

ICS 11.220

CCS B 42

# DB42

湖 北 省 地 方 标 准

DB42/T 1679—2021

## 副猪嗜血杆菌对替米考星的敏感性检测

Susceptibility test of *Glaesserella parasuis* to tilmicosin

地方标准信息服务平台

2021-05-12 发布

2021-07-12 实施

湖北省市场监督管理局 发布



## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 仪器和设备 .....	1
5 试剂或材料 .....	1
6 细菌分离培养和鉴定 .....	2
7 体外敏感性检测 .....	2
8 质控菌和质控药 .....	3
9 结果判定 .....	3
附录 A（资料性） 微量肉汤稀释法 96 微孔板加样操作示意图 .....	4

地方标准信息服务平台



## 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。

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这些专利的责任。

本文件由华中农业大学提出。

本文件由湖北省农业农村厅归口。

本文件起草单位：华中农业大学、武汉科维安检测科技有限公司。

本文件主要起草人：郝海红、袁宗辉、赵俊龙、黄玲利、王玉莲、陈冬梅、陶燕飞、彭大鹏、王旭、潘源虎、贺兰、谢书宇、程古月、瞿玮、蔡旭旺、徐小娟、张朋。

本文件实施应用中的疑问，可咨询湖北省农业农村厅，联系电话：027-87665821，邮箱 hbsnab@126.com；本文件的有关修改意见建议请反馈至华中农业大学动物科技-动物医学学院，联系电话027-87287140-8115，邮箱：haohaihong@mail.hzau.edu.cn。

地方标准信息服务平台



# 副猪嗜血杆菌对替米考星的敏感性检测

## 1 范围

本文件规定了副猪嗜血杆菌对替米考星的体外敏感性检测方法。

本文件适用于检测和判断兽医临床分离的副猪嗜血杆菌对替米考星的敏感性，合理应用替米考星治疗副猪嗜血杆菌感染。

## 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 34750 副猪嗜血杆菌检测方法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 仪器和设备

- 4.1 冰箱：2℃~4℃和-20℃。
- 4.2 恒温培养箱：37℃±1℃。
- 4.3 电子天平：感量0.00001g，0.001g，0.1g。
- 4.4 微量加样器：1μL~1000μL。
- 4.5 显微镜。
- 4.6 台式冷冻离心机。
- 4.7 细菌多位点接种仪。
- 4.8 生物安全柜：II级及以上。

## 5 试剂或材料

- 5.1 替米考星标准品。
- 5.2 无支原体胎牛血清。
- 5.3 无菌96孔微孔板：带盖。
- 5.4 微孔滤膜：0.22μm。
- 5.5 无菌加样槽。
- 5.6 麦氏比浊管：0.5麦氏浊度。
- 5.7 1%辅酶I(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，NAD)：准确称取0.01g NAD，用灭菌去离子水溶解并定容至10mL，0.22μm滤膜过滤，配制成1% NAD。
- 5.8 胰蛋白胍大豆琼脂(TSA)培养基：准确称取胰蛋白胍大豆琼脂8g，加188mL去离子水，摇匀，121℃高压灭菌15min，冷至45℃左右，加入10mL无支原体胎牛血清和2mL 1%NAD，混匀，配制成200mL

TSA 培养基。生物安全柜中，取 20 mL 倾入无菌平皿，晾干。4 °C 保存备用。其他体积 TSA 培养基可按此比例调整配制。

5.9 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基：准确称取胰蛋白胨大豆肉汤 6 g，加 188 mL 去离子水，摇匀，121 °C 高压灭菌 15 min，冷至 45 °C 左右时加入 10 mL 无支原体胎牛血清和 2 mL 1% NAD，配制成 200 mL TSB 培养基。现配现用。其他体积 TSB 培养基，可按此比例调整配制。

5.10 替米考星标准储备液：按替米考星标准品纯度和比例准确称取替米考星标准品，放置于 10 mL 容量瓶中，添加甲醇并定容至 10 mL，-20 °C 避光保存。推荐替米考星储备液的范围为 256 µg/mL~2560 µg/mL。

## 6 细菌分离培养和鉴定

副猪嗜血杆菌的分离、鉴定和检测按照GB/T 34750确定的方法和流程。

## 7 体外敏感性检测

### 7.1 方法选择说明

副猪嗜血杆菌对替米考星的敏感性试验方法：琼脂稀释法（参见本文件7.2）和微量肉汤稀释法（参见本文件7.3）。操作时任选其一即可。

### 7.2 琼脂稀释法

#### 7.2.1 菌悬液制备

细菌复苏于TSA培养基中，传代二次，挑取单菌落至TSB肉汤，振荡培养16 h~24 h至对数生长期。将菌液用TSB肉汤稀释至0.5麦氏浊度，菌液浓度约为 $1 \times 10^8$  CFU/mL。用TSB肉汤进行10倍稀释，使细菌浓度达到 $1 \times 10^7$  CFU/mL。

