

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/HBAAV

河北省畜牧兽医学会团体标准

T/HBAAV XXXX—XXXX

规模化猪场动物源细菌耐药性监测技术规范

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

河北省畜牧兽医学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 实验室安全要求	1
5 设备和材料	2
6 质控菌株	3
7 操作步骤	3
8 生物安全	12
附录 A（规范性） 药敏试验判定标准	13

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。

本文件由河北省畜牧兽医研究所提出并归口。

本文件起草单位：河北省畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：张宁、韩昱、杨威、胡连霞、肖娜、谌志伟、赵博伟、卢军霞、高英、张瑞华、胡晓悦、张超、黄志国、郭治、李丹、牛红颖、李炜、张靖沅。

规模化猪场动物源细菌耐药性监测技术规范

1 范围

本文件规定了规模化猪场动物源细菌耐药性监测的设备和材料、试剂和培养基、质控菌株、样品采集与细菌分离鉴定、细菌抗菌药物敏感性测试、折点判断标准、菌种保存和生物安全措施的技术要求。

本文件适用于规模化猪场动物源细菌（大肠埃希菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、猪链球菌、肠球菌、产气荚膜梭菌）的分离鉴定及对常见抗菌药物的耐药性监测。

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 4789.1-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则
- GB 4789.4-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.28-2024 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求
- GB/T 5750.2-2023 生活饮用水标准检验方法 第2部分：水样的采集与保存
- GB/T 6682-2016 分析实验室用水规格和试验方法
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
- NY/T 4141-2022 动物源细菌耐药性监测样品采集技术规程
- NY/T 4142-2022 动物源细菌抗菌药物敏感性测试技术规程 微量肉汤稀释法
- NY/T 4143-2022 动物源细菌抗菌药物敏感性测试技术规程 琼脂稀释法
- NY/T 4144-2022 动物源细菌抗菌药物敏感性测试技术规程 纸片扩散法
- NY/T 4145-2022 动物源金黄色葡萄球菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4146-2022 动物源沙门氏菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4147-2022 动物源肠球菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4149-2022 动物源大肠埃希菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4656-2025 动物源产气荚膜梭菌分离与鉴定技术规程
- WS/T 639-2018 抗菌药物敏感性试验的技术要求
- DB31/T 1160-2019 畜禽养殖过程细菌耐药性监测技术规范
- DB11/T 1429-2017 动物养殖场消毒效果评价规范
- DB15/T 2074—2021 动物垫料中肺炎克雷伯氏菌检测
- DB34/T 2996-2017 猪链球菌检验操作规程
- T/SHAAV 015-2024 动物源细菌耐药性监测实验室建设规范
- T/ZNZ 099-2021 畜禽源细菌耐药性测定 纸片扩散法
- CLSI M100 抗菌药物敏感性试验执行标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

规模化猪场（large-scale pig farms）采用现代养殖技术与设施设备，年出栏 500 头以上的自繁自养场、专业母猪场、专业育肥猪场。

4 实验室安全要求

实验室设施设备、人员防护、实验安全操作、实验废弃物及菌株处理应符合 GB 19489 的要求。

5 设备和材料

开展细菌耐药性监测微生物实验室应符合 GB 19489 生物安全二级实验室,微生物实验室常规灭菌、培养和鉴定设备按 GB 4789.1-2016 和 GB 4789.9-2014 执行,其他设备和材料如下。

5.1 设备

- 5.1.1 微量移液器: 0.1 μ L~2.5 μ L; 0.5 μ L~10 μ L; 10 μ L~100 μ L; 100 μ L~1000 μ L。
- 5.1.2 电子天平: 感量 0.0001 g。
- 5.1.3 显微镜: 10 \times ~100 \times 。
- 5.1.4 药敏试纸片分配器。
- 5.1.5 游标卡尺: 精度 0.1 mm。
- 5.1.6 全自动核酸提取仪。
- 5.1.7 核酸电泳仪。
- 5.1.8 凝胶成像系统。
- 5.1.9 高速低温离心机: 转速不低于 13000 rpm。
- 5.1.10 金属浴恒温器: 室温~100 $^{\circ}$ C。
- 5.1.11 PCR 扩增仪。
- 5.1.12 抑菌圈测量仪。
- 5.1.13 细菌多点接种仪。
- 5.1.14 全自动微生物鉴定及药敏分析系统。
- 5.1.15 微生物质谱仪 (MALDI-TOF MS)。
- 5.1.16 冰箱: 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C, -80 $^{\circ}$ C。

