

# 团 体 标 准

T/JPMA 032—2025

## 四类人源肠道耐药菌检测技术规范

Technical specification for detection of four categories of human intestinal drug-resistant bacteria



2025 - 06 - 24 发布

2025 - 07 - 01 实施

江苏省预防医学会

发布

## 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
5 培养基和试剂 .....	2
6 质控菌株 .....	2
7 检测程序 .....	2
8 操作步骤 .....	3
9 生物安全 .....	4
附录 A（规范性） 培养基和试剂 .....	6



## 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。

本文件由无锡市疾病预防控制中心提出。

本文件由江苏省预防医学会归口。

本文件起草单位：无锡市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、江苏省疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：管红霞、齐倩倩、马丹、王雅静、周琪、李娟、袁敏、谈忠鸣、钱慧敏、肖勇、沙丹、樊玲芳、冯微宏、曹文婷、韩毅。



# 四类人源肠道耐药菌检测技术规范

## 1 范围

本文件规定了人源肠道中产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌目细菌、碳青霉烯类耐药菌、多黏菌素耐药菌和耐万古霉素肠球菌检测的设备和材料、培养基和试剂、标本采集、保存和转运、菌株分离鉴定、药敏试验、质量控制、结果判定与报告、生物安全的要求。

本文件适用于人源肠道中产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌目细菌、碳青霉烯类耐药菌、多黏菌素耐药菌和耐万古霉素肠球菌的检测。

## 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 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS/T 639 抗菌药物敏感性试验的技术要求

CLSI M100 抗微生物药物敏感性试验执行标准

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**抗微生物药物敏感性试验 antimicrobial susceptibility testing, AST**

简称药敏试验。检测微生物（本文件特指细菌）对抗微生物药物（本文件特指抗菌药物）的体外敏感性的微生物学试验。

### 3.2

**最低抑菌浓度 Minimal inhibitory concentration, MIC**

在琼脂或肉汤稀释法药敏试验中能抑制肉眼可见的细菌生长的最低抗菌药物浓度。

### 3.3

**产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌目细菌 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacterales, ESBL-E**

一类产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶，对三代头孢菌素（如头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松）及单环 $\beta$ -内酰胺类（如氨曲南）耐药的革兰阴性杆菌。其酶活性可被 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂（如克拉维酸）所抑制。

### 3.4

**碳青霉烯类耐药菌 carbapenem-resistant organism, CRO**

通过药敏试验，对亚胺培南、美罗培南、厄他培南或多立培南任何一种碳青霉烯类抗生素表现为耐药或产生碳青霉烯酶的细菌。主要包括碳青霉烯耐药肠杆菌、碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌和碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌。

### 3.5

### 多黏菌素耐药菌 *polymyxin-resistant bacteria, PRB*

通过药敏试验,对多黏菌素类药物(黏菌素或多黏菌素B)表现为耐药的细菌。

## 3.6

### 耐万古霉素肠球菌 *vancomycin-resistant enterococcus, VRE*

通过药敏试验,对万古霉素表现为耐药的肠球菌,主要指具有重要临床意义的粪肠球菌和屎肠球菌。

## 4 设备和材料

- 4.1 二级生物安全柜。
- 4.2 高压灭菌器。
- 4.3 冰箱: 2 °C~8 °C、-80 °C。
- 4.4 恒温培养箱: 36 °C±1 °C。
- 4.5 涡旋振荡器。
- 4.6 电子天平: 感量 0.01 g、0.001 g。
- 4.7 微量移液器: 0.5 μL~10 μL、1 μL~100 μL、100 μL~1 000 μL。
- 4.8 pH 计。
- 4.9 微生物生化鉴定系统或微生物质谱鉴定仪。
- 4.10 比浊仪
- 4.11 无菌锥形瓶: 容量 1000 mL、500 mL。
- 4.12 无菌培养皿: 直径 90 mm。
- 4.13 无菌接种环: 1 μL、10 μL。
- 4.14 无菌旋盖管: 15 mL。
- 4.15 1.5 mL 离心管。
- 4.16 微孔滤膜: 0.22 μm。

