

EUCAST

欧盟药敏试验标准

影响力 **IMPACT**

SINO-SWEDISH INTEGRATED MULTI-SECTORIAL PARTNERSHIP
FOR ANTIBIOTIC RESISTANCE CONTAINMENT

刘玉庆 李璐璐 骆延波
廖晓萍 吴聪明 尹 红 编译



EUCAST 欧盟药敏试验标准

刘玉庆 李璐璐 骆延波 编译
廖晓萍 吴聪明 尹红

影响力 **IMPACT**

SINO-SWEDISH INTEGRATED MULTI-SECTORIAL PARTNERSHIP
FOR ANTIBIOTIC RESISTANCE CONTAINMENT

中国标准出版社

北京

图书在版编目 (CIP) 数据

EUCAST 欧盟药敏试验标准 / 刘玉庆等编译. —北京:
中国标准出版社, 2016. 3
ISBN 978-7-5066-8170-4

I. ①E… II. ①刘… III. ①抗菌素—药效试验—敏
感性试验—标准—欧洲 IV. ①R978. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 300231 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100029)

北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010)68533533 发行中心: (010)51780238

读者服务部: (010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880 × 1230 1/16 印张 9.75 字数 309 千字

2016 年 3 月第一版 2016 年 3 月第一次印刷

*

定价 39.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 68510107

序

抗药性关联地球村

抗生素产生抗药性的原因非常复杂，其后果会影响到地球村的每一个人。几年之内我们在医疗、社会和经济上，将会面临可怕的困境，除非我们立刻展开真正的前所未有的全球合作，并齐心协力，否则，抗生素疗效降低将对公共卫生造成严重威胁。为了更好地理解抗药性在不同的国家、地区乃至部门间的动态传播，我们迫切需要统一的实验室检测方法，而一个好的抗药性监测系统是国家层面克服抗药性的重要战略组成部分。

现在，中国已经迈出重要的一步——引入 EUCAST（欧盟药敏试验标准委员会）的方法（www.eucast.org）。EUCAST 提供了抗菌药物敏感性表型的体外试验指南和确定折点值的大数据库。准确而标准的药敏试验方法对于指导临床优化治疗至关重要。统一的微生物学方法也很重要，这样便于国际间比较研究。

感谢刘玉庆博士的团队翻译 EUCAST 药敏试验标准，在中国推广应用。

瑞典乌普萨拉大学医学院教授 **Otto Cars**
ReAct（Action on antibiotic resistance）主席

前 言

唯一的世界，共同的健康，统一的药敏试验折点值

抗药性严重威胁我们治疗感染的能力，且无远弗届，是全球抗击的公敌。

战胜抗药性的武器，包括研发新抗生素、快速诊断和非必要治疗、保护现有抗生素活性的抗生素管理，以及发展新方法来减少抗药性微生物在医院和社区的传播。而如何协调折点值以保证全球公认的抗药性定义和界定敏感与抗性的细菌和真菌，是许多措施和活动内容的核心。

曾经有过七个折点值委员会，EUCAST 将其中六个统一，现在公认的是欧洲的 EUCAST 和美国的 CLSI。EUCAST 被所有欧洲国家应用，并被欧洲以外的许多国家引入。EUCAST 网站 (www.eucast.org) 免费提供定期更新的英文版本。

刘玉庆博士的团队热心地在中国引入 EUCAST 国际药敏试验标准，并联合中瑞国际合作项目 (IMPACT) 的同事将 EUCAST 文件翻译出版。

译者出色的工作得到 EUCAST 的认可和感谢，我很荣幸为 EUCAST 中文版作序。

本书版权归 EUCAST 所有，可在 www.eucast.org/translations 或 www.varms.org 免费下载。

临床数据协调员和站长
欧盟药敏试验委员会 (EUCAST)



(Gunnar Kahlmeter)

目 录

序
前言

第一部分 EUCAST 标准试验方法

一、测量 MIC 时培养基的制备 (3)

 (一) 纸片扩散法培养基的制备 (3)

 (二) 微量肉汤稀释法进行 MIC 测定时培养基的制备 (4)

