

前 言

本标准是在卫生部发布的《全国临床检验操作规程(第二版)》的基础上,参考美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)标准,结合中国国情及卫生系统的实际情况和要求而制定。

本标准从2002年7月1日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准起草单位:北京大学人民医院。

本标准主要起草人:张正、杨婧、赵晓涛。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

商业性微生物培养基质量检验规程

WS/T 232—2002

Performance standard of quality assurance for commercially prepared microbiological culture media

1 范围

本标准规定了制造商和用户商业性微生物培养基进行质量检验的试验过程。制造商必须进行检测而无须用户进行检测的培养基列于表 1, 包括检测每组培养基所需的质控菌株及可被接受的预期结果。用户必须进行检测的培养基列于表 2。孵育环境和时间适用于所列的质控菌株, 但并不表示这些条件即被推荐用于临床标本。

2 制造商需进行的试验

2.1 质控菌株来源

表 1、表 2 中所有的质控菌株来源于 ATCC (American Type Culture Collection 美国标准菌株收藏中心), 也可以使用商业来源的 ATCC 演化的菌株或我国国家菌种库贮存的各级标准菌株。表 1、表 2 中罗列的菌株是评价所列培养基的试验组合中所应包括的最低要求, 制造商亦可有目的地使用额外的菌株。

表 1 商业性培养基对制造者质量保证标准

培养基	空气	孵育时间	质控菌株(ATCC 号)	预期结果
厌氧羊血琼脂培养基	厌氧	24 h~48 h	脆弱拟杆菌(25285) 产气荚膜梭菌(13124) 具核梭杆菌(25586) 厌氧消化球菌(27337)	生长 生长, 乙型溶血 生长 生长
厌氧肉汤(含羊血)	需氧或二氧化碳	24 h	化脓性链球菌(19615) 肺炎链球菌(6305) 金黄色葡萄球菌(25923) 大肠埃希菌(25922)	生长, 乙型溶血 生长, 甲型溶血 生长 生长
血琼脂-CAMP 试验	需氧	24 h	金黄色葡萄球菌(33862 或 25923) 无乳链球菌(12386) 化脓性链球菌(19615)	阴性反应(无箭头形成) 阳性反应(形成箭头区) 阴性反应(无箭头形成)
血琼脂-选择性羊血琼脂培养基	二氧化碳	24 h~48 h	化脓性链球菌(19615) 肺炎链球菌(6305) 金黄色葡萄球菌(25923) 奇异变形杆菌(12453)	生长, 乙型溶血 生长, 甲型溶血 生长 抑制(部分)

中华人民共和国卫生部 2002-04-20 批准

2002-07-01 实施

表 1 (续)

培养基	空气	孵育时间	质控菌株(ATCC号)	预期结果
苯乙醇琼脂	二氧化碳	24 h~48 h	化脓性链球菌(19615) 金黄色葡萄球菌(25923) 奇异变形杆菌(12453)	生长 生长 抑制(部分)
血培养基	厌氧(不通风)	5 天内	脆弱拟杆菌(25285) 肺炎链球菌(6305)	生长 生长
	需氧(通风)	5 天内	绿脓假单胞菌(27853) 肺炎链球菌(6305)	生长 生长
CLED 琼脂	需氧	24 h~48 h	大肠埃希菌(25922) 普通变形杆菌(8427) 金黄色葡萄球菌(25923)	生长,黄色中心 生长,青紫色,抑制蔓延(部分) 生长,不均一深黄色
CYE/BCYE 琼脂	需氧	48 h~72 h	嗜肺军团菌(33152) 波兹曼军团菌(33217)	生长,黄绿色荧光 生长,蓝白色荧光
肉汤	需氧	24 h	鼠伤寒沙门菌(14028) 宋内志贺菌(9290) 大肠埃希菌(25922)	传代生长 传代生长(可能被亚硝酸盐培养基抑制) 传代受抑制(部分到完全)
伊红美蓝培养基	需氧	24 h	鼠伤寒沙门菌(14028) 大肠埃希菌(25922) 粪肠球菌(29212)	生长,无色到琥珀色菌落 生长,蓝黑色菌落抑制(部分)
Hektoen enteric 琼脂	需氧	24 h	鼠伤寒沙门菌(14028) 福氏志贺菌(12022) 粪肠球菌(29212) 大肠埃希菌(25922)	生长,蓝至蓝绿色菌落,有黑心 生长,绿至蓝绿色菌落 抑制(部分;黄色菌落) 抑制(部分至完全,黄色菌落)
麦康凯琼脂	需氧	24 h	大肠埃希菌(25922) 奇异变形杆菌(12453) 鼠伤寒沙门菌(14028) 粪肠球菌(29212)	生长,粉色菌落 生长,无色菌落,抑制成堆(部分) 生长,无色菌落 抑制(部分)
甘露醇高盐琼脂	需氧	24 h~48 h	金黄色葡萄球菌(25923) 表皮葡萄球菌(12228) 奇异变形杆菌(12453)	生长,48 h 时菌落呈黄色 生长,48 h 时菌落呈红色 抑制(部分)
分枝杆菌属琼脂培养基	CO ₂	可达 21 天	H37Ra 结核分枝杆菌(25177) I 群堪萨斯分枝杆菌(12478) II 群瘰疬分枝杆菌(19981) III 群胞内分枝杆菌(13950) IV 群偶发分枝杆菌(6841) 大肠埃希菌(25922)	生长 生长 生长,在选择性 L-J 和选择性 Middlebrook 培养基上可能被抑制 生长,在选择性 L-J 和选择性 Middlebrook 培养基上可能被抑制 生长 抑制(部分到完全)——仅用于选择性分枝杆菌培养基

