

ICS 11.220

点击此处添加中国标准文献分类号

# 团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—2021

## 增强抗生素对兽医临床常见病原菌敏感性的 药物筛选及联合用药评价试验操作规范

Operational specification for drug screening and combined drug evaluation test to  
enhance the sensitivity of antibiotics to common veterinary clinical pathogens

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

2021 - XX - XX 发布

2021 - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

## 前 言

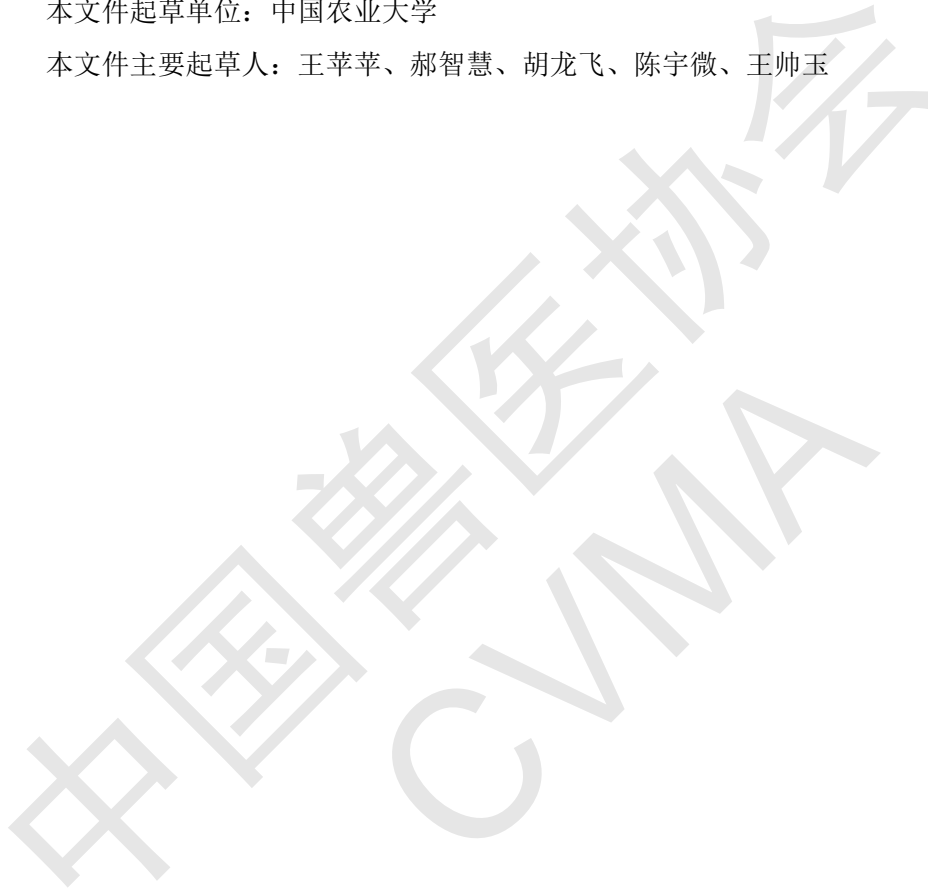
本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国农业大学

本文件主要起草人：王莘莘、郝智慧、胡龙飞、陈宇微、王帅玉



# 增强抗生素对兽医临床常见病原菌敏感性的药物筛选及联合用药评价试验操作规范

## 1 范围

本文件规定了筛选增强抗生素对兽医临床常见病原菌敏感性的药物操作方法，操作流程及记录要求，并对筛选出的敏感药物与抗生素的联合作用进行评价。

本文件适用于中药单体、中药提取物、天然药物活性成分、抗生素等作为增强抗生素对常见病原菌敏感性的药物筛选。

## 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

GB/T 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

WS/T 639—2018 抗菌药物敏感性试验的技术要求

EUCAST 欧盟药敏试验标准（2017年版）

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### **抗微生物药物敏感性试验 Antimicrobial susceptibility testing**

