

DB 6501

乌鲁木齐市地方标准

DB 6501/T 045—2023

动物源肺炎克雷伯菌耐药监测技术规范

Technical specification for monitoring drug resistance of animal-derived bacteria

2023 - 05 - 25 发布

2023 - 06 - 01 实施

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 设备和材料	2
4.1 设备	2
4.2 材料	2
5 培养基和试剂	2
5.1 培养基	2
5.2 试剂	2
6 质控菌株	2
7 生物安全要求	3
8 样品采集与细菌分离鉴定	3
9 细菌抗菌药物敏感性测试	3
10 折点判断标准	3
11 报告	5
附录 A（规范性） 培养基和试剂	6
A.1 阳离子调节 Mueller-Hinton 肉汤 (CAMHB)	6
A.2 营养琼脂 (NA)	7
A.3 MH 琼脂	7
A.4 无菌 0.85 %生理盐水	7

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。

本文件由乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心提出。

本文件由乌鲁木齐市农业农村局（乌鲁木齐市乡村振兴局）归口并组织实施。

本文件起草单位：乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心、新疆农业大学动物医学学院、新疆畜牧科学院兽医研究所（新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心）、新疆农业科学院微生物应用研究所、新疆维吾尔自治区兽药饲料监察所、新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、乌鲁木齐县畜牧兽医站、乌鲁木齐市达坂城区阿克苏乡农业（畜牧业）产业发展服务中心、乌鲁木齐市高新区（新市区）畜牧兽医站、乌鲁木齐经济技术开发区（头屯河区）畜牧兽医站、乌鲁木齐经济技术开发区（头屯河区）农业农村局、乌鲁木齐市乡村振兴指导服务中心、乌鲁木齐市米东区畜牧兽医站、乌鲁木齐市米东区三道坝镇农业畜牧业发展服务中心、乌鲁木齐市高新区（新市区）六十户乡农业（畜牧业）产业发展服务中心、新疆维吾尔自治区畜牧兽医局畜牧科技资料编译室、乌鲁木齐市达坂城区畜牧兽医站、乌鲁木齐市天山区畜牧兽医站、新疆中科基因科技有限公司。

本文件主要起草人：蔡扩军、夏俊、代金平、赵红琼、赵晓凤、杨建中、赵艳坤、陈贺、齐姗姗、依力肖堂、庞苏纳、马倩若、赵文年、王承、刘娅梅、杨晓宇、叶峰、逯晓龙、赵新伟、范玉娟、彭华刚、方新元、陈懿、李丽、帕提玛·努合曼、贾伟、卢琳、杨玲、张启耀、曹玉凤、宋震宇、郭亚军、赵春山、马晓燕、刘嘉敏。

本文件实施应用中的疑问，请咨询乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心。

对本文件的修改意见建议，请反馈至乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心（乌鲁木齐市南湖西路15号）。

乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心 联系电话：0991-4643100；传真：0991-4668587；邮编：830063。

动物源肺炎克雷伯菌耐药监测技术规范

1 范围

本文件规定了动物源肺炎克雷伯菌耐药监测的设备和材料、培养基和试剂、质控菌株、生物安全要求、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、报告等技术要求。

本文件适用于乌鲁木齐市动物源肺炎克雷伯菌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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 4142 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 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 动物源细菌抗菌药物敏感性测试技术规程 纸片扩散法

DB6501/T 044-2023 动物源肺炎克雷伯菌检验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌药物敏感性试验 antimicrobial susceptibility testing

用于测试抗菌药物在体外对病原微生物有无抑制或杀灭作用的试验。

3.2

最小抑菌浓度 minimal inhibitory concentration, MIC

体外能抑制肉眼可见的细菌生长的最低抗菌药物浓度。

3.3

折点 breakpoint

用以区分菌株敏感、中介还是耐药的最低抑菌浓度或抑菌圈直径。

3.4

敏感 susceptible

是指当对感染部位使用推荐剂量时，MIC小于等于敏感折点或抑菌圈直径大于等于敏感折点的菌株，通常可被抗菌药物所达到的浓度水平所抑制，产生可能的临床疗效。

3.5

中介 intermediate

是指抗菌药物MIC接近血液和组织中通常可达到的浓度，和/或疗效低于敏感菌株。

3.6

耐药 resistant

是指具有MIC值高于或抑菌圈直径小于耐药折点的菌株不能被常规剂量抗菌药物达到的浓度所抑制，和/或MICs或抑菌圈直径落在某些特殊的微生物耐药机制范围，以及在治疗研究中表现为抗菌药物对菌株的临床疗效不可靠。

