ICS 65.020.30

B 43

|  |
| --- |
|  |

DB15

     内蒙古自治区地方标准

DB 15/ XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

精准用药治疗奶牛乳房炎技术规程

The treatment regulation for the mastitis of dairy cows

with precise medication

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

|  |
| --- |
|  |
|  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

内蒙古自治区市场监督管理局       发布

前  言

本规程是按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本规程由内蒙古自治区农牧业科学院提出。

本标准由内蒙古自治区畜牧业标准化技术委员会（SAM/TC19）归口。

本标准起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院。

本规程主要起草人：王丽芳、姚一萍、史培、张三粉、宋洁、钟华晨、杨健、郭晨阳、连海飞、羿静、冯小慧。

精准用药治疗奶牛乳房炎技术规程

1. 范围

本标准规定了奶牛乳房炎精准用药的技术措施。

本标准适用于奶牛养殖场采用精准用药技术治疗奶牛乳房炎的操作程序。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 4789.38-2012 食品卫生微生物学检验 大肠杆菌计数

GB/T 6682分析实验室用水规格和试验方法

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

奶牛乳房炎 dairy cows mastitis

奶牛乳腺组织，受到物理、化学或微生物方面等因素刺激而引起一系列炎性反应的疾病。

最小抑菌浓度 MIC

用试管稀释法测定细菌对药物的敏感性。完全抑制细菌生长的最高稀释管1毫升所含的药量。亦即被测细菌对该药的敏感度。因药物和细菌的种类不同，需具体规定药物的稀释范围使用培养基的种类、加菌量，培养条件和判定结果的时间。

大肠杆菌 Escherichia coli

大肠埃希氏菌，是指一群好氧及兼性厌氧,在37℃、24h能分解乳糖产酸产气的革兰氏阴性无芽孢杆菌,是Escherich在1885年发现的。大肠杆菌是条件致病菌，在一定条件下可以引起人和多种动物发生胃肠道感染或尿道等多种局部组织器官感染。

金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus

“金葡菌”，隶属于[葡萄球菌](https://baike.baidu.com/item/%E8%91%A1%E8%90%84%E7%90%83%E8%8F%8C/3625429" \t "_blank)属，是革兰氏阳性菌代表，为一种常见的食源性致病微生物。该菌最适宜生长温度为37℃，pH为7.4，耐高盐，可在盐浓度接近10%的环境中生长。

无乳链球菌 Streptococcus agalactiae

一种革兰氏阳性链球菌，因最先从患[乳腺炎](https://baike.baidu.com/item/%E4%B9%B3%E8%85%BA%E7%82%8E/4420196" \t "_blank)的牛中分离而得名。该菌能导致动物体产生[败血症](https://baike.baidu.com/item/%E8%B4%A5%E8%A1%80%E7%97%87/629320" \t "_blank)和[脑膜炎](https://baike.baidu.com/item/%E8%84%91%E8%86%9C%E7%82%8E/2122235" \t "_blank)，且具有较高的致死率。

克雷伯氏菌 Klebsiella

革兰氏阴性菌。为较短粗的杆菌，大小0.5～0.8×1～2um，单独、成双或短链状排列。无芽胞，无[鞭毛](https://baike.baidu.com/item/%E9%9E%AD%E6%AF%9B/599456" \t "_blank)，有较厚的荚膜，多数有菌毛。在肠道杆菌选择性培养基上能发酵乳糖，呈现有色菌落。克雷伯氏杆菌寄生于动物呼吸道或肠道，为条件病原菌，是引起人类肺炎的病原菌之一。对人、畜等具有高度的病原性，能使人兽发生肺炎、子宫炎、乳房炎及其他化脓性炎症，甚至发生败血症。

1. 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T6682规定的一级水。

* 1. 乳头药浴液。
  2. 甘油（C3H8O3）。
  3. 75%酒精棉球。
  4. 无菌离心管10 ml。
  5. 离心管50 ml。
  6. 5%绵羊血琼脂平板。
  7. 60%无菌甘油：在40 mL蒸馏水中加入60 mL甘油(4.2)，配制后进行灭菌，置于4℃保存。
  8. 9 cm直径的培养皿。
  9. 1μl和10 μl两种规格的无菌接种环。
  10. 16 S rDNA引物：。
  11. PCR试剂盒。
  12. DNA marker：2000 DL。
  13. MHB肉汤：。
  14. 比浊管。
  15. 质控菌株ATCC 29213/25922。
  16. 96孔组合式药敏MIC&MBC测试盒（冻干型），产品信息详见说明书。
  17. 5 ml/1 ml/ 200 μl/10 μl 灭菌枪头。
  18. 2 ml灭菌离心管。
  19. 无菌医用棉签。