检测微生物（本文件特指细菌）对抗微生物药物（本文件特指抗菌药物）的体外敏感性，以指导临床合理选用药物的微生物学试验，简称药敏试验。

### 3.2

#### **最低抑菌浓度 Minimal inhibitory concentration; MIC**

在琼脂或肉汤稀释法药物敏感性检测试验中能抑制肉眼可见的微生物生长的最低抗菌药物浓度。

### 3.3

#### **分级抑菌浓度 The fractional inhibitory concentration; FIC**

分级抑菌浓度指数 FIC 值在各类联合用药敏感菌试验的结果中可以作为评价和疗效判断依据基础的数值。

### 3.4

#### **折点 Breakpoint**

能预测临床治疗效果，用以判断敏感、中介、剂量依赖型敏感、耐药、非敏感的最低抑菌浓度（MIC）数值。

### 3.5

#### **敏感 Susceptible**

当抗菌药物对分离株的 MIC 值处于敏感范围时，使用推荐剂量进行治疗，该药在感染部位通常达到的浓度可抑制被测菌的生长，临床治疗可能有效。

## 4 结果解释分类

实验室测试和报告抗菌药物的 MIC 值的结果，按折点分为:敏感 (S)、剂量依赖型敏感 (SDD)、中介 (I)、耐药 (R) 或非敏感 (NS)；实验室测试和报告抗菌药物联合抗生素增效敏感的 FIC 值的结果，按数值  $FIC \leq 0.5$ 、 $0.5 < FIC \leq 1$ 、 $1 < FIC \leq 2$ 、 $2 < FIC$  时，其与抗生素的联合作用分别为协同作用、相加作用、无关作用或拮抗作用；从而判定筛选的药物为具有协同作用药物、具有相加作用药物、具有无关作用、具有拮抗作用药物。

## 5 筛选试验方法

### 5.1 设备和材料

下列设备和试剂适用于本文件。

5.1.1 双人单面垂直净化工作台(SW-CJ-2FD)

5.1.2 生化培养箱(LRH-250F): 36°C~38°C

5.1.3 多功能酶标仪(M1000 Pro)

5.1.4 恒温振荡培养器(HZQ-X300C)

5.1.5 自动立式高压灭菌器(GI80DS)

5.1.6 十万分之一电子天平(BT125D)

5.1.7 0.22 $\mu$ m 过滤器

5.1.8 可调移液器: 10  $\mu$ L~100  $\mu$ L, 100  $\mu$ L~1000  $\mu$ L。

5.1.9 96 孔细菌培养板

### 5.2 菌种和培养基

#### 5.2.1 菌种

5.2.1.1 大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922。

5.2.1.2 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus Aureus* ATCC29213。

5.2.1.2 沙门氏菌 *Salmonella* ATCC14028

#### 5.2.2 培养基

保存、传代、增菌用 LB 固体和液体培养基，药敏筛选用 MH 固体或液体培养基[1]。

5.2.2.1 保存及传代用细菌培养基；按照附录 A.1 配置。

5.2.2.2 增菌用液体培养基；按照附录 A.2 配置。

5.2.2.3 增菌用固体培养基；按照附录 A.3 配置。

5.2.2.4 检定用培养基；按照附录 A.3 配置。

### 5.3 试剂制备和保存

本方法所用化学试剂为分析纯，试验用水为蒸馏水或去离子水，试验用水应符合 GB/T 6682 的规定。

#### 5.3.1 试样制备

协同增效剂候选药物储备液制备: 将粉末状抗菌药物溶于无菌水或适当的溶剂中后过滤除菌，使其贮存浓度为 5120  $\mu$ g/mL。贮存液最低制备浓度为 1280 $\mu$ g/mL，最大试验浓度为 32  $\mu$ g/L。

#### 5.3.2 试样保存

协同增效剂候选药物储备液于-80°C保存。

#### 5.3.3 测定方法

##### 5.3.3.1 方法提要

利用协同增效剂候选药物对敏感菌的 MIC 值来判别是否对病原菌具有抑制作用，再利用棋盘微量肉汤稀释法得到的 FIC 值判别协同增效剂候选药物与抗生素的联合作用，并据此判定协同增效剂候选药物是否能够作为抗生素的协同增效剂。

#### 5.3.3.1.1 细菌的培养、分离和鉴定

病原菌的增菌培养、分离和鉴定按 GB 4789.4-2016、GB/T 4789.6-2016、GB 4789.10-2016 和 GB/T 4789.28 等进行。经鉴定后的临床菌株移种到 MH 平板上，36°C~38°C 培养 18~24 h。若不能即时进行敏感性测定，应置 0°C~4°C 冰箱保存。耐药性测定前传代。

#### 5.3.3.1.2 增效剂候选药物工作液制备

取一管增效剂候选药物，提前半小时于 4°C 中自然升温融化，在超净工作台中稀释制备 1024 μg/ml 药物工作液。同时测定溶剂的抑菌情况即为溶剂对照。

#### 5.3.3.1.3 标准菌株的细菌菌悬液制备

用接种环挑取 3 个~5 个左右 MH 琼脂培养皿上的单菌落至灭菌的 PBS 溶液或生理盐水 (0.9% NaCl) 中，用浊度仪调至 0.5 麦氏浊度 (=  $1 \times 10^8$  CFU/mL) 然后用无菌 PBS 溶液或生理盐水在干净的培养皿中按 1:100 稀释菌悬液，即得到约含  $1 \times 10^6$  CFU/ml 的菌液，为防止菌液时间过长发生浓度变化应现配现用，在 15 min 接种完毕。

