

前 言

本标准是在卫生部颁发的《全国临床检验操作规程》(第二版)的基础上,参考 NCCLS 标准,结合中国国情及卫生系统的实际情况和要求而制定。

本标准从 2002 年 7 月 1 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准的附录 A 是标准的附录,附录 B、附录 C 都是提示的附录。

本标准由北京大学人民医院负责起草。

本标准主要起草人:张正、杨婧、赵晓涛。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

用于纸片扩散法抗生素敏感试验的脱水
Mueller-Hinton 琼脂的检验规程

WS/T 231—2002

Protocols for the evaluation of dehydrated Mueller-Hinton
agar in the disk diffusion procedure for
antimicrobial susceptibility testing

1 范围

本规程规定了评价 Mueller-Hinton 琼脂(M-H 琼脂)产品批号的要求,包括制造商评价(M-H 琼脂)产品批号的规则及评价新的参考培养基的规则。

本规程仅适用于评价纸片扩散法抗生素敏感试验用 M-H 琼脂的检验,而不能保证 M-H 琼脂在其他试验中的质量,例如琼脂稀释或抗生素梯度试验。

2 材料

2.1 质控标准菌株

用 ATCC 的冻干标准菌株制备质控菌株,根据 ATCC 的规定复苏菌种。所需的菌种有:金黄色葡萄球菌 ATCC 25 923,大肠埃希菌 ATCC 25 922,铜绿假单胞菌 ATCC 27 853,粪肠球菌 ATCC 33 186 (或 ATCC 29 212),金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 和大肠埃希菌 ATCC 35 218。

2.2 菌株 TSA 培养基培养

将质控菌种的复苏液接种于两或三个含 5% 羊血的大豆-酪蛋白消化琼脂(TSA)平板上,置 35℃ 环境中孵育 18 h~24 h。

2.3 肉汤增菌

孵育结束后检查纯度并收获平板上的全部生长物。在含有 15% 甘油的大豆-酪蛋白消化肉汤(TSB)中悬浮。(15% TSB 的制备:将脱水肉汤培养基 30 g 溶于大约 500 mL 去离子水中,并添加 150 mL 的甘油,定容至 1 L,混匀,121℃ 15 min 高压灭菌)。

2.4 标准菌株复苏

接种平板的前一天,将所需的质控菌种每种各融化一瓶,接种至含 5% 羊血的 TSA 平板上,在 35℃ 环境中孵育 18 h~24 h。孵育后,如果检查纯度满意,这些菌株就可以用于接种待测 M-H 培养基,按 WS/T 125—1999《纸片法抗菌药物敏感试验标准》操作。

2.5 质控菌种的更新

定期用 ATCC 的新鲜冻干标准菌株更新贮存菌种。

3 试验方法及流程

3.1 严格按照我国已有标准(WS/T 125)中规定的步骤和时间进行纸片扩散法抗生素敏感试验。

3.2 按照下面的时间表进行试验。

3.2.1 第一天

中华人民共和国卫生部 2002-04-20 批准

2002-07-01 实施

3.2.1.1 培养基制备:将 38.0 g 的脱水 Mueller-Hinton 培养基加至 1 L 去离子水或纯净水(中国药典标准)中。煮沸 1 min,121℃ 15 min 灭菌。冷却至大约 50℃ 时倒板。

3.2.1.2 倒板,使培养基厚度为 4 mm~5 mm(通常 150 mm 规格平皿需 70 mL)。对应于第 2.1 条中罗列的前三种质控菌,每种培养基(产品批和主要参考标准批)准备三个平板。对应于剩余的三个质控菌,每种培养基准备一个平板。另外每种培养基准备一个平板测定 pH 值。

3.2.1.3 如 WS/T 125 中所述,在 25℃ 测定 pH 值。pH 值应为 7.2~7.4。在制造商试验数据报告表(附录 B)上记录检测批和参考批的 pH 值。

3.2.1.4 如第 2.4 条所述,将冻存的质控菌株融解,用含 5% 羊血的 TSA 平板做传代培养。

3.2.2 第二天

3.2.2.1 检查第一天制备的平板。如果平板表面过于潮湿,应将其置于 35℃ 孵箱中或置于室温层流橱中,直至多余的水分蒸发掉。培养基表面应湿润,但不能有水滴。培养皿盖也不应有水滴。

3.2.2.2 在质控菌培养平板上挑取几个菌落,按 WS/T 125 所述,将生长物在 TSB 中悬浮,并调整浊度为 0.5 麦氏标准(约 $(1\sim 2)\times 10^8$ cfu/mL),制备标化培养物。

3.2.2.3 接种下述每个质控菌的标化接种物,每种培养基接种三个平板:金黄色葡萄球菌 ATCC 25 923,大肠埃希菌 ATCC 25 922,铜绿假单胞菌 ATCC 27 853。下述质控菌每个接种一个平板:粪肠球菌 ATCC 33 186(或 ATCC 29 212),金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300,大肠埃希菌 ATCC 35 218。调整菌悬液浊度与接种所有平板间的时间间隔不要超过 15 min。每种质控菌株亦不可不在同一天检测。

