



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0688.1—2008

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

Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems—
Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of
performance of antimicrobial susceptibility devices—
Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of
antimicrobial agents against rapidly
growing aerobic bacteria involved in infectious diseases

(ISO 20776-1:2006, MOD)

2008-10-17 发布

2010-01-01 实施

国家食品药品监督管理局 发布



目 次

前言 Ⅲ

引言 Ⅳ

1 范围 1

2 术语及定义 1

3 试验程序 3

3.1 概述 3

3.2 培养基 3

3.3 抗菌剂 3

3.4 接种菌液的制备 9

3.5 微量稀释盘的接种 10

3.6 微量稀释盘的孵育 10

3.7 结果的判读 10

3.8 MIC 结果可能不能反映抗菌剂真实活性的特殊情况及其处理 11

4 质量控制 12

附录 A (规范性附录) 对于 Mueller-Hinton 肉汤的要求 18

参考文献 20

前 言

YY/T 0688 的本部分修改采用 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》。

本部分与 ISO 20776-1:2006,差异如下:

- a) 在引言添加“注:已知对某抗菌剂固有耐药的细菌不做敏感性试验”的说明。
- b) 将原文中的“non-selective nutritive agar medium”译成“非选择性琼脂培养基”(在临床检验实际工作中,非选择性培养基与营养琼脂是两种截然不同的培养基,而试验菌株从储存培养物到工作培养物的所有传代培养用固体培养基均建议使用前者。如此翻译是为了避免与营养琼脂相混淆)。
- c) 将“4 质量控制……质控菌株的工作培养物可通过储存菌株在非选择性琼脂培养基上再培养获得。……”中的“再培养”改为“连续传代培养两次”;“储存菌株”改为“参考菌株的储存培养物”(结合临床检验工作的实际,并严格遵守 CLSI 在 M7-A6 中对菌株储存培养物连续传代培养次数的规定)。
- d) 将“4 质量控制……进一步的传代培养只能用第一次工作培养物(不能超过一周)进行。……”改为“4 质量控制……工作培养物只能再传代一次,且使用时间不能超过一周。……”(结合临床检验工作的实际,并严格遵守 CLSI 在 M7-A6 中对菌株工作培养物的使用时间及传代培养次数的规定)。

为便于使用,本标准相对于国际标准原文还做了下列编辑性修改:

- a) 将“本国际标准”一词改为“本部分”;
- b) 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”;
- c) 删除国际标准原文中的前言。

本部分的附录 A 为规范性附录。

本部分由国家食品药品监督管理局提出。

本部分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/TC 136)归口。

本部分主要起草单位:北京市医疗器械检验所、南京医科大学附属第一医院。

本部分主要起草人:童明庆、王辉。

引 言

抗菌剂体外敏感性试验通常是针对于可能导致疾病的微生物,尤其是那些被认为对频繁使用的抗菌剂呈现耐药性的微生物种属¹⁾。除此之外,该试验在细菌耐药性监测及其流行病学研究以及新抗菌剂与现有抗菌剂之间的比较等方面也很重要。

稀释法常被用来测定抗菌剂的最小抑菌浓度(MICs, minimum inhibitory concentrations),是抗菌剂敏感性试验的参考方法。MIC法通常用于细菌耐药性监测、新抗菌剂与现有抗菌剂之间的比较,该法也用于常规方法所得结果不可靠或临床需要定量结果的微生物的敏感性试验。对于稀释法测试,某抗菌剂对于特定微生物的MIC值是通过观察微生物分别在含有系列稀释浓度的该抗菌剂的一系列琼脂平板(琼脂稀释法)上或肉汤(肉汤稀释法)中的可见的生长能力来确定的。

抗菌剂的最小抑菌浓度(MIC值)是指在规定的体外条件下,规定的孵育时间内,能抑制某特定微生物出现肉眼可见生长的抗菌剂的最低浓度(以mg/L为单位)。MIC值有助于临床医师了解微生物对抗菌剂的敏感性从而帮助他们制定合理的用药方案。由于所用方法可能显著地影响试验结果,为了确保室内试验结果的可重复性和室间试验结果的可比性,实验室需要进行严格的质量控制及试验程序的标准化。通常情况下,对于给定的抗菌剂和试验菌株,肉汤稀释法的检测结果(MIC值)在MIC实际值 ± 1 个倍比稀释度的范围内是可以被接受的。

