



中华人民共和国水产行业标准

SC/T 7029—2025

水产养殖动物源弧菌耐药性调查规范

Specification for monitoring antimicrobial resistance in
Vibrio species from aquatic animals

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

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专利的责任。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会水产养殖病害防治分技术委员会(SAC/TC 156/SC 11)归口。

本文件起草单位：全国水产技术推广总站、中国水产科学研究院东海水产研究所、中国水产科学研究院珠江水产研究所、上海海洋大学。

本文件主要起草人：冯东岳、房文红、邓玉婷、宋晨光、王浩、胡鲲、赵姝、李阳、王元、李新苍。



水产养殖动物源弧菌耐药性调查规范

1 范围

本文件规定了水产养殖动物源弧菌耐药性调查中样品采集、样品信息采集、样品保存与运输、弧菌分离与鉴定、菌株保存、药敏试验(肉汤稀释法)、药物敏感性判定的基本要求,描述了结果记录与统计的方法。

本文件适用于水产养殖动物源弧菌属细菌耐药性调查。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法

SC/T 7028—2022 水产养殖动物细菌耐药性调查规范 通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

采样点 sample site

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。

[来源:SC/T 7028—2022,3.1]

3.2

抗菌药敏感性试验 antimicrobial susceptibility testing

用于测试抗菌药在体外对病原微生物有无抑制或杀灭作用的试验,简称药敏试验。

3.3

最小抑菌浓度 minimal inhibitory concentration, MIC

在采用稀释法测定药物敏感性的试验中,能抑制细菌生长的最低抗菌药物浓度。

[来源:SC/T 7028—2022,3.2]

3.4

折点 breakpoint

用于区分菌株为敏感、中介和耐药的 MIC 值。

[来源:SC/T 7028—2022,3.3]

3.5

细菌耐药性 bacterial resistance

细菌与抗菌药物多次接触后,对药物的敏感性下降甚至消失;细菌产生耐药性后,药物的抗菌作用明显下降。

3.6

敏感 susceptible, S

抗菌药物对菌株的 MIC 值等于或低于敏感折点,即菌株对该药物表现为敏感。

[来源:SC/T 7028—2022,3.4]

3.7

中介 intermediate, I

抗菌药物对菌株的 MIC 值在高于敏感折点且低于耐药折点的范围内,即菌株对该药物表现为中介。
[来源:SC/T 7028—2022,3.5]

3.8

耐药 resistant, R

抗菌药物对菌株的 MIC 值等于或高于耐药折点,即菌株对该药物表现为耐药。
[来源:SC/T 7028—2022,3.6]

4 样品采集

4.1 采样对象

宜采集患病的水产养殖动物,每个动物个体为一个样品。

4.2 采样频次

按 SC/T 7028—2022 中 5.1.2 的规定执行。

4.3 采样数量

每个采样点采集 3 个以上样品,每个样品单独放入无菌密封袋。

5 样品信息采集

5.1 样品信息

每个样品袋分别贴上标签,注明采样地、样品编号、采样人和采样日期。对样品进行编号,样品编号应包含采样动物种类、采样地、采样时间等信息。

5.2 样品信息表

样品采集时应填写水产养殖动物样品采集信息表,主要包括养殖场信息、样品信息、抗菌药使用和治疗效果等,见附录 A。

6 样品保存与运输

样品采集后及时于 0℃~10℃ 保存,使用密封保温容器运送;样品采集后应在 12 h 内进行细菌分离。

7 弧菌分离与鉴定

7.1 分离

7.1.1 体表和鳃组织

用无菌水冲洗体表或鳃组织 3 遍,用无菌吸水纸吸去水分,用无菌接种环刮取体表或鳃少许组织样品接种到 TCBS(按附录 B 中的 B.1 配制或使用商品化培养基)平板,划线法分离弧菌。

7.1.2 内脏组织器官

体表经 75%酒精消毒后,用无菌吸水纸吸去水分,用无菌剪刀打开腹腔(鱼类)、打开甲壳(虾和蟹)或分开外壳(贝类),无菌操作取内脏组织器官,于无菌均质器中匀浆,用无菌接种环蘸取少许于 TCBS 平板上进行划线。

7.2 纯化

将接种后的 TCBS 平板倒置,于(28±2)℃培养 24 h~28 h。观察培养后 TCBS 平板上的菌落形态,挑取平板上疑似弧菌的黄色、绿色、蓝绿色或黄绿色等优势单菌落,接种于 TCBS 平板上纯化培养。最终,每个样品分离保存优势菌株 1 株~2 株。