3.2.2.4 如下所述在每个平板上贴上适量的含抗生素纸片(纸片含量与 WS/T 125 中相同)。

对于金黄色葡萄球菌 ATCC 25 923,使用下列含抗生素纸片:羟氨苄西林/克拉维酸、红霉素、氨苄西林/舒巴坦、苯唑西林、头孢噻吩、四环素、环丙沙星、万古霉素。对于大肠埃希菌 ATCC 25 922,使用下列含抗生素纸片:氨苄西林、氯霉素、头孢噻肟、庆大霉素、头孢西丁、磺胺二甲异恶唑、头孢噻吩、四环素。

对于铜绿假单胞菌 ATCC 27 853,使用下列含抗生素纸片:阿米卡星、庆大霉素、头孢哌酮、亚胺培南、头孢噻肟、哌拉西林、头孢他啶、替卡西林、环丙沙星、妥布霉素。

3.2.2.5 接种粪肠球菌 ATCC 33 186(或 ATCC 29 212)的平板,贴两片磺胺增效剂/磺胺甲异恶唑做胸苷试验。接种金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 的平板,贴两片苯唑西林做 MRSA 试验。接种大肠埃希菌 ATCC 35 218 的平板,贴两片阿莫西林。

3.2.2.6 将平板翻转琼脂朝上(盖朝下)在 35℃ 环境中孵育 16 h~18 h(金黄色葡萄球菌 43 300 孵育 24 h)。

3.2.3 第三天

3.2.3.1 孵育结束后,在培养皿上方照明(反射光),在无反射黑色背景下,用两脚规(建议使用能直接读数的)在培养皿背面测量抑菌环直径,精确至 0.1 mm。亦可将平皿置于黑色无反射背景下,而使光线垂直及从操作者背后 45° 角方向照射。由于此项规则需要测量两批培养基抑菌环直径均值的差异,故而所有测量应采用完全相同方式。对于金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300,应用直射光仔细检查抑菌环,以检出环内任何模糊生长及细小菌落。

3.2.3.2 按第 4.1 条和 4.2 条所述,将结果记录在数据纸上(附录 B)。如果在个别试验中,由于纸片没有贴好,或者翻转平板时琼脂脱落等原因而没有得到三个重复结果,则试验必须重做。

4 结果解释

4.1 对于每种培养基(产品批和参考标准),接种金黄色葡萄球菌 ATCC 25 923、大肠埃希菌 ATCC 25 922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27 853 所做的抗生素敏感性试验,分别计算每种菌对同种抗生素纸片三个抑菌环直径的平均值。计算产品每批和参考培养基均值的差异,把结果记录在数据纸上(附录 B)。

4.2 对于粪肠球菌 ATCC 33 186(或 ATCC 29 212)、金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 和大肠埃希菌 ATCC 35 218,计算产品批抑菌环直径的平均值和参考标准批抑菌环直径的平均值之差。把结果记录在数据纸上(附录 B)。

4.3 对于可接受批,在抗生素敏感性试验中,由第 4.1 条确定的抑菌环直径的差值应有 $90\% \leq 2.0 \text{ mm}$,应全部 $< 3.0 \text{ mm}$ 。对于贴磺胺增效剂/磺胺甲异恶唑纸片的粪肠球菌 ATCC 33 186(或 ATCC 29 212),抑菌环直径应 $\geq 20 \text{ mm}$,且清晰度比得上参考培养基。对于金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300,贴上苯唑西林纸片经 24 h 孵育后,应无抑菌环或抑菌环非常模糊,在苯唑西林纸片周围都有细菌生长。对于大肠埃希菌 ATCC 35 218,羟氨苄西林/克拉维酸的抑菌环直径平均值应为 $17 \text{ mm} \sim 21 \text{ mm}$ 。如果接种粪肠球菌 ATCC 33 186(ATCC 29 212)、金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 或大肠埃希菌 ATCC 35 218 的参考培养基未得到满意结果,则试验必须重做。

4.4 对于可接受批,pH 值应为 $7.2 \sim 7.4$ 。

5 标签声明

对于可接受批,可在产品标签上加有下列声明:这批 Mueller-Hinton 琼脂已经根据我国当前出版的本标准进行检测,符合其要求。

对于每个制造商,当连续三批产品的数据经国家药品监督管理局有关机构检查通过后,才批准在标签上加此声明。在最初提交的检验产品时必须经此过程。

附录 A

(标准的附录)

正确使用本标准的说明

A1 在评价新参考培养基的规则中,一般过程与第3章所述相同,但所用的质控菌中粪肠球菌 ATCC 33 186不能用 ATCC 29 212 代替,且在记录时,除记录抑菌环直径外,还要记录其清晰度。其余质控菌相同。