## 5 培养基和试剂

- 5.1 实验用水: 符合 GB 4789.28 的规定。
- 5.2 生理盐水: 符合附录 A.1 的规定。
- 5.3 Cary-Blair 运送培养基: 符合附录 A.2 的规定。
- 5.4 ESBL 筛查培养基: 符合附录 A.3 的规定。
- 5.5 CRO 筛查培养基: 符合附录 A.4 的规定。
- 5.6 PRB 筛查培养基: 符合附录 A.5 的规定。
- 5.7 VRE 筛查培养基: 符合附录 A.6 的规定。
- 5.8 脑心浸液琼脂: 符合附录 A.7 的规定。
- 5.9 阳离子调节 Mueller-Hinton 肉汤 (CAMHB): 符合附录 A.8 的规定。
- 5.10 0.5 麦氏单位 (McFarland) 标准比浊液。
- 5.11 商品化药敏试验板。

## 6 质控菌株

- 6.1 大肠埃希菌 ATCC 25922。
- 6.2 铜绿假单胞菌 ATCC 27853。
- 6.3 粪肠球菌 ATCC 29212。

## 7 检测程序

ESBL-E、CRO、PRB和VRE检测程序见图1。

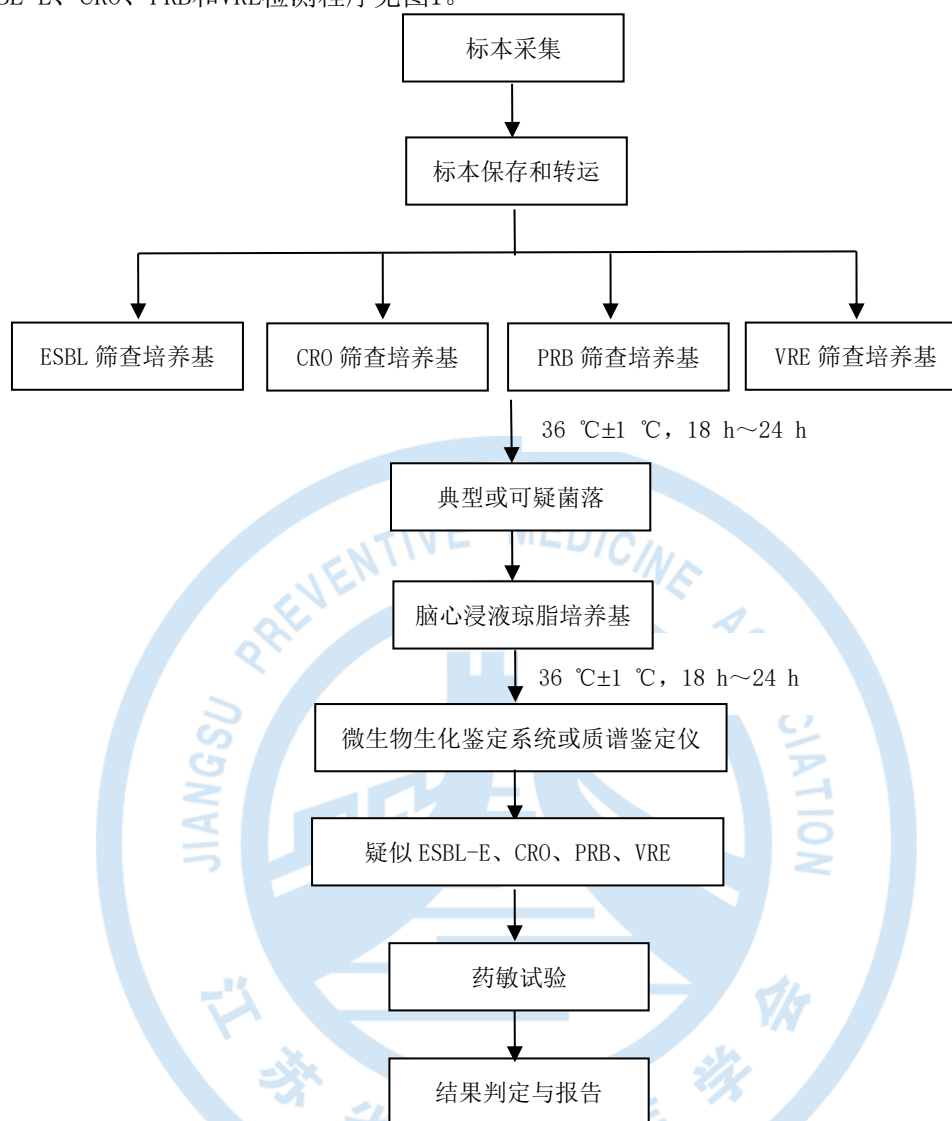


图1 ESBL-E、CRO、PRB 和 VRE 检测程序

## 8 操作步骤

### 8.1 标本采集

#### 8.1.1 粪便采集

采集5 g左右新鲜粪便标本置于无菌螺帽容器中，不应混入尿液及其它异物，采集过程应无菌操作。

#### 8.1.2 肛拭子采集

无菌棉拭子用生理盐水湿润，轻轻地插入肛门括约肌上方（约3 cm~5 cm），旋转3圈，取出，置于Cary-Blair运送培养基中，拭子上宜可见粪便。

### 8.2 保存和转运

采集的标本于冷藏（2 °C~8 °C）条件下运送到实验室检测。如不能立即检测，标本在2 °C~8 °C存放不得超过48 h。

### 8.3 菌株分离

8.3.1 粪便标本用无菌接种环挑取黄豆粒大小转移至含有 1 mL 生理盐水的管中，盖紧管盖，于涡旋振荡器上振荡 30 s，充分混匀标本。肛拭子采集管于涡旋振荡器上振荡 30 s，充分混匀标本。