1. 仪器和设备
   1. 电子天平：感量为0.001g。
   2. 高压灭菌锅。
   3. 生物安全柜。
   4. 恒温培养箱。
   5. 恒温振荡培养箱。
   6. 高速离心机。
   7. 小离心机。
   8. PCR仪。
   9. 微波炉。
   10. DNA电泳设备。
   11. 凝胶成像系统。
   12. 麦氏比浊仪。
   13. 移液器（包括多通道300μl，单通道5 ml/1 ml/200 μl/10 μl/2.5 μl）。
   14. -20℃冰箱。
   15. -80℃冰箱。
2. 分析步骤

6.1 样品采集

6.2 细菌的分离、纯化、保存

6.2.1 分离

将奶样混匀，用无菌医用棉签蘸取奶样，划线接种到直径为9 cm的5%绵羊血琼脂平板，将平板放在 37 ℃的恒温培养箱中培养，剩余的奶样置于4℃冰箱中保存，备用。24 h～ 48 h后观察菌落生长情况及形态特征，并做好记录。

6.2.2 纯化

用1 μl的无菌接种环挑取典型单个菌落, 接种到不同的肉汤中于 37 ℃恒温摇床培养箱中增菌培养。8 h～16 h后用1 μl的无菌接种环在血平板上进行划线培养，将平板放在 37 ℃的恒温培养箱中培养 24 h ～48 h。若无杂菌生长则认为该细菌已是纯化的细菌，若有杂菌生长则需重新纯化。

6.2.3 分离菌保存

从血平板上挑取已经纯化的典型单个细菌接种到肉汤中，于 37 ℃恒温振荡培养箱中增菌培养8 h～ 16 h，按照400 μl菌液加入200 μl 60%无菌甘油的比例进行菌种保存，充分混匀，制成终浓度为20%的甘油菌，封口，做好标记-80℃冰箱冷冻保存。

6.3 病原菌鉴定

6.3.1 分子生物学鉴定

6.3.1.1 细菌基因组DNA的小量提取

用水煮法或细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒进行提取（具体方法参照分子克隆指南或相关产品说明书）。

6.3.1.2 16S rDNA基因的PCR扩增

以提取出的细菌基因组DNA为模板，根据GenBank上的DNA序列设计通用引物。其引物序列为：

Bacterial 16s-F：ACGCGTCGACAGAGTTTGATCCTGGCT，

Bacterial 16s-R：CGCGGATCCGCTACCTTGTTACGACTT。

反应程序为：94℃预变性5 min；94℃变性45 s，55℃退火45 s，75℃延伸90 s，反应进行30个循环；72℃延伸10 min。预期目的条带大小为1500 bp。

7 药敏试验

根据牧场常用的乳房炎防治药物，参照美国临床和实验室标准化协会（CLSI）或欧盟药敏试验标准（EUCAST）推荐的药敏检测技术对已分离鉴定的葡萄球菌、链球菌、肠杆菌科细菌等主要乳房炎病原菌进行药物敏感性实验（最小抑菌浓度，MIC）。

7.1 受试菌液制备

挑取已经鉴定的单个菌落接种到肉汤中（肠杆菌用MH肉汤，葡萄球菌用MH肉汤，链球菌用含5%血清的MH肉汤），置于37 ℃恒温摇床培养箱中培养。葡萄球菌培养8～ 12 h左右、链球菌培养20～ 24 h左右，肠杆菌科则培养4～ 6 h左右。随后使用比浊仪检测菌液的浓度，最终制成0.5个麦氏浊度单位的细菌悬浊液（约1×108 CFU/mL）。将0.5个麦氏浊度单位的细菌悬浊液稀释1000倍，此时细菌悬浊液（约1×105 CFU/mL），此后将100 μl的细菌悬浊液加入100 μl的稀释药物中（约5×104 CFU/mL）。制备好的细菌悬浊液在30 min内接种并培养。

