增菌

50 mL 水样在 4℃、4 000 rpm 离心 5 min，将 0.5 mL 样品沉淀物加入 5 mL BPW 增菌液中，36℃ ± 1℃，180 rpm 培养 8 h~12 h。

8.1.1.3 环境样本预增菌

已置于 BPW 中的环境样本，置于 36℃ ± 1℃，180 rpm 培养 8 h~12 h。

8.1.2 SC 增菌

取 8.1.1 中 BPW 增菌液 0.5 mL 至 5 mL 的 SC 增菌液中，36℃ ± 1℃，静置培养 8 h~18 h。

8.2 分离

应采用两次选择性培养基进行筛选分离。

8.2.1 选择性培养基筛选

将 8.1.2 所述增菌液在 XLT4 培养基平板上划线，36℃ ± 1℃，培养 24 h~48 h，黑色或有黑色中心的菌落即为沙门氏菌可疑菌落，挑取单菌落进行显色培养基筛选。

8.2.2 显色培养基筛选

将 8.2.1 所述可疑单菌落划线于沙门氏菌显色培养基上，36℃ ± 1℃，培养 18 h~24 h，显色平板上呈品红色，直径约 2 mm 的菌落即为可疑沙门氏菌，对可疑菌落进行下一步确证。

8.3 纯化

挑取可疑菌落在 LB 琼脂培养基上进行划线培养，按 GB 4789.28 进行，获得的单菌落再重复操作 2 次，共对上述可疑菌落纯化 3 次。

8.4 确证

8.4.1 通用要求

菌株确证使用沙门氏菌的标准菌株进行对照。以下四种确证方法任选其一，结果阳性即可确认为沙门氏菌。

8.4.2 生化法

选择沙门氏菌疑似菌落进行生化确证，生化确证的具体方法应按照 GB 4789.4 的要求执行。

8.4.3 血清凝集试验法

选择沙门氏菌疑似菌落进行凝集试验，凝集试验采用商品化沙门氏菌诊断血清，判定按试剂盒说明所述。

8.4.4 PCR 法

8.4.4.1 DNA 提取

将沙门氏菌可疑菌落在 LB 平板上活化，挑取单菌落采用煮沸法或选用细菌 DNA 试剂盒提取细菌 DNA，具体操作应按照 GB/T 28642 的要求执行，

8.4.4.2 扩增

通过沙门氏菌特异性鉴定引物进行 PCR 扩增,具体引物序列及反应条件应按照 GB/T 28642 的要求执行。

8.4.4.3 PCR 结果判定

PCR 产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳观察,能扩增出相应大小条带的菌株即为沙门氏菌,具体操作按照 GB/T 28642 的要求执行。

8.4.5 质谱法

具体方法按照附录 B 中 B.1 执行。

8.5 菌株保藏

分离确证后的沙门氏菌菌株保藏应按照 GB 4789.28 的要求执行。

9 微量肉汤稀释法药敏试验

9.1 细菌培养

测试菌株和质控菌株在测试前应在 LB 琼脂上分别连续培养 2 次,以获得活化后的纯培养物。

9.2 药敏试验板准备

使用商品化药敏试验板时,按照药敏板说明书进行操作,若 MIC 范围符合美国临床和实验室标准协会 (CLSI M100) 标准则认为药敏试验板有效。

9.3 菌悬液制备

挑取活化后的单菌落转移至含 2 mL~3 mL 无菌生理盐水或 MH 肉汤的试管中混匀,用浊度仪和标准比浊管校正菌液浓度至 0.5 麦氏单位 ($\approx 1 \times 10^8$ CFU/mL),用 MH 肉汤稀释 100 倍,混匀备用,制备的菌悬液应在 15 min 内完成加样。

9.4 菌悬液加样

每块药敏试验板需设置阴性孔和阳性孔。阴性孔中加入无菌 MH 肉汤 100 μ L,阳性孔 (不含抗菌药物) 中加入制备好的 100 μ L 菌悬液,其余孔 (含不同梯度的抗菌药物) 各加入制备菌悬液 100 μ L,盖上无菌盖并标记菌株编号和时间等信息。

9.5 孵育

加样完成后于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~20 h。

9.6 质控

同一批次药敏试验应设置质控菌株的对照,菌悬液的制备、加样与孵育按 9.3、9.4、9.5 执行。

9.7 结果判定

9.7.1 结果观察

取出药敏试验板，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。

9.7.2 结果判读与记录

9.7.2.1 如阴性孔未见浑浊且阳性孔浑浊，则该药敏试验板结果有效，可进行 MIC 结果的判读；若出现单个跳孔现象，判读方法按照 WS/T 639 执行；出现两个以上跳孔现象的，则该次药敏试验无效，需重新检测。