7.3 鉴定

按附录 C 的规定对分离疑似弧菌菌株进行种的分类鉴定。

8 菌株保存

参考 SC/T 7028—2022 中的 5.4。

9 弧菌药敏试验(肉汤稀释法)

采用肉汤稀释法对分离菌株进行药物敏感性试验,具体操作方法和步骤按附录 D 的要求进行。

10 药物敏感性判定

按附录 E 给出的药敏试验折点值作为判定标准,判定弧菌对抗菌药物是敏感(S)、中介(I)或耐药(R)。

11 结果记录与统计

记录每一受试菌的菌株编号、菌种名称及对各种抗菌药的 MIC 结果。在汇总统计 MIC 数据基础上,计算 MIC_{50} (抑制 50% 受试菌株所需的 MIC) 和 MIC_{90} (抑制 90% 受试菌株所需的 MIC); 同时,按 SC/T 7028—2022 中 5.7 的方法计算分离菌株的敏感率、中介率及耐药率。

附 录 A
(资料性)
采样记录表

采集弧菌样品的养殖场基本信息和样品来源信息等参考表 A.1。

表 A.1 采样记录表

一、养殖场基本信息				
养殖场名称		地 址		
联系人		电话		
主要养殖品种		养殖面积	☐ ≤10 亩 ☐ 11~100 亩 ☐ ＞100 亩	
养殖模式		养殖年限	☐ 1 年~2 年 ☐ 3 年~5 年 ☐ 5 年以上	
二、样品来源信息				
动物品种		养殖密度		
平均规格	体长： 体重：	样品数量		
采样部位		样品编号 ^a		
三、抗菌药使用情况				
药物名称	生产企业	使用方式	剂量	用药天
		☐ 拌饲 ☐ 浸泡 ☐ 注射		
		☐ 拌饲 ☐ 浸泡 ☐ 注射		
		☐ 拌饲 ☐ 浸泡 ☐ 注射		
发病情况及发病症状：				
治疗效果：				
采样人(签名)：_____				
采样时间：_____年_____月_____日				
^a 样品编号应包含水产动物种类、采样地、采样时间和样品流水号等信息，水产动物种类和采样地采用字母来表示，采样时间和样品流水号采用数字来表示。				

附 录 B
(规范性)
TCBS 配方及其配制

硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TCBS)成分:
酵母浸膏 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 硫代硫酸钠 10.0 g/L, 枸橼酸钠 10.0 g/L, 牛胆粉 5.0 g/L, 蔗糖
20.0 g/L, 氯化钠 25.0 g/L, 柠檬酸铁 1.0 g/L, 溴麝香草酚蓝 0.04 g/L, 麝香草酚蓝 0.04 g/L, 琼脂
15.0 g/L, pH 8.5~8.7(25.0 ℃)。称取 89.0 g, 于 1 000 mL 水中加热溶解, 冷却至 45 ℃~50 ℃时, 倾
入无菌平皿, 备用。

注: 无需高压灭菌。

附 录 C
(规范性)
弧菌的分类鉴定

C.1 试剂和材料

C.1.1 营养肉汤(Nutrient Broth, NB)

成分:牛肉浸粉 3.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,pH 7.2~7.4(25℃)。称取 18.0 g,于 1 000 mL水中加热溶解,分装三角瓶,121℃高压灭菌 15 min~30 min,备用。

C.1.2 营养琼脂培养基(Nutrient Agar, NA)

成分:牛肉浸粉 3.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,琼脂 17.0 g/L,pH 7.2~7.4(25℃)。称取 32.0 g,于 1 000 mL 水中加热溶解,分装三角瓶,121℃高压灭菌 15 min~30 min,冷却至 45℃~50℃时,倾入无菌平皿,备用。

C.1.3 待测菌株菌液

从纯化后的平板上挑取典型单菌落,接种于 1 mL 含有 1.0%NaCl 的 NB 中,200 r/min 转速摇床中,(28±2)℃下增菌培养 8 h~12 h,备用。

C.2 形态特征

C.2.1 菌落形态

观察在 NA 和 TCBS 平板上的菌落形状、大小、边缘、隆起形状、透明度、菌落及培养基的颜色等。

C.2.2 革兰氏染色

取新鲜菌液进行革兰氏染色,用光学显微镜 100 倍油镜观察,弧菌为革兰氏阴性细菌,染色为红色。

C.2.3 运动试验

半固体琼脂穿刺法。

C.3 生理生化试验

C.3.1 盐度耐受试验

以 NB 为基础,调整 NB 中的 NaCl 浓度分别为 0、3%、6%、8%、9%、10%和 11%,检测分离菌株的盐度耐受范围。

C.3.2 碳源利用试验

采用生化管开展碳源利用试验,检测分离菌对蔗糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、肌醇、甘露醇、纤维二糖、棉籽糖、鼠李糖、水杨苷、果糖、麦芽糖、木糖、阿东醇、山梨醇等利用能力。

