

水产养殖动物病原菌耐药性监测技术规范

（第一版）

全国水产技术推广总站
2023年3月

水产养殖动物病原菌耐药性监测技术规范

1. 样品采集

1.1 采样点

同一水域、同一品种、相同环境及养殖条件的养殖场为一个采样点。

1.2 采样频次

4~10月，原则上单个采样点每月至少采样1次。同一个采样点同一次采集的相同临床症状样品不超过10个。

1.3 采样记录

采样时应做好养殖场基本信息、采样品种发病和用药情况调查，认真填写《采样记录表》（附录1）。对同一养殖场用药情况不同的养殖动物群，应分别填写采样表。

1.4 采样部位

每尾（个）动物个体为一个样品。

有明显临床症状的养殖动物，重点从病灶处分离细菌；对于濒死的养殖动物，重点从典型病灶处和内脏分离细菌。无明显临床症状的养殖动物，重点从肝脾肾分离细菌。

2. 细菌分离纯化

2.1 通用要求

全年采集不少于30个样品。若某一种类型病原菌分离率较低，可增加采集的样品数量。

为避免分离的病原菌为同一克隆株，每个样品分离菌株不超过2株。药敏检测的病原菌中同一个菌属的全年不少于30株。

2.2 气单胞菌

(1) 分离方法

用无菌接种环蘸取病料,划线接种于RS琼脂平板或血琼脂平板,28℃~30℃培养18h~24h。

气单胞菌,在RS琼脂平板上典型菌落为光滑、圆整、黄色,不同种的气单胞菌黄色深浅有差异、大小也有差异;在血琼脂平板上,菌落为灰白色、光滑、湿润,多数菌株有 β 溶血环。**建议优先使用RS琼脂平板,可提高气单胞菌的分离率。**

(2) 纯化方法

用无菌接种环挑取特征单菌落,接种到普通营养琼脂平板上,28℃~30℃培养18h~24h,备检。

2.3 假单胞菌

(1) 分离方法

用无菌接种环蘸取病料,划线接种于血琼脂平板或普通营养琼脂平板,25℃~30℃培养18h~24h。

假单胞菌,在血琼脂平板上,菌落为灰白色、光滑、湿润,多数菌株有 β 溶血环;在普通营养琼脂平板上,菌落为圆形、边缘整齐,荧光假单胞菌呈灰白色,半透明,20h开始产生绿色或黄绿色的色素,弥漫培养基,而恶臭假单胞菌或变形假单胞菌则呈淡黄色。

(2) 纯化方法

用无菌接种环挑取形态特征一致的优势单菌落,接种到普通营养琼脂平板上,28℃~30℃培养18h~24h,备检。

2.4 爱德华氏菌

(1) 分离方法

用无菌接种环蘸取病料，划线接种于血琼脂平板，28℃培养 24 h~48 h；

爱德华氏菌，在血琼脂平板上，菌落呈现灰白色、圆形、湿润、呈半透明状的菌落形态，有溶血环。

(2) 纯化方法：用无菌接种环挑取形态特征一致的优势单菌落，接种到普通营养琼脂平板上，28℃培养 24 h~48 h，备检。

2.5 柱状黄杆菌

(1) 分离方法：用无菌接种环蘸取病料，划线接种于胰胨琼脂培养基平板，25℃~28℃培养 48 h，出现稀薄、平铺在培养基表面的菌落，边沿不整齐，中央较厚，大小不一，颜色由浅逐渐变成黄色。

(2) 纯化方法：用无菌接种环挑取形态特征一致的优势单菌落，接种到胰胨琼脂培养基斜面试管上，25℃~28℃培养 48h，备检。

2.6 弧菌

(1) 分离方法

用无菌接种环蘸取病料，划线接种于硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂（TCBS）平板或弧菌显色培养基平板，28℃~36℃培养 18 h~24 h。

