

ICS 11.220

CCS B 41

团 体 标 准

T/CVMA 98—2022

猫癣源真菌的药物敏感性试验 纸片扩散法

Drug sensitivity test disk diffusion of fungi from cats

2022 - 10 - 26 发布

2022 - 10 - 26 实施

中 国 兽 医 协 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。

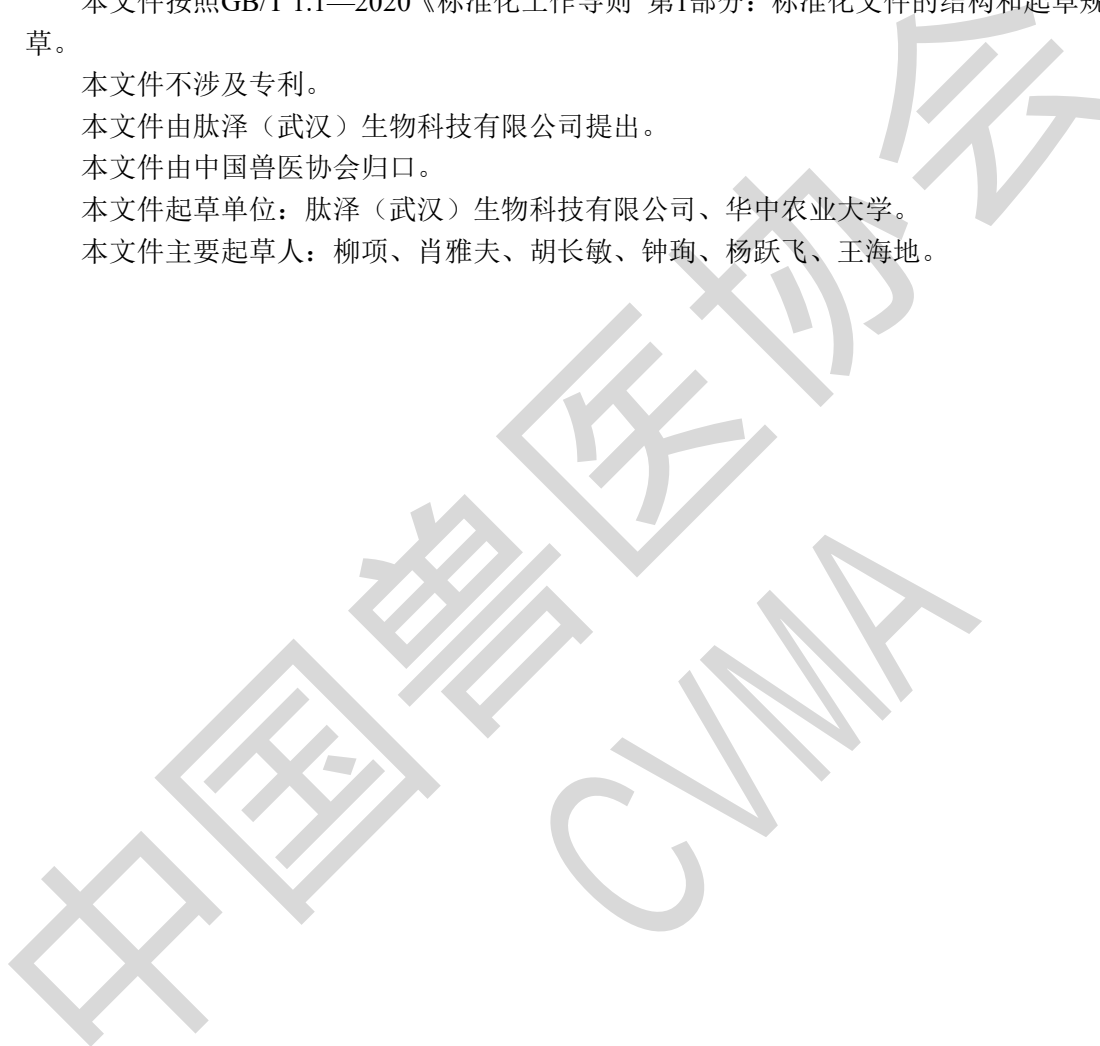
本文件不涉及专利。

本文件由肽泽（武汉）生物科技有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：肽泽（武汉）生物科技有限公司、华中农业大学。

本文件主要起草人：柳项、肖雅夫、胡长敏、钟珣、杨跃飞、王海地。



猫癣源真菌的药物敏感性试验 纸片扩散法

1 范围

本文件规定了猫癣源真菌体外药物敏感性试验纸片扩散法的试验条件、试剂与耗材、仪器设备、样品、试验步骤、结果判读。

本文件适用于用纸片扩散法开展猫癣源真菌体外药物敏感性检测试验。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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)

该抗真菌药物对猫癣源真菌具有强的抑制其生长或杀灭能力。

3.2

中敏 Intermediate (I)

该抗真菌药物对猫癣源真菌具有一定的抑制其生长或杀灭能力。

3.3

耐药 Resistant (R)

该抗真菌药物对猫癣源真菌无或仅有较弱的抑制其生长或杀灭能力。

4 试验条件

4.1 生物安全要求

所有样品、培养物和废弃物的处置应符合 GB 19489 的规定。

4.2 防污染措施

防污染措施应符合 GB/T 27401 的规定。

5 试剂与耗材

药敏纸片：特比萘芬（30 μg/片）、伊曲康唑（8 μg/片）、氟康唑（15 μg/片）、酮康唑（15 μg/片）。沙氏葡萄糖琼脂培养基、含 0.1%吐温-20 的 0.85%无菌生理盐水、Diff-Quick 染色液。