C.3.3 代谢试验

氧化—发酵(O/F)试验,VP(Voges—Proskauer)试验,吲哚试验,硫化氢试验,O/129 抑菌试验,氨基酸脱羧酶试验等。

C.3.4 其他试验

氧化酶试验,糖淀粉酶、酪蛋白酶、几丁质酶、明胶酶、卵磷脂酶、脂酶、脲酶等试验,三糖铁(TSI)琼脂试验等。

C.4 分子生物学分析

C.4.1 细菌 DNA 的提取

采用水煮法提取细菌总 DNA。取 100 μL NB 中培养的菌液,置沸水 10 min,再冰浴 10 min,然后于 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为 PCR 模板。

C.4.2 PCR 扩增

采用 16S rRNA 和 HSP60 两个基因序列鉴定弧菌种类。16S rRNA 基因 PCR 扩增引物为 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG,1492R:GGCTACCTTGTTACGACTT,产物长度为 1466 bp;HSP60 基因 PCR 扩增引物为 HSP60 F:ACAACAGCAACGGTACTAGC,HSP60 R:CAACTTTCACGATGC-CAC,产物长度为 550 bp。

PCR 反应体系为 50 μL :10 $\times$ PCR 缓冲液(含 15 mM MgCl_2),5 μL ;dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L),4 μL ;引物 16S rRNA 27F(10 $\mu\text{mol/L}$)和 16S rRNA 1492R(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL ,或引物 HSP60 F(10 $\mu\text{mol/L}$)和 HSP60 R 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL ;模板 DNA,3 μL ;Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL),0.3 μL ;超纯水,33.7 μL 。

PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;接着,95 $^{\circ}\text{C}$ 35 s、51 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,扩增结束后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存产物。

C.4.3 电泳

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶(每 0.1 g 琼脂糖加入 10 mL TAE 缓冲溶液)电泳(120 V,30 min)检测,用凝胶成像仪器观察有无条带。

C.4.4 序列比对

对扩增目的产物进行测序,在 NCBI 上对测序结果进行 BLAST 比对结果分析。

C.5 结果判定

根据菌落特征、生化特性和 16S rRNA、HSP60 两个基因片段序列的比对结果,对菌株进行种的鉴定。

附 录 D
(规范性)
水产养殖动物源弧菌药敏试验操作方法

D.1 试剂和材料

本文件中所有化学试剂,除非另有规定,均使用分析纯试剂。

D.1.1 实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。

D.1.2 TCBS 琼脂培养基:按 B.1 配制。

D.1.3 营养琼脂培养基(NA):按 C.1.2 配制。

D.1.4 1.0% NaCl 的 MHB

成分:牛肉浸粉 2.0 g/L,酸水解酪蛋白 17.5 g/L,可溶性淀粉 1.5 g/L,NaCl 10.0 g/L,pH 7.2~7.4(25℃)。称取 21.0 g,于 1 000 mL 水中加热溶解,121℃高压灭菌 15 min~30 min,备用。