弧菌，在 TCBS 平板上，菌落呈圆形、半透明、表面光滑，不同种的弧菌菌落颜色有差异，副溶血性弧菌、创伤弧菌呈蓝绿色，霍乱弧菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、哈维弧菌呈黄色；在弧菌显色培养上，不同种的弧菌菌落颜色有差异，副溶血性弧菌呈绿色、菌落较大，霍乱弧菌呈红色，其他弧菌显红色、蓝色或无色且菌落比较小，其它细菌绝大部分可被抑制。

(2) 纯化方法

用无菌接种环挑取形态特征一致的单菌落,接种到 3 %氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 平板上, 28℃~36℃培养 18 h~24 h, 备检。

2.7 链球菌

(1) 分离方法

用无菌接种环蘸取病料, 划线接种于血琼脂平板或 THB 平板, 28℃~36℃培养 24 h~48 h。

链球菌, 在血琼脂平板上, 菌落呈灰白色, 有乳光、表面光滑、边缘整齐、直径约 0.3 mm~1.0 mm 的细小菌落, 有溶血环; 在 THB 平板上呈现乳白色、圆形、边缘光滑且隆起的菌落形态。

纯化方法:

用无菌接种环挑取形态特征一致的单菌落,接种到 THB 或脑心浸出液(BHI)琼脂平板上, 28℃~36℃培养 24 h~48 h, 备检。

3. 细菌鉴定

采用生理生化鉴定、分子生物学鉴定等方法对分离纯化后的菌株进行鉴定。

3.1 生理生化鉴定

可采用细菌微量生化反应管、API 生化鉴定条、全自动生化细菌鉴定系统等方法进行生理生化鉴定, 操作方法按照说明书进行。

3.2 分子生物学鉴定 (PCR 法)

(1) 细菌基因组 DNA 提取

可采用水煮法、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、核酸提取仪等方法提取细菌基因组 DNA, 操作方法按照说明书进行。

水煮法：用接种环刮取新鲜纯化菌，置于盛有 0.5 mL 灭菌水的 1.5mL EP 管中，1 2000 r/min 离心 2 min，弃上清。沉淀中再加入 0.5 mL 灭菌水，悬浮并涡旋混匀，煮沸 10 min 后移至冰上，冷却后以 1 2000 r/min 离心 2 min，取上清液，-20℃保存，备用。

(2) 引物设计及 PCR 反应：

一般细菌鉴定选择通用引物，最常用的 *16S rRNA* 通用引物为 27F/1492R。为进一步确定到种，提高鉴定准确性，也可挑选一个或多个看家基因同时鉴定。以气单胞菌为例，可选用 DNA 促旋酶 B 亚单位合成基因 (*gyrB*)，相关引物信息如下：

PCR 引物信息

基因	引物序列 (5'-3')	退火温度	目的片段大小
<i>16S rRNA</i>	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	55℃	1500bp
	1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT		
<i>gyrB</i>	F: TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	59℃	1100bp
	R: TTGTCCGGG TTGTACTIONCGTC		