8.3.2 用接种环挑取混匀的液体分别划线接种于 ESBL 筛查培养基、CRO 筛查培养基、PRB 筛查培养基和 VRE 筛查培养基，于 36 °C ± 1 °C 分别培养 18 h~24 h。

8.3.3 观察每种筛查培养基上生长的菌落，是否符合表 1~表 4 的菌落特征。

8.3.4 分别挑取每种筛查培养基上典型或可疑菌落 3 个以上，接种脑心浸液琼脂平板纯化，于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。

表1 可疑 ESBL-E 菌落特征

细菌种属	菌落特征
大肠埃希菌	紫红色
克雷伯菌属、肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、沙雷氏菌属	金属蓝色
变形杆菌属	棕色晕环

表2 可疑 CRO 菌落特征

细菌种属	菌落特征
发酵乳糖细菌（如大肠埃希菌、克雷伯菌属、肠杆菌属）	黄色
不发酵乳糖细菌（如沙门菌属、变形杆菌属、假单胞菌属）	蓝绿色

表3 可疑 PRB 菌落特征

细菌种属	菌落特征
大肠埃希菌	蓝绿色
其它革兰氏阴性菌	无色

表4 可疑 VRE 菌落特征

细菌种属	菌落特征
肠球菌属	菌落为黄色（或黄白色、褐色），菌落周围培养基为黑褐色

### 8.4 鉴定

取纯培养的菌落进行鉴定，可选择微生物生化鉴定系统或微生物质谱鉴定仪。

### 8.5 药敏试验

采用微量肉汤稀释法对初步判断为 ESBL-E、CRO、PRB 和 VRE 的菌落进行药敏试验，参照 WS/T 639 执行。如选择商品化药敏试验板，参照说明书进行操作。

### 8.6 质量控制

每次药敏试验应用质控菌株与待测菌株同时检测，只有质控菌株的 MIC 值在允许范围内（参照 CLSI M100 执行），测试菌株的结果才可以报告。

### 8.7 结果判定与报告

记录 MIC 值，并根据 CLSI M100 的折点标准判定其敏感、中介或耐药。如果该种属菌株对某些药物没有折点判定标准，则只记录 MIC 值。根据药敏结果，报告标本中检出或未检出 ESBL-E、CRO、PRB 和 VRE。