肉汤稀释法:是一种向一系列相同体积的含抗菌剂的肉汤培养基(其中所含某抗菌剂的浓度通常是以几何级数递增的)中接种已知固定量某微生物以确定该微生物对该抗菌剂的MIC值的方法。

肉汤微量稀释法:顾名思义,就是在微量稀释盘中进行肉汤稀释试验。

本标准所描述的方法仅适用于需氧菌的纯培养物,这些细菌在Mueller-Hinton琼脂平板和Mueller-Hinton肉汤(可能需要加入添加剂)中经过夜孵育均易于生长。本标准所描述的肉汤稀释法本质上与法国^[1]、德国^[2]、瑞典^[3]、英国^[4]和美国^[5]等许多国家目前所用的方法是一致的,该法与欧洲抗菌剂敏感性试验委员会(EUCAST)^[6]所发布的肉汤微量稀释法是同一种方法,所有这些方法都是在Ericsson和Sherris^[7]所描述方法的基础上发展而来的。

1) 已知对某抗菌剂固有耐药的细菌不做敏感性试验。

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

1 范围

YY/T 0688 的本部分介绍了测定抗菌剂 MIC 值的一种参考方法——肉汤微量稀释法。MIC 值仅反映抗菌剂在规定的体外试验条件下的抗菌活性。医生在制定用药方案时,不但要参考 MIC 结果,还应考虑诸如药物在人体内的药代/药效学参数以及细菌对抗菌剂的耐药机制等其他因素。对于某种抗菌剂,根据体外敏感性试验结果(MIC 值)可将相应受试菌划分为“敏感(S)”、“中介(I)”和“耐药(R)”。另外,MIC 值可用于确定该受试菌株是野生型还是非野生型。尽管解释 MIC 值的临床意义已超出了本部分的范畴,但为了适应临床需要,根据不同抗菌剂-细菌组合对方法的基本内容进行调整是必要的。这些调整体现在下列各表格中。为了确保试验结果的可比性与可靠性,其他药敏试验方法(如常规方法或抗菌剂敏感性试验设备)应该和本参考方法进行比对以确定其准确性。