D.1.5 抗菌药物,标准品或对照品。

D.1.6 待测菌株为水产养殖动物源弧菌属细菌,按附录 C 进行鉴定。

D.1.7 质控菌株,为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC25922。

D.1.8 0.9%生理盐水:称取 0.9 g 氯化钠溶于 100 mL 水中。

D.1.9 1 mol/L 氢氧化钠:称取 40 g 氢氧化钠,先用少量水溶解,冷却后定容至 1 L。

D.1.10 1 mol/L 盐酸:移取 84 mL 浓盐酸,先用适量水稀释,冷却后定容至 1 L。

D.2 仪器设备

D.2.1 恒温培养箱:温控精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

D.2.2 恒温摇床:温控精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

D.2.3 分光光度计或麦氏比浊仪。

D.2.4 超净工作台。

D.2.5 电子天平:感量 0.01 g 和 0.0001 g。

D.2.6 pH 计。

D.2.7 恒温水浴锅:温控精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

D.2.8 高压灭菌锅。

D.2.9 微量移液器:0.5 μL ~10 μL 、1 μL ~100 μL 、100 μL ~1 000 μL 。

D.2.10 八通道微量移液器:20 μL ~200 μL 。

D.2.11 吸头:与微量加样器匹配。

D.2.12 微量稀释板:96 孔板,U 形底。

D.2.13 培养皿:直径 60 mm、90 mm 和 100 mm。

D.2.14 试管:13 mm $\times$ 100 mm,带螺旋盖,高压灭菌后使用。

D.2.15 容量瓶:100 mL。

D.2.16 纯水仪。

D.2.17 高速离心机。

D.3 接种菌悬液的制备

D.3.1 取分离纯化菌株,或适量-80℃冻存的待测菌株和质控菌株,分别在NA上分区划线,28℃恒温培养箱中培养18 h~24 h。

D.3.2 采用直接菌落法或肉汤增菌法制备。

D.3.2.1 直接菌落法:从平板上挑取菌落形态一致的单菌落3个~5个,转移至4 mL~5 mL含1.0% NaCl的MHB或无菌生理盐水中。

D.3.2.2 肉汤增菌法:挑取单个菌落接种于含1.0% NaCl的MHB肉汤中,(28±2)℃恒温摇床中,转速200 r/min下增菌培养16 h~20 h。

D.3.3 采用含1.0% NaCl的MHB或生理盐水将上述两种方法制备的菌悬液调整到0.5麦氏比浊度,或使用光径为1 cm的比色皿,在波长625 nm下将菌悬液吸光值调整到0.08~0.10,此时菌悬液浓度为(1~2)×10⁸ CFU/mL,备用。

D.4 抗菌药物储备液的配制

D.4.1 抗菌药物称量

D.4.1.1 用作水产养殖动物弧菌药物敏感性试验的常见药物

用作水产养殖动物弧菌药物敏感性试验的常见药物见表D.1。

表 D.1 用作水产养殖动物弧菌药物敏感性试验的常见药物

抗菌药物 ^a	溶剂	稀释剂
恩诺沙星	1/2 体积的水,用少量 1.0 mol/L NaOH 溶解	水
环丙沙星	1/2 体积的水,用少量 1.0 mol/L NaOH 溶解	水
氟甲喹	1/2 体积的水,用少量 1.0 mol/L NaOH 溶解	水
氟苯尼考	乙醇	水
甲砒霉素	乙醇	水
盐酸多西环素	水	水
硫酸新霉素	水	水
磺胺间甲氧嘧啶钠	1/2 体积的水,最少量 2.5 mol/L NaOH 溶解	水
磺胺甲噁唑	1/2 体积的水,最少量 2.5 mol/L NaOH 溶解	水
甲氧苄啶 ^b	0.05 mol/L 的乳酸或盐酸,终体积的 10 % (v/v)	水
^a 上述抗菌药物为我国政府允许用于水产动物疾病的药物;		
^b 甲氧苄啶为磺胺类药物的增效剂,药敏试验时复方磺胺类药物浓度按甲氧苄啶:磺胺类药=1:19(v/v)进行配制。		

D.4.1.2 抗菌药物储备液浓度应为最高测试浓度的10倍,配制复方磺胺类药物时,磺胺类药和甲氧苄啶按最高测试浓度的20倍配制,肉汤稀释法时可以稀释为2倍最高测试浓度的工作液(磺胺类药和甲氧苄啶稀释为4倍)。根据抗菌药物的纯度、含水量和活性分数,计算配制储备液活性成分浓度应精确称量的药物粉剂的重量,精准到0.001 g。

D.4.2 储备液配制

准确称量抗菌药物,置于烧杯中,用最低量的溶剂来溶解药物粉末,待完全溶解后转移至100 mL容量瓶中,烧杯至少漂洗3遍,全部转移至容量瓶中,用稀释剂定容至刻度。制备抗菌药物储备液所用的溶剂和稀释剂见表D.1。储备液使用前用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌。

D.4.3 保存

储备液分装至无菌的玻璃瓶或聚丙烯瓶中,密封后在低于-20℃(最好在-60℃及以下)条件下储存。玻璃瓶(或聚丙烯瓶)可以按需要取出融化并在当天使用,当天未用完的抗菌药物应弃去。

D.5 药敏试验操作步骤(肉汤稀释法)

D.5.1 肉汤培养基制备

D.5.1.1 用含 1.0 % NaCl 的 MHB 配制药敏试验用肉汤培养基, (w/v), 于 103.4 kPa、121.3 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

D.5.1.2 培养基制备完毕后在室温环境(25 °C) pH 应为 7.2~7.4, 如不在此范围内须在配制时调整其 pH。

D.5.2 抗菌药物梯度稀释

根据表 D.2 建议的稀释范围配制药敏试验的抗菌药物肉汤, 抗菌药物采用 2 倍倍比稀释法, 将稀释后的抗菌药物肉汤按顺序依次吸取 0.05 mL 至 96 孔微量稀释板中(微量肉汤稀释法), 或吸取 1 mL 至试管中(常量肉汤稀释法)。

