

食源性致病菌耐药监测技术规范

Technical specification for monitoring drug resistance of foodborne
pathogens

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

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。

本文件由海南省市场监督管理局提出并归口。

本文件起草单位：海南省检验检测研究院、海口市疾病预防控制中心、海南医科大学公共卫生学院

本文件主要起草人：谢作蓉、杨俊斌、龙文芳、李平、黄文秀、周玉玲、魏静、张海防、杨穗珊、朱梦、罗小菊、常秀亭、寇力丹、陈文俊、罗泽人。

食源性致病菌耐药监测技术规范

1 范围

本标准规定了食源性致病菌耐药监测的范围、规范性引用文件、术语和定义、设备和材料、培养基和试剂、质控菌株、样品采集与细菌分离鉴定、药敏试验和结果判定、实验室生物安全等技术要求。

本标准适用于预包装食品和散装即食食品中常见致病菌沙门氏菌、致泻大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌对抗菌药物敏感性试验。

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 食品安全国家标准 食品微生物学检验

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

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

CLSI M100 抗菌药物敏感性试验执行标准（Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

预包装食品

预包装食品预先包装或者制作在包装材料、容器中的食品。包括预先定量包装或者预先定量制作在包装材料、容器中并且在一定量限范围内具有统一的质量或体积或长度标识的食品；也包括预先包装或者制作在包装材料、容器中以计量方式销售的食品。

3.2

散装即食食品

提供给消费者可直接食用的非预包装食品（含预先包装但需要计量称重的散装即食食品），包括热处理散装即食食品、部分或未经热处理的散装即食食品、其他散装即食食品。不包括餐饮服务中的食品、未经加工或处理的初级农产品。

3.3

药敏试验

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。

3.4

最低抑菌浓度（minimal inhibitory concentration, MIC）

在药敏实验中能抑制肉眼可见微生物生长的最低抗菌药物浓度。

3.5

敏感 (susceptible, S)

当抗菌药物对分离株的 MIC 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。

3.6**耐药 (resistant, R)**

当抗菌药物对分离株的MIC处于该分类范围时，该药物浓度不能抑制细菌的生长，和（或）被测菌株获得特殊耐药机制，临床治疗效果不佳。

3.7**中介 (intermediate, I)**

当抗菌药物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。

4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，规定了本标准适用的其他设备和材料

- 4.1 恒温培养箱：35±2℃。
- 4.2 比浊仪。
- 4.3 微量移液器。
- 4.4 无菌培养皿：90 mm。
- 4.5 游标卡尺：精度 0.1 mm。
- 4.6 酶标仪。
- 4.7 商品化微生物药敏系统。
- 4.8 二级生物安全柜。
- 4.9 高压灭菌器。

5 培养基和试剂

- 5.1 M-H琼脂（MHA）：见附录A.1。
- 5.2 M-H肉汤（MHB）：见附录A.2。
- 5.3 细菌分离、纯化培养基：按照GB 4789系列标准执行。
- 5.4 商品化培养基、药敏纸片、MIC板、药敏卡：按说明书使用。
- 5.3 实验用水：符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

6 质控菌株

- 6.1 大肠埃希菌ATCC 25922或其等效菌株；
- 6.2 铜绿假单胞菌ATCC 27853或其等效菌株；
- 6.3 金黄色葡萄球菌ATCC 25923或其等效菌株；
- 6.4 金黄色葡萄球菌ATCC 29213或其等效菌株。

7 样品采集与细菌分离鉴定

样品采集与细菌分离鉴定按照GB 4789系列标准执行，对鉴定为致病菌的纯培养用作药敏试验或冻存后经传代再用于药敏试验。

8 药敏试验和结果判定

8.1 菌悬液制备

挑取纯化或冻存传代后平板上的菌落制备成经比浊仪测定为0.5 McF的菌悬液。

8.2 纸片扩散法

用无菌棉拭子沾取菌悬液均匀涂抹于MHA培养基，不留空隙，最后沿培养基周围涂抹两圈。待培养基上的菌悬液干燥后在培养基表面贴于待测抗菌药物药敏纸片，纸片之间间隔均匀（90mm培养皿中以上下左右放置4块纸片为宜）。置于恒温培养箱中 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养16~18h，取出平板，用游标卡尺精确量取抑菌圈直径，参照CLSI M100中要求的折点值进行结果判定。