2 术语及定义

下列术语和定义适用于 YY/T 0688 的本部分。

2.1

抗菌剂 antimicrobial agent

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。

2.2

抗菌剂属性 properties of antimicrobial agents

2.2.1

效价 potency

受试物中有效抗菌活性成分所占比例,是受试物通过生物学方法所测值与相同质量或体积的参考品通过相同方法测得值的比率。

注:效价的单位有毫克/克(mg/g)、国际活性单位/克(IU/g)或百分含量(%、体积分数或质量分数)或受试物的物质的量浓度(mol/L)。

2.2.2

浓度 concentration

抗菌剂在规定体积溶液中的量。

注1:常用毫克/升(mg/L)来表示。

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

2.3

原液 stock solutions

用于进一步稀释的初始浓度溶液。

2.4

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最低浓度。

注:常用 mg/L 表示。

2.5

折点 break points BP

用以界定受试细菌对某抗菌剂是敏感、中介或耐药的特定的 MIC 值。

注:关于折点的最新解释,可参考应用本参考方法的机构的最新出版物。

2.5.1

敏感 susceptible S

受试菌株的生长可被某浓度抗菌剂抑制预示着该抗菌剂的临床推荐剂量能够获得理想的疗效。

注1:菌株是在规定的表型测试系统中基于合理的折点被判定为敏感的。

注2:折点应根据测试环境的改变(诸如药物常规剂量的改变、新的耐药机制的出现等)做相应调整。

2.5.2

中介 intermediate I

受试菌株的生长可被某浓度抗菌剂抑制,但无法确定该抗菌剂临床推荐剂量的准确疗效。

注1:菌株是在规定的表型测试系统中基于合理的折点被判定为中介的。

注2:“中介”意味着由受试菌株导致的感染可通过该抗菌剂在患处的生理富集或使用更高剂量的该抗菌剂来获得妥善的治疗。

注3:该级别还提供了一个“缓冲区”,从而避免了小的、不可控的技术因素所导致的重大的结果解释偏差。

注4:折点应根据测试环境的改变(诸如药物常规剂量的改变、新的耐药机制的出现等)做相应调整。

2.5.3

耐药 resistance R

受试菌株的生长可被某浓度抗菌剂抑制预示着该抗菌剂的临床推荐剂量不能获得理想的疗效。

注1:菌株是在规定的表型测试系统中基于合理的折点被判定为耐药的。

注2:折点应根据测试环境的改变(诸如药物常规剂量的改变、新的耐药机制的出现等)做相应调整。

2.6

野生型 wild type

对某抗菌剂没有获得性耐药机制的菌株。

2.7

参考菌株 reference strains

有特定分类编号的,且抗菌剂敏感性表型和(或)基因型确定及稳定的菌株。

注:参考菌株是从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。

2.8

敏感性试验方法 susceptibility testing methods

2.8.1

肉汤稀释法 broth dilution

是一种确定某微生物对某抗菌剂的 MIC 值的方法,即:向一系列含有某抗菌剂(通常倍比稀释)的适当体积的溶液中接种已知适当量的某微生物的接种菌液。

注:该方法的目的是确定 MIC 值。

2.8.2

微量稀释法 microdilution

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。

2.9

液体培养基 broth

用于细菌体外培养的液体培养基。

2.10

接种量 inoculum

依据接种后终体积计算出的细菌在最终菌药混合物中的数量。

注：接种量通常以每毫升的菌落形成单位(CFU/mL)来表示。

2.11

接种量效应 inoculum effect

由接种量的改变所导致的 MIC 值的变化。

3 试验程序

3.1 概述

本试验是在微量稀释盘中进行的。该方法首先是抗菌剂工作液的配制,然后或者每孔加抗菌剂工作液 50 μL (同时再加入 50 μL 接种物),或者每孔工作液为 100 μL (接种物的接种量最多不超过 5 μL)。

3.2 培养基

应使用 Mueller-Hinton 肉汤(详见附录 A)。

3.3 抗菌剂

3.3.1 概述

受试抗菌剂可直接从制造商或通过可靠的商业来源获得,但不能以临床使用的药物制剂作为受试物。所有抗菌剂均应有批号、效价、失效日期及推荐的保存条件细节,如果制造商没有推荐其他的保存条件,一般受试物均在 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,保存于密闭、干燥、避光的容器中。抗菌剂的每个包装单位在整个试验过程中均应有干燥剂。

注：为避免受试物凝结成块,在打开装有受试物的容器之前,应将其恢复至室温。

3.3.2 原液的配制

抗菌剂必须用校准过的分析天平称量。配制抗菌剂标准溶液时,可根据受试物的效价,通过下列公式计算出受试物的质量和稀释溶剂的体积。

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \dots\dots\dots (1)$$

$$V = \frac{m \times P}{\rho} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

ρ ——原液的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

m ——抗菌剂(干粉)的质量,单位为克(g);

P ——抗菌剂(干粉)的效价,单位为毫克每克(mg/g);

V ——稀释剂的体积,单位为升(L)。

虽然某些抗菌剂的溶解度有限,但抗菌剂母液的浓度至少应为 1 000 mg/L。原液的实际配制浓度取决于工作液(系列稀释浓度梯度)的配制方法。除非生产商有特殊的配制稀释要求,所有抗菌剂都应该用无菌蒸馏水溶解并稀释。某些抗菌剂需要用特殊的溶剂来溶解(详见表 1)。通常配好的抗菌剂工作液没必要进行消毒。如果必要,抗菌剂工作液可采用膜过滤除菌,但除菌前后的工作液应进行组分分析比较以确保抗菌剂样品在除菌过程中未发生吸附损失。

