

中华人民共和国农业行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

动物源细菌耐药性监测实验室菌株管理与
使用技术规范

Technical specifications for strain management and use in laboratory of antimicrobial
resistance surveillance of animal-derived bacteria

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国农业农村部

发布

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国兽药残留与耐药性控制专家委员会归口。

本文件起草单位：中国兽医药品监察所、上海市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：张纯萍、孙冰清、程敏、商军、王鹤佳、姜芹、赵琪、张好、崔明全、曹莹、李霆、张亦菲、方雅红、吴雨珊、蔡昱婷。

动物源细菌耐药性监测实验室菌株管理与使用技术规范

1 范围

本文件规定了动物源细菌耐药性监测实验室（以下简称“实验室”）菌株管理与使用的总体要求，质控菌株的采购验收，质控储备菌株和质控工作菌株的制备，质控储备菌株、质控工作菌株及分离菌株的命名、保存、使用、菌株台账以及实验室生物安全要求。

本文件适用于动物源细菌耐药性监测实验室菌株的管理与使用。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 19489 实验室生物安全通用要求
- NY/T 4142 动物源细菌抗菌药物敏感性测试技术规程 微量肉汤稀释法
- NY/T 4143 动物源细菌抗菌药物敏感性测试技术规程 琼脂稀释法
- NY/T 4144 动物源细菌抗菌药物敏感性测试技术规程 纸片扩散法
- NY/T 4145 动物源金黄色葡萄球菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4146 动物源沙门氏菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4147 动物源肠球菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4148 动物源弯曲杆菌分离与鉴定技术规程
- NY/T 4149 动物源大肠埃希菌分离与鉴定技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

质控菌株 quality control strain

源自被认可的保藏机构，生物性状明确，其传代培养物用于分离菌株的鉴定及药物敏感性测试等试验的对照菌株。

注：代次为0代。

3.2

质控储备菌株 quality controlled reserve strain

由质控菌株（3.1）经过1代~2代转接培养后获得的子代菌株。

3.3

质控工作菌株 quality control working strain

由质控储备菌株（3.2）转接培养后获得的不超过5代的子代菌株。

3.4

分离菌株 isolated strain

来自动物源样品，经分离、纯化、鉴定，属种明确的菌株。

注：动物源样品见NY/T 4141-2022。

4 总体要求

4.1 实验室菌株管理与使用必须遵守《动物病原微生物菌（毒）种保藏管理办法》《动物病原微生物分类名录》《人间传染的病原微生物目录》的规定。

4.2 实验室应配备2名及以上具有微生物相关专业背景或培训经历的实验人员。

4.3 实验室菌株的使用与管理应有文件化的管理程序，涵盖菌株采购、验收、保管、领用、使用、保存、销毁等方面，确保菌株背景清楚和安全使用。

4.4 实验室应保存开展动物源细菌耐药性监测所需数量及种类的质控菌株。

4.5 菌株应按“双人双锁”等措施进行管理。

5 菌株管理

5.1 质控菌株采购验收

采购质控菌株时，应确定其名称和代次。实验室在接收质控菌株时，应检查其外观的完整性，获取质控菌株的质量证明材料或检验报告单，并进行验收和记录。验收记录包括菌株来源信息（购置单位、购入时间、有效期）、菌株基础信息（名称、保藏编号、代次、数量、批号）、菌株检查信息（培养特性、纯度、革兰染色等鉴定结果）等内容。验收记录的内容应符合质控菌株的质量证明材料或检验报告单要求。常用质控菌株见附录A。

5.2 质控储备菌株和质控工作菌株的制备

5.2.1 质控储备菌株

在无菌环境下，开启安剖瓶或西林瓶。按使用说明书要求，加适宜溶剂适量，轻轻震荡溶解。取溶解物划线接种适宜培养基，在适宜条件下培养。验证菌株的纯度及特性，按6.2、6.3执行。菌株传代常用培养基及培养条件见附录B。实验室也可使用其他经验证的培养基或培养条件进行传代培养。

5.2.2 质控工作菌株

将质控储备菌株（5.2.1）接种适宜培养基，在适宜条件下培养。验证菌株的纯度及特性，按6.2、6.3执行。菌株传代常用培养基及培养条件见附录B。实验室也可使用其他经验证的培养基或培养条件进行传代培养。

5.3 菌株命名

5.3.1 质控储备菌株和质控工作菌株

质控储备菌株和质控工作菌株应按照“细菌缩写—菌株保藏编号—代次—保存年月—菌株序列号”的顺序命名。细菌缩写一般以拉丁文首字母组合表示，首字母大写，其余小写。缩写出现重复，以属名前两位和种名首字母组合表示。常见细菌缩写见附录A。