9.7.2.2 质控菌株判读结果在 MIC 质控范围内，则认为该次药敏试验有效。

9.7.2.3 在 9.7.2.1 和 9.7.2.2 同时有效的前提下，可进行测试菌株的 MIC 的记录，按表 D.1 记录。

9.7.3 药敏试验结果的判读

根据测试菌株的 MIC 值，按照表 C.2 判定其耐药性，结果报告为敏感（S）、中介（I）或耐药（R）。对于没有规定折点的药物，报告其 MIC 值。

10 生物安全

10.1 开展细菌分离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。

10.2 废弃物处理应严格按照 GB 19489 的要求执行。

10.3 菌株管理按照中华人民共和国农业农村部令 16 号文件中动物病原微生物菌（毒）种保藏管理办法相关规定执行。

附 录 A

(规范性)

培养基

A.1 XLT4 培养基配方与配制方法

A.1.1 XLT4 培养基配方

XLT4 培养基成分见表 A.1。

表 A.1 XLT4 培养基成分

组分, 单位	用量
蛋白胨, g	1.6
酵母提取物, g	3.0
赖氨酸, g	5.0
木糖, g	3.75
乳糖, g	7.5
蔗糖, g	7.5
柠檬酸铁铵, g	0.8
硫代硫酸钠, g	6.8
氯化钠, g	5.0
酚红, g	0.08
琼脂, g	18.0
Tergitol-4, mL	4.6
蒸馏水, mL	1 000.0

A.1.2 XLT4 配制方法

取各成分溶于蒸馏水中, 调节 pH 至 7.4 ± 0.2 。边加热边搅动, 煮沸 1 min, 无需高压蒸汽灭菌, 冷至 $45^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$, 倾注平板。

附录 B

(规范性)

质谱确证方法

B.1 微生物质谱确证方法

B.1.1 靶板预备

在使用靶板前,应清洗质谱靶板并使用 80%三氟乙酸水溶液处理,或者使用一次性靶板。质谱靶板如存在严重刮伤应更换。

B.1.2 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (α -Cyano-4-hydroxy cinnamic acid, HCCA) 基质配制

在装有 HCCA 管中添加标准溶剂(乙腈 50%、水 47.5%和三氟乙酸 2.5%),使其最终浓度达到 10 mg/mL,使用涡旋混合器在室温下完全溶解 HCCA。溶解后的 HCCA 在 20°C~25°C室温条件下存放稳定期最长为一周。

B.1.3 质谱标准品配制及使用

在室温下将 50 μ L 标准溶剂加入到装有 BTS (Bacteria Testing Standards)固体颗粒的管子中,用移液枪上下吹打至少 20 次,使其完全溶解。在室温下离心 2 min,离心机转速 13 000 rpm。吸取 5 μ L 上清液分装至离心管中,并盖紧管盖。在-18°C 或更低温度下存放分装液。

将 1 μ L BTS 溶液放置在清洗后的质谱靶板上,在室温下晾干后滴加 1 μ L HCCA 基质,随后室温晾干。

B.1.4 待测细菌处理

待测细菌应是新鲜的纯培养物,使用新的无菌枪头或者新的无菌接种环挑取单菌落,以避免交叉污染。按 B.1.3 制备后放置在质谱靶板上必须在 24 h 之内测试。细菌培养物应在室温下保存,不可保存在冰箱中,否则会影响质谱图质量。

B.1.5 细菌上样

确认待分析的菌体具有符合实验室要求的明确标识。

B.1.5.1 为进行待测细菌跟踪,必须确保具有明确标识的细菌及其在质谱靶板上相应的位置经过确认和记录。

B.1.5.2 将新鲜培养的 1-3 个菌落以薄膜形式直接涂到清洗后的质谱靶板上;可使用移液枪吸头、一次性接种环或牙签。应该避免由于基质液滴溢出到另一样本中而导致不同样本混合。这种溢出会引起交叉污染,继而导致假性结果。