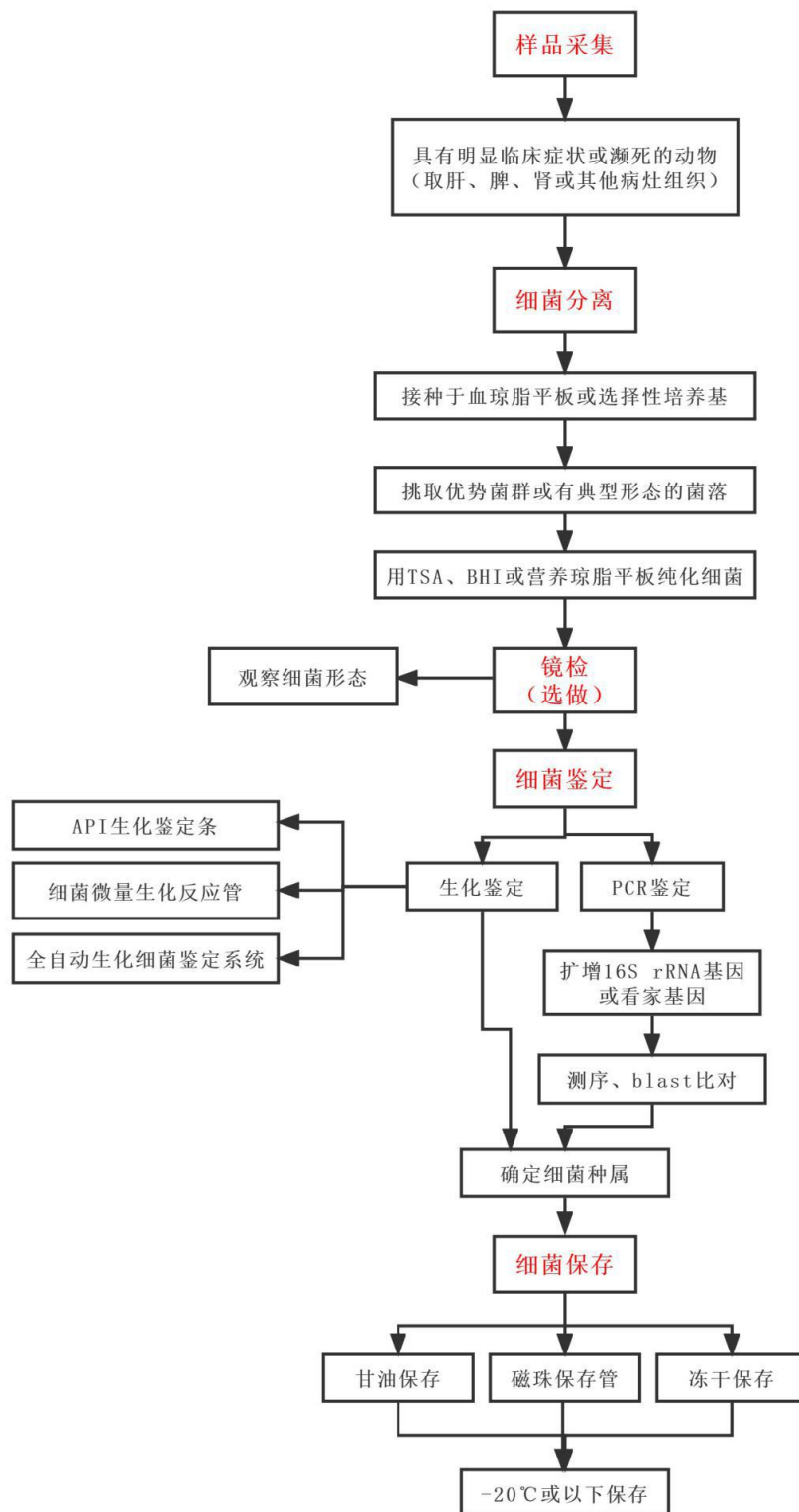
(3) 回收-测序

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离并切胶回收，用试剂盒纯化后将目的片段送出测序；或直接将经电泳检测后的 PCR 扩增产物送出测序，反馈的序列在 NCBI 上进行 blast 比对，选择与比对序列相似度高的菌株，也可将选择的序列与测序序列用 DNASTar 软件的 MegAlign 构建菌株系统进化树。

4. 细菌保存

鉴定后，取新鲜纯化菌，加无菌生理盐水制成菌悬液，与灭菌甘油溶液混合，

使甘油终浓度为 20 %~40 %；或加入磁珠保存管；或加入 5 %蔗糖脱脂乳保护剂制成冻干粉，-20 ℃或以下保存。



细菌分类鉴定操作流程

5. 药物敏感性测定

分别测试每株菌对恩诺沙星、硫酸新霉素、甲砒霉素、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/甲氧苄啶等 8 种抗菌药物的敏感性。统一采用微量肉汤稀释法，使用经过质量认定的药敏试验板，按照操作说明进行药物敏感性检测。

6 结果判定

根据不同抗菌药物对受试菌的 MIC 值，将菌株判定为敏感、中介或耐药。不同细菌的耐药性判定参考值参考《水产养殖动物细菌耐药性调查规范 通则》（SC/T 7028-2022）（附录 2）。