5.2 材料

- 5.2.1 无菌培养皿: 直径 70 mm 和 90 mm。
- 5.2.2 麦氏比浊管和比浊仪: 可测量范围麦氏浊度 0.01~4.00。
- 5.2.3 一次性无菌接种环 (1 μ L)。
- 5.2.4 一次性无菌植绒拭子。
- 5.2.5 一次性涂布器。
- 5.2.6 标准比浊管。
- 5.2.7 厌氧培养袋。
- 5.2.8 厌氧产气包。
- 5.2.9 革兰氏阳性菌鉴定卡 (全自动微生物鉴定及药敏分析系统适用)。
- 5.2.10 革兰氏阴性杆菌鉴定卡 (全自动微生物鉴定及药敏分析系统适用)。
- 5.2.11 厌氧菌和棒状杆菌鉴定卡 (全自动微生物鉴定及药敏分析系统适用)。
- 5.2.12 革兰氏阴性菌药敏卡片 (全自动微生物鉴定及药敏分析系统适用)。
- 5.2.13 革兰氏阳性菌药敏卡片 (全自动微生物鉴定及药敏分析系统适用)。
- 5.2.14 葡萄球菌属、肠球菌属、无乳链球菌药敏卡 (全自动微生物鉴定及药敏分析系统适用)。
- 5.2.15 肺炎链球菌药敏卡片 (全自动微生物鉴定及药敏分析系统适用)。
- 5.2.16 一次性悬浮液管。
- 5.2.17 药敏试纸片: 根据检测目标菌株与药物选购,可使用符合 CLSI M100 的商品化药敏试纸片。
- 5.2.18 药敏试验板。

5.3 试剂

- 5.3.1 实验用水: 培养基和试剂配制用水应符合 GB/T 6682-2016 的规定。无菌生理盐水的制备按 GB 4789.1-2016 执行。
- 5.3.2 革兰氏染色液: 商品化革兰氏染色液套装。
- 5.3.3 营养肉汤。
- 5.3.4 营养琼脂。
- 5.3.5 缓冲蛋白胨水 (BPW)。

- 5.3.6 肠球菌增菌液。
- 5.3.7 四硫磺酸钠煌绿增菌液 (TTB)。
- 5.3.8 RVS 增菌液。
- 5.3.9 亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC)。
- 5.3.10 7.5%氯化钠肉汤。
- 5.3.11 脑心肉汤培养基。
- 5.3.12 选择性 Todd-Hewitt 肉汤 (选择性 THB)。
- 5.3.13 厌氧庖肉培养基。
- 5.3.14 液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG)。
- 5.3.15 伊红美蓝琼脂培养基。
- 5.3.16 麦康凯琼脂培养基。
- 5.3.17 肠球菌显色琼脂。
- 5.3.18 沙门菌二代显色培养基。
- 5.3.19 胆硫乳琼脂 (DHL)。
- 5.3.20 麦康凯肌醇阿东醇羧苄西林琼脂。
- 5.3.21 金黄色葡萄球菌显色琼脂。
- 5.3.22 绵羊血琼脂培养基。
- 5.3.23 胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础 (TSC)。
- 5.3.24 阳离子调节 Mueller-Hinton 肉汤 (CAMHB)。
- 5.3.25 Mueller-Hinton 琼脂 (MHA)。
- 5.3.26 强化布氏血琼脂产性能。

6 质控菌株

- 6.1 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 质控菌株: ATCC 25922。
- 6.2 肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 质控菌株: ATCC 29212。
- 6.3 沙门菌 (*Salmonella*) 质控菌株: ATCC 14028。
- 6.4 肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 质控菌株: ATCC 10031。
- 6.5 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 质控菌株: ATCC 25923、ATCC29213。
- 6.6 猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 质控菌株: ATCC 49619、ATCC 25922。
- 6.7 产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 质控菌株: ATCC 13124。
- 6.8 脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 质控菌株: ATCC 25285。
- 6.9 多型拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 质控菌株: ATCC 29741。
- 6.10 迟缓优杆菌 (*Eggerthella lentum*) 质控菌株: ATCC 43055。
- 6.11 质控菌株保存、传代: 按照 T/SHAAV 015-2024 的要求执行。

7 操作步骤

7.1 样品采集与保存运输

7.1.1 样品采集

直肠/泄殖腔拭子、咽/喉拭子、鼻拭子、粪便样品/粪便拭子、肠道内容物、病料采集按照 NY/T 4141-2022 中 7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.7、7.8、7.9 的规定执行；环境样品采集按照 DB11/T 1429-2017 的规定执行；水样采集按照 GB/T 5750.2-2023 的规定执行；其他样品采集按照 NY/T 541-2016 的规定执行。

7.1.2 样品保存运输

不同样品应分开包装、密封，避免样品泄漏和交叉污染，保存与运输的样品容器应贴有明确的标签。用于分离产气荚膜梭菌的样品应排除包装袋中的空气，放置相应产气包，保持微需氧/厌氧环境。2℃~8℃保存，运输时间不超过 72 h。用于分离产气荚膜梭菌的样品，不超过 24 h。

