

畜禽源和养殖环境中弗格森埃希菌的分离 及药敏试验方法

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

2021 - 12 - 24 发布

2022 - 01 - 24 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化标准的结构和起草规则》的规定起草。

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：浙江省农业科学院农产品质量安全与营养研究所、佛山科学技术学院、浙江省动物疫病预防控制中心、浙江大学医学院附属第一医院、金华金婺农业发展有限公司。

本文件主要起草人：唐标、马剑钢、杨华、林家辉、刘璨颖、关椿久、吴静、陈洁、周炜、汪建妹、罗琦霞、冯伟峰、蒋春青、王小骊、吉小凤、肖英平、吕文涛、肖兴宁、汪雯、李锐。

引言

弗格森埃希菌 (*Escherichia fergusonii*)，肠杆菌科埃希氏菌属，无芽孢、周身鞭毛的杆状革兰氏阴性菌，兼性厌氧，不发酵乳糖、D-山梨醇，能利用 D-木糖、阿拉伯糖、核糖醇、L-鼠李糖、海藻糖、麦芽糖和纤维二糖，可引起腹泻等症状，是动物和人的条件致病菌。弗格森埃希菌作为大肠埃希菌的同属菌，对抗生素同样存在多重耐药性，频繁的从动物和人类感染组织中被分离出来，且具有致病性。此外，从前期研究和文献报道中发现，常规分离的大肠埃希菌存在一定比例被误判为弗格森埃希菌，从而给细菌流行性和疾病诊断造成困扰。因此，加强对弗格森埃希菌的分离及药敏试验十分必要。

畜禽源和养殖环境中弗格森埃希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弗格森埃希菌的分离及药敏试验的术语和定义、设备和材料、试剂、培养基与参考菌株、试验程序、样品处理、分离纯化、PCR鉴定、微量肉汤稀释法药敏试验及生物安全的要求。

本文件适用于畜禽源（指源于畜禽的组织、内容物、排泄物、分泌物和肉制品等）和养殖环境中弗格森埃希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 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数
- 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 4789.28 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
- WS/T 639 抗菌药物敏感性试验的技术要求
- T/ZNZ 044 畜禽养殖环节细菌耐药性监测方法
- CLSI M100 抗微生物药敏试验标准 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

药敏试验 antimicrobial susceptibility testing

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

3.2

最低抑菌浓度 minimal inhibitory concentration, MIC

采用肉汤稀释法等培养微生物进行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。

3.3

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, $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的数值。

4 设备和材料

4.1 设备

用于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 执行，其他设备如下：

- 生物安全柜；
- 微量移液器：0.1 μL ~2.5 μL 、1 μL ~10 μL 、10 μL ~100 μL 、100 μL ~1000 μL ；
- 自动加样仪或多通道微量加样器：10 μL ~100 μL ；
- 电子天平：感量 0.001 g；
- 麦氏比浊仪：可测量范围 0.01~4.00 麦氏单位；
- 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 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ；
- 低温贮藏箱；
- 冰箱：2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ ，-20 $^{\circ}\text{C}$ ，-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

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 或 90 mm；
- 96 孔透明无菌微孔板；
- 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；
- 商品化药敏试验板；
- 细菌 DNA 提取试剂盒；
- 弗格森埃希菌特异性 PCR 扩增引物；
- PCR 扩增试剂盒。

5 试剂、培养基和参考菌株

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 试剂

5.2.1 无菌生理盐水及其制备按 GB 4789.1 执行。

5.2.2 核糖醇（adonitol）母液及制备按附录 A 中 A.1 执行。

5.3 培养基

- 5.3.1 Carry-Blair 转运培养基 (Carry-Blair Transport Medium) 及其制备按 GB 4789.28 执行。
- 5.3.2 LB (Luria-Bertani) 琼脂平板及其制备按 T/ZNZ 044 执行。
- 5.3.3 缓冲蛋白胨水 (Buffered Peptone Water, BPW) 及其制备按 GB 4789.4 执行。
- 5.3.4 西蒙氏枸橼酸盐琼脂 (Simmons Citrate Agar, SCA) 平板其制备按附录 A 中表 A.1 执行。
- 5.3.5 mFC 琼脂平板及其制备按附录 A 中表 A.2 执行。
- 5.3.6 MH 肉汤 (Mueller-Hinton broth) 及其制备按 WS/T 639 执行。

5.4 参考菌株

5.4.1 质控菌株

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 标准菌株 ATCC 25922, 保存、传代等要求应按照 GB 4789.28 的要求执行。