二、纸片扩散法 (5)

三、肉汤稀释法 (13)

第二部分 质量控制表格

一、常规（质量控制）和内部质量控制注释 (25)

二、常规质量控制 (26)

 1. 大肠杆菌 ATCC 25922 (26)

 2. 大肠杆菌 ATCC 35218 (28)

 3. 铜绿假单胞菌 ATCC 27853 (28)

 4. 金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 (29)

 5. 粪肠球菌 ATCC 29212 (30)

 6. 肺炎链球菌 ATCC 49619 (31)

 7. 流感嗜血杆菌 NCTC 8468 (33)

 8. 流感嗜血杆菌 ATCC 49766 (34)

 9. 空肠弯曲杆菌 ATCC 33560 (35)

三、延伸的纸片扩散法检测耐药机制的质量控制 (36)

 (一) 使用 MH 琼脂、纸片法检测抗药性机制的质控菌株 (36)

 1. 肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 (36)

 2. 金黄色葡萄球菌 NCTC 12493 (36)

 3. 粪肠球菌 ATCC 51299 (36)

 (二) 使用 MH - F 琼脂、纸片法检测抗药性机制的质控菌株 (37)

 流感嗜血杆菌 ATCC 49247 (37)

第三部分 折点表格

一、注释 (41)

二、阅读 EUCAST 折点表格的指导 (42)

三、肠杆菌科 (43)

四、假单胞菌属 (48)

五、嗜麦芽窄食单胞菌 (52)

六、不动杆菌属 (53)

七、葡萄球菌属 (57)

八、肠球菌属 (63)

九、A、B、C 和 G 族链球菌 (68)

十、肺炎链球菌 (73)

十一、其他链球菌 (78)

十二、流感嗜血杆菌 (83)

十三、卡他莫拉菌 (88)

十四、淋病奈瑟氏菌 (92)

十五、脑膜炎奈瑟氏菌 (95)

十六、革兰氏阳性厌氧菌（除艰难梭菌） (99)

十七、艰难梭菌 (103)

十八、革兰氏阴性厌氧菌 (104)

十九、幽门螺杆菌 (108)

二十、单核细胞增生李斯特菌 (109)

二十一、多杀性巴氏杆菌 (110)

二十二、空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌 (112)

二十三、除白喉杆菌的棒状杆菌属 (113)

二十四、结核分枝杆菌 (115)

二十五、PK/PD 折点值（与种属无关） (116)

第四部分 EUCAST 专家规则

一、固有型抗药性 (123)

二、特殊的抗药性表型 (124)

三、EUCAST 专家规则对抗生素敏感性测试的解释说明 (136)

跋 (147)

第一部分

EUCAST 标准试验方法



一、测量 MIC^① 时培养基的制备

(版本 4.0, 2014 年 6 月)

(一) 纸片扩散法培养基的制备

MH 琼脂 (MHA) 用于非苛养菌的纸片扩散法。

MH-F 琼脂, 在 MH 琼脂中添加 5% 脱纤维马血和 20mg/L β -NAD, 用于测试链球菌属 (包括肺炎链球菌)、嗜血杆菌属、卡他莫拉菌、单核细胞增多性李斯特氏菌、弯曲杆菌属、多杀性巴斯德菌、棒状杆菌属和其他一些苛养菌。

琼脂板可通过商品化的途径购买或者按照下列步骤进行制备:

1. 试剂

- (1) 商品化的 MHA 粉。
- (2) 机械性脱纤维马血。
- (3) β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (β -NAD), 纯度 $\geq 98\%$ 。

2. β -NAD 储备液的制备步骤

- (1) 使用灭菌的去离子水溶解 β -NAD, 浓度为 20mg/mL。
- (2) 使用 0.2 μ m 的滤膜进行过滤。
- (3) 储备液按照需要, 以小份放置于 -20℃。避免反复冻融。