7.2 最小抑菌浓度（MIC）检测

采用CLSI推荐的微量肉汤（测试链球菌科时在肉汤中加入5%的血清）稀释法测定细菌对药物敏感性，具体步骤如下：

7.2.1移液器先吸取100 μl无菌肉汤加入到第12孔中，作为空白对照，然后吸取100 μl稀释好的菌液依次加入到96孔反应板的第1～11孔中。

7.2.2在37 ℃恒温培养箱中培养16 h～ 20 h，进行MIC结果的读取。

7.2.2.1只加细菌孔生长良好且只加MH肉汤孔无细菌生长时，可进行下一步。

7.2.2.2 细菌对某种药物的MIC，即抑制细菌生长的最低抑菌浓度，一般判定是参考细菌生长孔前一孔的浓度，即为MIC值（用甲氧苄啶和磺胺类药物进行测试时，培养基中的拮抗剂容易导致微生物的少量生长；所以，当相比对照孔某一孔的药物浓度能抑制≥80%的微生物生长时即可判定该浓度为终点浓度）。

8 数据处理

先确定大肠杆菌ATCC25922标准菌株、金黄色葡萄球菌ATCC29213标准菌株的MIC数据是否符合质控要求，在此基础上确认各菌株的MIC检测结果有效性。

1. 药物敏感性判定

测试菌株药物敏感性判定参考CLSI或EUCAST标准，详见~~表1，~~表1。

表1 革兰氏阳性细菌耐药性判定标准**（单位：μg/ml）**

|  |  |
| --- | --- |
| 葡萄球菌 | 链球菌 |
| PEN(＞0.25) | PEN(≥2) |
| AMP(≥0.5) | AMP(>2) |
| AMC(≥8/4) | AMC(≥8/4) |
| OX(≥4) | OX(无标准) |
| CF(≥ 32) | CF(≥32) |
| EFT(≥ 8) | EFT(≥ 8) |
| CC(＞4) | CC(≥ 1) |
| ERY(≥ 8) | ERY(≥ 1) |
| GEN(≥16) | GEN(≥16) |
| DOX(≥16) | DOX(≥1) |
| FFC(≥ 8) | FFC(＞8) |
| RIF(≥4) | RIF(≥4) |
| VA(≥ 16) | VA(＞2) |
| CIP(≥4) | CIP（无标准) |
| SIZ(≥512) | SIZ(≥512) |
| TMP/SMX(≥4/76) | TMP/SMX(≥4/76) |

注：1）药物缩写：PEN-青霉素；AMP-氨苄西林；AMC-阿莫西林+克拉维酸（2:1）；OX-苯唑西林；CF-头孢噻吩（可代表头孢氨苄）；EFT-头孢噻呋；CC-克林霉素（可代表林可霉素）；ERY-红霉素；GEN-庆大霉素；DOX-多西环素；FFC-氟苯尼考；RIF-利福平(可代表利福昔明)；VA-万古霉素；CIP-环丙沙星；SIZ-磺胺异噁唑； TMP/SMX-甲氧苄啶+磺胺甲噁唑(1:19)。2）药物后括号内数值代表细菌对该药物耐药的判定标准。

表2 革兰氏阴性细菌耐药性判定标准**（单位：μg/ml）**

|  |  |
| --- | --- |
| 药物名称 | 折点（肠杆菌属） |
| AMP | ≥32 |
| AMC | ≥32/16 |
| CF | >16 |
| EFT | ≥ 8 |
| MEM | ≥4 |
| STR | - |
| KAN | ≥64 |
| GEN | ≥16 |
| TE | ≥16 |
| DOX | ≥16 |
| FFC | ＞8 |
| CT | - |
| RIF | - |
| CIP | ≥4 |
| SIZ | ≥512 |
| TMP/SMX | ≥4/76 |

注：1）药物缩写：AMP-氨苄西林；AMC-阿莫西林+克拉维酸（2:1）；CF-头孢噻吩（可代表头孢氨苄）；EFT-头孢噻呋；MEM-美罗培南，STR-链霉素,KAN-卡那霉素；GEN-庆大霉素；TE-四环素；DOX-多西环素；FFC-氟苯尼考；CT-多粘菌素E；RIF-利福平(可代表利福昔明)；CIP-环丙沙星；SIZ-磺胺异噁唑； TMP/SMX-甲氧苄啶+磺胺甲噁唑(1:19)。2）“-”代表无折点标准。

1. 耐药菌谱建立

耐药率R=耐药菌的数量/总菌的数量×100%

根据上述耐药性判定，如果对评估的药物耐药率R＞75%，则判定为严重耐药；如果耐药率R介于75%≥R>25% ，则判定为中度耐药；如果耐药率R介于25%≥R>5%，则判定为轻度敏感；如果R≤5%，则判定为很敏感。

1. 精准用药判定依据

在对奶牛乳房炎治疗时，建议优先选择R≤5%的药物，其次是25%≥R>5%的药物。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_