8.3 肉汤稀释法

加样：96孔板第二列起每孔加入100 μL MHB培养基，第一列加入200 μL 目标最高浓度药物-MHB混合液，吸取100 μL 加入至第二列，依次二倍系列稀释至倒数第二列吸取100 μL 弃去，最后一列（生长对照孔）无药物，阴性对照孔加入200 μL MHB培养基。菌悬液用MHB培养基稀释100倍，每孔中加入100 μL 稀释后的菌悬液，接种菌量约为 5×10^5 CFU/mL，阴性对照孔无药物和菌液。

培养：盖上车盖或将96孔板放入湿盒中，置于恒温培养箱中 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养16~20h。

判读：肉眼判读阴性对照孔应清澈透明（即无细菌生长），生长对照孔应明显浑浊，从低浓度向高浓度观察，肉眼观察无可见浑浊的最低药物浓度孔，仪器判读可使用酶标仪在600 nm左右波长下读取吸光度（OD值），OD值低于生长对照孔90%的为最低药物浓度孔，即为MIC值，参照CLSI M100中要求的折点标准进行结果判定。

8.4 商品化试剂法

取菌悬液，按照商品化微生物药敏系统配套药敏卡使用说明书进行菌悬液稀释，具体操作严格按厂家说明书进行。

8.5 质量控制

每次实验必须同时接种质控菌株，质控菌株药敏试验与测试菌株同步进行。保存的质控菌株与测试菌株使用前传代2~3次，以确保菌株状态。工作质控菌株传代一般不超过5次。

沙门氏菌、致泻大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌药敏试验质控菌株选择为：

①大肠埃希菌ATCC 25922或其等效菌株；

②铜绿假单胞菌ATCC 27853或其等效菌株：适用于测试碳青霉烯类药物；

③金黄色葡萄球菌ATCC 25923或其等效菌株（纸片扩散法）或金黄色葡萄球菌ATCC 29213或其等效菌株（肉汤稀释法）：适用于测试阿奇霉素。

金黄色葡萄球菌药敏试验质控菌株选择为：

金黄色葡萄球菌ATCC 25923或其等效菌株（纸片扩散法）或金黄色葡萄球菌ATCC 29213或其等效菌株（肉汤稀释法）。

使用商品化试剂法时，质控菌株选择参考制造商质控测试推荐和质控范围的说明。

9 结果报告

结果报告应包含：

菌株信息：包括质控菌株和测试菌株的名称、编号、来源；

药物信息：包括药物名称、英文缩写等；

药敏结果：耐药（R）、中介（I）、敏感（S）判定结果。

10 实验室生物安全

药敏试验需在经备案的二级生物安全实验室内进行，实验室生物安全管理参照GB 19489和WS 233执行，整个过程中必须严格无菌操作、防止污染。

实验人员需经培训、上岗，操作时必须穿着合适的实验服、佩戴好口罩、帽子及一次性手套。进行活体处理或接触含有微生物的物品后，要洗手。离开实验室前要脱掉手套，一次性手套不得清洗和再次使用。

实验过程如果发生污染性物质溢出等事故，应及时向实验室负责人报告，并记录经过和处理方案。禁止在实验室饮食、吸烟、化妆和储存食物。非工作人员禁止进入实验室。

实验过程中所用的器皿、耗材及产物均需要经过121℃，15 min高压蒸汽灭菌后，方可处置。

附 录 A
(规范性)
培养基

A.1 MHA

A.2.1 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.2.2 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 ℃高压灭菌15 min，倾注平板。

A.2 MHB

A.2.1 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

水 1 000 mL

A.2.2 制法

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 ，分装三角瓶，121 ℃高压灭菌15 min，分装于灭菌试管中。

附 录 B
(资料性)
测试药物种类、梯度范围和判读标准

表1 沙门氏菌、致泻大肠埃希氏菌药敏试验药物名称、梯度范围和判定标准

序号	药物名称		梯度范围 (ug/mL)	药敏判定标准 MIC折点 (ug/mL)		
	中文名	英文缩写		敏感S	中介I	耐药R
1	氯霉素	Chloramphenicol (CHL)	4-32	≤8	16	≥32
2	甲氧苄啶/磺 胺异恶唑	Trimethoprim-sulfam ethoxazole (SXT)	0.5-8	≤2/38	-	≥4/76
3	多粘菌素	EColistin (CT)	0.25-8	-	≤2	≥4
4	厄他培南	Ertapenem (ETP)	0.25-8	≤0.5	1	≥2
5	美罗培南	Meropenem (MEM)	0.125-2	≤1	2	≥4
6	头孢噻肟	Cefotaxime (CTX)	0.25-16	≤1	2	≥4
7	头孢他啶	Ceftazidime (CAZ)	0.25-16	≤4	8	≥16
8	头孢他啶/阿 维巴坦	Ceftazidime/avibacta m (CZA)	0.25/4-8/ 4	≤8/4		≥16/4
9	四环素	Tetracycline (TET)	1-16	≤4	8	≥16
10	替加环素	Tigecycline (TIG)	0.25-8	≤0.5	-	>0.5
11	环丙沙星	Ciprofloxacin (CIP)	0.015-2	≤0.06	0.12-	≥1