3. 琼脂平皿的制备步骤

- (1) 按照生产厂家的指示对 MHA 进行制备和高压灭菌。
- (2) 将培养基冷却至 42℃ ~ 45℃。
- (3) 对于 MH-F, 每升培养基中加入 50mL 机械脱纤维马血和 1mL β -NAD 储备液。混合均匀后立即分装。
- (4) 将培养基分装于灭菌的培养皿中, 厚度为 4mm $\pm$ 0.5mm (90mm 圆形培养皿中大约 25mL, 100mm 圆形培养皿中大约 31mL, 150mm 圆形培养皿中大约 71mL, 100mm 方形培养皿中大约 40mL)。
- (5) 在移动培养皿之前, 确保培养皿水平放置。
- (6) 使用时确保培养基的表面干燥。培养基是否需要干燥以及培养基表面干燥所需要的时间, 取决于内容物与干燥条件。避免过分干燥培养基。

4. 培养基的储存

- (1) 将培养基置于开口的塑料制品中 8℃ ~ 10℃ 储藏。如果培养基需要储藏的时间长于 7 天, 那么需要将培养基置于密封的塑料袋中, 4℃ ~ 8℃ 储存。
- (2) 如果培养皿是在实验室条件下制备的, 那么应该将培养基的干燥、储藏条件和储藏时间纳入实验室质量保证项目的考核指标中。
- (3) 商品化的培养基应该按照生产厂家的要求进行储存, 并且确保在标示的有效期内进行使用。
- (4) 对于 MH-F 培养基 (商品化的或者实验室内制备的), 不论是储存在塑料袋中或者密封环境中, 在使用前必须确保培养基的干燥。这样避免培养基过度潮湿, 从而引起抑菌圈直径模糊或者抑菌圈内薄雾状生长的现象。

5. 质量控制

- (1) 使用 pH 计确认 pH 在 7.2 ~ 7.4 之间。

^① MIC 为最小抑菌浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。

- (2) 确保培养基的厚度在 $4\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ 。
- (3) 在选定测试菌的情况下，确保目标菌的质控菌株能够在培养基上生长良好。
- (4) 对于使用的所有细菌-抗菌药物组合，确保抑菌圈直径都在可控制的范围内。

(二) 微量肉汤稀释法进行 MIC 测定时培养基的制备

MH 肉汤：阳离子调节的 MH 肉汤，按照 ISO 20776-1 (2006) 的要求，用于非苛养菌的微量肉汤稀释法。

MH-F 肉汤：添加 5% 溶解马血和 20mg/L β -NAD 的 MH 肉汤，用于测试链球菌属（包括肺炎链球菌）、嗜血杆菌属、卡他莫拉菌、单核细胞增多性李斯特菌、弯曲杆菌属、多杀性巴斯德菌、棒状杆菌属和其他一些苛养菌。

按照下列步骤配置 MH-F 肉汤：

1. 试剂

- (1) 商品化的阳离子调节的 MHB 粉末。
- (2) 50% 溶解的马血。
- (3) β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (β -NAD)，纯度 $\geq 98\%$ 。

2. 50% 溶解马血储备液的制备步骤

- (1) 无菌条件下，使用等量的灭菌去离子水稀释马血。
- (2) 将马血置于 -20°C 条件下过夜冷冻随后解冻。重复上一步骤直至细胞完全溶解（一般情况下重复上述步骤三次就可以，但是按照 ISO 20776-1，需要重复上述步骤七次）。
- (3) 将 50% 溶解马血离心取上清。清澈透明的液体是便于读取结果的必需条件。获取上清液失败的可能原因是未充分溶解或离心。重复离心可以确保获得的上清液足够澄清。
- (4) 将制备好的溶解马血按照需要小份储藏在 -20°C 条件下，使用时取出解冻。避免反复冻融。

3. β -NAD 储备液的制备步骤

- (1) 使用灭菌的去离子水溶解 β -NAD，浓度为 20mg/L 。
- (2) 使用 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜进行过滤。
- (3) 将制备好的储备液按照需要小份储藏在 -20°C 条件下，使用时取出解冻。避免反复冻融。