示例：Ec-ATCC 25922-F2-2301-0001，其中：Ec（大肠埃希菌）-ATCC 25922（菌株保藏编号）-F2（代次）-23（年）01（月）-0001（菌株序列号）。

5.3.2 分离菌株

分离菌株应按照“细菌属种缩写—采样地—养殖场（或屠宰场）—动物种类缩写—采样年月—菌株序列号”的顺序命名。动物种类一般以动物英文名称首字母为缩写，若出现重复，则以英文名称前两个字母作为缩写，首字母大写，后一位小写。

常用动物种类缩写如下：

- “P”为猪（pig）；
- “B”为牛（bovine）；
- “S”为羊（sheep）；
- “C”为鸡（chickens）；
- “D”为鸭（duck）；
- “G”为鹅（goose）；
- “Do”为犬（dog）；
- “Ca”为猫（cat）。

示例：Ec-GDGZ-LF-B-2301-0001，其中：Ec（大肠埃希菌）-GD（广东）GZ（广州）-LF（绿丰养殖场）-B（牛）-23（年）01（月）-0001（菌株序列号）。

5.4 菌株保存

5.4.1 通则

根据菌株性质选择适宜保存方法和有效保存时间，定期进行传代活化。质控菌株、质控储备菌株和质控工作菌株与分离菌株宜分别保存。具有长期保存价值的分离菌株应送至具有资质的保藏机构保存。

示例：具有长期保存价值的分离菌株，例如：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、耐万古霉素金黄色葡萄球菌（VRSA）、耐万古霉素肠球菌（VRE）、耐美罗培南肠杆菌科/属细菌（CRE）等。

5.4.2 保存方法

5.4.2.1 质控菌株

新购买的质控菌株应按保藏机构的保存要求进行保存，备用。

5.4.2.2 质控储备菌株

质控储备菌株宜采用甘油、瓷珠或冻干保存法，同时保存多管。操作步骤及要求按附录C执行。

5.4.2.3 质控工作菌株

质控工作菌株宜采用斜面保存法，同时保存多管。操作步骤及要求按附录 C 执行。

5.4.2.4 分离菌株

分离菌株宜采用斜面、甘油、瓷珠或冻干保存法，根据需要可保存多管。操作步骤及要求按附录 C 执行。

5.5 菌株台账

应建立菌株台账，条件允许的实验室宜设置电子台账。台账内容包括但不限于菌株来源、菌株编号、菌株代次、保存条件、保存位置、取出、使用及处理销毁情况。菌株台账的保存时间宜与菌株的实际保存期限一致。

6 菌株使用

6.1 菌株复苏

在无菌环境下，取斜面菌、甘油菌、瓷珠菌或冻干菌溶解物接种于适宜培养基，在适宜的条件下培养，常用培养基配制见附录D。

注：冻干菌溶解物是指在无菌环境下，将适宜溶剂加入冻干菌株后得到的溶解物。

6.2 菌株纯度检查

取新鲜培养物观察，同一平板上菌落的大小、形状、颜色、质地、光泽等应相似；出现两种及以上的菌落形态，应再次纯化、鉴定。

6.3 细菌鉴定

选择对数生长期的菌株用于细菌鉴定，鉴定结果应符合NY/T 4145、NY/T 4146、NY/T 4147、NY/T 4148、NY/T 4149等要求或Bergey's Manual of Systematic Bacteriology（伯杰氏系统细菌学手册）的相关要求。