7 结果记录与统计

将每一受试菌的菌株编号、菌属/种名称、各种药物的 MIC 值以及判定结果记录于药物敏感性试验结果记录表中（附录 3）。按照以下公式计算分离菌株的敏感率、中介率及耐药率。

$$\text{敏感率} = (\text{敏感菌株数} / \text{受试菌株总数}) \times 100\%$$

$$\text{中介率} = (\text{中介菌株数} / \text{受试菌株总数}) \times 100\%$$

$$\text{耐药率} = (\text{耐药菌株数} / \text{受试菌株总数}) \times 100\%$$

附录 1

采样记录表

一、养殖场基本信息			
养殖场：		联系人：	电话：
地址：			
养殖面积： <input type="checkbox"/> ≤10 亩 <input type="checkbox"/> 11~100 亩 <input type="checkbox"/> >100 亩			
养殖年限： <input type="checkbox"/> 1~2 年 <input type="checkbox"/> 3~5 年 <input type="checkbox"/> 5 年以上			
养殖模式： <input type="checkbox"/> 池塘； <input type="checkbox"/> 网箱； <input type="checkbox"/> 网围； <input type="checkbox"/> 滩涂； <input type="checkbox"/> 工厂化； <input type="checkbox"/> 海上筏式； <input type="checkbox"/> 底播； <input type="checkbox"/> 其他			
二、样品来源信息			
采样品种：			
品种规格：平均体重		克	平均体长
			厘米
样品数量：		采样部位：	
发病情况及症状：			
使用抗菌药物情况			
药物名称		使用方式	
剂量		用药天数	
其他情况（疑似病因判定）：			
采样人（签名）： 采样时间：_____年_____月_____日			

附录 2

细菌耐药性判定参考值

药物类别	药物名称	折点 μg/mL		
		敏感	中介	耐药
酰胺醇类	氟苯尼考	≤2	4	≥8
四环素类	盐酸多西环素	≤4	8	≥16
		≤1 ^a	— ^b	≥2 ^a
磺胺类	磺胺甲噁唑/甲氧苄啶	≤38/2	—	≥76/4
		≤19/1 ^a	—	≥38/2 ^a
	磺胺间甲氧嘧啶	≤256	—	≥512
喹诺酮类	恩诺沙星	≤0.5	1-2	≥4
^a 只适用于链球菌，除盐酸多西环素和磺胺甲噁唑/甲氧苄啶外，其他药物暂无判定参考值； ^b “—”表示无折点。				

附录 3

药物敏感性试验结果记录表

注意：表中每种药物不同浓度对应的所有菌株数的和要与总数 n 一致

表 1-1 恩诺沙星对 XX 菌的 MIC 频数分布表 ($n=$)

供试药物	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	不同药物浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 下的菌株数 (株)											
			≥ 32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	≤ 0.015
恩诺沙星														

表 1-2 硫酸新霉素和氟甲喹对 XX 菌的 MIC 频数分布表 ($n=$)

供试药物	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	不同药物浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 下的菌株数 (株)											
			≥ 256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	≤ 0.125
硫酸新霉素														
氟甲喹														

表 1-3 甲砒霉素和氟苯尼考对 XX 菌的 MIC 频数分布表 ($n=$)

供试药物	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	不同药物浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 下的菌株数 (株)											
			≥ 512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	≤ 0.25
甲砒霉素														
氟苯尼考														

表 1-4 磺胺间甲氧嘧啶钠对 XX 菌的 MIC 频数分布表 (n=)

供试药物	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	不同药物浓度 (μg/mL) 下的菌株数 (株)											
			≥1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	≤1	
磺胺间甲氧嘧啶钠														

表 1-5 磺胺甲噁唑/甲氧苄啶对 XX 菌的 MIC 频数分布表 (n=)

供试药物	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	不同药物浓度 (μg/mL) 下的菌株数 (株)											
			≥1216/64	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	
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶														

表 1-6 盐酸多西环素对 XX 菌的 MIC 频数分布表 (n=)

供试药物	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	不同药物浓度 (μg/mL) 下的菌株数 (株)											
			≥128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	≤0.06
盐酸多西环素														