4. MH-F 肉汤的制备步骤

- (1) 按照生产厂家的指示准备和灭菌阳离子调节的 MHB，但是在添加溶解马血的时候，每升中加入的水应少于 100mL 。
- (2) 将培养基冷却至 $42^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ 。
- (3) 每升培养基中加入 100mL 50% 的溶解马血和 1mL β -NAD，混匀。
- (4) 用带有螺旋盖的无菌容器分装 MH-F 肉汤。

5. MH-F 肉汤的储存

- (1) 在 $4^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 的条件下储存 MH-F 肉汤。
- (2) 应将储存条件和时间作为实验室质量检测项目的一部分，一般能够储存 3 个月。

6. 质量控制

- (1) 确保肉汤的 pH 在 $7.2 \sim 7.4$ 之间。
- (2) 确保目标菌株的质控菌株能够在培养基上生长良好。
- (3) 确保使用的所有细菌-抗菌药物组合的 MICs 在可控制范围内。

二、纸片扩散法

(5.0 版本, 2015 年 1 月)

此部分的主要缩略语和术语见表 1-2-1。

表 1-2-1 缩略语和术语

缩略语	完整名称
ATCC	美国模式菌株收藏中心, http://www.atcc.org
BLNAR	β -内酰胺酶阴性, 氨苄西林耐药
CCUG	Culture Collection University of Göteborg, http://www.ccug.se
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo, http://www.cect.org
CIP	Collection de Institut Pasteur, http://www.cabri.org/CABRI/srs—doc/cip_bact.info.html
DSM	Bacterial cultures from Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) have DSM numbers, https://www.dsmz.de/
ESBL	超广谱 β 内酰胺酶
EUCAST	抗生素敏感性测试欧洲协会, http://www.eucast.org
MH	MH 琼脂
MH-F	MH-F 琼脂-苛养菌 (添加 5% 脱纤维马血和 20mg/L β -NAD 的 MH 琼脂)
MRSA	甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌 (携带 <i>mecA</i> 和 <i>mecC</i> 基因)
NCTC	National Collection of Type Culture, http://www.hpacultures.org.uk
β -NAD	β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
生理盐水	水中加入 0.85% 的 NaCl

1 引言

纸片扩散法是最早用于抗生素敏感性测试的方法之一, 并且迄今为止, 仍然在常规的临床试验中广泛用于抗生素敏感性测试。这种方法可用于测试绝大多数的细菌, 包括许多苛养菌, 同时对于抗菌药物, 均是通用的、可行的, 而且不需要额外的装置。

类似于纸片扩散法的其他技术, EUCAST 方法是基于 1972 年药敏试验的国家合作研究的基础上的一种标准方法, 并且全世界的许多专业团队都在使用这种方法。

EUCAST 纸片扩散法中抑菌圈直径的折点值是被校正过的折点值, 并且可在 EUCAST 官方网站 (<http://www.eucast.org>) 上免费获取。

与所有的方法一样, 这里描述的试验技术不能加以任何改变, 以避免产生不可靠的试验结果。

2 培养基的制备与储存

2.1 按照生产厂家的指示进行 MH 琼脂的制备, 苛养菌的添加物可参考表 1-2-2。苛养菌添加物的准备和添加详见 <http://www.eucast.org>。

2.2 培养基的厚度大概为 $4\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ (90mm 圆形培养皿大约 25mL, 100mm 圆形平皿大约 31mL, 150mm 圆形培养皿大约 71mL, 100mm 方形培养皿大约 40mL)。

2.3 在培养基使用之前必须确保培养基表面干燥。培养基是否需要干燥以及培养基需要多久才能干燥, 取决于培养基的储存和干燥条件。避免过度干燥培养基。

2.4 培养基在室内储存时保持温度 8℃ ~ 10℃。当培养基需要储存的时间多于 7 天时，或许需要改变储存条件，比如说将培养基置于密封袋子中，保持温度 4℃ ~ 8℃。