					0.5	
12	萘啶酸	Nalidixic (NAL)	4-32	≤16	-	≥32
13	阿奇霉素	Azithromycin (AZM)	2-64	≤16	-	≥32
14	阿米卡星	Amikacin (AMI)	4-64	≤16	32	≥32
15	链霉素	Streptomycin (STR)	4-32	≤8	16	≥32
16	氨苄西林	Ampicillin (AMP)	2-32	≤8	16	≥32
17	氨苄西林/舒巴坦	Ampicillin/sulbactam (AMS)	2-32	≤8/4	8/16	≥32/16

表2 副溶血性弧菌药敏试验药物名称、梯度范围和判定标准

序号	药物名称		梯度范围 (ug/mL)	药敏判定标准 MIC折点 (ug/mL)		
	中文名	英文缩写		敏感S	中介I	耐药R
1	氯霉素	Chloramphenicol (CHL)	4-32	≤8	16	≥32
2	甲氧苄啶/磺胺异恶唑	Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	0.5-8	≤2/38	-	≥4/76
3	多粘菌素	EColistin (CT)	0.25-8	N	≤2	≥4

4	厄他培南	Ertapenem (ETP)	0.25-8	≤0.5	1	≥2
5	美罗培南	Meropenem (MEM)	0.125-2	≤1	2	≥4
6	头孢噻肟	Cefotaxime (CTX)	0.25-16	≤1	2	≥4
7	头孢他啶	Ceftazidime (CAZ)	0.25-16	≤4	8	≥16
8	头孢他啶/阿 维巴坦	Ceftazidime/avibacta m (CZA)	0.25/4-8/ 4	≤8/4		≥16/4
9	四环素	Tetracycline (TET)	1-16	≤4	8	≥16
10	替加环素	Tigecycline (TIG)	0.25-8	≤0.5	-	>0.5
11	环丙沙星	Ciprofloxacin (CIP)	0.015-2	≤1	2	≥4
12	萘啶酸	Nalidixic (NAL)	4-32	≤16	-	≥32
13	阿奇霉素	Azithromycin (AZM)	2-64	≤2	-	N
14	阿米卡星	Amikacin (AMI)	4-64	≤16	32	≥64
15	链霉素	Streptomycin (STR)	4-32	≤8	16	≥32
16	氨苄西林	Ampicillin (AMP)	2-32	≤8	16	≥32
17	氨苄西林/舒 巴坦	Ampicillin/sulbactam (AMS)	2-32	≤8/4	8/16	≥32/1 6

表3 金黄色葡萄球菌药敏试验药物名称、梯度范围和判定标准

序号	药物名称		梯度范围 (ug/mL)	药敏判定标准 MIC折点 (ug/mL)		
	中文名	英文缩写		敏感S	中介I	耐药R
1	苯唑西林	OXA	0.125-8	≤2	-	≥4
2	红霉素	ERY	0.25-16	≤0.5	1-4	≥8
3	克林霉素	CLI	0.125-8	≤0.5	1-2	≥4
4	左氧氟沙星	LEV	0.125-8	≤1	2	≥4
5	四环素	TET	0.25-16	≤4	8	≥16
6	庆大霉素	GEN	0.25-16	≤4	8	≥16
7	万古霉素	VAN	0.5-32	≤2	4-8	≥16
8	替考拉宁	TEC	0.5-32	≤8	16	>32
9	利福平	RIF	0.06-4	≤1	2	≥4
10	甲氧苄啶/磺 胺异恶唑	SXT	0.25/4.75 -/152	≤2/38	-	≥4/76
11	达托霉素	DAP	0.125-4	≤1	-	-
12	青霉素	PEN	0.06-2	≤0.12	-	≥0.25
13	利奈唑胺	LZD	1-8	≤4	-	≥8

14	头孢西丁	FOX	1-8	≤4	-	≥8
15	呋喃妥因	NIT	16-128	≤32	64	≥128
16	红霉素/克林 霉素诱导实验 (4/0.5)	ERY/CLI	阳性/阴性	不生长， 阴性		生长，阳 性