配制好的不同浓度抗菌药物的 96 孔微量稀释板(微量肉汤稀释法)或 13 mm×100 mm 带螺旋盖的无菌试管(常量肉汤稀释法), 须当日使用; 不立即使用的须用密封袋封闭, 置于-20 °C 以下冻存备用; 融化后的药物溶液应立即使用, 不宜再次冻存。

表 D.2 抗菌药物建议稀释范围

抗菌药物	建议稀释范围, $\mu\text{g/mL}$
恩诺沙星	0.008~64
环丙沙星	0.008~64
氟甲唑	0.125~64
氟苯尼考	0.25~128
甲矾霉素	0.25~128
盐酸多西环素	0.125~64
硫酸新霉素	0.062~32
磺胺间甲氧嘧啶钠	2~1024
复方磺胺甲噁唑	0.125/2.375~64/1216

D.5.3 接种菌悬液稀释和接种

D.5.3.1 使用含 1.0% NaCl 的 MHB 或生理盐水将 D.3.3 培养的接种物(待测菌株和质控菌株)稀释至约 1×10^6 CFU/mL, 混匀, 在稀释后 15 min 内完成接种。

D.5.3.2 将稀释后的接种菌悬液按顺序依次吸取 0.05 mL 至 D.5.2 步骤制备的 96 孔微量稀释板中(微量肉汤稀释法), 或吸取 1 mL 至 D.5.2 步骤制备的试管中(常量肉汤稀释法), 最终接种物浓度为 5×10^5 CFU/mL。

D.5.3.3 将稀释后的菌悬液接种至不含抗菌药物的微量稀释板孔中(或试管中)作为生长对照, 同时设置一孔(或试管)不加菌悬液和不加抗菌药的空白 MHB, 观察肉汤是否有污染。

D.5.4 培养

将接种后的微量稀释板或试管盖好盖子, 包括不加抗菌药物的对照, 置于 $(28\pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温培养箱孵育培养 24 h~28 h。微量稀释板重叠放置不超过 4 块。

D.5.5 质量控制

D.5.5.1 本文件中采用大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922 作为质控菌株, 对试剂、仪器、环境、人员操作和结果判读等进行质量控制, 以保证试验结果的准确性和可重复性。

D.5.5.2 每批药敏试验, 以及试剂和实验条件变化时应进行质控菌株的药敏试验。

D.5.5.3 在判读和报告临床菌株的药敏结果前, 应先检查质控菌株和不含抗菌药物的质控平板, 质控菌株大肠埃希氏菌 ATCC 25922 的结果应符合表 D.3 的规定。

表 D.3 稀释法药敏试验质控菌株的允许范围

抗菌药物	大肠埃希氏菌 ATCC25922,μg/mL
恩诺沙星	0.008~0.03
环丙沙星	0.004~0.015
氟甲喹	— ^a
氟苯尼考	4~16
甲砒霉素	—
盐酸多西环素	0.5~2
硫酸新霉素	—
磺胺间甲氧嘧啶钠	8~32
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶	0.6/0.03~4.8/0.25
^a “—”表示暂无该药物质控菌株的允许范围。	

D.5.6 结果判读

- D.5.6.1 对微量稀释板或试管进行肉眼观察,以能抑制微量稀释板孔内或试管内细菌生长的抗菌药物的最低浓度为 MIC 值。
- D.5.6.2 当微量稀释板出现单个跳孔或试管出现单个跳管时,应记录最高的 MIC 值。当出现不止一个跳孔或跳管时,则结果不能报告,需重新检测。

附 录 E
(规范性)
抗菌药物药敏试验结果判定参考标准

表 E.1 给出了抗菌药物药敏试验结果判定参考标准。

表 E.1 抗菌药物药敏试验结果判定参考标准

抗菌药物	折点, $\mu\text{g/mL}$		
	S	I	R
恩诺沙星	≤ 0.5	1~2	≥ 4
环丙沙星	≤ 1	2	≥ 4
氟甲喹	N/A ^a	N/A	N/A
氟苯尼考	≤ 2	4	≥ 8
甲砒霉素	N/A	N/A	N/A
盐酸多西环素	≤ 4	8	≥ 16
硫酸新霉素	N/A	N/A	N/A
磺胺间甲氧嘧啶钠	≤ 256	— ^b	≥ 512
复方磺胺甲噁唑	$\leq 2/38$	—	$\geq 4/76$
^a N/A 表示暂无折点判定参考值。 ^b “—”表示无折点。			