5.4.2 阳性对照菌株

弗格森埃希菌 (*Escherichia fergusonii*) 标准菌株 ATCC 35469, 保存、传代等要求应按照 GB 4789.28 的要求执行。

6 试验程序

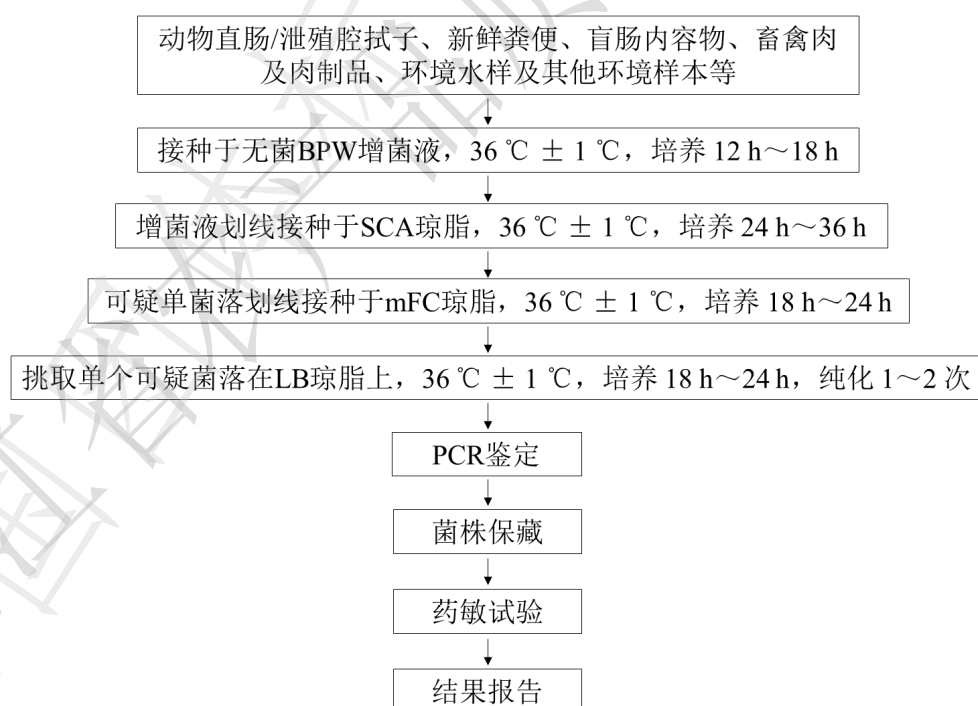


图1 弗格森埃希菌分离及药敏试验程序

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棉棒，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 转运培养基中。

7.1.2 新鲜粪便采集

用一次性无菌棉棒蘸取新鲜粪便，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 转运培养基中。

7.1.3 盲肠内容物采集

用一次性无菌棉棒蘸取盲肠内容物，立即置于 10 mL 转运培养基中。

7.1.4 畜禽肉及肉制品采集

采集屠宰场、批发市场、超市及农贸市场等的畜禽肉及肉制品，每个样品量不少于 50 g，置于无菌采集袋中，密封冷藏。

7.1.5 环境水样采集

用无菌水样采集袋收集 50 mL 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，密封后冷藏。

7.1.6 环境样本采集

用无菌棉棒擦拭养殖环境中的笼子、料槽、水槽、围墙等各个物体的表面 (>4 cm²)，收集环境表面微生物，迅速置于含有BPW增菌液的密封袋中，冷藏。

7.2 样品保存

样品采集后应密封置于 2 °C~8 °C 保存，且需要避免交叉污染，并加注样品标识，保留采样记录和样品编码，应按照GB 4789.1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，运输过程中应防止包装破损导致样品渗漏。

7.4 样品接收

样品运回实验室时，应确认样品完好情况，拭子样品可在 2 °C~8 °C 保存不超过 5 d 后增菌，其他样品应立即进行增菌。

8 分离纯化

8.1 增菌

拭子样品在 5 mL BPW增菌液中搅动数次；组织样本参照GB 4789.3制备匀液，取 0.5 mL接种于 5 mL BPW增菌液中；水样样本直接取 0.5 mL接种于 5 mL BPW增菌液中。接种后的增菌液在 36 °C ± 1 °C条件下 180 r/min 培养 12 h~18 h。

8.2 筛选

8.2.1 SCA 琼脂平板培养

蘸取按8.1培养后的增菌液，划线接种于SCA琼脂平板，置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h~36 h。菌落中心若有橙黄色沉淀，可判定为疑似弗格森埃希菌。

8.2.2 mFC 琼脂平板培养

将8.2.1所述疑似单菌落划线于mFC琼脂平板上， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 18 h~24 h。平板上呈透明无色、灰色或淡红色的菌落可判定为疑似弗格森埃希菌。

8.3 纯化

将8.2.2所述可疑单菌落划线于LB琼脂平板上， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 12 h~18 h，纯化可进行 1~2次。

9 PCR 鉴定

9.1 DNA 提取

从8.3纯化后的LB琼脂平板挑取单菌落于 100 μL 双蒸水中煮沸 10 min，冰浴后 10 000 r/min离心 2 min，取上清液作为DNA模板。或挑取单菌落在LB液体培养基中， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 200 r/min振荡培养4 h~6 h，取 1 mL菌液 10 000 r/min离心 2 min后，弃去培养基，采用细菌DNA提取试剂盒提取基因组DNA。阴性和阳性对照采用相同方法提取。

9.2 PCR 扩增

通过弗格森埃希菌特异性鉴定引物进行PCR扩增，扩增过程中均需要设置阴性对照和阳性对照，阴性对照使用无菌水，阳性对照使用阳性菌株以相同提取方式获得的基因组DNA。引物序列及反应条件应符合附录B的规定。