7.2 细菌分离鉴定与保存

7.2.1 大肠埃希菌的分离鉴定

7.2.1.1 分离鉴定流程

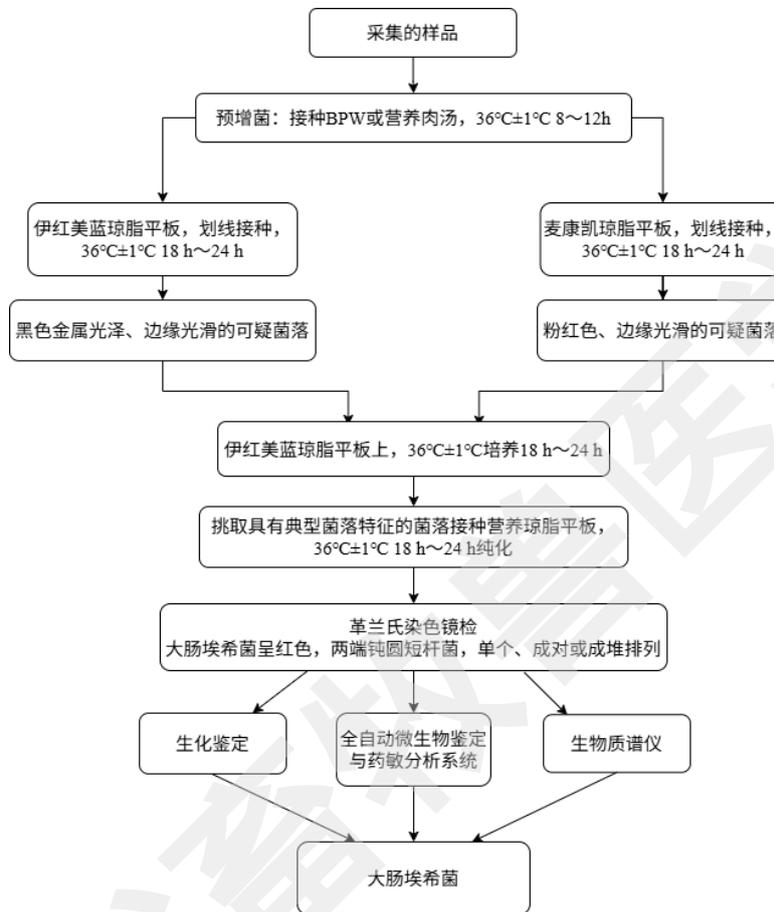


图1 大肠埃希菌的分离与鉴定流程

7.2.2.2 试验步骤

将采集的样品接种在BPW或营养肉汤中，在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 $8\text{ h}\sim 12\text{ h}$ ，进行预增菌；用接种环蘸取少量培养液，在伊红美蓝琼脂平板或麦康凯琼脂平板上划线接种， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ ；挑取伊红美蓝琼脂培养基上黑色金属光泽、边缘光滑的可疑菌落或麦康凯培养基上粉红色、边缘光滑的可疑菌落，接种在伊红美蓝琼脂平板上， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ ；挑取具有典型菌落特征的菌落接种营养琼脂平板 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$ 纯化。挑取纯化后的菌落革兰氏染色，显微镜油镜下观察，大肠埃希菌呈红色，两端钝圆短杆菌，单个、成对或成堆排列。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定。使用生化鉴定法、全自动微生物鉴定与药敏分析系统或微生物质谱仪进行鉴定。全自动微生物鉴定与药敏分析系统按照说明书进行操作，生化鉴定和质谱鉴定按照NY/T 4149-2022中的8.2.2和8.2.3执行。

