

文章编号: 1001-764X(2012)10-776-03

抗菌药物敏感性试验执行标准解读

马筱玲(安徽医科大学附属省立医院检验科,合肥 230001)



作者简介:马筱玲,1962年生,女,主任医师,教授,博士,博士研究生导师,安徽省政府特殊津贴专家,安徽省卫生厅有突出贡献的中青年专家、省级学术与技术带头人。中华医学会检验分会常务委员、中国医师协会检验分会常务理事、中华医学会检验分会微生物学组副组长;安徽省检验分会主任委员;先后主持安徽省自然科学基金等各类课题8项,作为第一完成人获安徽省科技进步二等奖2项、三等奖1项,发表论文100余篇,主编出版著作2部,副主编及参编著作4部。

摘要:抗菌药物敏感性试验(药敏试验)在个体化治疗和经验治疗方面具有重要作用。规范药敏试验操作方法,减少试验误差,为临床提供准确的检验报告非常重要。目前我国多数临床实验室根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)的“抗菌药物敏感性试验执行标准”进行药敏试验。本文对该标准中的重点内容进行解读,以便检验界同道能更好地理解和应用。

关键词:抗菌药物敏感性试验;标准;方法;报告

中图分类号:R446.5;Q93-3

文献标志码:A

抗菌药物敏感性试验(以下简称药敏试验)结果可以帮助临床医师针对特定的感染选择合适的抗菌药物,实现个体化治疗。此外,综合某地区的药敏试验结果,也可以了解该地区主要分离菌的耐药状况,为临床经验用药提供参考^[1]。因此,规范药敏试验操作方法,减少试验误差,为临床提供准确的药敏报告非常重要。本文对药敏试验执行标准^[2-4]中的重点内容进行解读。

1 药敏试验的指征

1.1 开展药敏试验的前提条件 从细菌的种属特征不能准确推测其对某类抗菌药物的敏感性时,或细菌对抗菌药物的敏感性容易改变时,必需做药敏试验。如肠杆菌科细菌对 β -内酰胺类药物的敏感性是不确定的,需要做药敏试验;反之,肠杆菌科细菌对万古霉素天然耐药,其敏感性是确定的,则不需要做药敏试验。某些细菌对治疗用的抗菌药物最初是敏感的,但在治疗过程中容易转变为耐药,如肠杆菌属、枸橼酸杆菌属和沙雷菌属细菌感染使用三代头孢菌素治疗时,葡萄球菌感染使用喹诺酮、万古霉素治疗时,铜绿假单胞菌感染使用各类抗菌药物治疗时,均应在治疗3~4 d后,对来自身体相同感染部位重新分离的细菌做药敏试验。

1.2 注意鉴别感染菌、污染菌和定植菌 仅针对明确引起患者感染的病原菌进行药敏试验,污染菌或定植菌不做药敏试验。在人体表面及与外界相通的器官存在大量的正常菌群,可能会因为消毒不严而

污染无菌体液标本(如血液、穿刺液等)。对这些细菌进行药敏试验不但浪费医疗资源、增加试验成本,也可导致抗菌药物不合理应用,诱导耐药菌产生,增加医疗支出。因此,实验室工作人员应能正确甄别污染菌和定植菌。血培养中常见的污染菌有表皮葡萄球菌、微球菌、气球菌、棒状杆菌和丙酸杆菌等。若在2套血培养标本中仅有1瓶培养出上述细菌,一般判断为污染。人体痰标本中的定植菌,随年龄、人群、环境的不同而有所不同,一般认为痰液中分离出的草绿色链球菌、奈瑟菌、血浆凝固酶阴性葡萄球菌、白念珠菌等为定植菌,不需进行药敏试验。

1.3 注意挑取纯培养菌落 细菌不纯是药敏试验结果错误的主要原因之一。药敏结果可能表现为罕见的耐药表型,如葡萄球菌中混有革兰阴性菌,可表现为对万古霉素耐药。所以,细菌的混合培养物必须分纯以后方可进行药敏试验。应避免直接用临床标本做药敏试验,除非在临床紧急情况下、革兰染色提示为单一细菌时可以直接做,但其结果仅作初步报告,随后必须用标准方法重复做药敏试验。

2 药敏试验中抗菌药物的选择

选择试验的抗菌药物必须满足两个基本条件。(1)试验药物对被试菌引起的感染应有确切的临床疗效。临床实验室经常容易出现此方面的错误,即使在国内权威的耐药监测数据中,也发现有部分细菌测定了没有抗菌活性或临床不推荐应用的抗菌药物。(2)试验药物的体外药敏试验结果应是可以接

受的。如纸片扩散法检测肺炎链球菌对青霉素的敏感性,应选择苯唑西林纸片,而不是青霉素纸片。而检测该菌对阿莫西林、氨苄西林、头孢吡肟、头孢曲松、头孢唑啉、厄他培南、亚胺培南和美罗培南等的药物敏感情况,纸片扩散法结果是不可靠的,应测定并报告最低抑菌浓度(MIC)。