9.3 结果判定

PCR产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳观察，在500 bp~600 bp 间能扩增出特异性条带，与阳性对照条带一致的菌株可判定为弗格森埃希菌。

9.4 菌株保藏

弗格森埃希菌的分离株保藏参照GB 4789.28执行。

10 微量肉汤稀释法药敏试验

10.1 细菌培养

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

10.2 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。

10.3 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。

10.4 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。

10.5 孵育

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

10.6 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 10.3、10.4、10.5 执行。

10.7 结果判读与记录

10.7.1 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。

10.7.2 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。

10.7.3 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。

10.7.4 在 10.7.2 和 10.7.3 同时有效的前提下，参照 T/ZNZ 044 中大肠埃希氏菌药敏试验方法进行测试菌株 MIC 的记录。

10.8 药敏试验结果报告

根据测试菌株的 MIC 值，参照 T/ZNZ 044 中的大肠埃希氏菌药敏试验方法判定其耐药性，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。

11 生物安全

11.1 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。

11.2 废弃物处理应严格按照 GB 19489 规定执行。

11.3 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）种保藏管理相关规定执行。

附 录 A
(规范性)
试剂及培养基

A.1 SCA 琼脂平板

A.1.1 核糖酵母液

称取 4.0 g 核糖醇粉末，溶解于一定量的蒸馏水中，定容至 100.0 mL，过滤除菌，2 °C~8 °C 冷藏备用。

A.1.2 SCA 基础培养基

SCA 基础培养基配方见表 A.1。

表 A.1 SCA 基础培养基配方

组分, 单位	用量
七水硫酸镁, g	0.2
氯化钠, g	5.0
磷酸二氢铵, g	1.0
溴麝香草酚蓝, g	0.08
磷酸氢二钾, g	1.0
柠檬酸钠, g	5.0
琼脂, g	13.0
蒸馏水, mL	定容至 1000.0

A.1.3 SCA 琼脂平板配制方法

称取基础培养基各组分于一定量的蒸馏水中，加热煮沸至完全溶解，调节 pH 至 6.8 ± 0.2 ，定容至 1.0 L，121 °C 高压灭菌 15 min，冷却至 45 °C~50 °C，按 1:20 的比例添加核糖酵母液倾注平板。

A.2 mFC琼脂平板

A.2.1 mFC培养基配方

mFC培养基配方见表A.2。

表A.2 mFC培养基配方

组分, 单位	用量
多价蛋白胨, g	5.0
胰蛋白胨, g	10.0
乳糖, g	12.5
酵母粉, g	3.0
三号胆盐, g	1.5
氯化钠, g	5.0
苯胺蓝, g	0.2
琼脂, g	15.0
玫红酸, g	0.1
蒸馏水, mL	定容至 1 000.0

A.2.2 mFC琼脂平板配制方法

称取各成分, 于一定量的蒸馏水中加热煮沸至溶解完全, 调节 pH 至 7.4 ± 0.2 , 定容至 1.0 L, 冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 倾注平板。

附 录 B
(规范性)
PCR 引物、反应条件及结果对照

B.1 PCR引物

弗格森埃希菌 PCR 引物见表 B.1。

表 B.1 弗格森埃希菌PCR引物

引物名称	引物序列 (5'-3')	扩增片段 长度 (bp)
EF-F	AGATTCACGTAAGCTGTTACCTT	575
EF-R	CGTCTGATGAAAGATTTGGGAAG	

B.2 PCR反应条件

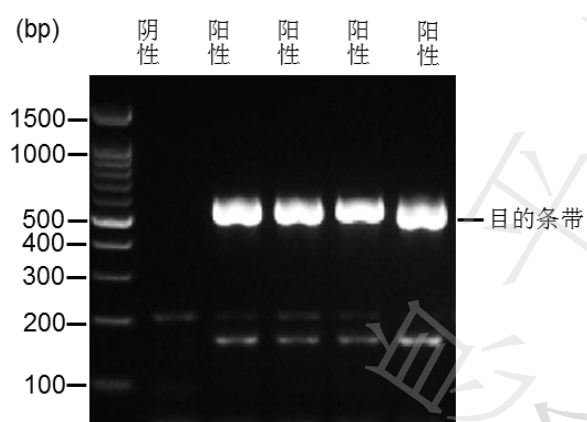
B.2.1 PCR程序

94 °C 预变性 5 min;
94 °C 变性 20 s;
55 °C 退火 20 s;
72 °C 延伸 30 s;
第 2 到第 4 步循环 34 次;
72 °C 延伸 5 min。

B.2.2 PCR反应体系

PCR 反应体系为 30 μ L: 15 μ L 2 \times Taq PCR Mix, 1 μ L 引物 EF-F (10 μ M), 1 μ L 引物 EF-R (10 μ M), 12 μ L ddH₂O, 每个体系含 1 μ L DNA 模板。

B.3 结果对照



图B.2 弗格森埃希菌PCR鉴定

用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检验目的条带，阴阳性对照成立条件下，通过观察 575 bp 处是否出现目的条带（图B.2），通过测序进一步确证弗格森埃希菌。