#### 5.3.3.1.4 MIC 检测用 96 孔微量稀释板的制备

采用微量稀释法检测最小抑菌浓度 (MIC) 值。在接种悬浮液制备好 30 min 内，在每孔含有 100 μL 稀释好的药物的微量稀释板中，向每孔中加入 100 μL 细菌悬浮液 (终浓度为  $5 \times 10^5$  CFU/ml)。确保设有阳性对照 (细菌悬浮液)、阴性对照 (MH 肉汤)、溶剂对照，中药活性单体检测可加抗生素对照；耐药菌株检测时每次检测须同时做质控菌株对照。将接种过的 96 孔板置于 36°C~38°C 培养箱中孵育 18 h~24 h，读数。对于一些生长缓慢的菌株，在 24 h~30 h 时读取。

#### 5.3.3.1.5 增效剂候选物及抗生素的最小抑制浓度判读

在确定生长终点时，以无肉眼可见的细菌生长孔浓度为该药的 MIC 值。只有在生长对照孔的细菌有足够生长 ( $\geq 2$  mm 纽扣状沉淀或绝对的浊度)，且质控菌 MIC 在范围内，阴性对照澄清透亮，测定视为有效。每个孔中细菌生长的程度均应与阳性对照孔进行对比，能够明细抑制细菌生长的最小药物浓度认定为该增效剂候选物对该细菌的最小抑菌浓度。

#### 5.3.3.1.6 增效剂候选物与抗生素联合作用检测

选取有效增效剂进行与抗生素联合作用的测试。每块 96 孔板最多可测试 2 个化合物，重复三次。具体操作如下：

采用棋盘法进行联合药敏试验。以各菌株单药 MIC 值确定稀释浓度，最高终浓度为 MIC 值的 2 倍，使用灭菌 MH 肉汤倍比稀释，一般取 6 个~8 个稀释度左右，两种药物在一次性 96 孔 U 型板上横纵联合。将制备好的菌液依次加入药物孔中，设置阳性对照孔为菌液对照组，阴性对照为空白肉汤，单药需设置两组平行试验。密封后置于 37°C 恒温培养箱中培养 18~24 h 后观察记录结果，试验重复 2 次。质控菌株与供试菌株同法操作。菌液最终接种浓度  $5 \times 10^5$  CFU/mL。

#### 5.3.3.1.7 检测结果的判定和报告

通过计算两种药物的部分抑菌指数 (FIC) 判断相互作用。 $FIC = \text{联合用药时甲药 MIC} / \text{单独应用甲药时 MIC} + \text{联合应用乙药时 MIC} / \text{单独应用乙药时 MIC}$ ；

当  $FIC \leq 0.5$  时，判定甲、乙两药具有协同作用，当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时，增效剂候选药物可以作为抗生素的协同增效剂；当  $0.5 < FIC \leq 1$  时，判定甲、乙两药具有相加作用，当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时，增效剂候选药物可以作为抗生素的增效剂；当  $1 < FIC \leq 2$  时，判定甲、乙两药具有无关作用，当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时，增效剂候选药物不作用抗生素的增效剂候选药物；当  $2 < FIC$  时，判定甲、乙两药具有拮抗作用，当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时，增效剂候选药物不作用抗生素的增效剂候选药物。

#### 5.3.3.1.8 临床细菌菌悬液的制备

用接种环挑取 5 个~10 个左右 37°C 过夜培养的 MH 琼脂培养皿上的单菌落至生理盐水 (0.9%NaCl) 中, 用浊度仪调至 0.5 麦氏浊度( $=1 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ )然后将生理盐水稀释的菌液用无菌 MH 肉汤在干净的培养皿中按 1:100 稀释菌悬液, 即得到约含  $1 \times 10^6 \text{CFU/mL}$  的菌液, 待用。

