

ICS 11.100
C 44



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXX—20XX/ISO/TS 16782:2016

临床实验室检验
抗菌剂敏感试验脱水 MH 琼脂和肉汤可接受批标准

Clinical laboratory testing –
Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and
broth for antimicrobial susceptibility testing
(ISO/TS 16782:2016, IDT)

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

国家标准化委员会 发布

目 次

前言	iii
引言	iv
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 MH 肉汤的要求	3
4.1 MH 肉汤的组成	3
4.2 理化特性	3
4.3 脱水 MH 肉汤生产批的生产商的检测方案	4
4.4 结果解释	5
4.5 结果评价	6
5 MH 琼脂的要求	7
5.1 MH 琼脂的组成	7
5.2 理化特性	7
5.3 脱水 MH 琼脂生产批的生产商的检测方案	8
5.4 结果解释	8
5.5 结果评价	10
6 用脱水 MH 肉汤或琼脂生产批测试新抗菌剂	10
附录 A	11
(资料性附录)	11
MH 培养基	11
附录 B	13
(资料性附录)	13
质控菌株制备	13
附录 C	14
(资料性附录)	14
推荐的生产批检测数据表	14
附录 D	17
(资料性附录)	17
标签声明	17
参考文献	18

前言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准使用翻译法等同采用 ISO/TS 16782: 2016《临床实验室检验 抗菌剂敏感试验脱水 MH 琼脂和肉汤可接受批标准》进行编写的。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 为资料性附录。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC136）归口。

本标准主要起草单位：

本标准主要起草人：

引言

历史上，虽然有各种培养基被推荐用于抗菌剂敏感试验，MH 肉汤（MHB）被选定为肉汤微量稀释法最小抑菌浓度（MIC）参考方法（YY/T 0688.1/ISO 20776-1）的培养基，并且 MH 琼脂（MHA）广泛用于快速生长细菌的纸片扩散法试验。

MH 培养基能对多数非苛养病原菌提供满意的生长，具有可接受的批间重现性以及低含量的磺胺、甲氧苄氨嘧啶和四环素抑制剂，并且几十年来从此培养基的抗菌剂敏感性实验中已积累了大量数据。

此标准旨在建立一个标准描述和方案，据此，脱水 MH 琼脂（dMHA）MH 和肉汤（dMHB）制造商可确定其可接受的性能特征。

试验结果必须符合每个抗菌剂和质控菌株组合规定的质量控制限值范围。每个生产批至少应对这些抗菌剂和质控菌株组合进行测试。

本文件是基于美国临床和实验室标准协会（CLSI）以往两个文件在许可下制定的。即 CLSI M6-A2[1]（脱水 MH 琼脂评价方案）和 CLSI M32-P[2]（抗菌剂药敏试验脱水 MH 肉汤批次评价）。本标准改进并取代了以前的 CLSI 出版物。ISO 16782 出版后，CLSI M6-A2[1]和 CLSI M32-P[2]将不再使用，制造商可采用 ISO 16782 来评价其 MH 琼脂（dMHA）MH 肉汤（dMHB）生产批的性能特征。

临床实验室检验

抗菌剂敏感性试验脱水MH琼脂和肉汤可接受批标准

1 范围

本标准给出了脱水 MH 肉汤 (dMHB) 和脱水 MH 琼脂 (dMHA) 物理属性的标准描述和性能标准, 以此制造商可评价其 dMHA 和 dMHB 生产批的性能特征。肉汤或琼脂的生产批随后可被所有用户 (包括体外药敏试验器械制造商) 作为进行抗菌剂敏感性试验的培养基。

本标准不阐述添加到培养基中支持苛养菌生长的添加剂 (例如血液或血液制品) (CLSI 方法) [3] [4][5] [6]。这些添加剂作为终产品在脱水培养基制备为液态时加入, 不在本标准的范围。虽然 dMHA 能用于琼脂稀释法 [4][6]或梯度扩散法测定 MIC, 本标准仅包含按照美国临床和实验室标准协会 (CLSI) [5]以及欧洲抗菌剂敏感性试验委员会 (EUCAST) [3] 使用纸片扩散法的性能试验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件, 其随后所有的修改单 (不包括勘误的内容) 或修订版均不适用于本标准, 然而, 鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件, 其最新版本适用于本标准。

YY/T 0688.1-2008 / ISO 20776-1:2006 临床实验室检测和体外诊断系统 感染病原体敏感性试验与抗菌剂敏感性试验设备的性能评价 第 1 部分: 抗菌剂对感染性疾病相关的快速生长需氧菌的体外活性检测的参考方法

CLSI M100, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Informational Supplement

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准:

3.1

抗菌剂 antimicrobial agent

指一类可以抑制或杀死微生物, 可能用于抗感染治疗的生物来源的、合成的或半合成的物质的总称。

注: 消毒剂、灭菌剂和防腐剂不在此定义范围内。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1; 2006, 2.1]

3.2

药敏纸片 antimicrobial disc

用于体外敏感试验的含有已知量抗菌剂的圆形小纸片。

3.3

浓度 concentration

抗菌剂在规定体积溶液中的量。

注 1: 该浓度表示为 mg/L。

注 2: $\text{mg/L} = \mu\text{g/ml}$, 但不推荐使用 $\mu\text{g/ml}$ 单位。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006, 2.2.2]