4 设备和材料

4.1 设备

- 4.1.1 自动加样仪或单道和多道微量移液器；
- 4.1.2 二级生物安全柜；
- 4.1.3 比浊仪；
- 4.1.4 高压灭菌器；
- 4.1.5 电子天平：感量 0.01 g 和感量 0.000 01 g；
- 4.1.6 恒温培养箱；
- 4.1.7 pH 计：测量范围 pH 0~14，精度 0.02 pH 单位；
- 4.1.8 冰箱：4℃，-20℃(或以下)；
- 4.1.9 全自动药敏判读系统；
- 4.1.10 游标卡尺：精度 0.1 mm。

4.2 材料

- 4.2.1 抗菌药物纸片；
- 4.2.2 0.5 麦氏单位(McFarland)标准比浊液；
- 4.2.3 接种环。

5 培养基和试剂

5.1 培养基

- 5.1.1 阳离子调节 Mueller-Hinton 肉汤(CAMHB)：按照 A.1 的规定执行；
- 5.1.2 营养琼脂：按照 A.2 的规定执行。如购买商品化培养基则按说明书配制；
- 5.1.3 MH 琼脂：按照 A.3 的规定执行。

5.2 试剂

- 5.2.1 试验用水：符合 GB/T 6682 的要求；
- 5.2.2 氯化钙；
- 5.2.3 氯化镁；
- 5.2.4 0.85%生理盐水：见附录 A.4。

6 质控菌株

大肠埃希菌ATCC 25922

7 生物安全要求

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GB19489的要求。

8 样品采集与细菌分离鉴定

样品采集与肺炎克雷伯菌分离鉴定参照DB6501/T 044-2023执行。

9 细菌抗菌药物敏感性测试

细菌抗菌药物敏感性测试微量肉汤稀释法、琼脂稀释法、纸片扩散法分别参照NY/T 4142、NY/T 4143、NY/T 4144动执行。商品试剂参照说明书执行。

10 折点判断标准

根据MIC值或抑菌圈直径进行判定，判定标准见表1。无折点则记录MIC值或抑菌圈直径。

表1 肺炎克雷伯菌对常见抗菌药物的折点判断标准

抗菌药物种类	抗菌药物	纸片含量	临床折点判断标准 μg/mL			抑菌圈直径 (mm)			判断依据
			S(敏感)	I(中介)	R(耐药)	S(敏感)	I(中介)	R(耐药)	
青霉素类	氨苄西林	10 μg	≤8	16	≥32	≥17	14-16	≤13	CLSI M100-S31
β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂	阿莫西林/克拉维酸(奥格门汀)	20 μg/10 μg	≤8/4	16/8	≥32/16	≥18	14-17	≤13	CLSI M100-S31
	氨苄西林-舒巴坦	10 μg/10 μg	≤8/4	16/8	≥32/16	≥15	12-14	≤11	CLSI M100-S31
	头孢他啶/阿维巴坦	30 μg/20 μg	≤8/4	-	≥16/4	≥21	-	≤20	CLSI M100-S31
头孢类	头孢噻吩	30 μg	≤2	4	≥8	≥21	18-20	≤17	CLSI VET01SEd5E-2020
	头孢他啶	30 μg	≤4	8	≥16	≥21	18-20	≤17	CLSI M100-S31
	头孢噻肟	30 μg	≤1	2	≥4	≥26	23-25	≤22	CLSI M100-S31
	头孢唑林	30 μg	≤2	4	≥8	≥23	20-22	≤19	CLSI M100-S31
	头孢吡肟	30 μg	≤2	4-8	≥16	≥25	19-24	≤18	CLSI M100-S31

