

DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB50/T 1607—2024

水生动物细菌性病原菌耐药检测技术规范

地方标准信息服务平台

2024 - 07 - 08 发布

2024 - 10 - 08 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。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由重庆市水产技术推广总站提出。

本文件由重庆市农业农村委员会归口并组织实施。

本文件起草单位：重庆市水产技术推广总站、中国水产科学研究院长江水产研究所、西南大学、重庆市水产学会。

本文件主要起草人：张利平、王波、陈波、李虹、梅会清、翟旭亮、廖雨华、周勇、朱成科、卓东渡、冯俊、薛明洋、薛洋、徐凤、甘婷婷、吴晓清、周春龙、刘晓莉、何忠谊。

地方标准信息服务平台

水生动物细菌性病原菌耐药检测技术规范

1 范围

本文件规定了水生动物细菌性病原菌耐药检测的试剂、仪器设备、药敏实验、结果判定、无害化处理和病原微生物实验室生物安全等技术要求。

本文件适用于水生动物细菌性病原菌耐药检测。

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

SC/T 7015 病死水生动物及病害水生动物产品无害化处理规范

SC/T 7028 水产养殖动物细菌耐药性调查规范 通则

SC/T 7201.1 鱼类细菌性病检疫技术规程 第1部分：通用技术

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS/T 639 抗菌药物敏感性试验的技术要求

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

在药物敏感性检测实验中能抑制肉眼可见微生物生长的最低抗菌药物浓度。

3.2

敏感 Susceptible; S

当抗菌药物对分离株的MIC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。

3.3

耐药 Resistant; R

当抗菌药物对分离株的MIC处于该分类范围时，该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，临床治疗效果不佳。

4 试剂

4.1 实验

实验用水、NaCl、脑心浸液肉汤、脑心浸液琼脂培养基。试剂配制应符合附录A的规定。实验用水应符合GB/T 6682中一级水的规定。

4.2 耗材

96孔药敏板、“V”型加样槽(30°~45°)。

5 仪器设备

超净工作台、生物安全柜、医用冰箱、高压灭菌锅、生化培养箱、麦氏浊度仪、移液器。

6 药敏试验

6.1 单菌落制备

6.1.1 将已鉴定的病原菌在脑心浸液琼脂平板(或者选用已知的适宜培养基)上进行平板划线, 28 °C ±2 °C培养 16 h~24 h。

6.1.2 待测菌株应为单菌落。单菌落的制备可参考 SC/T 7201.1 中分离和纯培养方法进行。

6.2 菌悬液制备

无菌棉签挑取单个菌落于5 mL无菌生理盐水的比浊管中混匀, 麦氏浊度仪测量, 使其达到0.5麦氏单位浓度的菌悬液, 标记为A管。菌悬液应在15 min内使用。

6.3 96孔药敏板加样

6.3.1 取1支10 mL的无菌脑心浸液肉汤, 以无菌操作方式向空白对照孔中分别加入100 μL无菌脑心浸液肉汤。

6.3.2 另取一支10 mL的无菌脑心浸液肉汤, 从A管中吸取200 μL菌悬液加入到其中, 记为B管。

6.3.3 将B管中菌液混匀后倒入无菌“V”型槽内。

6.3.4 利用移液器吸取“V”型槽内的菌液, 加入到所有微孔中(空白对照除外), 每孔100 μL。空白对照孔最后加入100 μL无菌生理盐水。96孔药敏板所用药物及药物浓度见附录B。

6.3.5 将加样后的96孔药敏板放置于28 °C ±2 °C生化培养箱中培养24 h~48 h后读取结果。

6.4 结果读取

若阴性对照孔底浑浊, 或阳性对照孔澄清, 则此次试验无效, 重新进行实验。若阴性对照孔底澄清, 阳性对照孔浑浊, 则与阳性对照孔比较, 孔底内液体浑浊则为阳性(+); 孔底内液体澄清, 则为阴性(-)。微孔内抑制肉眼可见微生物生长的最低抗菌药物浓度为MIC。当出现单一跳孔时, 应记录抑制细菌生长的最高药物浓度。