3.4

原液 stock solutions

用于进一步稀释的初始浓度溶液。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006, 2.3]

3.5

最小抑菌浓度 minimum inhibitory concentration , MIC

在规定的体外试验条件下,在规定的孵育时间内,能抑制细菌出现肉眼可见生长的抗菌剂最低浓度。

注: MIC 常用 mg/L 表示。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006, 2.4, “最低浓度”已被修改为“抗菌剂最低浓度”]

3.6

参考株 reference strains

有特定分类编号,具有稳定、确定的抗菌剂敏感性表型和(或)基因型的特征明确的微生物。

注:参考菌株是从认可的国家菌种保藏机构获得并作为质量控制,其通常以储存培养物的形式进行保存,试验所用工作培养物均来源于此。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006, 2.7, “特征明确的细菌”已被修改为“特征明确的微生物”,“菌种保藏机构”已被修改为“认可的国家菌种保藏机构”]

3.7

敏感性试验方法

3.7.1

肉汤稀释法 broth dilution

容器加入适当体积某抗菌剂递增浓度(通常两倍)的肉汤和某微生物的规定接种量的技术。

注:该方法的目的是确定 MIC 值。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006, 2.8.1, 有修改-“抗菌剂溶液,采用某抗菌剂递增浓度(通常两倍)和适当体积肉汤”已被修改为“含有某抗菌剂递增浓度(通常两倍)的肉汤”]

3.7.2

微量稀释法 microdilution

指在微量稀释盘中进行的肉汤稀释试验,每孔最终工作液体积不超过 200 μ L。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006, 2.8.2]

3.7.3

纸片扩散法 disc diffusion

将药敏纸片贴附于已均匀接种规定量微生物的琼脂培养基表面,然后在规定条件下孵育,微生物生长抑制区域的大小与微生物对某抗菌剂敏感/耐药相对应的技术。

3.7.4

抑菌环直径 zone diameter

纸片扩散法试验中含有特定量抗菌剂纸片周围生长抑制区的直径（mm）。

3.8

肉汤 broth

用于细菌体外培养的液体培养基。

3.9

接种量 inoculum

依据终体积计算出的在悬液中的活菌数量。

注：接种量通常以每毫升的菌落形成单位（CFU/mL）来表示。

[引自:YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006, 2.8.1, 有修改-“细菌数量”已被修改为“活菌数量”]

3.10

脱水 MH 肉汤, dMHB

用于制备肉汤稀释法抗菌剂敏感试验液体培养基的干粉细菌培养基。

3.11

脱水 MH 琼脂, dMHA

干粉细菌培养基, 用于制备纸片扩散法、梯度扩散 MIC 法和琼脂稀释法抗菌剂敏感试验琼脂平板。

4 MH 肉汤的要求

4.1 MH 肉汤的成分

历史上, 抗菌剂敏感性试验用 MH 肉汤培养基每升纯化水大致包含如下成分 (为符合性能要求可能需要调整) [7]:

- 脱水 300 g 牛肉浸液 (即 2 克牛肉浸膏粉);
- 酪蛋白酸消化物 17.5 g;
- 淀粉 1.5 g

4.2 理化特性

4.2.1 干燥的粉末或颗粒

颜色: 米色至浅米色。

均匀, 自由流动, 同质, 不含外来物质。

4.2.2 制备的肉汤培养基

经过水化, 高压灭菌后, 在 25° C 时最终测得的 pH 值应在 7.2 到 7.4。

液体为浅草黄色、透明、没有可见的沉淀。

4.2.3 MHB 阳离子补充和含量

肉汤应含有足够浓度的阳离子以对质控菌株提供充足的生长, 并使得用户能确定其 MIC 值 (如氨基糖苷类、喹诺酮类) 在 YY/T 0688.1-2008/ISO 20776-1:2006 表 4 规定的范围 (检查 CLSI 和 EUCAST 文件的最新版本的 QC 范围)。对于新批次 MHB 可能需要进行可接受的阳离子含量测试。对于标准生产批的 dMHB, 由其脱水产品制备的肉汤应含不超过 25 mg/L 的总钙和 12.5 mg/L 的总镁。生产商可以

选择向商品批的 dMHB 提供要求的阳离子浓度或实际水平少于 20 mg/L 的钙和少于 10 mg/L 的镁。在后一种情况下，最终标签应注明肉汤中所含的实际数量。最后的测试，所制备的 MHB 应含有 20mg/L 至 25mg/L 的 Ca^{2+} 和 10mg/L 至 12.5mg/L Mg^{2+} 。

痕量锰是生长所需的，但浓度应低于 8mg/L，以避免对甘氨环素类的假耐药解释[8]。这应通过检测大肠埃希菌 WDCM 00013 和替加环素获得的 MIC 值在可接受的范围内来确定。

痕量锌是生长所需的，但锌的浓度应低于 3mg/L，以避免亚胺培南[9]和可能与其他碳青霉烯类抗生素的假耐药解释。这应由检测铜绿假单胞菌 WDCM 00025 与亚胺培南获得的 MIC 值在可接受的范围内来确定。

钙、镁、锰和锌的阳离子浓度应采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)或火焰原子吸收光谱法(FAAS)测定[10]。

