

ICS 11. 220

CCS B 41

团 体 标 准

T/CVMA 99—2022

犬脓皮病源细菌的药物敏感性试验 纸片扩散法

Drug sensitivity test disks diffusion of bacteria from canine pyoderma

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。

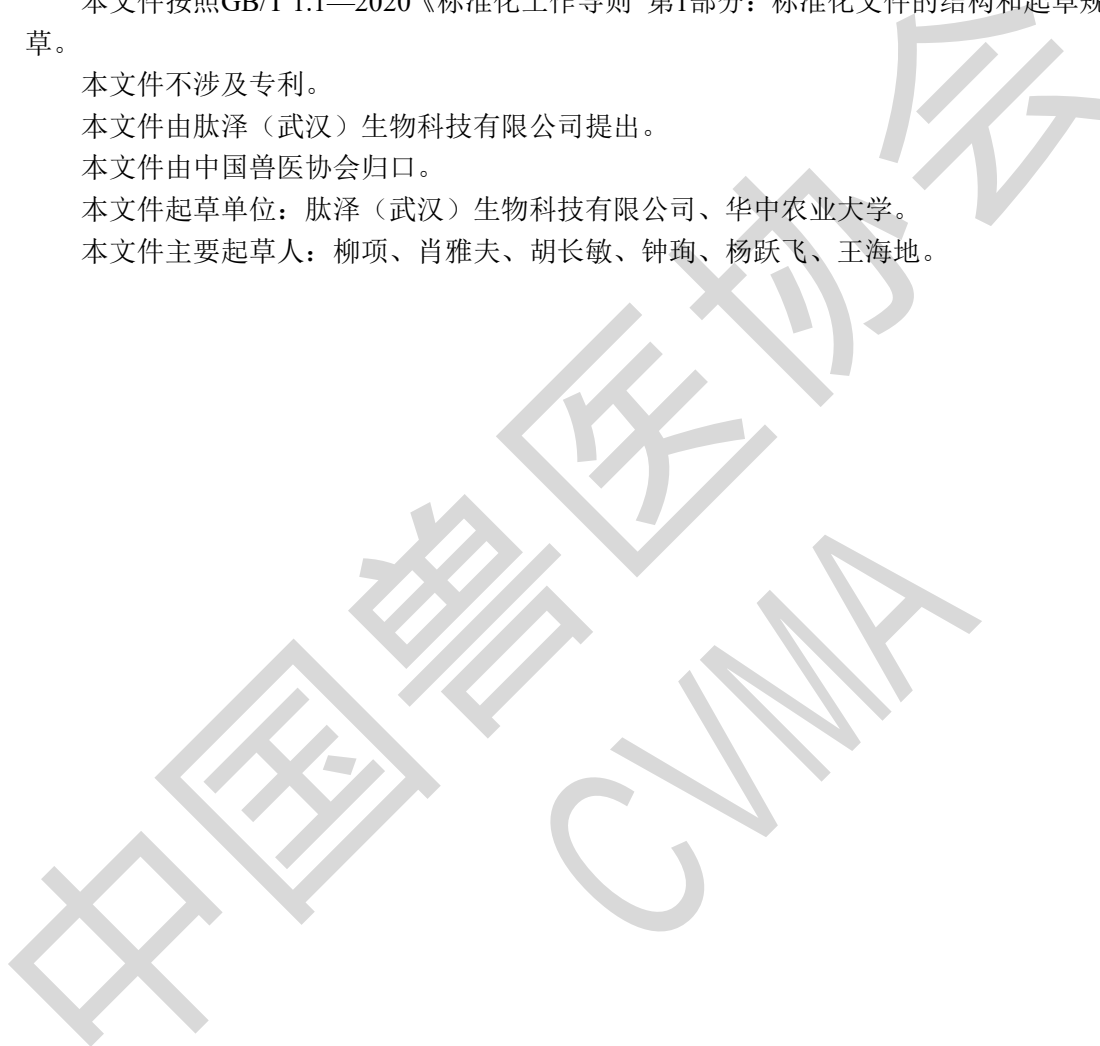
本文件不涉及专利。

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。



犬脓皮病源细菌的药物敏感性试验 纸片扩散法

1 范围

本文件规定了犬脓皮病源细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犬脓皮病源细菌体外药物敏感性试验。