注：Diff-Quick 染色液为商品化试剂。

6 仪器设备

恒温恒湿培养箱：精度（28±1）℃、无菌操作台、接种环、高压灭菌锅、显微镜、振荡器、移液器、麦氏比浊仪：量程 0 mL~1 mL、游标卡尺：精度 0.02 mm。

7 样品

7.1 样品采集与运输

样品采集及运输按照 NY/T 541 的规定执行。

7.2 样品保存

采集或处理好的样品在 2℃~8℃应保存不超过 24 h。如需长期保存，应置-70℃以下保存，避免反复冻融。

7.3 真菌分离与鉴定

接种了样品的培养基放置于 28℃恒温培养箱中进行培养 3 d~21 d，待菌落生长到肉眼可观察的合适大小且周围不与其他菌落相互连接成片时，使用无菌接种环挑取少量菌丝，重新接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基中再度于 28℃培养，进行菌种的分离纯化。对分离得到的菌株进行 Diff-Quick 染色镜检，根据其镜下菌丝形态、大分生孢子或小分生孢子形态初步判断其菌种。也可收集纯培养样本通过 PCR 扩增测序或质谱法进行菌种鉴定，真菌鉴定方法按附录 A 操作。

8 试验步骤

8.1 待测菌株的复苏培养

将分离得到的菌株接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基内培养 7 d~14 d 进行活化，然后将已经活化的菌株转接于新的沙氏葡萄糖琼脂培养基上，28℃恒温培养 7 d。

8.2 菌悬液的制备

取 2 mL 含有 0.1%吐温-20 的 0.85%无菌生理盐水覆盖菌落，用无菌接种环轻刮菌落表面使孢子脱落，反复多次抽吸液体制成菌悬液。

8.3 调整菌悬液浓度

将菌悬液移至一次性无菌试管中，放置于振荡器上振荡 5 min 后，静置 10 min，用移液器吸取 1 mL 上层均质液体至无菌试管中，调整菌悬液浓度为 0.5 个麦氏单位。

8.4 涂布平板

采用灭菌棉签蘸取菌悬液，在管壁内挤压去除多余水分后，涂布于真菌药敏培养基上，重复此过程两次，每次旋转平板约 60°，以确保每次接种均匀分布，最后用棉签沿平板内部边缘涂布一圈。盖子可半开 3 min ~ 5 min，以便在放置含有药物的纸片前，使琼脂吸收表面多余的水分。

8.5 贴药敏纸片

用灭菌镊子夹取各种药敏纸片紧贴于真菌药敏培养基上。每个纸片应压下确保与琼脂表面完全接触。直径为 90 mm 的平板上最多贴 5 片药敏纸片，各药敏纸片的中心距离不少于 24 mm，纸片距离平板边缘应大于 15 mm。将贴好药敏纸片的培养基放入 28 °C 恒温恒湿培养箱中培养 7 d，观察结果。

9 结果判读

采用肉眼观察的方式，以平板上病原菌无明显生长的区域作为抑菌圈边缘。取游标卡尺或尺子在平板背面测量抑菌圈直径，至最接近的整毫米数，结果参照表 1 所规定内容进行药敏判读评价。

表 1 纸片扩散法判读数

单位为毫米

药敏纸片	药敏判读评价		
	敏感	中敏	耐药
伊曲康唑	≥20	12~20	≤12
特比萘芬	≥20	12~20	≤12
酮康唑	≥20	12~20	≤12
氟康唑	≥19	15~19	≤15

附录 A
(规范性)
真菌鉴定规程

A.1 材料

真菌DNA提取试剂盒、Master Mix、真菌ITS通用引物(ITS1/ITS4)、蒸馏水、PCR仪、DL2000 DNA Marker、电泳仪、凝胶成像系统。

A.2 方法

由于真菌细胞壁较厚,无法直接以菌液作为模板进行PCR片段扩增,故需进行破壁处理后提取全基因组DNA以进行后续试验。

以提取的基因组DNA为模板,用真菌ITS通用引物(ITS1/ITS4)进行PCR扩增目的片段。

反应体系(50 μ L): 4 μ L模板DNA、1 μ L引物ITS1、1 μ L引物ITS4(10 μ mol/L)、25 μ L Master Mixs、19 μ L蒸馏水。

PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 进入PCR循环: 94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 30个循环后; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min后结束反应。

PCR产物电泳: 以DL2000 DNA Marker作为参照,吸取PCR产物20 μ L加样在1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳,电压110 V,时间40 min。染色后于凝胶成像系统观察拍照,预计条带在500 bp到900 bp之间。

真菌通用引物ITS1(5'-3'): TCCGTAGGTGAACCTGCGG;

ITS2(5'-3'): TCCTCCGCTTATTGATATGC

A.3 结果

经跑胶鉴定若有与目的条带大小(500 bp ~ 900 bp)相近的条带出现,说明PCR扩增结果为阳性,即可将PCR扩增得到的产物送到测序公司进行测序,待测序结果出来后,将其进行同源性比对,以确定致病菌的种属。