虽然已知会影响其他抗菌剂的药敏试验结果的离子效应未包括在本标准中，制造商应考虑其对 MHB 稀释药敏试验的影响。受影响的药物包括达托霉素[11]和多粘菌素[12]。达托霉素测试时，MHB 应补充至终浓度为 50 mg / L 的总 Ca^{2+} 。参见 YY/T 0688.1/ISO 20776-1 对培养基制备和抗菌剂敏感性试验相应的指示。

4.2.4 其他培养基成分

培养基胸腺嘧啶脱氧核苷质量浓度应小于 0.03 mg/L，这可通过粪肠球菌 WDCM 00087 与甲氧苄氨嘧啶、磺胺甲恶唑药敏试验得出的 MIC 结果 $\leq 0.5/9.5$ mg/L 来指示[13]。

4.2.5 制造商要求的特定调整

对于表 1 所包含的抗菌剂:

a) 葡萄球菌属与苯唑西林测试来检测其甲氧西林耐药时，要求加入氯化钠（2% m/V NaCl）中肉汤中终浓度为 20 g/L;

b) 对于替加环素的微量肉汤稀释法检测，当制备 MIC 测试盘时，培养基应当新鲜配制。制备测试盘时，培养基应不超过 12 h。然而，制好的测试盘随后可被冷冻以供日后使用。进一步的细节参见 YY/T 0688.1/ISO 20776-1。

制造商可选择测试额外的抗菌剂和菌株，以及苛养菌生长需要的 MH 培养基添加剂，预期的性能限值应被验证。

对于表 1 未包含的微生物（即在制造商的决定下进行扩展测试）:

c) 对诸如链球菌和嗜血杆菌属等苛养微生物的测试需要添加生长补充剂（例如血液或血液成分）。如果用符合本标准的 MH 琼脂或肉汤批次测试苛养微生物，其在添加补充剂后的 MIC 或抑菌区直径应落在 YY/T 0688.1/ISO 20776-1 公布的对特定培养基和测试微生物可接受的质量控制范围。

见 A.1 对抗菌剂特定效应的汇总。

4.3 脱水 MH 肉汤生产批的生产商的检测方案

微量稀释盘准备和执行测试的程序在 YY/T 0688.1/ISO 20776-1 有描述。应遵守这些程序并有以下的限制:

- a) 每个测试盘上抗菌剂最小和最大浓度应超出各抗菌剂质量控制范围上下限值至少两个倍比稀释度。
- b) 4.4 所列的每个微生物抗菌剂组合至少在三个独立测试盘上测试一个浓度的接种量。该微生物抗菌剂组合的列表代表了测试的最低要求，并包括可能检测到培养基特定问题的抗菌剂。其他抗菌剂可根据制造商的判断进行测试，以确保培养基的一致性能。培养基应适合于测试的抗菌剂。
- c) 质控菌株维护的具体细节见 YY/T 0688.1/ISO 20776-1, CLSI[6] or EUCAST[4]。测试前至少 2 天，解冻每个需要质控菌株的一个小瓶（见 4.4）。每个菌种接种于非选择性营养琼脂培养基上并按照 YY/T 0688.1/ISO 20776-1 在 34℃至 37℃大气环境下孵育 18h-24h。孵育后，检查纯度。在接种试验板前一天，再次传代以提供接种菌制备需要的新鲜菌落。所有冷冻状态微生物用于测试前应传代培养至少两次。
- d) 如果使用冷冻测试盘，应在室温下完全解冻（通常需要 1 小时到 2 小时）。测试盘应在解冻的当天使用。
- e) 应按照 YY/T 0688.1/ISO 20776-1 描述设置试验，每个质控菌株应采用菌落悬浮法制备单一接种量。接种的微量稀释盘应孵育 16h-20h（对于金黄色葡萄球菌与氨苄西林孵育 24h），并且在从培养箱取出后 1 小时内读数。
- f) 结果应按制造商的记录保留政策记录和维持。为此目的所建议的数据表见附件 C。

4.4 结果解释

表 1 中可接受的 MIC 范围是在许可下从 CLSI [14] 和 EUCAST [http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/qc_tables/] [15]获得的。可接受范围可能被修订。因此，应检查参考文献[14]或 EUCAST 的最新版本可能的更新。同一质控微生物在不同保藏中心的编号见附录 B。

表 1 质控菌株 MIC 范围 (mg/L)

质控菌株	抗菌剂	可接受范围 mg/L
铜绿假单胞菌 WDCM 00025	环丙沙星	0.25 - 1
	庆大霉素	0.5 - 2
	亚胺培南	1 - 4
	哌拉西林/他唑巴坦	1/4 - 8/4
大肠埃希菌 WDCM 00013	氨苄青霉素	2 - 8
	头孢噻肟	0.03 - 0.12
	替加环素	0.03 - 0.25
金黄色葡萄球菌 WDCM 00131	克林达霉素	0.06 - 0.25
	红霉素	0.25 - 1
	苯唑西林	0.12 - 0.5
	四环素	0.12 - 1
粪肠球菌 WDCM 00087	万古霉素	0.5 - 2
	氨苄青霉素	0.5 - 2
	甲氧苄啶-磺胺甲氧异恶唑	≤0.5/9.5a
金黄色葡萄球菌 WDCM 00211	万古霉素	1 - 4
	苯唑西林	4 - 32

a CLSI 或 EUCAST 还未建立甲氧苄啶-磺胺甲氧异恶唑质控范围。甲氧苄啶-磺胺甲氧异恶唑 MIC 结果应为 ≤0.5/9.5 mg/L。

4.5 结果评价

如果所有微生物抗菌剂组合的所有性能标准都在 4.4 列出的可接受范围内。并且所有的理化特性满足（见 4.2），制造商可以使用附件 D 中给出的标签声明。制造商应设法使得平均 MIC 值接近质控范围的中点。数据应保存于文件并且结果可供任何人请求获取。