A2 在评价新参考培养基的规则中,对粪肠球菌 ATCC 33 186 贴下列纸片:磺胺增效剂/磺胺甲异恶唑,磺胺增效剂,万古霉素。对金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 贴下列纸片:甲氧苯西林,苯唑西林。对大肠埃希菌 ATCC 35 218 贴下列纸片:阿莫西林/克拉维酸,氨苄西林/舒巴坦,替卡西林/克拉维酸。

A3 在评价新参考培养基的规则中,金黄色葡萄球菌 ATCC 25 923,大肠埃希菌 ATCC 25 922,铜绿假单胞菌 ATCC 27 853,用候选批和主要参考批各需要进行30份重复试验。如果由于纸片没有贴好,或者翻转平皿时琼脂脱落等原因而没有得到30份重复的结果,使用至少28份重复试验的结果亦可。否则,该批号的所有30份重复试验必须重做。对于粪肠球菌 ATCC 33 186,金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 和 大肠埃希菌 ATCC 35 218,各仅需4份重复试验。

A4 选择主要参考培养基的标准

A4.1 金黄色葡萄球菌 ATCC 25 923,大肠埃希菌 ATCC 25 922,铜绿假单胞菌 ATCC 27 853 的抑菌环直径的均值见 WS/T 125。

A4.2 抑菌环直径的变异不应偏离平均值二个标准差。方差(S^2)应为 0.5 mm。

A4.3 培养基的 pH 值应为 7.2~7.4。

A4.4 当与主要参考培养基比较时,候选批抑菌环直径均值的 90%必须在参考批均值的 2.0 mm 以内,全部必须在 3.0 mm 以内。

A4.5 t 值应在附录 C 计算确定的 +2.663 和 -2.663 之间。 t 的临界值都同样设为 30 个标本(参考批和检测批),且 $\alpha=0.01$ 。

A4.6 金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 贴苯唑西林纸片,经 24 h 孵育后,应无可分辨的抑菌环(平板上模糊生长或出现细小菌落)。贴甲氧苯西林的平皿可能会观察到抑菌环。

A4.7 由粪肠球菌 ATCC 33 186 贴磺胺增效剂/磺胺甲异恶唑的抑菌环结果显示,培养基应相对无胸苷,它应比得上主要参考培养基的清晰度,且直径至少 20 mm。由于粪肠球菌 ATCC 29 212 在检测上不够敏感,因而不用于参考培养基的试验。

A4.8 所有由大肠埃希菌 ATCC 35 218 得到的抑菌环直径的均值应在参考培养基均值的 3.0 mm 以内。

A5 辅助参考培养基的选择标准

A5.1 辅助参考培养基批号仅次于符合第 A4 条中标准的主要参考培养基,而且要满足以下条件:

A5.2 pH 值为 7.2~7.4。

A5.3 粪肠球菌 ATCC 33 186 贴磺胺增效剂/磺胺甲异恶唑纸片的抑菌环直径结果满意。

A5.4 与新的主要参考培养基相比,在 30 份重复试验中不应有超过三个的抑菌环直径均值相差 3.0 mm 以上。

A5.5 金黄色葡萄球菌 ATCC 43 300 取得第 A4.6 条中叙述的同样结果。

附录 B
(提示的附录)
制造商试验数据报告

制造商试验数据报告

厂家名称: _____ 日期: _____
 Mueller-Hinton 琼脂批号: _____ 保质期: _____
 pH:(规定 7.2~7.4) _____
 国家标准: _____ 检测批: _____
 Diff 值: _____
 试验:

- (1) 粪肠球菌-胸苷试验(规定: ≥ 20 mm)
- (2) 大肠埃希菌 35 218, 贴阿莫西林/克拉维酸(规定 17 mm~21 mm)
- (3) 金黄色葡萄球菌, 贴苯唑西林(MRSA 试验)(规定为极其模糊的抑菌环生长至无抑菌环)

Diff 值: 代表检测批和标准琼脂抑菌环直径均值的差值, 用毫米表示。差值大于 2.0 mm 的应不超过 10%(两种方法), 不应有差值大于 3.0 mm 者。

试验结果: _____ mm

	标准琼脂	检测批均值	Diff 值
(1)			
(2)			
(3)			

附录 C
(提示的附录)
选择新参考培养基的统计学计算

此方法基于以下假设: 抑菌环直径的最大方差(S^2)是 0.5 mm, 对于每个纸片扩散法抗生素敏感试验, 通过 $\alpha=0.01$ (双侧)的双样本检验, 检测批和参考批抑菌环直径相差 1 mm 及以上者有 99% 的概率被检测出来。如果通过与参考批进行比较, 评价一个以上的候选批, 则必须加以调整, 根据检测批的数目分割概率。

C1 对于三种质控菌, 在与其对应的抗生素所做的 30 份重复试验中, 使用 A4 部分中的规则, 确定在参考培养基上和每种检测培养基上形成的 30 份重复的抑菌环直径。

C2 对于每个纸片扩散法抗生素敏感试验取得的每组 30 份重复试验结果($n=30$, 或者实际重复数目), 计算均值(\bar{X})和方差(S^2)。

C3 计算总体方差 S_p^2 。

C4 计算 t 。