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)

该抗菌药物对犬脓皮病源细菌具有强的抑制其生长或杀灭能力。

3.2

中敏 Intermediate (I)

该抗菌药物对犬脓皮病源细菌具有中等强度的抑制其生长或杀灭能力。

3.3

耐药 Resistant (R)

该抗菌药物对犬脓皮病源细菌缺乏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

防止污染措施应符合 GB/T 27401 的规定。

5 试剂与耗材

药敏纸片：红霉素（15 μg/片）、左氧氟沙星（5 μg/片）、阿莫西林/克拉维酸（10 μg/片）、头孢唑啉（30 μg/片）、克林霉素（2 μg/片）、氨苄西林（10 μg/片）、头孢他啶（30 μg/片）。

胰大豆蛋白胨琼脂培养基、MHA 培养基、含 0.1%吐温-20 的 0.85%无菌生理盐水、革兰氏染色液。

6 仪器设备

恒温恒湿培养箱：精度（37±1）℃、无菌操作台、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

培养好的样品在 2℃~8℃应保存不超过 24 h。如需长期保存，应添加 20%的甘油，并置-70℃以下保存，避免反复冻融。

7.3 细菌分离与鉴定

将划线好的平板倒置放于 37℃恒温箱中，同时做好空白对照，培养 12 h~24 h，出现肉眼可观察的合适大小的单菌落后，挑取在平板上占绝对优势的菌落或形态、颜色不同的单菌落分别接种于胰大豆蛋白胨琼脂培养基再次培养，进行菌种的分离纯化。对分离得到的菌株进行革兰氏染色镜检，染色结果判定：革兰氏阳性菌为紫色，革兰氏阴性菌为红色。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，细菌鉴定方法按附录 A 操作。

8 试验步骤

8.1 待测菌株的复苏培养

吸取 100 μL 样品接种于胰大豆蛋白胨琼脂培养基平板内，置于 37℃恒温恒湿培养箱中倒置培养 18 h~24 h。然后将已经活化的菌株转接于新的平板上，37℃恒温培养 16 h~18 h，保持菌株活性。

8.2 菌悬液制备

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之脱落，反复多次抽吸液体体制成菌悬液。

8.3 菌悬液浓度调整

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 接种平板

采用灭菌棉签蘸取菌悬液，并在管壁内挤压掉多余水分，然后涂布于 MHA 培养基平板上，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 放置药敏纸片

用灭菌镊子夹取各种药敏纸片紧贴于 MHA 培养基平板上。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 37 °C 恒温恒湿培养箱中培养 24 h，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
红霉素	≥23	14~22	≤13
左氧氟沙星	≥19	16~18	≤15
阿莫西林/克拉维酸	≥18	14~17	≤13
头孢唑啉	≥18	15~17	≤14
克林霉素	≥21	15~20	≤14
氨苄西林	≥17	14~16	≤13
头孢他啶	≥18	15~17	≤14

附录 A
(规范性)
细菌鉴定规程

A.1 材料

细菌DNA提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、10×缓冲液、灭菌ddH₂O、细菌16S rRNA通用引物（27F/1492R）、PCR仪、DL2000 DNA Marker、电泳仪、凝胶成像系统。

A.2 方法

由于革兰氏阳性菌（G⁺）的细胞壁较厚，直接将菌体作为模板，比较难获得目的产物，因此需要对其进行破壁处理。于是对上述步骤未扩增出目的片段的菌株，进行基因组DNA的提取。

以提取的基因组DNA为模板，用细菌16S rRNA通用引物（27F/1492R）进行PCR扩增目的片段。

反应体系(25 μL)：10×缓冲液2.5 μL，2 mmol/L dNTPs 2.0 μL，10 μmol/L 上下游引物各0.5 μL，Taq 酶0.25 μL，模板1.0 μL，灭菌ddH₂O 18.25 μL。

PCR反应条件：95℃ 预变性5 min，进入PCR循环；95℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 2 min，30个循环后；72℃延伸7 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 μL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上观察拍照，预计条带在1.5 kb。

细菌通用引物27F (5'-3')：AGAGTTTGATCCTGGCTCAG；

1492R (5'-3')：TACGGCTACCTTGTTACGACTT

A.3 结果

经跑胶鉴定若有与目的条带大小（1.5 kb）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。