6.4 抗菌药物敏感性测试

选择对数生长期的菌株按NY/T 4142、NY/T 4143、NY/T 4144开展药物敏感性测试，或采用其他标准或方法开展试验。

6.5 其他

菌株可用于兽用抗菌药物流行病学界值、药动学/药效学界值、临床界值制定，或用于耐药机制研究、耐药性监测工作的溯源与回顾等，使用时满足相关标准或方法的要求。

7 生物安全

实验室设施设备、人员防护及实验的安全操作、实验废弃物和菌株的处理销毁应符合GB 19489的规定。

AA

附 录 A
(资料性)
常用质控菌株

常用质控菌株中文名称、属种名称、缩写及菌株保藏编号见表 A.1。

表 A.1 常用质控菌株

中文名称	属种名称	缩写	菌株保藏编号
大肠埃希菌	<i>Escherichia coli</i>	Ec	ATCC 25922、ATCC 35218、CMCC (B) 44102、CVCC 1570 等
粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ef	ATCC 29212 等
屎肠球菌	<i>Enterococcus faecium</i>	Enf	ACCC 19434 等
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sa	ATCC 29213、CMCC (B) 26003 等
空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	Cj	ATCC 33560 等
结肠弯曲菌	<i>Campylobacter coli</i>	Cc	ATCC 43478 等
肠炎沙门菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	Se	ATCC 14028、CMCC (B) 50335 等
副猪嗜血杆菌	<i>Haemophilus parasuis</i>	Hp	ATCC 19417、CVCC 3721、CVCC 3894 等
产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	Cp	CVCC 60101 等
伪结核棒状杆菌	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Cop	ATCC 19410、CVCC 1186 等
<p>注1：常用质控菌株包括但不限于以上几种。</p> <p>注2：表中菌株保藏机构缩略语如下：</p> <p>a) ACCC：中国农业微生物菌种保藏管理中心（Agricultural Culture Collection of China）；</p> <p>b) CVCC：国家兽医微生物（毒）种保藏中心（National Center for Veterinary Culture Collection）；</p> <p>c) CMCC：中国医学细菌保藏管理中心（National Center for Medical Culture Collections）；</p> <p>d) ATCC：美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection）。</p>			

附录 B

(资料性)

菌株传代培养常用培养基及培养条件

菌株传代培养常用培养基及培养条件见表 B.1。

表 B.1 菌株传代培养常用培养基及培养条件

菌株	培养基 ^a	培养条件
大肠埃希菌	营养琼脂	(36±1) °C, 16 h~18 h
肠球菌	营养琼脂或胰酪大豆胨琼脂	(36±1) °C, 16 h~24 h
金黄色葡萄球菌	营养琼脂	(36±1) °C, 16 h~24 h
弯曲菌	哥伦比亚血琼脂	微需氧条件, (36±1) °C, 24 h~48 h
沙门菌	营养琼脂	(36±1) °C, 16 h~24 h
副猪嗜血杆菌	胰酪大豆胨琼脂 (含 0.1% NAD ^b +5%胎牛血清)	(36±1) °C, 24 h~48 h
产气荚膜梭菌	5%绵羊血琼脂	厌氧条件, (36±1) °C, 20 h~24 h
伪结核棒状杆菌	5%~10%绵羊血琼脂	(36±1) °C, 24 h~48 h
^a 培养基配制见附录 D。 ^b NAD 为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的缩略语。		

附 录 C
(规范性)
菌株保存方法

C.1 通则

- C.1.1 保存菌株应无菌操作。
- C.1.2 冻存管宜快速解冻，不宜反复冻融。
- C.1.3 按菌株命名(5.3)对斜面、保存管、安瓿及西林瓶进行标记。
- C.1.4 除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682 规定的三级水。

C.2 斜面保存法

C.2.1 操作步骤

取菌株纯培养物，以点接、划线或穿刺等方法接种斜面培养基，适宜条件下培养。

C.2.2 保存条件

将斜面培养物(C.2.1)于2℃~8℃保存备用。

C.2.3 保存时间

1周~2周。

C.3 甘油保存法

C.3.1 操作步骤

C.3.1.1 取无菌冻存管，加入无菌甘油肉汤0.5 mL~1 mL(甘油最终体积分数为10%~30%)。或使用商品化无菌甘油冻存管。

C.3.1.2 取拟保存菌株的新鲜培养物适量，加入无菌甘油肉汤冻存管中，搅拌使分散均匀，制成混悬液。

C.3.2 保存条件

将冻存管(C.3.1.2)置-20℃及以下保存备用。

C.3.3 保存时间

1年~2年。

C.4 瓷珠保存法

C.4.1 操作步骤

C. 4. 1. 1 取拟保存菌株的新鲜培养物适量，加入瓷珠冻存管中，搅拌使分散均匀，制成混悬液。

C. 4. 1. 2 瓷珠与菌液吸附5 min后，弃干冻存管中的液体。

C. 4. 2 保存条件

将瓷珠冻存管（C.4.1.2）于-20℃及以下保存备用。

C. 4. 3 保存时间

1年~2年。

C. 5 冻干保存法

C. 5. 1 冷冻干燥管的选择与清洗

C. 5. 1. 1 冷冻干燥管的选择

宜采用耐温度骤变、耐压、管壁厚度均一、中空玻璃的安瓿或西林瓶。

C. 5. 1. 2 冷冻干燥管及西林瓶瓶塞的清洗

用0.5%盐酸水溶液浸泡冷冻干燥管2天~3天，然后用水冲洗20 min，浸泡过夜后，控干水分备用；西林瓶瓶塞用水冲洗，浸泡后控干水分备用。

C. 5. 1. 3 灭菌

冷冻干燥管于150℃~160℃干燥灭菌2 h；西林瓶瓶塞于121℃高压灭菌15 min。

C. 5. 2 蔗糖脱脂乳保护剂的制备

取蔗糖5 g~10 g，脱脂乳10 g，溶解至1 000 mL水中，115℃高压灭菌20 min，制备蔗糖脱脂乳保护剂。冻干厌氧微生物前，宜将蔗糖脱脂乳保护剂水浴15 min后，脱气放入冷水中，以除去保护剂中的溶解氧。