2.5 对于在实验室条件下制备的培养皿，可以将培养基的干燥、储存条件和储存时间都列入实验室质量保证项目的测量数据中。

2.6 商品化生产的培养皿需要按照生产商的要求进行储存，并且在标注的有效期内使用。

2.7 对于 MH - F 培养基（无论是商品化的还是实验室制备的），储存在塑料袋中或者密封容器中，在使用前均需保证培养基表面的干燥。避免过度湿润，因为会引起抑菌圈边缘的模糊或者抑菌圈内的薄雾状生长。

表 1 - 2 - 2 抗生素敏感性测试所需的培养基

微生物	培养基
肠杆菌	MH 琼脂
假单胞菌属	MH 琼脂
嗜麦芽窄食单胞菌	MH 琼脂
不动杆菌属	MH 琼脂
葡萄球菌属	MH 琼脂
肠球菌属	MH 琼脂
A、B、C 和 G 族链球菌	MH - F 琼脂 ¹
肺炎链球菌	MH - F 琼脂 ¹
草绿色链球菌	MH - F 琼脂 ¹
嗜血杆菌属	MH - F 琼脂 ¹
卡他莫拉菌	MH - F 琼脂 ¹
单核细胞增多性李斯特菌	MH - F 琼脂 ¹
多杀性巴氏杆菌	MH - F 琼脂 ¹
空肠和结肠弯曲杆菌	MH - F 琼脂 ¹ （见附录 A）
棒状杆菌属	MH - F 琼脂 ¹
其他苛养菌	待定

¹ MH + 5% 脱纤维马血 + 20mg/L β - NAD。

3 接种物的制备

3.1 使用菌落悬浮法来制备目标微生物的悬浮液，要求达到 0.5 麦氏浊度（配制方法见表 1 - 2 - 3），大肠杆菌此时大约 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ CFU/mL。

基本上所有的微生物都可以使用直接菌落悬浮法，包括嗜血杆菌属、卡他莫拉菌、肺炎链球菌、β 溶血性链球菌和其他链球菌在内的苛养菌。

3.1.1 使用过夜生长的没有选择性的培养基来制备悬浮液。使用无菌接种环或无菌棉拭子在培养基上挑取几个形态学上相似的菌落到无菌的生理盐水中以获得悬浮液。

3.2 接种物悬浮液必须达到 0.5 麦氏浊度。如果高于 0.5 麦氏浊度，会造成抑菌圈直径的缩小，而小于 0.5 麦氏浊度则会引起相反的结果。

3.2.1 推荐使用光度计来校准悬浮液的浊度。按照生产商的指导，来调整光度计从而达到 0.5 麦氏浊度。

3.2.2 或者使用目测法，目测悬浮液的浓度达到 0.5 麦氏浊度。

使用前在涡旋仪上剧烈摇动浊度标准管（某些商品化的标准浊度管是依据凝胶进行设置的，不需要进行混合，因此必须按照生产商的指示）。

为了便于进行对比，在一个白色带有黑线的背景下，比较测试管和标准管。

3.2.3 一般建议从血平皿上挑取肺炎链球菌，此时要求达到 0.5 麦氏浊度。当从巧克力平皿上挑取肺炎链球菌时，需要达到 1.0 麦氏浊度。

3.2.4 通过添加生理盐水或挑取更多微生物菌落带调整菌悬液，使其达到 0.5 麦氏浊度。

3.3 制备好的悬浮液需在 15min 内使用。

表 1-2-3 0.5 麦氏浊度标准液的制备步骤

序号	内 容
1	在 99.5mL 0.18mol/L (0.36N) 的 H ₂ SO ₄ (1% , V/V) 中加入 0.5mL 0.048mol/L 的 BaCl ₂ (1.175% , W/V Ba ₂ Cl ₂ · 2H ₂ O)
2	使用带有 1cm 光径、比色皿的分光光度计来测量悬浮液的浓度。其 625nm 的吸光度应在 0.08 ~0.13 之间
3	使用与盛装测试液相同的管子来分装标准液。密封管子
4	在室温下避光保存标准液
5	使用前在涡旋仪上剧烈震荡混匀标准液
6	储存 6 个月后更换标准液或重新测量其吸光度数值
7	从商业途径购买的商品化的标准液需测试其吸光度，以保证吸光度在可使用范围内