5 MH 琼脂的要求

5.1 MH 琼脂的成分

历史上，抗菌剂敏感性试验用 MH 琼脂培养基每升纯化水大致包含如下成分（为符合性能要求可能需要调整）[7]：

- 脱水 300 g 牛肉浸液 (即 2 克牛肉浸膏粉)；
- 酪蛋白酸消化物 17.5 g；
- 淀粉 1.5 g
- 琼脂 17 g

5.2 理化特性

5.2.1 干燥的粉末或颗粒

颜色：米色至浅米色。

均匀，自由流动，同质，不含外来物质。

5.2.2 制备的琼脂培养基

高压灭菌并凝固后，在 25℃ 时最终测得的 pH 值应在 7.2 到 7.4。

凝固的培养基为浅草黄色、轻微乳白色。平板中培养基厚度应均匀，在 3.5mm 至 5.0mm 范围[EUCAST 规定为 $4\text{ mm} \pm 0.5\text{ mm}$ ，CLSI 规定或是约 4 mm [6] 或是 4 mm 至 5 mm (CLSI 文件 M6[1])]。不同来源平皿可能直径不同（在平皿底部的内部测量）。特定厚度需要的琼脂体积按此公式计算“ $3.143 \times$ 平皿半径 (cm) 的平方 \times 厚度 (cm)”。这样对于 90 mm、100 mm 和 150 mm 内径圆形平皿分别需要 23 ml 至 31 ml、28 ml 至 39 ml 及 62 ml 至 88 ml 以达到可接受培养基厚度范围。对于其他尺寸平皿，应计算所需培养基的体积。

5.2.3 MHA 阳离子补充和含量

琼脂应含有足够浓度的阳离子以对质控菌株提供充足的生长，并使得用户能够确定其抑菌环直径在 5.4 规定的范围。

培养基中应具有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子，其浓度应能使铜绿假单胞菌和氨基糖甙类抗菌剂给出的抑菌环直径在预期范围内，可通过庆大霉素和铜绿假单胞菌 WDCM 00025 抑菌环直径在可接受的范围内来体现。

痕量锰是生长所需的，但浓度应低于 8mg/L，以避免对甘氨环素类的假耐药解释[8]。这应通过检测大肠埃希菌 WDCM 00013 和替加环素获得的抑菌环直径值在可接受的范围内来确定。

为避免碳青霉烯类抗生素测试时的假耐药解释，培养基中锌的浓度应低于 3mg/L。这可通过检测铜绿假单胞菌 WDCM 00025 与亚胺培南获得的抑菌环直径值在可接受的范围内来确定。对于亚胺培南过量锌浓度的影响是已知存在的，并且可能适用于其他碳青霉烯类。

5.2.4 其他培养基成分

培养基胸腺嘧啶脱氧核苷质量浓度应小于 0.03 mg/L，这可通过透明度以及粪肠球菌 WDCM 00210 与甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲恶唑药敏试验得出的抑菌环直径 ≥ 20 mm 或通过检测粪肠球菌 WDCM 00087 得到的抑菌圈直径在可接受范围来表明。

一致性和足够凝胶强度是符合质量控制规范的抑菌环直径的重现性所必需的。

5.2.5 制造商要求的特定调整

对诸如链球菌和嗜血杆菌属等苛养微生物的测试需要添加生长补充剂（例如血液或血液成分）。如果用符合本标准的 MH 琼脂或肉汤测试苛养微生物，其在添加补充剂后的 MIC 或抑菌区直径应落在公布于 CLSI[5]或 EUCAST[3]文件中特定培养基和测试微生物可接受的质量控制范围。

见 A.2 对抗菌剂特定效应的汇总。未指明的微生物/抗菌剂可由制造商决定下进行测试。

5.3 脱水 MH 琼脂生产批的生产商检测方案

应使用纸片扩散法评价 dMHA 的生产批。CLSI[5]和 EUCAST[3]描述了平板制备、试验执行和结果阅读以及菌株维护。应遵守这些程序并有以下的限制：

- a) 5.4 所列的每个微生物抗菌剂组合至少在三个独立平板上测试一个浓度的接种量。该微生物抗菌剂组合的列表代表了测试的最低要求，并包括可能检测到培养基特定问题的抗菌剂。其他抗菌剂可根据制造商的判断进行测试，以确保培养基的一致性能。培养基应适合于测试的抗菌剂。
- b) 质控菌株维护的具体细节见 ISO 20776-1, CLSI[6] or EUCAST[4]。测试平板接种前至少 2 天，解冻每个需要质控菌株的一个小瓶（如下并见附录 C）。每个菌种接种于非选择性营养琼脂培养基上，在 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ （CLSI）或 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ （EUCAST）大气环境下孵育 18h-24h。孵育后，检查纯度。在接种试验平板前一天，再次传代培养。所有冷冻状态的微生物用于测试前应传代培养至少两次。
- c) 每个质控菌株应按照最新版 CLSI 或 EUCAST 文件描述的方法采用菌落悬浮法制备单一接种量。
- d) 每个培养基用每个质控菌株培养物的标准接种量接种三个平行平板，接种悬液调整后 15min 内接种平板。
- e) 接种后在适宜温度下[即 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ （CLSI）或 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ （EUCAST）]培养适当时间(即 16h-20h)，从培养箱取出平板并在一小时内读数。对于肠球菌和万古霉素，孵育时间应增加至 24h。
- f) 结果应按制造商的记录保留政策记录和维护。为此目的所建议的数据表见附件 C。