7.2.2 肠球菌的分离鉴定

7.2.2.1 分离鉴定流程

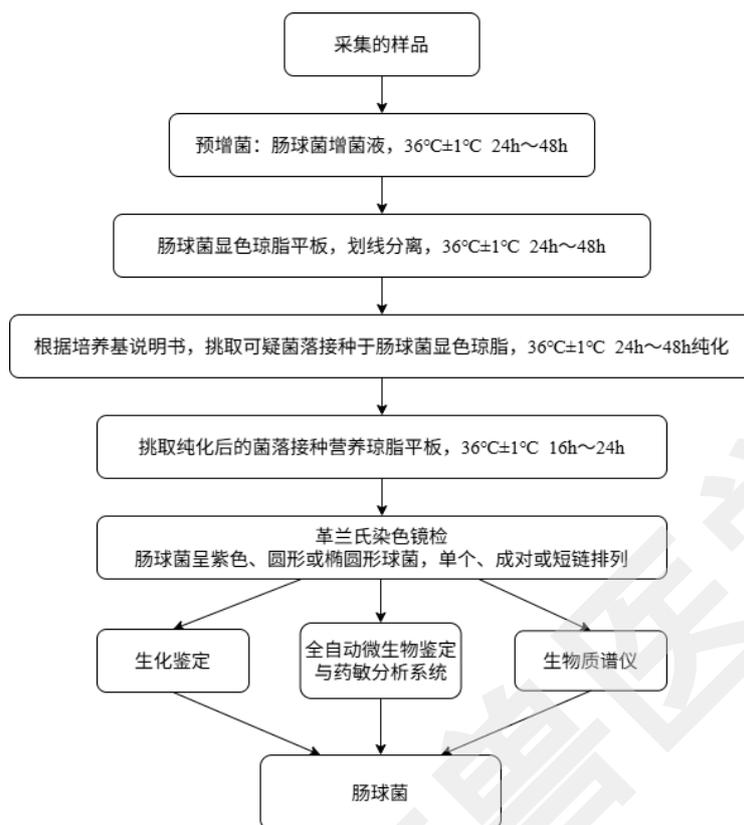


图2 肠球菌的分离与鉴定流程

7.2.2.2 试验步骤

将采集的样品接种在肠球菌增菌液培养基中, 在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 $24\text{h}\sim 48\text{h}$ 进行预增菌; 用接种环蘸取少量培养液, 接种于肠球菌显色琼脂平板, 并划线分离, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h}\sim 48\text{h}$; 根据培养基说明书挑取可疑菌落, 接种在肠球菌显色琼脂上 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h}\sim 48\text{h}$ 纯化; 挑取纯化后的菌落接种营养琼脂平板 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $16\text{h}\sim 24\text{h}$ 。从营养琼脂上挑取纯化菌落进行革兰氏染色, 显微镜下观察, 肠球菌呈紫色、圆形或椭圆形球菌, 单个、成对或短链排列。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定。使用生化鉴定法、全自动微生物鉴定与药敏系统或微生物质谱仪进行鉴定。全自动微生物鉴定与药敏分析系统按照说明书进行操作, 生化和质谱鉴定方法按照 NY/T 4147-2022 中的 10.2.2 和 10.2.3 执行。

7.2.3 沙门菌的分离鉴定

7.2.3.1 分离鉴定流程

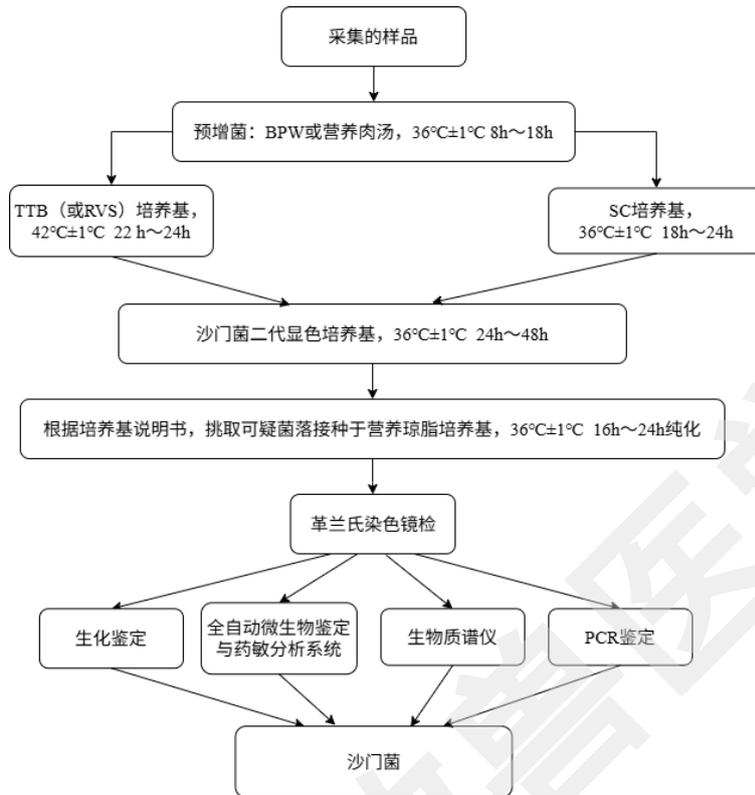


图3 沙门菌的分离与鉴定流程

7.2.3.2 试验步骤

将采集的样品接种于 BPW 或营养肉汤中进行前增菌， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $8\text{h}\sim 18\text{h}$ ，再分别接种于 TTB（或 RVS 培养基）和 SC 增菌液中，在 TTB 中 $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $22\text{h}\sim 24\text{h}$ ，在 SC 中 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $18\text{h}\sim 24\text{h}$ ；用一次性接种环蘸取 TTB 增菌液和 SC 增菌液分别接种于沙门菌二代显色培养基上， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{h}\sim 48\text{h}$ ，根据培养基说明书挑取可疑菌落，在营养琼脂培养基上 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $16\text{h}\sim 24\text{h}$ 纯化。挑取纯化后的菌落革兰氏染色，显微镜油镜下观察，沙门菌呈红色，较细杆菌，单个、成对或短链排列。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定。使用生化鉴定法、PCR 鉴定法、微生物质谱仪或全自动微生物鉴定与药敏分析系统进行鉴定。全自动微生物鉴定与药敏分析系统按照说明书进行操作，生化鉴定方法按照 GB 4789.4-2024 中的 5.4 执行，PCR 鉴定和质谱鉴定方法按照 NY/T 4146-2022 中的 10.2.3 和 10.2.4 方法执行。