4 琼脂培养基的接种

4.1 通常情况下，已校准的悬浮液接种物需在制备后 15min 内使用。在悬浮液制备好的 60min 内必须使用。

4.2 使用一个灭菌的棉拭子蘸取悬浮液，在管壁的内侧挤去棉棒上多余的水分。

在管壁上挤去多余的水分非常重要，因为这样可以避免琼脂培养基的过度接种，尤其对于革兰氏阴性菌。

4.3 使用自动旋转仪或者从三个方向均匀的涂布整个琼脂培养基的表面。

4.4 在 15min 内将药敏纸片放置于琼脂培养基表面。

如果已接种的琼脂培养基在室温下放置过久，那么此时微生物已经开始生长，此时会引起抑菌圈直径的错误缩小。因此在接种培养基后，需在 15min 内将药敏纸片放置于琼脂培养基表面。

5 药敏纸片的使用

5.1 药敏纸片所要求的药物含量在折点与质控表格中列出，详见 <http://www.eucast.org>。

5.2 将药敏纸片牢牢地放置于已接种的干燥的培养基的表面。药敏纸片与培养基的接触必须紧密且平坦。药敏纸片一旦接触到培养基的表面，就不能再进行移动，因为纸片中的抗生素扩散的速度非常快。

5.3 一个平皿中药敏纸片的数量必须进行一定的限制，以避免抑菌圈相互重叠以及抗生素之间的互相干扰。必须保证抑菌圈是清晰、可测量的。一个平皿中可以放置的药敏纸片的数量取决于微生物和所用的纸片的特性。一般情况下，在 90mm 和 150mm 的平皿中，最多可放置 6 个和 12 个药敏纸片。

5.3.1 在测试葡萄球菌和链球菌诱导型克林霉素耐药表型时，红霉素和克林霉素的药敏纸片必须间隔一定的距离：葡萄球菌时需间隔 12mm ~20mm，而链球菌时需间隔 12mm ~16mm。

5.4 当纸片中抗生素药物失效时，会引起抑菌圈直径的减小，以及引起一定的失误。以下因素必须进行考虑：

5.4.1 药敏纸片储存时，包括分配器中的那些药敏纸片，都必须密封储存在一个干燥的避光的环境中（包括甲硝唑、氯霉素和氟喹诺酮类在内的一些药物，当长期暴露在光照条件下时，药物会失活）。

5.4.2 除非生厂商有相应的声明，所有的药敏纸片都应储存在 -20℃ 条件下。如果没有上述条件，

药敏纸片至少应该储存在 <8℃ 的环境中。

- 5.4.3 将正在使用中的药敏纸片储存在 <8℃ 的环境中。
- 5.4.4 为避免冷凝，药敏纸片在打开使用前，需在室温环境下解冻。
- 5.4.5 药敏纸片需在标注的有效期内使用。

6 琼脂平皿的孵育

- 6.1 在放置好药敏纸片后，倒置平皿并在 15min 内置于培养箱中进行孵育。如果放置好药敏纸片后，平皿在室温下长时间放置，由于药物的提前扩散，会引起抑菌圈的错误增大。
- 6.2 如果将培养皿在培养箱中进行堆叠放置，由于培养皿受热不均，会对结果产生一定的影响。由于不同的培养箱，其孵育效率会有所差异，因此应该对孵育条件进行控制，包括培养皿可堆叠的数目，这些可以列入实验室质量控制项目中的一部分。
- 6.3 按照表 1-2-4 中的说明孵育培养皿。
- 6.4 当测试肠球菌的糖肽类敏感性试验时，某些耐药的菌株只有在完全孵育 24h 时才能出现抑菌圈。然而，一般应在孵育 16h~20h 时进行测量，并且报告耐药。但是对于结果是敏感的菌株，需要进行重新孵育，并且确保孵育时间足够 24h。