5.4 结果解释

同一质控微生物在不同保藏中心的编号见附录 B。

表 2 质控菌株纸片扩散范围 (mm)

质控菌株	纸片含量 µg	抗菌剂	可接受范围 mm
金黄色葡萄球菌 WDCM 00034	20/10	阿莫西林-克拉维酸	28-36
	10/10	氨苄西林-舒巴坦	29-37
	30	头孢西丁	23-29
	5	环丙沙星	22-30
	15	红霉素	22-30
	10	庆大霉素	19-27
	30	利奈唑胺	25-32
	10 单位	青霉素	26-37
	30	四环素	24-30
金黄色葡萄球菌 WDCM 00131 a,b	1 单位	青霉素 (苜青霉素)	12-18
	30	头孢西丁	24-30
	5	环丙沙星	21-27
	15	红霉素	23-29
	10	庆大霉素	19-25
	10	利奈唑胺	21-27
	30	四环素	23-31
粪肠球菌 WDCM 00087 c	2	氨苄西林	15-21
	10	亚胺培南	24-30
	10	利奈唑胺	19-25
	100	硝基呋喃妥因	18-24
	5	甲氧苄氨嘧啶	24-32
	1.25-23.75	甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑	26-34
	5	万古霉素	10-16
大肠埃希菌 WDCM 00013	20/10	阿莫西林-克拉维酸	18-24
	10	氨苄西林	15-22
	30 或 5	头孢噻肟	29-35 25-31
	30	氯霉素	21-27
	5	环丙沙星	30-40
	10	庆大霉素	19-26
	250 或 300	磺胺异恶唑	15-23
	30	四环素	18-25
	15	替加环素	20-27
	1.25/23.75	甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑	23-29
铜绿假单胞菌 WDCM 00025	30	氨基糖苷	23-29
	10 或 30	头孢他啶	21-27 22-29
	5	环丙沙星	25-33
	10	庆大霉素	17-23
	10	亚胺培南	20-28
	100/10 或 30/6	哌拉西林-他唑巴坦	25-33 23-29
	10	妥布霉素	20-26
	粪肠球菌 WDCM 00210	1.25/23.75	甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑
金黄色葡萄球菌 WDCM 00211	30	头孢西丁	d

金黄色葡萄球菌 WDCM 00212	30	头孢西丁	14-29
<p>a 对于金黄色葡萄球菌 WDCM 00034, 使用利奈唑胺 30 µg 纸片和青霉素 10 单位纸片。对于金黄色葡萄球菌 WDCM 00131, 使用利奈唑胺 10 µg 纸片和青霉素 (苄青霉素) 1 单位纸片。</p> <p>b 纸片扩散范围来自 EUCAST 质控范围表[3]。检查来自 EUCAST http://www.eucast.org 最新版本的更新范围, 因为会有定期更新。对于抗菌剂纸片扩散法试验, 金黄色葡萄球菌 WDCM 00131 通常作为金黄色葡萄球菌 WDCM 00034 的替代菌株。抗菌剂对金黄色葡萄球菌 WDCM 00131 没有可接受范围时应检测金黄色葡萄球菌 WDCM 00034。头孢西丁代替苯唑西林作为检测甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的替代品。苯唑西林纸片扩散法试验不再推荐。参见 CLSI[5] or EUCAST[3] 文件。</p> <p>c 甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑抑菌环直径应≥20 mm。</p> <p>d 头孢西丁抑菌环直径应≤21 mm[CLSI[3]]。</p>			

5.5 结果评价

如果所有微生物抗菌剂组合所有性能标准在可接受限值内 (见 5.4) 并且所有理化指标符合 (见 5.2), 制造商可以使用附件 D 中给出的标签声明。制造商应设法使得平均抑菌环直径值接近质控范围的中点。数据应保存于文件并且结果可供任何人请求获取。

6 用脱水 MH 肉汤或琼脂生产批测试新抗菌剂

当开发新抗菌剂的体外数据时, 应使用符合本标准的 dMHB 或 dMHA 生产批来研发这些新抗菌剂的质量控制参数。dMHB 或 dMHA 生产批与新抗菌剂的试验应遵从本标准规定的程序。对于 dMHB, 应检查离子含量以确定新抗菌剂是否受到培养基中不同于本标准推荐范围的特定阳离子或阴离子或离子浓度影响。这些研究中发现的其他可能影响体外药敏试验质量控制结果的培养基成分要予以识别。必要时应进行调整以达到稳定、可重复的实验结果。并且这些信息应在其他涉及抗菌剂敏感试验和质量控制的人员中交流, 包括 CLSI 抗菌剂敏感性试验分委员会和 EUCAST。这是新抗菌剂生产公司的责任。

附录 A

(资料性附录)