C. 5. 3 冻干菌液的制备

取拟保存菌株的新鲜培养物，加入蔗糖脱脂乳保护剂适量，振荡混匀，制成冻干菌液。

C. 5. 4 分装与加棉塞

取冻干菌液0.2 mL~0.5 mL（球形安瓿的装量应为半个球部），分装至冻存管底部。1 h~2 h内分装完毕。分装后，取少许灭菌棉松松地塞于安瓿颈口，西林瓶宜半盖瓶塞。

C. 5. 5 冷冻干燥

根据冷冻干燥机操作要求，按特定冻干曲线进行冻干，冷冻干燥8 h~20 h。

C. 5. 6 封口及真空检验

C. 5. 6. 1 安瓿封口及真空检验

冷冻干燥完全后，取出安瓿颈口的灭菌棉，抽真空，封口。测定安瓿瓶真空度，剔除失真空安瓿。

C.5.6.2 西林瓶封口

取出冷冻完全的西林瓶，用压盖机压实封口。

C.5.7 保存条件

将安瓿瓶（C.5.6.1）、西林瓶（C.5.6.2）于2℃~8℃或-20℃及以下保存备用。

C.5.8 保存时间

5年以上。

征求意见稿

附 录 D
(资料性)
常用培养基配制

D.1 营养琼脂

D.1.1 成分

营养琼脂培养基成分见表D.1。

表 D.1 营养琼脂成分

组分	用量
蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

D.1.2 制法

取上述各成分，混合，加热溶解，调节pH为 7.2 ± 0.2 ， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min，冷却至约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，摇匀后倾注平板。

D.2 胰酪大豆胨琼脂

D.2.1 成分

胰酪大豆胨琼脂成分见表D.2。

表 D.2 胰酪大豆胨琼脂基础液

组分	用量
胰蛋白胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

D.2.2 制法

取上述各成分，混合，加热溶解，调节pH为 7.2 ± 0.2 ， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min，冷却至约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，摇匀后倾注平板。

D.3 胰酪大豆胨琼脂（含 0.1% NAD+5%胎牛血清）

D.3.1 制法

取D.2.1各成分，混合，加热溶解，调节pH为 7.2 ± 0.2 ， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min。冷却至约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，加入胎牛血清50 mL、NAD溶液10 mL，摇匀后倾注平板， $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，一周内使用。

D.4 哥伦比亚血琼脂

D.4.1 成分

哥伦比亚血琼脂成分见表D.3。

表 D.3 哥伦比亚血琼脂成分

组分	用量
哥伦比亚血琼脂基础培养基	42.5 g
无菌脱纤维绵羊血	50 mL~100 mL
水	1 000 mL

D.4.2 制法

除无菌脱纤维羊血外，取上述各成分，混合，加热溶解，调节pH为 7.2 ± 0.2 ， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min。冷却至约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，加无菌脱纤维绵羊血50 mL~100 mL，混匀，倾注平板，凝固。抽样置于 $(35\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养18 h~24 h。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，一周内使用。

D.5 绵羊血琼脂

D.5.1 成分

绵羊血琼脂成分见表D.4。

表 D.4 绵羊血琼脂成分

组分	用量
蛋白胨	10.0 g
牛肉浸出粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	13.5 g
无菌脱纤维绵羊血	50 mL~100 mL
水	1 000 mL

D.5.2 制法

除无菌脱纤维绵羊血外，取上述各成分，混合，加热溶解，调节pH为 7.2 ± 0.2 ， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min。冷却至约 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，加无菌脱纤维绵羊血50 mL~100 mL，混匀，倾注平板。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，一周内使用。

参 考 文 献

- [1] NY/T 4141-2022 动物源细菌耐药性监测样品采集技术规程
- [2] 中华人民共和国农业农村部令 2022 年第 1 号修订《动物病原微生物菌（毒）种保藏管理办法》
- [3] 中华人民共和国农业部令 第 53 号《动物病原微生物分类名录》
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会国卫科教发（2023）24 号《人间传染的病原微生物目录》
- [5] Whitman,W.B.,*et al*;*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.2nd edition.Springer,2012
-

征集意见稿