7.2.4 肺炎克雷伯菌的分离鉴定

7.2.4.1 分离鉴定流程

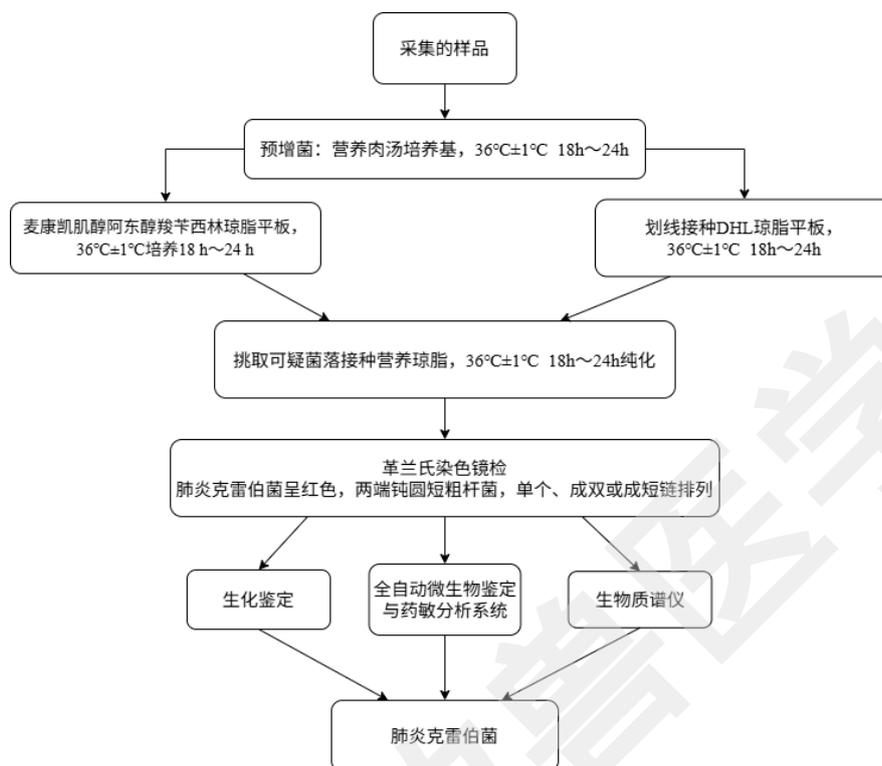


图4 肺炎克雷伯菌的分离与鉴定流程

7.2.4.2 试验步骤

将采集的样品接种于营养肉汤培养基的试管中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增菌培养18h~24h。然后使用一次性接种环蘸取增菌液划线接种麦康凯肌醇阿东醇羧苄西林琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养18h~24h，在麦康凯肌醇阿东醇羧苄西林琼脂平板上肺炎克雷伯氏菌菌落为圆形、凸起、湿润、光滑、有沉淀环的红色大菌落；或将增菌液划线接种DHL琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养18h~24h，在DHL平板上肺炎克雷伯氏菌菌落呈淡粉红色，大而隆起、光滑湿润、黏液状，相邻菌落容易融合成脓汁样，接种针挑取菌落时呈丝状粘连。挑取可疑菌落接种营养琼脂 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养18h~24h纯化。挑取纯化后的菌落革兰氏染色，显微镜油镜下观察，肺炎克雷伯菌呈红色，两端钝圆短粗杆菌，单个、成双或成短链排列。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定。使用生化鉴定法、全自动微生物鉴定与药敏分析系统进行鉴定。全自动微生物鉴定与药敏分析系统按照说明书进行操作，生化鉴定方法按照DB15/T 2074—2021中的7.3.5执行。