表 1 (完)

培养基	空气	孵育时间	质控菌株(ATCC号)	预期结果
沙保弱葡萄糖培养基	需氧	可达7天, 25 C~35 C	白色念珠菌(60193 或 10231) 髯癣毛癣菌(9533)	生长 生长
SS琼脂	需氧	24 h	鼠伤寒沙门菌(14028) 福氏志贺菌(12022) 粪肠球菌(29212) 大肠埃希菌(25922)	生长,无色菌落,有或无黑心 生长,无色菌落 抑制(完全) 抑制(部分至完全),粉红至玫瑰 红菌落,有沉淀
选择性支原体培养基	需氧	可达7天, 25 C	A. niger(16404) 白色念珠菌(10231) 髯癣毛癣菌(9533) 大肠埃希菌(25922)	在含有放线菌酮的培养基上受 抑制(部分至完全) 生长 生长 在含有氯霉素的培养基上受抑 制(部分至完全)
肠球菌的选择性培养基, (含叠氮化物)	需氧	24 h 和 48 h	粪肠球菌(29212) 化脓性链球菌(19615) 大肠埃希菌(25922)	生长,菌落周围变黑 抑制(部分至完全) 抑制(部分)—在胆汁七叶苷琼 脂上为无色菌落
肠球菌的选择性培 养基,(不含叠氮 化物)	需氧	24 h 和 48 h	粪肠球菌(29212) 化脓性链球菌(19615)	生长,菌落周围变黑 抑制(部分至完全)
巯基乙酸酯培养基, 有或没有指示剂	需氧	48 h (塞紧瓶盖)	脆弱拟杆菌(25285) 金黄色葡萄球菌(25923)	生长 生长
巯基乙酸酯培养基, 富含维生素K和氯 化血红素	需氧	48 h (塞紧瓶塞)	厌氧消化球菌(27337) 普通拟杆菌(8482) 产气荚膜梭菌(13124)	生长 生长 生长
管培养基(BHI和 TSB)	需氧	24 h~48 h	大肠埃希菌(25922) 金黄色葡萄球菌(25923)	生长 生长
XLD琼脂	需氧	24 h	伤寒沙门菌(14028) 福氏志贺菌(12022) 粪肠球菌(29212) 大肠埃希菌(25922)	生长,红色菌落,有黑心 生长,红色菌落 抑制(部分) 抑制(部分至完全,黄色至黄红 色菌落)
<p>注1 如无特殊标明,温度为35 C。</p> <p>注2 ATCC 是美国标准菌株收藏中心的注册商标。</p> <p>注3 此要求适用于制造商,用户不必进行检测。</p>				

表 2 商业性培养基的用户质量检验

培养基	空气	孵育时间	质控菌株(ATCC号)	预期结果
弯曲菌属琼脂	减少氧气, 增加二氧化碳, 42℃	48 h	空肠弯曲菌(33291)	生长
			大肠埃希菌(25922)	抑制(部分)
病原性奈瑟菌属的 选择性培养基	二氧化碳	24 h~48 h	淋病奈瑟菌(43069 或 43070)	生长
			奇异变形杆菌(43071)	抑制(部分),仅用于含甲氧苄氨 嘧啶的培养基
			表皮葡萄球菌(12228)	抑制(部分)
注 1 如无特殊标明,温度为 35℃。				
注 2 ATCC 是美国标准菌株收藏中心的注册商标。				