B.1.5.3 覆盖 1 μ L 70%甲酸水溶液,室温下自然晾干。需在 30 min 内进行下一步。

B.1.5.4 覆盖 1 μ L HCCA 基质溶液,室温下自然晾干,应观察到均质的细菌制备样。

B.1.5.5 再次检查待测细菌制备过程正确,以及无基质液滴溢出到另一位置中。

B.1.5.6 将质谱靶板立即放入质谱仪。

B.1.6 数据采集

B.1.6.1 谱图采集

打开数据采集软件，采集 BTS 样本质谱数据，进行校准。录入待测细菌标识信息，进行批处理采集谱图数据，并与仪器数据库中的标准谱图进行对比，生成鉴定报告，显示鉴定结果。也可选择数据库，调入待鉴定细菌的质谱数据进行逐个鉴定。

B.1.6.2 结果判定

可根据输出所得结果分值判定鉴定结果是否可靠，具体判定标准见表 B.1，若结果分值小于 2.0，则应重新采集谱图进行判定，不同品牌的仪器，根据各自仪器的细菌判定标准进行鉴定。

表 B.1 质谱鉴定技术指标

分值范围	结果	标记
2.300~3.000	极可靠的物种鉴定	(+++)
2.000~2.299	可靠的物种鉴定	(++)
1.700~1.999	可能可靠的物种鉴定	(+)
0.000~1.699	不可靠的物种鉴定	(-)

附 录 C

(资料性)

抗菌药物浓度及沙门氏菌折点判断标准

C.1 抗菌药物工作液的制备

测试的浓度范围取决于细菌的种类和抗菌药物，选择的范围应覆盖菌株的 MIC 最大值。使用 MH 肉汤和对倍稀释法将抗菌药物制成 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 至 512 $\mu\text{g/mL}$ 之间的梯度，具体抗菌药物名称及浓度范围见表 C.1。

表 C.1 抗菌药物名称及浓度范围

单位： $\mu\text{g/mL}$

抗菌药物	稀释浓度范围
氨苄西林	512~0.25
阿莫西林-克拉维酸	512/256~0.25/0.12
庆大霉素	512~0.25
大观霉素	512~0.25
四环素	512~0.25
多西环素	512~0.25
氟苯尼考	256~0.12
头孢噻呋	256~0.12
头孢他定	256~0.12
恩诺沙星	32~0.015
氧氟沙星	64~0.03
美罗培南	64~0.03
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶	32/608~0.06/0.12
磺胺异恶唑	512~0.25
安普霉素	64~0.03
黏菌素	256~0.12
乙酰甲喹	512~1

C.2 沙门氏菌对常见抗菌药物的折点判断标准

沙门氏菌对常见抗菌药物的折点判断标准见表 C.2。

表 C.2 沙门氏菌对常见抗菌药物的折点判断标准

抗菌药物种类	抗菌药物	折点判断标准 ($\mu\text{g/mL}$)		
		S	I	R
β -内酰胺类	氨苄西林	≤ 8	16	≥ 32
β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂	阿莫西林/克拉维酸	$\leq 8/4$	8/16	$\geq 32/16$
头孢类	头孢噻呋	≤ 2	4	≥ 8
	头孢他啶	≤ 4	8	≥ 16
碳青霉烯类	美罗培南	≤ 1	2	≥ 4
氨基糖苷类	大观霉素	≤ 32	64	≥ 128
	庆大霉素	≤ 4	8	≥ 16
	安普霉素	-	-	-
四环素类	多西环素	≤ 4	8	≥ 16
	四环素	≤ 4	8	≥ 16
氯霉素类	氟苯尼考	≤ 4	8	≥ 16
磺胺类	磺胺异噁唑	≤ 256	-	≥ 512
	甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$
喹诺酮类	恩诺沙星	≤ 0.5	0.25~1	≥ 2
	氧氟沙星	≤ 0.12	0.25-1	≥ 2
多肽类	黏菌素	≤ 2		≥ 4
喹噁啉类	乙酰甲喹	-	-	-

注：“-”表示没有相应判断标准。

附 录 D
(资料性)
沙门氏菌 MIC 统计表

D.1 沙门氏菌 MIC 统计表

沙门氏菌 MIC 统计表见表 D.1。

表 D.1 沙门氏菌 MIC 统计表

单位：μg/mL

编 号	氨 苄 西 林	阿 莫 西 林/ 克 拉 维 酸	头 孢 他 啶	头 孢 噻 吩	庆 大 霉 素	大 观 霉 素	四 环 素	多 西 环 素	氟 苯 尼 考	磺 胺 异 噁 唑	复 方 新 诺 明	恩 诺 沙 星	氧 氟 沙 星	美 罗 培 南	黏 菌 素	安 普 霉 素	乙 酰 甲 唑
注：直接填写检测的MIC数值																	

检测人：

检测时间：