结果读取参考附录C 96孔药敏板结果参考图。

6.5 质量控制

标准菌株宜为大肠埃希菌(ATCC25922)。标准菌株药敏实验同步步骤6.1~6.4规定方法进行。

7 结果判定

对照受试菌的MIC, 依据SC/T 7028中规定要求, 将菌株判定为敏感(S)、中介(I)或耐药(R)。

8 无害化处理

实验过程中所用的器皿、耗材及产物均需要经过121 ℃，15 min高压灭菌后，方可处置。

9 生物安全防护

实验人员必须穿着合适的实验服、佩戴好口罩、帽子及一次性手套。进行活体处理或接触含有微生物的物品后，要洗手。离开实验室前要脱掉手套，一次性手套不得清洗和再次使用。如果发生污染性物质溢出等事故，应及时向实验室负责人报告，并记录经过和处理方案。

禁止在实验室饮食、吸烟、化妆和储存食物。非工作人员禁止进入实验室。

地方标准信息服务平台

附录 A
(规范性)
试剂配制

A.1 灭菌生理盐水

A.1.1 配方

NaCl	8.5 g
水	1000 mL

A.1.2 配制

混匀，121 °C 高压灭菌 15 min，备用。

A.2 脑心浸液 (BHI) 肉汤

A.2.1 配方

脑心浸液肉汤培养基	50.0 g
水	1000 mL

A.2.2 配制

混匀，加热使之完全溶解，用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节 pH，使灭菌后为 7.2~7.4。分装烧瓶，121 °C，高压灭菌 15 min。4 °C 保存备用。

A.3 脑心浸液 (BHI) 琼脂平板

A.3.1 配方

脑心浸液琼脂培养基	24.5 g
水	1000 mL

A.3.2 配制

混匀，加热使之完全溶解，用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调节 pH，使灭菌后为 7.2~7.4。分装烧瓶，121 °C，高压灭菌 15 min，冷却至 50 °C 左右，制成平板。4 °C 保存备用。

附 录 B
(资料性)
96 孔板药敏板的制备

B.1 试剂和材料

B.1.1 抗菌药物标准品

恩诺沙星、硫酸新霉素、甲矾霉素、氟苯尼考、盐酸多西环素、氟甲喹、磺胺间甲氧嘧啶钠、磺胺甲噁唑+甲氧苄啶

B.1.2 溶剂与稀释剂

各药物的溶剂与稀释剂见表B.1。试验用水应符合GB/T 6682中三级水的要求

表 B.1 抗菌药物储备液所用的溶剂和稀释剂

药物名称	储备液浓度 $\mu\text{g}/\text{mL}$	溶剂	稀释剂
恩诺沙星	100	1/2体积的水和最小浓度为2.5 mol/L NaOH至溶解	水
硫酸新霉素	2500	水	水
甲矾霉素	5120	0.1N二甲基甲酰胺溶液	水
氟苯尼考	5120	95%乙醇	水
盐酸多西环素	1280	水	水
氟甲喹	2560	1/2体积的水和最小浓度为2.5 mol/L NaOH至溶解	水
磺胺间甲氧嘧啶钠	10240	1/2体积的水和最小浓度为2.5mol/L NaOH至溶解	水
磺胺甲噁唑	6080	1/2体积的水和最小浓度为2.5mol/L NaOH至溶解	水
甲氧苄啶	320	0.05 mol乳酸或盐酸，终体积的10%	水
注1：复方药物，先单独配置与储存，做药物敏感性试验时，再按1:1等体积混合使用。			
注2：恩诺沙星为盐类时，溶剂为水。			
注3：若药物有所析出，稍微温热使其溶解。			

B.1.3 抗菌药物稀释

取灭菌的BHI肉汤，在无菌96孔板的第1孔加入160 μL 。在第2孔至第10孔中分别加入100 μL 。在第1孔中加入抗菌药储备液40 μL ，吹打混匀；取第1孔中的含药肉汤100 μL 至第2孔中吹打混匀；吸取第2孔中的100 μL 含药肉汤至第3孔中吹打混匀，重复上述操作，将药物进行2倍梯度稀释，当第12孔稀释完后吸出100 μL 含药肉汤弃去，使含有药物的BHI肉汤每一孔均为100 μL 。其中坐标G11、G12、H11、H12，各加100 μL BHI肉汤，作为阳性对照孔和阴性对照孔。药敏板药物及药物浓度见表B.2。