实验室在选择试验和报告的抗菌药物之前,应咨询感染科医师、医院药事委员会、感染控制委员会的意见,综合考虑细菌的天然耐药和获得性耐药特征,药物的活性和毒性作用,药物的价格及供应情况等,作出最佳选择^[1]。但我国长期以来,实验室缺少与临床沟通,且各级医院临床医师和检验人员的水平参差不齐,所以目前多数临床实验室是根据美国 CLSI M100 文件中表 1 和表 1A“临床微生物实验室在细菌常规药敏试验和报告中应考虑抗微生物药物推荐分组”进行抗菌药物的选择。上述文件中列出了能够满足大多数临床实验室对各类细菌药敏试验基本要求的药物,这些推荐药物均具有确切的临床疗效,且体外试验结果是可以接受的。

在临床上同一类抗菌药物往往具有相同或相似的抗菌活性,所以可选择一种药物(预测药物)作为另一种或几种药物的代表进行药敏试验,来预测其他同类药物的敏感性。预测药可以选择一类药中抗菌活性最小的,若被测细菌对预测药敏感,表示对这一类药物均敏感,如葡萄球菌对青霉素敏感,表示对所有 β -内酰胺类抗菌药物均敏感。也可以选择一类药中抗菌活性最强的,被测细菌对预测药耐药,表示对这一类药物均耐药,如葡萄球菌对苯唑西林耐药,表示对所有 β -内酰胺类抗菌药物均耐药。在 CLSI M100 文件表 1 和 1A 中,在每一单元格中药物间有“或”字,表示其交叉耐药和敏感的结果几乎完全一致,可以用一种药物的药敏试验结果预测另一种药物的结果。

目前,越来越多的医院采用自动化仪器进行药敏试验,其抗菌药物的组合是固定的,通常只根据革兰染色结果来设定试验药物,所以其药物的选择可能与细菌种属不匹配,建议检验人员应在获得细菌鉴定结果以后,对药敏试验结果进行审核和删除,如嗜麦芽窄食单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物天然耐药,不需要报告亚胺培南的药敏结果。

3 药敏试验方法操作的标准化

纸片扩散法简单易行,但不适用于厌氧菌、某些苛氧菌和某些非发酵菌(除铜绿假单胞菌、不动杆

菌属、洋葱伯克霍尔德菌和嗜麦芽窄食单胞菌以外的非发酵菌),检测这些细菌的药物敏感性须使用稀释法。临床微生物实验室应根据细菌的种类、检测的抗菌药物及耐药机制选择可靠的检测方法,进行标准化操作和有效的质控,以保证结果的准确性。

药敏试验的标准化操作程序包括培养基制备、菌悬液制备、接种、培养等。不同的试验菌种和抗菌药物组合的药敏试验操作程序有所不同,具体步骤应参照 CLSI 文件 M100、M02 和 M07 执行。对于大多数需氧和兼性厌氧菌一般采用普通的 M-H 琼脂或肉汤,按纸片扩散法或肉汤稀释法进行菌液制备和接种,35℃ 空气培养。但对苛氧菌检测方法则有所不同,如检测脑膜炎奈瑟菌对青霉素的敏感性必须使用肉汤稀释法,使用 CAMHB(阳离子调节的 M-H 肉汤)加 2%~5% 的 LHB(溶解的马血),挑取在巧克力平板上生长 20~24 h 的菌落用直接菌落悬液法制备菌悬液,35℃、CO₂ 环境培养 20~24 h。

药敏试验中培养基的厚度、pH、离子浓度、添加剂,菌悬液浓度和纯度,培养条件和时间,药敏纸片的来源和储藏等均影响试验结果的准确性,需严格进行质量控制。在使用稀释法检测 MIC 时,尤其要重视菌悬液的浓度和纯度,每次药敏试验后应立即取一份菌悬液在非选择琼脂平板上传代培养,以检查接种物的纯度。为保证接种物浓度的准确性,实验室应定期对浊度管、比浊仪进行检查、校准,并定期进行接种菌悬液的菌落计数。

4 药敏试验结果判断

药敏试验结果应准确读取抑菌环直径或 MIC 值。纸片扩散法使用直尺或游标卡尺,用反射光照明读取。检查葡萄球菌对利奈唑胺、苯唑西林、万古霉素的敏感性和检查肠球菌对万古霉素的敏感性时,需要用透射光照明读取。稀释法采用肉眼读取结果。读取结果后应根据 CLSI M100 中表 2A-2J“抑菌圈直径及 MIC 解释标准”进行结果判断。注意该表每年都有部分更新和改动,临床微生物室工作人员应不断学习,跟踪和使用最新的标准。

5 药敏试验结果审核

5.1 审核试验的药物是否与菌株鉴定结果一致如肠杆菌科细菌应该做 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类和磺胺类药物的药敏试验,而不需要检测对糖肽类和大环内酯类抗菌药物的敏感性。