2.2 质控菌株的保存

保存用于质控目的的菌株的过程必须标准化,以减少污染或者生长特性发生改变的机会,为此可以采用冻存菌种或者采用商业来源的标化菌种。下面的过程(2.3 及 2.4 部分)可用于制备快速生长菌的质控菌种,如葡萄球菌属、多数链球菌属、肠杆菌科及铜绿假单胞菌。在制备和使用奈瑟菌属、嗜血杆菌属、分枝杆菌属及真菌时须对这些过程做些改变。如果是商业来源的菌株,则按厂家的说明使用。

2.3 冷冻菌种的制备

2.3.1 质控菌种一般由来自 ATCC 的冻干菌种制备,按 ATCC 的说明进行复苏。

2.3.2 用一无菌环,将复苏的菌悬液划线接种于两或三个加有 5% 羊血的大豆-酪蛋白消化琼脂(TSA),在合适的环境和温度下孵育 18 h~24 h(见表 1)。

2.3.3 孵育后,通过菌落形态检查纯度。如有必要则进行生化试验。用足量菌悬浮于 50 mL~100 mL 的防冷冻培养基中。防冷冻培养基可以是无菌脱纤维羊血、兔血、脱脂牛奶或大豆-酪蛋白消化肉汤(TSB),其中包含终浓度为 10% 到 15% 的甘油。如果这些冻存菌种要用以接种待测培养基,则在冰冻前应将悬浮物浊度调至 0.5 麦氏标准($1\sim 2\times 10^8$ CFU/mL)。淋病奈瑟菌的悬液调至 1.0 麦氏标准。细菌悬液必须含有足量有活力的细菌,以便在冻融一个循环后仍能继续传代。

2.3.4 将少量(0.5 mL~1.0 mL)菌悬液分装到小的无菌玻璃瓶或塑料瓶中。制备足够量的质控菌种瓶以够一年之用。在进行质控检测前检查纯度。

2.3.5 将小瓶置于-50℃或更低的温度保存备用。可将小瓶在超低温冰箱或液氮罐的气相中保存。在低于-70℃的温度下菌株可以无限期保存,在-50℃~-70℃仅能保存一年,不应在-50℃以上的温度保存。

2.3.6 当需要时,从冰箱或液氮罐中取出一瓶质控菌种并迅速融化,即可用于试验或制备工作质控菌种。也可用次级培养物进行检测,可通过接种一个固体培养基来获得单个的菌落。孵育后,用单个的菌落做试验或接种琼脂斜面或平板用做主要工作质控菌株。未用的细菌悬液应弃掉,不要重复冷冻后使用。

2.4 工作质控菌种

2.4.1 用冻存的质控菌种最多向下传三代,就应更换质控菌种。过多的传代会增加表型改变的机会。

2.4.2 制备工作质控菌种,用冻存的质控菌种接种一个琼脂斜面或平板,孵育过夜或得到足够的量为止。这些工作琼脂斜面或平板上的培养物应贮存于 2℃~8℃,或者室温,可放四个星期。菌种再传代后应检查纯度和典型的菌落形态。

2.4.3 工作冻存菌种也可使用 2.3 条中所述的步骤由冻存的质控菌种制备。原代贮存瓶或工作质控菌株均可用来接种待测培养基。

2.4.4 厌氧菌的工作质控菌株应在庖肉培养基或其他适宜的厌氧肉汤培养基中保存,或使用冷冻保存

菌种,不应使用琼脂斜面或平板。

2.5 培养基检测过程

2.5.1 将工作质控菌株在培养皿上转种,孵育后取3~5个单个的菌落悬浮于少量的灭菌TSB中,孵育4h~5h。用分光光度计调整浊度至0.5麦氏标准或在625nm吸光度值为0.08~0.1。或者由培养过夜的生长物直接制备菌悬液,用同样方法调节浊度。不论使用哪种方法进行接种物的浊度测定,都应使菌落计数达到 $(1\sim 2)\times 10^8$ CFU/mL。如果冻存菌种已被调整到此范围,则稀释物可由融化的菌种直接制备。为了在冷冻后获得适宜活力的细菌,对于对冷冻敏感的微生物(如淋病奈瑟菌),冻存时的计数需达到 $(3\sim 6)\times 10^8$ CFU/mL(1.0麦氏)。

2.5.2 为检测培养基的营养能力,将基础细菌悬液用生理盐水或纯净水1:100稀释,在每个待测培养基上用10 μ L接种环或0.01mL稀释悬液划线接种,使浓度达到 $(1\sim 2)\times 10^4$ CFU/碟。如果这样操作不能保证在特定的测试培养基上形成单个的菌落,则应再10倍稀释接种物。

2.5.3 为检测选择性培养基的抑制能力,将基础细菌悬液用生理盐水或纯净水1:10稀释,在每个测试培养基上用10 μ L环或0.01mL稀释悬液划线接种,使浓度达到 $(1\sim 2)\times 10^5$ CFU/碟。为防止在选择性培养基上生长过度,可能需要10倍稀释接种物。