7.2.5 金黄色葡萄球菌的分离鉴定

7.2.5.1 分离鉴定流程

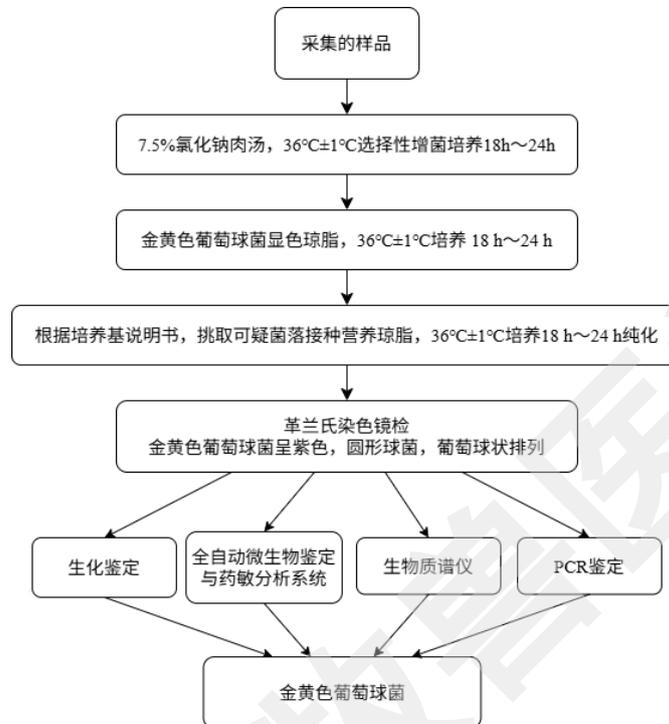


图5 金黄色葡萄球菌的分离与鉴定流程

7.2.5.2 操作步骤

将采集的样品接种于 7.5% 氯化钠肉汤管, $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 选择性增菌培养 18h~24h。然后使用一次性接种环蘸取增菌液划线接种于金黄色葡萄球菌显色琼脂, $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。根据培养基说明书挑取可疑菌落接种营养琼脂 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h 纯化。挑取纯化后的菌落革兰氏染色, 显微镜油镜下观察, 金黄色葡萄球菌呈紫色, 圆形球菌, 葡萄球状排列。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定。使用生化鉴定法、PCR 鉴定法、微生物质谱仪或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。全自动微生物鉴定与药敏分析系统按照说明书进行操作, 生化鉴定和质谱鉴定方法按照 NY/T 4145-2022 中的 10.2.2 和 10.2.3 执行。PCR 鉴定方法按照 NY/T 2962-2016 中的 8.2.2 执行。

7.2.6 猪链球菌的分离鉴定

7.2.6.1 分离鉴定流程

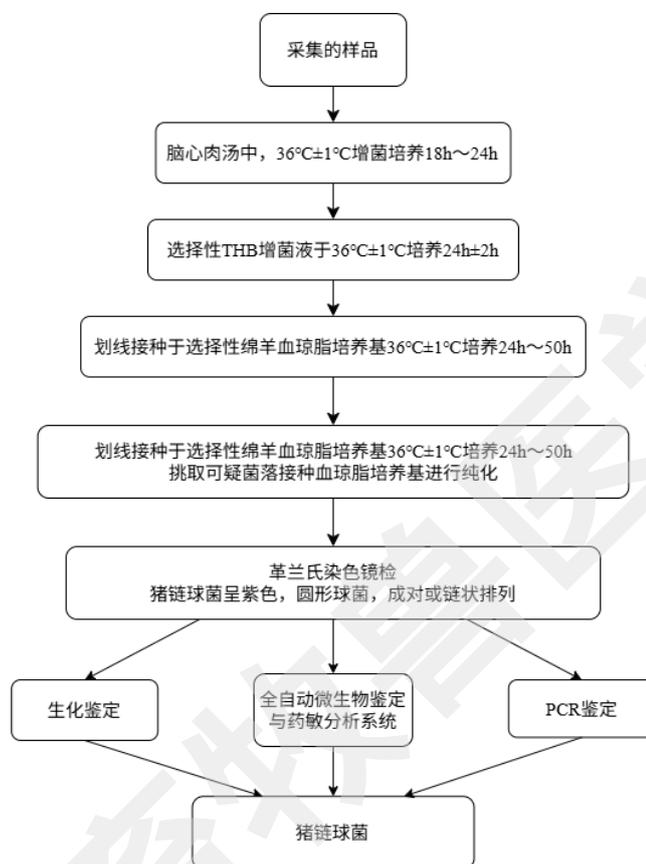


图6 猪链球菌的分离与鉴定流程

7.2.6.2 操作步骤

将采集的样品接种于脑心肉汤中, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 增菌培养18h~24h, 然后用选择性THB增菌液于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养24h \pm 2h, 划线接种于选择性绵羊血琼脂培养基 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养24h~50h。猪链球菌呈圆形、微凸、表面光滑、湿润、边缘整齐、半透明的菌落, 直径约0.3mm~1.0mm。挑取可疑菌落接种血琼脂培养基进行纯化后, 挑取纯化后的菌落进行革兰氏染色, 显微镜油镜下观察, 猪链球菌呈紫色, 圆形球菌, 成对或链状排列。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定。使用生化鉴定法、PCR鉴定法或全自动微生物生化鉴定系统进行鉴定。全自动微生物鉴定与药敏分析系统按照说明书进行操作, 生化和PCR鉴定方法按照DB34/T 2996-2017中的5.4和5.6执行。