5.2 审核药物的敏感性结果是否遵循特定药物的

活性规则层次 如三代头孢菌素对肠杆菌科细菌的活性高于一、二代头孢。肠杆菌科细菌如果对一代、二代头孢菌素敏感,一定对三代头孢菌素也敏感。

5.3 审核分离菌株的药敏试验结果是否违背细菌的天然耐药和罕见耐药表型特征 如检出嗜麦芽窄食单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物敏感,链球菌属对万古霉素耐药等结果时,应进行如下检查予以核实:(1)抄写是否错误;(2)试验中是否有污染(重新检查平板上菌落纯度等);(3)MIC 试验时,是否使用了有缺陷的药敏试验板条、琼脂平板或卡条(如损坏、充料不足等);(4)核实患者以前的结果(如以前分离的相同细菌是否也具有不寻常的抗菌谱)。如以上检查不能查明原因,须重新进行药敏试验和细菌鉴定,同时要保留菌株并送参考实验室确认。M100 文件附录 A 中列出了一些需要核实的药敏结果的建议。实验室应该形成一套自己的策略和规程以核实实验室不常见或不一致的药敏试验结果。

6 药敏试验结果报告

药敏试验结果判断标准是建立在推荐剂量和临床使用方法基础上的,以敏感、中介和耐药表示。这种表示方式只是对抗菌药物临床治疗效果的一种预测。有些细菌对某种抗菌药物没有或罕见有耐药菌株,如 β -溶血性链球菌对万古霉素的 MIC 值高于敏感临界值或抑菌圈直径小于敏感临界值时,则应报告为非敏感。出现这种情况应证实细菌鉴定和药敏试验结果,随后将菌株保存并送参考实验室。

出于救治患者的需要,可直接向临床医师报告 MIC 值,但必须提供解释结果的判断标准,以便临床医师理解。不应报告无解释标准的抑菌圈直径。

在 CLSI 文件 M100 表 1 和 1A 中,按照临床选药的优先顺序将试验的抗菌药物分成 A、B、C 和 U 组。每个实验室应决定表内哪些药物用于常规试验和报告,哪些用于选择性试验和报告。选择性报告有助于提高药敏试验的临床相关性,有助于减少滥用广谱抗菌药物导致的多重耐药菌株产生。

6.1 特殊菌株的药敏试验报告 对沙门菌属和志贺菌属细菌,第一、二代头孢菌素和氨基糖苷类抗菌药物体外可能有活性,但临床治疗却无效,所以对上述药物不应报告为敏感。

肠球菌属对头孢菌素类、氨基糖苷类(除外筛选高水平耐药)、磺胺甲恶唑/甲氧苄啶和克林霉素在体外可能有活性,但在临床上耐药,所以对这类药物不能报告敏感。肠球菌属对高水平氨基糖苷类敏

感,并不表示单独使用氨基糖苷类有效,而是表示氨基糖苷类与作用于细胞壁的抗菌药物(如青霉素、万古霉素)联合使用能发挥协同作用。

克雷伯菌属、大肠埃希菌和奇异变形杆菌中的产 ESBLs 菌株应报告对所有青霉素类、头孢菌素及氨基糖苷类耐药。

对于甲氧西林、苯唑西林/头孢西丁耐药或证实有 *mecA* 基因或青霉素结合蛋白 2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a) 的葡萄球菌定义为耐甲氧西林的葡萄球菌 (MRS), 应报告对所有青霉素类、 β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂复合物、头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物耐药。

6.2 特殊部位分离菌株药敏试验报告 从威胁生命的感染(脑膜炎、菌血症、会厌炎和面部蜂窝组织炎)患者的血液和脑脊液中分离的流感嗜血杆菌,应常规报告对氨苄西林、一种三代头孢菌素和氯霉素的药敏结果。

用有些药物治疗细菌引起的颅内感染可能无效,故对分离于脑脊液中的细菌,下列抗菌药物不进行常规报告,包括:仅通过口服途径给药的药物、一代和二代头孢菌素(头孢吡辛钠除外)、头霉素、克林霉素、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类。

尿道分离菌不常规报告的药物有阿齐霉素、氯霉素、克拉霉素、克林霉素和红霉素。

6.3 与治疗有关的注释报告 M100 文件中与治疗有关的注释用 Rx 符号标出,在药敏试验报告中可以包含这样的注释。如血培养中分离出肠球菌,且药敏试验证实分离菌株对氨苄西林、高水平庆大霉素和链霉素敏感,可在药敏报告中注明:“严重的肠球菌感染,通常需要氨苄西林、青霉素或万古霉素与氨基糖苷类抗菌药物联合治疗,可起协同杀菌效果”。

7 参考文献

- [1]倪语星,王金良,徐英春,等. 抗微生物药物敏感性试验规范 [M]. 第 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2009:2-16.
- [2]CLSI M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement [S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [3]CLSI M02-A11. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-eleventh edition [S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [4]CLSI M07-A9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved Standard-ninth edition [S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

(收稿日期:2012-08-31)

(本文编辑:刘群,陈维忠)