2.5.4 为检测培养管的生长效果,用10 μ L环或0.01mL基础细菌悬液接种。如有需要,调整接种物的浓度。

2.5.5 将接种后的培养基在表2的条件下孵育,正常情况下在35 $^{\circ}$ C孵育18h~24h或42h~48h。巧克力琼脂和选择性分离病原性奈瑟菌属的培养基必须在5%~10%二氧化碳环境中孵育,在18h~24h及42h~48h检查结果。对于厌氧菌,通常在富含二氧化碳的厌氧环境中培养至少48h。对于弯曲菌属琼脂,在42 $^{\circ}$ C富含二氧化碳微氧环境中孵育48h。

2.6 如果解释

如果检测菌株在表1所列培养基中充分生长并形成典型的菌落形态,则认为培养基效果满意。对于选择性培养基,某些菌被抑制,而所需要的细菌充分生长。在某些情况下,必须产生表1所示的适当的颜色或溶血反应。

2.7 向用户报告质控数据

2.7.1 表1罗列的培养基

制造商应该用标签、技术手册或其他文件表明经检测产品符合本标准。制造商还应标示出无菌试验、pH测定等其他试验。

2.7.2 表1未列的培养基

制造商必须向用户报告所需的特殊质控步骤,包括:检测所用菌种、pH、操作标准的评价、待测菌株所产生的反应以及对污染的评价。

每批检测结果不必逐一报告,但应提供证明表明达到产品的质控标准。报告中需注明批号和保质期。

表1中未列的培养基应由用户进行检测。

2.8 运输和贮存

培养基在运输时应防止过分失水,并应进行机械保护及保温。制造商在制定失效期时,应考虑运输和贮存条件。

3 用户所需进行的试验

3.1 操作试验

如前所述,所有用户制备的培养基应参照以上规定进行检测。对于表1未列的培养基及下列培养基即弯曲菌属琼脂及选择性分离病原性奈瑟菌属的培养基(列于表2),用户必须对每批培养基进行检测。

从其他地方以非商品形式分发获得培养基的用户使用时也应参照本文件中的规则。生产者(制备培

培养基的试验室)也应执行适用于商家的质量检验。

3.2 其他的质量保证标准

使用商业性培养基的用户必须检查每批培养基:平皿的裂纹,充碟不均,培养基裂纹,溶血(血琼脂),冷冻,过多的气泡或斑点,污染。

3.3 缺陷性报告

如果发现培养基有缺陷,实验室应记录此结果并通知制造商。其中包括:不能生长,不能产生预期大小的菌落,或提供污染、干燥、破裂的证据。制造商应有适当的改进措施,这也应该进行试验室记录。这些情况不一定改换培养基,用户可以加做试验以查明原因并加以纠正。

表 3 培养基中英文名称对照

培养基中文名称	培养基英文名称
厌氧肉汤	anaerobic broths
厌氧羊血琼脂培养基	anaerobic sheep blood and laked blood agar media
血琼脂-CAMP 试验	blood agar-CAMP test
血琼脂-选择性羊血琼脂培养基	blood agar-selective sheep blood agar media
血培养基	blood culture media
肉汤	broth
弯曲菌属琼脂	campylobacter agar
CLED 琼脂	CLED agar aerobic
CYE/BCYE 琼脂	CYE/BCYE agar aerobic
伊红美蓝培养基	eosin methylene blue media
Hektoen enteric 琼脂	Hektoen enteric agar aerobic
麦康凯琼脂	macconkey agar aerobic
甘露醇高盐琼脂	mannitol salt agar aerobic
分枝菌属琼脂培养基	mycobacteria agar media
苯乙醇琼脂	phenylethyl alcohol agar
沙保弱葡萄糖培养基	sabouraud dextrose agar aerobic
SS 琼脂	salmonella shigella
肠球菌的选择性培养基(含叠氮化物)	selective media for enterococci, with azide aerobic
肠球菌的选择性培养基(不含叠氮化物)	selective media for enterococci, without azide aerobic
病原性奈瑟菌属的选择性培养基	selective media for pathogenic Neisseria species
选择性支原体培养基	selective mycology media
巯基醋酸酯 培养基,富含维生素 K 和氯化血红素	thioglycolate medium, enriched with vitamin K and hemin aerobic
巯基乙酸酯 培养基,有或没有指示剂	thioglycolate medium, with or without indicator aerobic
管培养基(BHI 和 TSB)	tubed media(BHI and tryptic soy broth)
XLD 琼脂	XLD(xylose lysine desoxycholate) agar aerobic