表 1-2-4 抗生素敏感性测试时琼脂平皿的孵育条件

微 生 物	孵 育 条 件
肠杆菌	35℃ ±1℃，空气环境，16h~20h
假单胞菌属	35℃ ±1℃，空气环境，16h~20h
嗜麦芽窄食单胞菌	35℃ ±1℃，空气环境，16h~20h
不动杆菌属	35℃ ±1℃，空气环境，16h~20h
葡萄球菌属	35℃ ±1℃，空气环境，16h~20h
肠球菌属	35℃ ±1℃，空气环境，16h~20h（测试糖肽类时，需孵育 24h）
A、B、C 和 G 族链球菌	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h
肺炎链球菌	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h
草绿色链球菌	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h
嗜血杆菌属	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h
卡他莫拉菌	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h
单核细胞增多性李斯特菌	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h
多杀性巴氏杆菌	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h
空肠弯曲杆菌和结肠弯曲杆菌	见附录 A
棒状杆菌属	35℃ ±1℃，4%~6% CO ₂ 的空气环境，16h~20h。孵育 16h~20h 后依旧孵育不充分的菌株应该立即重新孵育，并且在孵育 40h~48h 后测量抑菌圈
其他厌氧菌	待定

7 孵育后琼脂平皿的检查

- 7.1 准确的接种与涂布能够保证细菌的生长良好。
- 7.2 细菌应该在整个琼脂培养基表面生长良好从而产生一个均匀的圆形抑菌圈。
- 7.3 如果在琼脂培养皿上能够看到单菌落，说明接种量太少，应该重新接种、孵育。
- 7.4 检测抑菌圈直径是否在质控范围之内。

8 抑菌圈直径的测量和敏感性的解释

- 8.1 对于所有测试的药物，将培养皿置于眼睛前方 30cm 的位置，观察到细菌的完全抑制。

8.2 对于没有添加任何添加剂的琼脂培养皿，应将培养皿置于黑色的背景下，使用反射光从培养皿的反面进行测量。

8.3 对于添加了添加剂的琼脂培养皿，应在移除盖子后，使用反射光从培养皿的正面进行测量。

8.4 除非进行特别说明（见下面部分），避免使用透射光（将培养皿对着光）或放大镜进行测量。

8.5 测量抑菌圈时，直径的读取结果应最接近直尺上的毫米、圆规或自动读取器。

8.6 使用折点表格来解释抑菌圈直径的结果，见 <http://www.eucast.org>。

8.7 如果使用模板来解释抑菌圈直径，那么应将平皿置于模板上，并且使用模板中标注的 EUCAST 折点值来解释结果。应该确保使用的折点值是最新的 EUCAST 折点值表格。可参阅 <http://bsac.org.uk/susceptibility/template-program> 进行免费的模板制作。

8.8 特异性的测量说明

8.8.1 应该注意那些在抑菌圈内生长的细菌，此时若有需要，应该重新鉴定细菌并且重复测试。

8.8.2 当培养基中含有拮抗剂时，此时在测量磺胺类或甲氧苄啶时，会在药敏纸片附近出现薄雾状生长。此时忽略这些薄雾状生长，并且在测量时，测量那些更为清晰的抑菌圈边缘。

当测量嗜麦芽窄食单胞菌对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的敏感性时，此时会在抑菌圈内出现大量的细菌生长。这些生长可以忽略，并且在抑菌圈边缘可见的情况下，读取抑菌圈直径。如果药敏纸片周围大量细菌生长并且看不到抑菌圈时，此时认为没有抑菌圈。

8.8.3 当测试肠杆菌对氨苄西林敏感性时，使用某些批次的 MH 琼脂时，抑菌圈内会出现细菌的薄雾状生长。

8.8.4 测试大肠杆菌对美西林的敏感性时，忽略抑菌圈内细菌的生长。

8.8.5 对于变形杆菌属，忽略细菌群集生长的现象，阅读抑菌圈。

8.8.6 当测试葡萄球菌对青霉素 G 的敏感性时，使用透射光观察紧贴培养皿的抑菌圈的边缘。当抑菌圈直径 $\geq$ 敏感性折点，但是抑菌圈直径边缘尖锐时，报告为耐药。