抗菌药物 种类	抗菌药物	纸片含量	临床折点判断标准 μg/mL			抑菌圈直径 (mm)			判断依据
			S(敏 感)	I(中 介)	R(耐 药)	S(敏 感)	I(中 介)	R(耐 药)	
	头孢西丁	30 μg	≤8	16	≥32	≥18	15-17	≤14	CLSI M100-S31
碳青霉烯 类	美罗培南	10 μg	≤1	2	≥4	≥23	20-22	≤19	CLSI M100-S31
	厄他培南	10 μg	≤0.5	1	≥2	≥22	19-21	≤18	CLSI M100-S31
氨基糖苷 类	庆大霉素	10 μg	≤4	8	≥16	≥15	13-14	≤12	CLSI M100-S31
	阿米卡星	30 μg	≤16	32	≥64	≥17	15-16	≤14	CLSI M100-S31
	卡那霉素	30 μg	≤16	32	≥64	≥18	14-17	≤13	CLSI M100-S31
	链霉素	10 μg	2	4-8	16	≥15	12-14	≤11	CLSI M100-S31
	大观霉素	100 μg	≤32	64	≥128	≥14	11-13	≤10	CLSI VET01SEd5E-2020
	安普霉素	-	≤8	16	≥32	-	-	-	CLSI M100 30th
四环素类	多西环素	30 μg	≤4	8	≥16	≥14	11-13	≤10	CLSI M100-S31
	四环素	30 μg	≤4	8	≥16	≥15	12-14	≤11	CLSI M100-S31
氯霉素类	氟苯尼考	-	≤4	8	≥16	≥18	13-17	≤12	CLSI VET01SEd5E-2020
	氯霉素	30 μg	≤8	16	≥32	≥18	13-17	≤12	CLSI M100-S31
叶酸合成 抑制剂	磺胺异噁唑	250 μg 或 300 μg	≤256	-	≥512	≥17	13-16	≤12	CLSI M100-S31
	甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(复 方新诺明)	1.25 μg /23.75 μg	≤2/38	-	≥4/76	≥16	11-15	≤10	CLSI M100-S31
	甲氧苄啶	5 μg	≤8	-	≥16	≥16	11-15	≤10	CLSI M100-S31
氟喹诺酮 类	恩诺沙星	5 μg	≤0.25	0.5-1	≥2	≥23	17-22	≤16	CLSI VET01SEd5E-2020
	氧氟沙星	5 μg	≤2	4	≥8	≥16	13-15	≤12	CLSI M100-S31
	环丙沙星	5 μg	≤0.25	0.5	≥1	≥26	20-25	≤21	CLSI M100-S31
	加替沙星	5 μg	≤2	4	≥8	≥18	15-17	≤14	CLSI M100-S31
	吉米沙星	5 μg	≤0.25	0.5	≥1	≥20	16-19	≤15	CLSI M100-S31
	萘啶酸	30 μg	≤16	-	≥32	≥19	14-18	≤13	CLSI M100-S31
多肽类	多粘菌素 B	-	-	≤2	≥4	-	-	-	CLSI M100-S31
	多粘菌素 E	-	-	≤2	≥4	-	-	-	CLSI M100-S31
喹噁啉类	乙酰甲喹	-	-	-	-	-	-	-	-

抗菌药物 种类	抗菌药物	纸片含量	临床折点判断标准 $\mu\text{g}/\text{mL}$			抑菌圈直径 (mm)			判断依据
			S(敏 感)	I(中 介)	R(耐 药)	S(敏 感)	I(中 介)	R(耐 药)	
磷霉素类	磷霉素	200 μg	≤ 64	128	≥ 256	≥ 16	-	≤ 12	CLSI M100-S31

11 报告

11.1 菌株信息：包括质控菌株和测试菌株的名称、来源、编号等；

11.2 药物信息：包括药物通用名称、测试浓度范围等；

11.3 MIC 值；

11.4 抑菌圈直径；

11.5 耐药、中介、敏感判定结果。

附 录 A
(规范性)
培养基和试剂

A.1 阳离子调节 Mueller-Hinton 肉汤 (CAMHB)

A.1.1 MH 肉汤

A.1.1.1 成分

牛肉粉	2.0 g
可溶性淀粉	1.5 g
酸水解酪蛋白	17.5 g
水	1 000 mL

A.1.1.2 制备

按A.1.1.1取各固体成分,加水1 000 mL,搅拌使溶解,调pH使灭菌后在25 °C pH为7.0±0.2,121 °C 高压灭菌15 min。

A.1.2 氯化钙溶液

A.1.2.1 成分

氯化钙 (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	3.68 g
水	100 mL

A.1.2.2 制备

将氯化钙加入水中,搅拌使溶解,过0.22 μm滤膜,冷藏。

A.1.3 氯化镁溶液

A.1.3.1 成分

氯化镁 (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	8.36 g
水	100 mL

A.1.3.2 制备

将氯化镁加入水中,搅拌使溶解,过0.22 μm滤膜,冷藏。

A.1.4 完全肉汤

A.1.4.1 成分

氯化钙溶液	0.1 mL
氯化镁溶液	0.1 mL
MH肉汤	1 000 mL

A.1.4.2 制备

在无菌条件下将A. 1. 4. 1中各成分混匀，冷藏备用。

A. 2 营养琼脂 (NA)

A. 2. 1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

A. 2. 2 制法

除琼脂外，将各成分加入水中，混匀，煮沸溶解，冷却，调pH至 7.3 ± 0.2 ，加琼脂， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min，倾注平板。 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存7 d。

A. 3 MH 琼脂

A. 3. 1 成分

牛肉浸膏粉	5.0 g
干酪素水解物	17.5 g
水解性淀粉	1.5 g
琼脂	13.0 g~15.0 g
水	1 000 mL

A. 3. 2 制法

除琼脂外，将各成分加入水中，混匀，静置约10 min，煮沸溶解，冷却，调pH至 7.3 ± 0.2 ，加入琼脂 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min，倾注平板。 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存7 d。

A. 4 无菌 0.85 %生理盐水

A. 4. 1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 4. 2 制法

氯化钠加入1000 mL蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min，备用。