7.2.7 产气荚膜梭菌的分离鉴定

7.2.7.1 分离鉴定流程

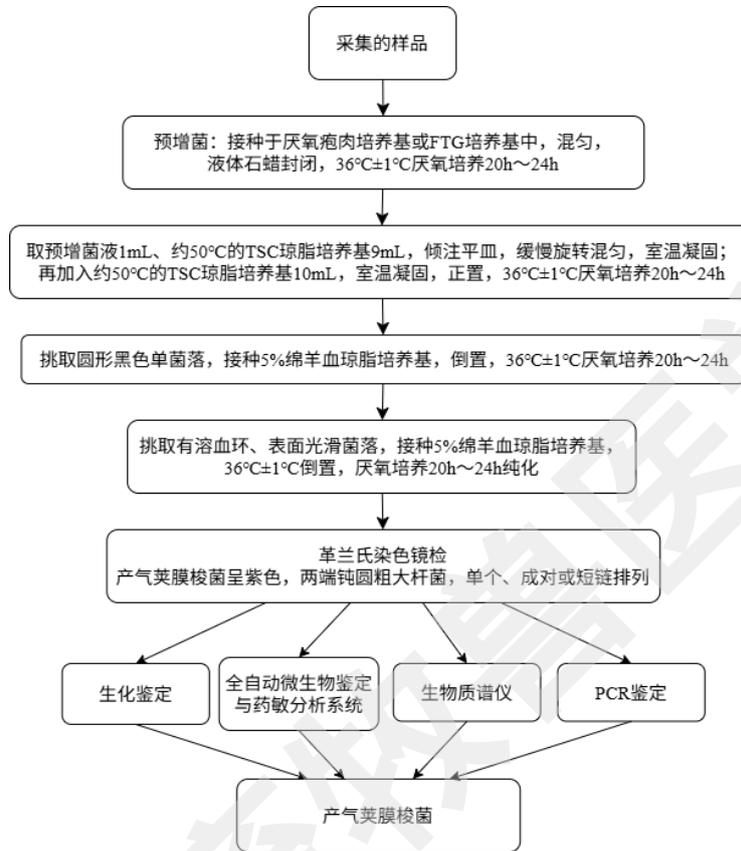


图 7 产气荚膜梭菌分离与鉴定流程

7.2.7.2 操作步骤

将采集的样品接种于厌氧肉培养基或 FTG 培养基中，混匀，液体石蜡封闭， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 20 h~24 h 预增菌。取预增菌液 1 mL、约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 TSC 琼脂培养基 9 mL，倾注平皿，缓慢旋转混匀，室温凝固。再加入约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 TSC 琼脂培养基 10 mL，室温凝固，正置， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 20 h~24 h。培养结束挑取圆形黑色单菌落，接种 5% 绵羊血琼脂培养基， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置厌氧培养 20 h~24 h。挑取有溶血环、表面光滑菌落，接种 5% 绵羊血琼脂培养基， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置厌氧培养 20 h~24 h 纯化。挑取纯化的菌落进行革兰氏染色，显微镜下油镜观察，产气荚膜梭菌呈紫色，两端钝圆粗大杆菌，单个、成对或短链排列。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定，使用生化鉴定法、PCR 鉴定法、微生物质谱仪或全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行鉴定。全自动微生物鉴定及药敏分析系统按照说明书进行操作，生化鉴定、PCR 鉴定和质谱鉴定按照 NY/T 4656-2025 中的 9.2.2、9.2.3 和 9.2.4 执行。

7.2.8 细菌的保存

菌株的保存、传代按照 GB 4789.28-2024 的要求执行。

7.3 药敏试验

7.3.1 全自动微生物鉴定及药敏分析系统检测

按照全自动微生物鉴定及药敏分析系统说明书进行操作，记录药敏试验结果。适用于大肠埃希菌、肠球菌、沙门菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、猪链球菌、产气荚膜梭菌耐药性监测。

7.3.2 微量肉汤稀释法

适用于大肠埃希菌、肠球菌、沙门菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌和猪链球菌耐药性监测。

7.3.2.1 药敏试验板准备

使用商品化药敏试验板时，按照药敏板说明书进行操作，若最低抑菌浓度（minimal inhibitory concentration, MIC）范围符合美国临床和实验室标准协会标准CLSI M100，则认为药敏试验板有效。