## 9 生物安全

实验室设施设备、人员防护、实验操作、废弃物处理应符合GB 19489的要求。



## 附录 A (规范性) 培养基和试剂

### A.1 生理盐水

#### A.1.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1000 mL

#### A.1.2 制法

将8.5 g氯化钠溶于1000 mL蒸馏水中，121 °C高压灭菌15 min。

### A.2 Cary-Blair 运送培养基

#### A.2.1 成分

硫乙醇酸钠	1.5 g
磷酸氢二钠	1.1 g
氯化钠	5.0 g
氯化钙	0.09 g
蒸馏水	1000 mL

#### A.2.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅匀加热溶解后分装到试管，每管2 mL，121 °C高压灭菌15 min。

### A.3 ESBL 筛查培养基

#### A.3.1 尿道菌群定位显色培养基<sup>1)</sup>

##### A.3.1.1 成分

酵母粉	5.0 g
蛋白胨	12.0 g
色素	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

##### A.3.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅匀后加热溶解，必要时调节pH，121 °C高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25 °C的pH 为7.0±0.2。

#### A.3.2 头孢曲松贮存液

##### A.3.2.1 成分

头孢曲松	适量
蒸馏水	10 mL

##### A.3.2.2 制法

1) 尿道菌群定位显色培养基是由CHROMagar提供的产品。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果，那么可以使用这些等效产品。

称取适量头孢曲松溶解于10 mL蒸馏水中，用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，配制成4 mg/mL的贮存液，分装至无菌小管，每管1 mL，置于-80 °C保存，时限为6个月。

注：实际称取抗菌药物粉末重量 (mg) = 实际配制抗菌药物贮存液的体积 (mL) × 贮存液浓度 (mg/mL) / 抗菌药物的纯度。下同。

### A. 3.3 ESBL筛查培养基的配制

在3.1制备的已高压灭菌完毕且温度在40 °C~50 °C的尿道菌群定位显色培养基中加入头孢曲松贮存液1 mL，使头孢曲松终浓度为4 μg/mL。充分混匀后，倾注于90 mm的无菌培养皿，室温放置冷却至凝固。当日使用或将平皿装入密闭塑料袋中，置于2 °C~8 °C保存，时限为5 d。

## A. 4 CR0 筛查培养基

### A. 4.1 石蕊乳糖琼脂 (Drigalski Lactose Agar)

#### A. 4.1.1 成分

牛肉浸粉	3.0 g
酵母提取物	3.0 g
蛋白胨	15.0 g
硫代硫酸钠	1.0 g
乳糖	15.0 g
结晶紫	0.005 g
溴酚蓝	0.08 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1000 mL

#### A. 4.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅匀后加热溶解，必要时调节pH，121 °C高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25 °C的pH为7.4±0.2。

### A. 4.2 厄他培南贮存液

#### A. 4.2.1 磷酸盐缓冲液

##### A. 4.2.1.1 成分

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.44 g
磷酸二氢钾	0.24 g
蒸馏水	1000 mL

##### A. 4.2.1.2 制法

将各成分加入1000 mL蒸馏水中，用1 mol/L盐酸或氢氧化钠溶液调节pH至7.2，配制成0.01 mol/L的溶液，分装至无菌小管，121 °C高压灭菌15 min。

#### A. 4.2.2 厄他培南贮存液

##### A. 4.2.2.1 成分

厄他培南	适量
磷酸盐缓冲液	10 mL

##### A. 4.2.2.2 制法

称取适量厄他培南溶解于10 mL磷酸盐缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.2)，用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，配制成10 mg/mL的贮存液，分装至无菌小管，每管100 μL，置于-80 °C保存，时限为6个月。

### A. 4.3 氯唑西林贮存液

#### A. 4.3.1 成分

氯唑西林	适量
蒸馏水	50 mL

#### A. 4.3.2 制法

称取适量氯唑西林溶解于50 mL蒸馏水中，用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，配制成50 mg/mL的贮存液，分装至无菌小管，每管5 mL，置于-80 °C保存，时限为6个月。

### A. 4.4 ZnSO<sub>4</sub>溶液

#### A. 4.4.1 成分

ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.248 g
蒸馏水	10 mL

#### A. 4.4.2 制法

称取1.248 g ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O溶解于10 mL蒸馏水，用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，配制成70 mg/mL的贮存液，置于2 °C~8 °C保存。