#### 7.2.2 替米考星的倍比稀释

将2560 µg/mL替米考星标准储备液，用TSB肉汤依次两倍系列稀释为0.62 µg/mL~1280 µg/mL，配制成含12个浓度梯度的倍比稀释液。

#### 7.2.3 含药 TSA 平板的制备

取18 mL灭菌未凝固TSA培养基，冷却至45 °C左右，加1 mL无支原体胎牛血清（5%）、200 µL NAD（1%）和2 mL替米考星倍比稀释液（参见本文件7.2.2），涡旋混匀，倾入培养皿，制备成替米考星TSA平板，晾干后置于-4 °C备用。

#### 7.2.4 替米考星 TSA 平板浓度范围

替米考星TSA平板浓度范围为0.06 µg/mL~128 µg/mL，含12个浓度梯度。根据临床条件，替米考星TSA平板的浓度范围可适当缩小至0.06 µg/mL~32 µg/mL，含10个浓度梯度。

#### 7.2.5 药敏试验细菌点样

在生物安全柜中，吸取1 mL菌悬液（浓度为 $1 \times 10^7$  CFU/mL）至细菌多位点接种仪中；将接种仪的点样针置于点样孔中，蘸取1 µL~2 µL菌悬液，使平板上的点菌量在 $10^4$  CFU~ $10^5$  CFU，于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h~32 h。



### 7.2.6 最小抑菌浓度 (MIC) 结果记录

确定无菌无药平板中无菌生长, 含菌无药平板中菌株生长。以替米考星含药平板上无细菌生长的最低药物浓度为其MIC。

## 7.3 微量肉汤稀释法

### 7.3.1 菌悬液制备

采用7.2.1的方法制备菌悬液, 用TSB肉汤稀释, 制备 $10^5$  CFU/mL菌悬液。

### 7.3.2 替米考星浓度稀释

微孔板每孔加TSB 100  $\mu$ L。A-F排第一孔加256  $\mu$ g/mL替米考星储备液 (参见本文件5.10) 100  $\mu$ L, 移液器吹打混匀; 从第一孔吸取100  $\mu$ L加入第二孔, 移液器吹打混匀; 以此重复进行二倍稀释, 直至第12列最后一孔, 吸出100  $\mu$ L弃掉。操作示意图见附录A。

### 7.3.3 加菌液

微孔板A-C三排每孔加同一株菌的菌悬液 (参见本文件7.3.1) 100  $\mu$ L, 即同一株菌设3个平行重复。D-F三排加另一株菌的菌悬液。G排每孔加200  $\mu$ L TSB肉汤, 作为阴性对照; H排每孔加100  $\mu$ L菌液和100  $\mu$ L TSB肉汤, 作为阳性对照。微孔板于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养18 h~24 h。操作示意图见附录A。

### 7.3.4 微孔板中替米考星浓度范围

微孔板中替米考星浓度范围是0.03  $\mu$ g/mL~64  $\mu$ g/mL, 含12个倍比浓度梯度。据临床条件, 替米考星浓度范围可适当缩小至0.06  $\mu$ g/mL~32  $\mu$ g/mL, 含10个浓度梯度。

### 7.3.5 最小抑菌浓度 (MIC) 结果记录

确定无菌无药孔中无菌生长, 无药含菌对照孔中菌株生长。以孔内无细菌生长的最低药物浓度为MIC。当出现单一跳孔时, 需记录抑制细菌生长的最高药物浓度; 当出现多处跳孔, 需重复试验。

## 8 质控菌和质控药

粪肠球菌ATCC 29212为药敏试验质控菌。替米考星为药敏试验质控药。粪肠球菌ATCC 29212对替米考星的最小抑菌浓度 (MIC) 的质控范围为8  $\mu$ g/mL~32  $\mu$ g/mL。每次药敏试验需保证质控药对质控菌的MIC在质控范围中。

## 9 结果判定

副猪嗜血杆菌对替米考星的敏感性和耐药性折点宜为1  $\mu$ g/mL和16  $\mu$ g/mL。

当体外敏感性实验测定的替米考星对临床副猪嗜血杆菌的MIC $\leq$ 1  $\mu$ g/mL时, 该菌对替米考星敏感, 结果记录为S; 当MIC $\geq$ 16  $\mu$ g/mL时, 该菌对替米考星耐药, 结果记录为R; 当MIC在1  $\mu$ g/mL~16  $\mu$ g/mL之间, 则为非敏感中介状态, 结果记录为I。

附录 A

(资料性)

微量肉汤稀释法 96 微孔板加样操作示意图

图A.1 给出了微量肉汤稀释法中，在96微孔板中倍比稀释替米考星和添加菌悬液的操作方法。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	a)肉汤 100μl b)药物 100μl c)菌液① 100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
B	同 A 排											
C	同 A 排											
D	a)肉汤 100μl b)药物 100μl c)菌液② 100μl											
E	同 D 排											
F	同 D 排											
G	阴性对照											
H	阳性对照											

图 A.1 微量肉汤稀释法 96 微孔板加样操作示意图

地方标准信息服务平台