7.3.2.2 菌悬液制备

测试菌株和质控菌株复苏后于营养琼脂上培养出单菌落，挑取单菌落至含有2 mL CAMHB的试管中混匀，比浊仪和标准比浊管校正菌液浓度至0.5 麦氏单位（ $\approx 1 \times 10^8$ CFU/mL，CFU为菌落形成单位 Colony-Forming Unit的缩写）；不易直接乳化的细菌可将菌株于CAMHB中 $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养3 h~5 h，培养好的菌液用CAMHB调菌液浓度至0.5 麦氏单位（ $\approx 1 \times 10^8$ CFU/mL）。用CAMHB稀释100倍，混匀备用，制备的菌悬液在15 min内完成加样。

7.3.2.3 菌悬液加样

每块药敏试验板需设置阴性孔和阳性孔。阴性孔中加入无菌CAMHB 100 μL ，阳性孔（不含抗菌药物）中加入制备好的50 μL 菌悬液，其余孔（含不同梯度的抗菌药物）各加入制备菌悬液50 μL ，盖上无菌盖并标记菌株编号和时间等信息。

7.3.2.4 孵育

加样完成后于 $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养18 h~20 h。

7.3.2.5 质量控制

按照NY/T 4142-2022 8执行。

7.3.2.6 结果判定

a) 结果观察

取出药敏试验板，在光线良好条件下用肉眼观察。肉眼可见抑制细菌生长的最低药物浓度为MIC。

b) 结果判读与记录

两种方法任选其一：

1) 直接菌悬液法：取质控菌、测试菌单菌落，分别置于无菌生理盐水或无菌CAMHB中，用比浊仪或0.5麦氏单位标准比浊液调节菌液浓度至0.5 麦氏单位（相当于 1.0×10^8 CFU/mL~ 2.0×10^8 CFU/mL）；

2) 生长法：取质控菌、测试菌单菌落，分别置于加有4 mL~5 mL无菌CAMHB的试管中， $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养3 h~5 h。取菌液适量，用无菌生理盐水或无菌CAMHB调节菌液浓度至0.5 麦氏单位。

注：菌悬液应在制备后15 min内完成接种。

7.3.4.4 接种

使用细菌多点接种器取1-2 μL 接种到琼脂表面。接种物每点约 10^5 CFU。试管按顺序排列在架子上，将少量体积（约0.5 mL）移至多点接种器的相应孔中。在琼脂平板上做标记，以标明接种点的方位。从最低到最高的药物浓度依次接种。

7.3.4.5 孵育

注意观察平板，一旦变干后，翻转置于厌氧环境中 $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育18 h~20 h。

7.3.4.6 质量控制

试验开始时首先接种两个无抗微生物药的对照平板。其中一个平板标记“pre-02”（检查需氧菌污染），另外一个平板标记“pre-Ana”（厌氧菌最初生长对照）。每一系列平板之间，接种一个无抗微

生物药的对照平板做生长对照。最后，再次接种两个平板，标记为“post-02”和“post-Ana”，来证实最终测试菌生长力和纯度。

7.3.4.7 结果判读

- a) 阴性对照和阳性对照
阴性对照应无菌生长，阳性对照在接种部位形成菌团或菌斑；否则，实验结果无效。
- b) 质控菌株MIC范围
根据抗菌药物的浓度及排布，以无菌生长的最低浓度为该药物的MIC。质控菌株的MIC 值应位于质控菌株的质控范围，否则：实验结果无效
- c) 测试菌株
在符合 a) 和 b) 要求的前提下与 b) 同法判读 MIC。
- d) 药敏试验结果的判定
根据测试菌株的MIC值，按照附录判定其耐药性，结果报告为敏感(S)、中介(I)或耐药(R)。对于没有规定折点的药物，报告其MIC值。

8 生物安全

开展细菌分离鉴定与药敏试验等实验室管理应符合GB 4789.1-2016、GB 19489生物安全要求，废弃物处理应严格按照 GB 19489-2019规定执行。菌株管理按照《动物病原微生物菌(毒)种保藏管理办法》执行。

附录 A
(规范性)
药敏试验判定标准

A.1 大肠埃希菌和沙门菌对常见抗菌药物的药敏试验判断标准与质控范围

药敏试验判断标准按照T/ZNZ 099-2021执行。

A.2 肠球菌对常见抗菌药物的药敏试验判断标准与质控范围

按T/ZNZ 099-2021执行。

A.3 肺炎克雷伯菌对常见抗菌药物的药敏试验判断标准与质控范围

按CLSI M100执行。

A.4 金黄色葡萄球菌对常见抗菌药物的药敏试验判断标准与质控范围

按T/ZNZ 099-2021执行。

A.5 猪链球菌对常见抗菌药物的药敏试验判断标准与质控范围

根据溶血性不同，按照CLSI M100链球菌 β 溶血群抑菌圈直径及MIC值解释标准和链球菌草绿色群的抑菌圈直径及MIC折点标准执行。

A.6 产气荚膜梭菌对常见抗菌药物的药敏试验判断标准与质控范围

按CLSI M100执行。