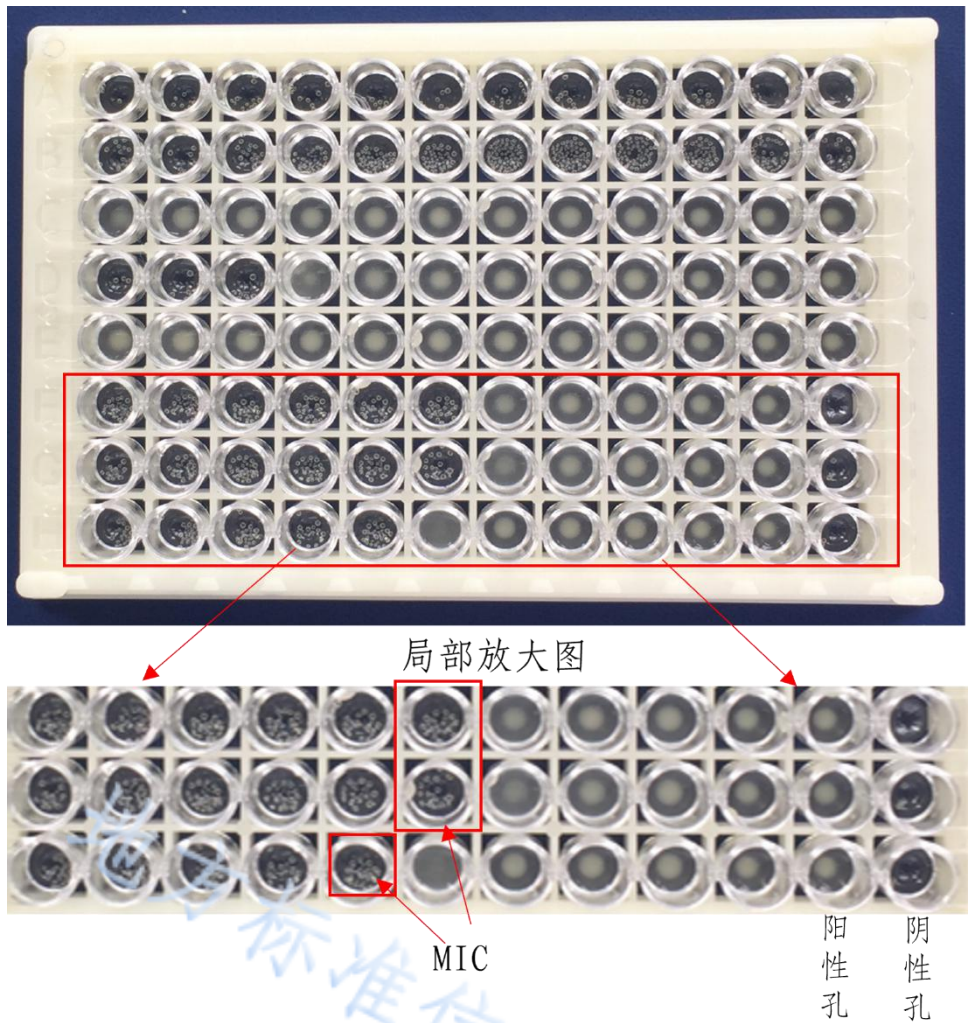
表 B.2 药敏板药物及药物浓度

药物名称		浓度 ($\mu\text{g/mL}$)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	恩诺沙星	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	0.008
B	硫酸新霉素	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
C	甲砒霉素	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
D	氟苯尼考	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
E	盐酸多西环素	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06
F	氟甲喹	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
G	磺胺间甲氧嘧啶钠	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	阳性 对照	阳性 对照
H	磺胺甲噁唑 +甲氧苄啶	608/32	304/16	152/8	76/4	38/2	19/1	9.5/ 0.5	4.8/ 0.25	2.4/ 0.12	1.2/0. 06	阴性 对照	阴性 对照

地方标准信息服务平台

附录 C
(资料性)
96 孔药敏板结果参考图

C.1 96 孔药敏板结果参考图见图 C.1。



图C.1 96孔药敏板结果参考图