8.8.7 当使用头孢西丁测定金黄色葡萄球菌对甲氧西林的耐药性时，测量明显的抑菌圈，并且需要在极好的光线条件下检测抑菌圈内部生长的细菌菌落。这些细菌菌落可能是受污染的细菌菌落或者是甲氧西林耐药的异质性表现。

8.8.8 当测试葡萄球菌对利奈唑胺的敏感性时，需要使用透射光从培养皿后面进行测量。

8.8.9 测量肠球菌对万古霉素敏感性时，使用透射光检测紧贴培养皿的抑菌圈的边缘。模糊的抑菌圈边缘和抑菌圈内部生长的菌落，表明万古霉素耐药，并且可进行后续的研究。

8.8.10 对于使用 MH-F 培养基测试溶血性链球菌时，测量细菌生长的抑菌圈而不是溶血性抑制的圈。 β 溶血性通常可与细菌的生长予以区分，而 α -溶血性的现象与生长现象较为一致。

9 质量控制

9.1 使用特异性的标准菌株（见表 1-2-5）来监控试验步骤。通常情况下推荐使用的质控菌株为典型的敏感菌株，但是也可以使用耐药菌株来检测某些已知的耐药机制所介导的耐药表型（见表 1-2-6）。这些菌株可通过商品化的途径予以购买。

9.2 质控菌株储存时必须确保储存环境可以维持菌株的生存和特性。将质控菌株在 -70°C 条件下，储存在带有玻璃珠的甘油肉汤中（或者商品化设备中）是一种非常方便的方法。非苛养菌株可储存在 -20°C 条件。每个质控菌株至少保存两份，一份用来使用，一份用来存档。

9.3 每周都应当从正在使用的那份质控菌株小瓶中取出一个玻璃珠，在没有选择性的培养基上生长来确认其纯度。通过这种纯培养的方式，每天都制备一份再培养物。对于那些需要生长 5 天~7 天的苛养菌，每周需要制备一份再培养物。

9.4 质控菌株的可允许范围见 <http://www.eucast.org>。

9.5 使用推荐的常规质控菌株来监测实验操作。

每天都应设计质控试验并且进行检测，至少应对那些常规药板中包含的部分抗生素进行测试。

每天都应进行测试，并且持续 20 天进行测试。测试结果应高于或低于目标值。对于连续的 20 次测试，允许有 2 次甚至更多次结果不在范围内。

9.6 每天都应该进行质控菌株的测试直至操作完全合乎规程（≤1/20 的结果超出质控范围），此时可将测试频率降为每周一次。如果不符合操作的标准，必须对原因进行调查。

9.7 此外，对于常规的 QC 测试，测试每一批次的 MH 琼脂确保所有的抑菌圈直径都在可允许的范围内。

在培养基中含有二价阳离子的情况下，氨基糖苷类的药敏纸片法试验的结果可能会出现较大的误差，镁离子存在时替加环素会出现误差，培养基中含有胸腺嘧啶时，甲氧苄啶 - 磺胺甲噁唑会出现误差，在 pH 值不合适时，红霉素会出现明显的误差。

表 1-2-5 常规测试的质控菌株

微生物	菌 株	特 性
大肠杆菌	ATCC 25922	敏感，野生型
	NCTC 12241	
	CIP 7624	
	DSM 1103	
	CCUG 17620	
	CECT 434	
大肠杆菌	ATCC 35218	TEM - 1 β 内酰胺酶，氨苄西林耐药
	NCTC 11954	
	CIP 102181	
	DSM 5564	
	CCUG 30600	
	CECT 943	
铜绿假单胞菌	ATCC 27853	敏感，野生型
	NCTC 12934	
	CIP 76110	
	DSM 1117	
	CCUG 17619	
	CECT 108	
金黄色葡萄球菌	ATCC 29213	产 β 内酰胺酶能力较弱
	NCTC 12973	
	CIP 103429	
	DSM 2569	
	CCUG 15915	
	CECT 794	
粪肠球菌	ATCC 29212	敏感，野生型
	NCTC 12697	
	CIP 103214	
	DSM 2570	
	CCUG 9997	
	CECT 795	