Mueller-Hinton 培养基

A.1 肉汤

表 1 脱水 MH 肉汤的注意事项

抗菌剂	说明
氨基糖甙类	特定水平的Ca ²⁺ (20mg/L至25mg/L) 和Mg ²⁺ (10mg/L至12.5mg/L) 基于研究[16][17], 比较铜绿假单胞菌临床株MH琼脂和肉汤稀释
碳青霉烯类	虽然痕量锌是生长所需的, 但锌的浓度应低于3mg/L。以避免假的耐药解释[9]。对于亚胺培南的影响是已知存在的, 并且可能适用于其他碳青霉烯类
达托霉素	培养基应补充到终浓度50mg/L 总Ca ²⁺ 。
叶酸途径抑制剂类 (例如磺胺类药和甲氧苄氨嘧啶)	培养基胸腺嘧啶脱氧核苷质量浓度应小于 0.03 mg/L, 这可通过检测粪肠球菌 WDCM 00087 与甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲恶唑药敏试验得出结果<0.5/9.5mg/L 来表明。
磷霉素	应只使用琼脂稀释法作为参考方法, 因为肉汤稀释法不可靠[4][6]
甘氨酸环素类 (例如替加环素)	痕量锰是生长所需的, 但浓度应低于8mg/L, 以避免对甘氨酸环素类的假耐药解释[8]。这应通过检测大肠埃希菌WDCM 00013和替加环素获得的MIC值在可接受的范围内来确定。
脂糖肽类 (例如达巴万星或奥利万星)	肉汤应添加0.002%v/v聚山梨醇-80。这也可适用于此类药物的其它药物
苯唑西林	当使用苯唑西林检测时, 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌检测需要在肉汤中加入终浓度20g/l NaCl。
喹诺酮类	人尿中喹诺酮活性研究数据表明当MH肉汤中镁浓度在8mM至10mM (100mg/L 至150mg/L) 时喹诺酮活性会下降[18]。其它数据表明35mg/L 至60mg/L Mg ²⁺ 引起几个菌属细菌的MIC增加[19][20]
四环素类	MH 肉汤添加至 50mg/L Ca ²⁺ 和 25mg/L Mg ²⁺ 已显示会对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和其它假单胞菌属的 MIC 增加 2-32 倍
全部	诸如链球菌和嗜血杆菌属等苛养微生物的测试需要添加生长补充剂 (例如血液或血液成分) [4][6]。

A.2 琼脂

表 2 脱水 MH 琼脂的注意事项

抗菌剂	说明
氨基糖甙类	培养基中应具有 Ca ²⁺ 和 Mg ²⁺ 阳离子, 其浓度应能使铜绿假单胞菌和氨基糖甙类抗菌剂给出的抑菌圈直径在预期范围内, 可通过庆大霉素和铜绿假单胞菌 WDCM 00025 抑菌圈直径在可接受的范围内来体现。
碳青霉烯类	培养基锌的浓度应低于3mg/L。这可通过检测铜绿假单胞菌WDCM 00025与亚胺培南获得的抑菌圈直径值在可接受的范围内来确定。对于亚胺培南过量锌浓度的影响是已知存在的, 并且可能适用于其他碳青霉烯类
达托霉素	不能使用纸片扩散法检测
叶酸途径抑制	培养基胸腺嘧啶脱氧核苷质量浓度应小于 0.03 mg/L, 这可通过透明度以及粪肠球菌

剂类（例如磺胺类药和甲氧苄氨嘧啶）	WDCM 00210 与甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲恶唑药敏试验得出的抑菌圈直径 ≥ 20 mm 或通过检测粪肠球菌 WDCM 00087 得到的抑菌圈直径在可接受范围来表明。
磷霉素	应只使用琼脂稀释法作为参考方法，因为肉汤稀释法不可靠[4][6]。测试琼脂应添加 25mg/L葡萄糖-6-磷酸
甘氨酰环素类（例如替加环素）	痕量锰是生长所需的，但浓度应低于8mg/L，以避免对甘氨环素类的假耐药解释[8]。这应通过检测大肠埃希菌WDCM 00013和替加环素获得的MIC值在可接受的范围内来确定。
喹诺酮类	数据表明镁浓度在35mg/L 至60mg/L时会引起抑菌圈直径下降，并会引起几个菌属细菌的MIC增加[19][20]。
四环素类	培养基中应具有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 阳离子，其浓度应能使铜绿假单胞菌和氨基糖甙类抗菌剂给出的抑菌圈直径在预期范围内，可通过庆大霉素和铜绿假单胞菌 WDCM 00025 抑菌圈直径在可接受的范围内来体现。
全部	诸如链球菌和嗜血杆菌属等苛养微生物的测试需要添加生长补充剂（例如血液或血液成分）[3][5]。

附录 B

(资料性附录)

质控菌株制备

B.1 贮存菌株

从认可的国家保藏中心菌株获取的冻干菌株制备贮存菌株。应按保藏中心规定的步骤复溶菌株，并以对遗传变异体的选择性最小化方式来保藏。如可用，来自不同保藏中心的相同微生物的不同编号如下所列。如下为本方案的目的所需菌株。