### A. 4.5 CR0筛查培养基的配制

在4.1制备的已高压灭菌完毕且温度在40 °C~50 °C的石蕊糖琼脂中加入厄他培南贮存液100 μL，使厄他培南终浓度为1 μg/mL；加入氯唑西林贮存液5 mL，使氯唑西林终浓度为250 μg/mL；加入ZnSO<sub>4</sub>溶液1 mL，使ZnSO<sub>4</sub>终浓度为70 μg/mL。充分混匀后，倾注于90 mm的无菌培养皿，室温放置冷却至凝固。当日使用或将平皿装入密闭塑料袋中，置于2 °C~8 °C保存，时限为5 d。

### A. 5 PRB 筛查培养基

#### A. 5.1 大肠杆菌显色培养基<sup>2)</sup>

##### A. 5.1.1 成分

蛋白胨和酵母粉	8.3 g
氯化钠	5.0 g
色素	9.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1000 mL

##### A. 5.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅匀后加热溶解，必要时调节pH，加热至100 °C，不停搅拌，使其完全溶解。培养基在25 °C的pH 为7.5±0.2。

#### A. 5.2 多黏菌素E贮存液

##### A. 5.2.1 成分

多粘菌素E	适量
蒸馏水	10 mL

##### A. 5.2.2 制法

2) 大肠杆菌显色培养基是由CHROMagar提供的产品。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果，那么可以使用这些等效产品。

称取适量多黏菌素E溶解于10 mL蒸馏水中，用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，配制成4 mg/mL的贮存液，分装至无菌小管，每管1 mL，置于-80 °C保存，时限为6个月。

### A. 5.3 PRB筛查培养基的配制

在5.1制备的已灭菌完毕且温度在40 °C~50 °C的大肠杆菌显色培养基中加入多黏菌素E贮存液1 mL，使多黏菌素E终浓度为4 μg/mL。充分混匀后，倾注于90 mm的无菌培养皿，室温放置冷却至凝固。当日使用或将平皿装入密闭塑料袋中，置于2 °C~8 °C保存，时限为5 d。

## A. 6 VRE 筛查培养基

### A. 6.1 肠球菌琼脂

#### A. 6.1.1 成分

胰蛋白胨	17.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
酵母浸粉	5.0 g
牛胆粉	10.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸钠	1.0 g
七叶苷	1.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
叠氮化钠	0.25 g
琼脂	13.5 g
蒸馏水	1000 mL

#### A. 6.1.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅匀后加热溶解，必要时调节pH，121 °C高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25 °C的pH为7.1±0.2。

### A. 6.2 万古霉素贮存液

#### A. 6.2.1 成分

万古霉素	适量
蒸馏水	10 mL

#### A. 6.2.2 制法

称取适量万古霉素溶解于10 mL蒸馏水中，用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌，配制成8 mg/mL的贮存液，分装至无菌小管，每管1 mL，置于-80 °C保存，时限为6个月。

### A. 6.3 VRE筛查培养基的配制

在6.1制备的已高压灭菌完毕且温度在40 °C~50 °C的肠球菌琼脂中加入万古霉素贮存液1 mL，使万古霉素终浓度为8 μg/mL。充分混匀后，倾注于90 mm的无菌培养皿，室温放置冷却至凝固。当日使用或将平皿装入密闭塑料袋中，置于2 °C~8 °C保存，时限为5 d。

## A. 7 脑心浸液琼脂

### A. 7.1 成分

牛脑浸粉	4.0 g
牛心浸粉	4.0 g
蛋白胨	5.0 g
酪蛋白胨	16.0 g

氯化钠	5.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
琼脂	13.5 g
蒸馏水	1000 mL

#### A. 7.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅匀后加热溶解，必要时调节pH，121 °C高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25 °C的pH为7.4±0.2。

#### A. 8 阳离子调节 Mueller-Hinton 肉汤 (CAMHB)

##### A. 8.1 成分

牛肉浸粉	3.0 g
可溶性淀粉	1.5 g
酸水解酪蛋白	17.5 g
氯化钙	0.05 g
蒸馏水	1000 mL

##### A. 8.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，搅匀后加热溶解，必要时调节pH，121 °C高压灭菌15 min。灭菌后的培养基在25 °C的pH为7.3±0.1。