#### 5.3.3.1.9 检测用 96 孔微量稀释板的制备

参考方法 5.3.3.1.3 采用微量稀释法初筛出具有协同和增效作用的增效剂候选药物和抗生素分别对临床病原菌的 MIC 值。

#### 5.3.3.1.10 增效剂候选物及抗生素的最小抑制浓度判读

在确定生长终点时, 以肉眼可见的细菌生长孔浓度为该药的 MIC 值。只有在生长对照孔的细菌有足够生长 ( $\geq 2 \text{ mm}$  纽扣状沉淀或绝对的浊度), 且质控菌 MIC 在范围内, 阴性对照澄清透亮, 测定视为有效。每个孔中细菌生长的程度均应与阳性对照孔进行对比, 能够明显抑制细菌生长的最小药物浓度认定为该增效剂候选物对该细菌的最小抑菌浓度。如相关设备可以识别孔内微生物的生长情况, 也可使用其读取微量稀释试验结果和记录结果。

#### 5.3.3.1.11 增效剂候选物与抗生素联合作用检测

根据初筛出具有协同和增效作用的增效剂候选药物和抗生素对临床病原菌的 MIC 值进行联合作用的检测。每块 96 孔板最多可测试 2 个化合物, 重复三次。具体操作如下:

纵横两条边线先再梯度稀释单独的增效剂候选物和抗生素制板验证单用时 MIC 值, 后每种药物最高从 2 倍 MIC 浓度开始, 使用灭菌 MH 肉汤倍比稀释, 一般取 6 个~8 个稀释度左右, 各取 50  $\mu\text{L}$  分别排列在平板的行与列上, 然后在加入 100  $\mu\text{L}$  菌液, 是最终接种量在  $5 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ , 过夜培养, 无细菌生长的最低药物浓度为 MIC。

#### 5.3.3.1.12 检测结果的判定和报告

通过计算部分抑菌指数 (FIC) 判断相互作用。FIC=联合用药时甲药 MIC/单独应用甲药时 MIC+联合应用乙药时 MIC/单独应用乙药时 MIC;

当  $\text{FIC} \leq 0.5$  时, 判定甲、乙两药具有协同作用, 当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时, 增效剂候选药物可以作为抗生素的协同增效剂; 当  $0.5 < \text{FIC} \leq 1$  时, 判定甲、乙两药具有相加作用, 当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时, 增效剂候选药物可以作为抗生素的增效剂; 当  $1 < \text{FIC} \leq 2$  时, 判定甲、乙两药具有无左右, 当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时, 增效剂候选药物不作用抗生素的增效剂候选药物; 当  $2 < \text{FIC}$  时, 判定甲、乙两药具有拮抗作用, 当甲、乙两药分别为增效剂候选药物和抗生素时, 增效剂候选药物不作用抗生素的增效剂候选药物。

### 5.4 结果及判断

同时对标准菌株和临床菌株菌均具有协同增效作用的增效剂候选药物和抗生素组合可以判定为该增效剂候选药物可以作为该抗生素对病原菌的协同增效剂, 且两者联合具有协同增效作用。

## 6 各种属细菌药敏试验方法和试验条件

临床常见快速生长非苛养菌、常见苛养菌、不常见菌、潜在生物恐怖病原菌、诺卡菌属和其他需氧放线菌、厌氧菌的药敏试验方法和试验条件参考标准 WS/T 639—2018《抗菌药物敏感性试验的技术要求》。常见菌各种属细菌药敏折点参照参考文献[1]。

## 7 记录要求

7.1 所有记录应统一规范, 记录不得涂改和伪造。

7.2 原始记录应详细、清楚、真实、准确, 并具有可追溯性, 保存期不少于 3 年。

## 参考文献

[1] 刘玉庆,李璐璐,骆延波,等. EUCAST 欧盟药敏试验标准[M],北京:中国标准出版社,2016,(03)17-18.

---

中国兽医协会  
CVMA

## 附录 A

(规范性)

## 培养基

## A.1 保存及传代用细菌培养基

## A.1.1 成分

胰蛋白胨	10.0g
酵母浸粉	5.0g
氯化钠	10.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1000mL

## A.1.2 制法

将各成分加热溶解，分装试管，121℃高压灭菌 15min，制成斜面。

注：制成半固体时，琼脂量为 0.5%。

## A.2 增菌用液体培养基

## A.2.1 成分

胰蛋白胨	10.0g
酵母浸粉	5.0g
氯化钠	5.0g
蒸馏水	1000mL
pH7.0±0.1, 25℃	

## A.2.2 制法

将各成分加热溶解，121℃高压灭菌 15min，后在超净工作台分装。

## A.3 增菌用固体培养基

## A.3.1 成分

胰蛋白胨	10.0g
酵母浸粉	5.0g
氯化钠	10.0g
琼脂	15.0g
蒸馏水	1000mL

## A.3.2 制法

将各成分加热溶解，分装 300mL 于锥形瓶内封口后，121℃高压灭菌 15min。