金黄色葡萄球菌	WDCMa 00131; ATCC@b 29213; NCTC@c 12973; CIPd 103429; DSMe 2569; CCUGf 15915; CECTg 794
金黄色葡萄球菌	WDCMa 00034; ATCC@b 25923; NCTC@c 12981; CIPd 76.25; DSMe 1104; CCUGf 17621; CECTg 435
金黄色葡萄球菌	WDCMa 00211; ATCC@b 43300
或	
金黄色葡萄球菌	WDCMa 00212; NCTC@c 12493
大肠埃希菌	WDCMa 00013; ATCC@b 25922; NCTC@c 12241; CIPd 76.24; DSMe 1103; CCUGf 17620; CECTg 434
铜绿假单胞菌	WDCMa 00025; ATCC@b 27853; NCTC@c 12903; CIPd 76.110; DSMe 1117; CCUGf 17619; CECTg 108
粪肠球菌	WDCMa 00087; ATCC@b 29212; NCTC@c 12697; CIPd 103214; DSMe 2570; CCUGf 9997; CECTg 795
或	
粪肠球菌	WDCMa 00210; ATCC@b 33186
<p>a WDCM, 世界微生物数据中心, www.wdcm.org.</p> <p>b ATCC 美国菌种保藏中心供应产品的商标, www.atcc.org. 便于此标准使用者的方便给出这个信息, 不构成 ISO 对该产品名称的背书。可使用如上所列等同产品。</p> <p>c NCTC 是国家典型菌种保藏中心的产品商标, 为英格兰公共卫生的菌种保藏, www.hpacultures.org.uk. 便于此标准使用者的方便给出这个信息, 不构成 ISO 对该产品名称的背书。可使用如上所列等同产品。</p> <p>d CIP, 巴斯德研究院菌种中心, www.pasteur.fr.</p> <p>e DSMZ, 德国微生物和细胞培养保藏中心 (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen), www.dsmz.de.</p> <p>f CCUG, 菌种中心, 哥德堡大学 (Culture Collection, University of Göteborg) www.ccug.se.</p> <p>g CECT, 西班牙典型菌种保藏中心, www.cect.org</p>	

B.1.1 初始贮存菌株制备

用灭菌接种环或拭子, 对表 B.1 所列每个质控微生物, 接种一块或更多非选择性营养琼脂平板 (取决于要制备的冷冻管数量)。每块平板分区划线以获取独立菌落。按 ISO 20776-1.将平板在周围空气温度 34°C-37°C 下孵育 18h-24h。

B.1.2 制备冷冻贮存菌株

孵育后, 检查纯度并从每组平板收获所有生长物, 然后混悬于含 15%w/v 甘油大豆酪蛋白消化物肉汤 [胰酶大豆肉汤 (TSB)] 制备成均一浊度的悬液。

附录 C

(资料性附录)

推荐的生产批检测数据表

C.1 推荐的 dMHB 生产批检测数据表

日期:

生产批号:

批产量:

颜色描述:

透明度:

pH:

抗菌剂	可接受范围 mg/L	MIC mg/L		
		1	2	3
铜绿假单胞菌 WDCM 00025				
环丙沙星	0.25-1			
庆大霉素	0.5-2			
亚胺培南	1-4			
哌拉西林-他唑巴坦	1/4-8/4			
大肠埃希菌 WDCM 00013				
氨苄西林	2-8			
头孢噻肟	0.03-0.12			
替加环素	0.03-0.25			
金黄色葡萄球菌 WDCM 00131				
克林霉素	0.06-0.25			
红霉素	0.25-1			
苯唑西林	0.12-0.5			
四环素	0.12-1			
万古霉素	0.5-2			
粪肠球菌 WDCM 00087				
氨苄西林	0, 5-2			
甲氧苄氨嘧啶-磺 胺甲基异恶唑	≤0.5/9.5			
万古霉素	1-4			
金黄色葡萄球菌 WDCM 00211				
苯唑西林	4-32			

C.2 推荐的 dMHA 生产批检测数据表

日期:

生产批号:

批产量：
 颜色描述：
 透明度：
 琼脂强度：
 pH：

抗菌剂	纸片含量 µg	可接受范围 mm	抑菌圈直径，最近整数 mm		
			1	2	3
金黄色葡萄球菌 WDCM 00034					
阿莫西林-克拉维酸	20/10	28-36			
氨苄西林-舒巴坦	10/10	29-37			
头孢西丁	30	23-29			
环丙沙星	5	22-30			
红霉素	15	22-30			
庆大霉素	10	19-27			
利奈唑胺	30	25-32			
青霉素	10 单位	26-37			
四环素	30	24-30			
金黄色葡萄球菌 WDCM 00131					
青霉素（苜青霉素）	1 单位	12-18			
头孢西丁	30	24-30			
环丙沙星	5	21-27			
红霉素	15	23-29			
庆大霉素	10	19-25			
利奈唑胺	10	21-27			
四环素	30	23-31			
粪肠球菌 WDCM 00087					
氨苄西林	2	15-21			
亚胺培南	10	24-30			
利奈唑胺	10	19-25			
硝基呋喃妥因	100	18-24			
甲氧苄氨嘧啶	5	24-32			
甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑	1.25-23.75	26-34			
万古霉素	5	10-16			
大肠埃希菌 WDCM 00013					
阿莫西林-克拉维酸	20/10	18-24			
氨苄西林	10	15-22			
头孢噻肟	30 或 5	29-35 25-31			
氯霉素	30	21-27			
环丙沙星	5	30-40			
庆大霉素	10	19-26			
磺胺异恶唑	250 或 300	15-23			
四环素	30	18-25			
替加环素	15	20-27			
甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑	1.25/23.75	23-29			
铜绿假单胞菌 WDCM 00025					
氨基曲南	30	23-29			

头孢他啶	10 或 30	21-27 22-29			
环丙沙星	5	25-33			
庆大霉素	10	17-23			
亚胺培南	10	20-28			
哌拉西林-他唑巴坦	100/10 或 30/6	25-33 23-29			
妥布霉素	10	20-26			
粪肠球菌 WDCM 00210					
甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异恶唑	1.25/23.75	≥20			
金黄色葡萄球菌 WDCM 00211					
头孢西丁	30	≤21			
金黄色葡萄球菌 WDCM 00212					
头孢西丁	30	14-29			

范围会受到定期更新。范围更新可检查从 CLSI 获取的 M100 最新版本。CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087, USA[14] 或检查 EUCAST 质控表最新版本, 可从 EUCAST 网址获取 http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/qc_tables/.

附录 D

（资料性附录）

标签声明

D.1 脱水 MH 肉汤

如果所有微生物抗菌剂组合所有性能标准在可接受限值内并且所有物理和化学指标符合，制造商可标示该生产批（批号）的 dMHB 符合本标准（ISO 16782）抗菌剂敏感性试验规定的性能标准要求。

对于标准生产批的 dMHB，由其脱水产品制备的肉汤应含不超过 25 mg/L 的 Ca^{2+} 、12.5 mg/L 的 Mg^{2+} ，并且锌离子的浓度应低于 3mg/L。dMHB 的测试证书应能被用户获取，给出该批次脱水培养基中这些离子的浓度并标示出为达到 YY/T 0688.1/ISO 20776-1 规定的浓度，是否需要补充钙和/或镁。

D.2 脱水 MH 琼脂

如果所有微生物抗菌剂组合所有性能标准在可接受限值内并且所有物理和化学指标符合，制造商可标示该生产批（批号）的 dMHA 符合本标准（ISO 16782）抗菌剂敏感性试验规定的性能标准要求。

D.3 标签声明

对可接受批次，如下声明可加在产品标签或使用说明：

“本批次脱水 MH 琼脂、肉汤已按照 ISO 16782 检测并符合 ISO 16782 规定的质量控制标准”
数据应保存于文件并且结果可供任何人请求获取。

参考文献

- [1] NCCLS. Evaluation of Lots of Dehydrated Mueller-Hinton Broth for Antimicrobial Susceptibility Testing; Proposed Guideline. NCCLS document M32-P. Wayne, PA: NCCLS; 2001)
- [2] CLSI. Protocols for Evaluating Dehydrated Mueller-Hinton Agar; Approved Standard—Second edition. CLSI document M6-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006)
- [3] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2012), Disk diffusion method. (for latest version, see http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)
- [4] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution, EUCAST Definitive Document E.Def 3.1. 2000, 9 pp. 509-515
- [5] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015
- [6] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015
- [7] Mueller J.H., & Hinton J. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1941, 48 p. 330
- [8] Veenemans J., Mouton J.W., Kluytmans J.A.J.W., Donnelly R. Verhulst, C., van Keulen, PHJ. Effect of manganese in test media on in vitro susceptibility of Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii to tigecycline. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 pp. 3077 - 3079
- [9] Daly J.S., Dodge R.A., Glew R.H., Soja D.T., DeLuca B.A., Hebert S. Effect of zinc concentration in Mueller-Hinton agar on susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to imipenem. J. Clin. Microbiol. 1997, 35 pp. 1027 - 1029
- [10] Morrison G.H. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 1969;(14):28A. ©CRC Press, Boca Raton, Florida
- [11] Fuchs P.C., Barry A.L., Brown S.D. Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on in vitro tests. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2000, 38 pp. 51 - 58
- [12] Fass R.J., & Barnishan J. Effect of divalent cation concentrations on the antibiotic susceptibilities of non-fermenters other than Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 1979, 16 pp. 434 - 438
- [13] Swenson J.M., & Thornsberry C. Susceptibility Tests for Sulfamethoxazole-Trimethoprim by a

Broth Microdilution Procedure. *Curr. Microbiol.* 1978, 1 pp. 89 – 193

[14] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI M100S. Wayne,

PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.

[15] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.”

1) Upon publication of ISO 16782, CLSI document M6-A2 and M32-P will be discontinued and no longer available.

[16] Barry A.L., Miller G.H., Thornsberry C. Influence of cation supplements on activity of netilmicin against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987, 31 pp. 1514 – 1518

[17] Barry A.L., Reller L.B., Miller G.H. Revision of standards for adjusting the cation content of Mueller-Hinton broth for testing susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30 pp. 585 – 589

[18] Eliopoulos G.M., & Eliopoulos C.T. Quinolone antimicrobial agents: Activity in vitro. In Wolfson JS, Hooper DC, eds. *Quinolone Antimicrobial Agents*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1989:3:35-70

[19] Auckenthaler R., Michea-Hamzhepour M., Pechere J.C. In vitro activity of newer quinolones against aerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1986, 17 pp. 29 – 39

[20] Blaser J., Dudley M.N., Gilbert D., Zinner S.H. Influence of medium and method on the in vitro susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria to ciprofloxacin and enoxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986, 29 pp. 927 – 929