如果抗菌剂溶液没有在指定储存条件下的稳定性信息,所有抗菌剂溶液都应该现用现配。

表 1 某些抗菌剂原液的制备所需的溶剂和稀释剂

抗菌剂	溶 剂	稀 释 剂
阿米卡星 (amikacin)	蒸馏水	
阿莫西林 (amoxicillin)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)
氨苄西林 (ampicillin)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=8.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)
阿奇霉素 (azithromycin)	95%乙醇或冰醋酸 ^a	水
阿洛西林 (azlocillin)	蒸馏水	
氨曲南 (aztreonam)	饱和 NaHCO ₃ 溶液	蒸馏水
羧苄青霉素 (carbenicillin)	蒸馏水	
头孢克洛 (cefaclor)	蒸馏水	
头孢孟多 (cefamandole)	蒸馏水	
头孢唑啉 (cefazolin)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)
头孢地尼 (cefdinir)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	蒸馏水
头孢托仑 (cefditoren)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	蒸馏水
头孢吡肟 (cefepime)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)
头孢他美 (cefetamet)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	蒸馏水
头孢克肟 (cefixime)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=7.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=7.0)
头孢美唑 (cefmetazole)	蒸馏水	
头孢尼西 (cefonicid)	蒸馏水	
头孢哌酮 (cefoperazone)	蒸馏水	
头孢噻肟 (cefotaxime)	蒸馏水	
头孢替坦 (cefotetan)	二甲基亚砷	蒸馏水
头孢西丁 (cefoxitin)	蒸馏水	
头孢泊肟 (cefpodoxime)	质量百分比浓度为 0.1% 的 NaHCO ₃ 溶液	蒸馏水
头孢丙烯 (cefprozil)	蒸馏水	

表 1 (续)

抗菌剂	溶 剂	稀 释 剂
头孢他啶 (ceftazidime)	饱和 NaHCO_3 溶液	蒸馏水
头孢布烯 (ceftibuten)	1/10(体积分数)的二甲基亚砷水溶液	蒸馏水
头孢唑肟 (ceftizoxime)	蒸馏水	
ceftobiprole	二甲基亚砷+冰醋酸 ^b	蒸馏水,用涡旋振荡器剧烈振荡混匀
头孢曲松 (ceftriaxone)	蒸馏水	
头孢呋辛 (cefuroxime)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)
头孢噻吩 (cephalothin)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	蒸馏水
氯霉素 (chloramphenicol)	95%(体积分数)乙醇	蒸馏水
西诺沙星 (cinoxacin)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再缓缓加入最小体积量的 1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解,最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
环丙沙星 (ciprofloxacin)	蒸馏水	
克拉霉素 (clarithromycin)	甲醇或冰醋酸 ^a	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.5)
克拉维酸 (clavulanic acid)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)
克林沙星 (clinafloxacin)	蒸馏水	
克林霉素 (clindamycin)	蒸馏水	
粘杆菌素 ^c (colistin)	蒸馏水	蒸馏水
dalbavancin	二甲基亚砷	蒸馏水和二甲基亚砷 ^d
达托霉素 (daptomycin)	蒸馏水	蒸馏水
地红霉素 (dirithromycin)	冰醋酸 ^a	蒸馏水
多尼培南 (doripenem)	0.85%(体积分数)的 NaCl 溶液	0.85%(体积分数)的 NaCl 溶液
强力霉素 (doxycycline)	蒸馏水	
依诺沙星 (enoxacin)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再缓缓加入最小体积量的 0.1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解,最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水

表 1 (续)

抗菌剂	溶 剂	稀 释 剂
厄他培南 (ertapenem)	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2)	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2)
红霉素 (erythromycin)	95% (体积分数) 乙醇或冰醋酸*	蒸馏水
法罗培南 (faropenem)	蒸馏水	蒸馏水
氟罗沙星 (floxacin)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水, 再缓缓加入最小体积量的 0.1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解, 最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
夫西地酸 (fusidic acid)	95% (体积分数) 乙醇	蒸馏水
加雷沙星 (garenoxacin)	蒸馏水 (搅拌溶解)	
加替沙星 (gatifloxacin)	蒸馏水 (搅拌溶解)	
gemifloxacin	蒸馏水	
庆大霉素 (gentamicin)	蒸馏水	
亚胺培南 (imipenem)	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2)	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2)
卡那霉素 (kanamycin)	蒸馏水	
左旋氧氟沙星 (levofloxacin)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水, 再缓缓加入最小体积量的 1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解, 最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
利奈唑烷 (linezolid)	蒸馏水	
氯碳头孢/劳拉头孢 (loracarbef)	蒸馏水	
美西林 (mecillinam)	蒸馏水	
美洛培南 (meropenem)	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2)	0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.2)
甲氧西林 (methicillin)	蒸馏水	
美洛西林 (mezlocillin)	蒸馏水	
米诺环素 (minocycline)	蒸馏水	
拉氧头孢磷酸氢二铵盐* (moxalactam diammonium salt)*	用 0.04 mol/L 的 HCl 溶解后静置 1.5 h~ 2 h	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=6.0)

表 1 (续)

抗菌剂	溶 剂	稀 释 剂
莫西沙星 (moxifloxacin)	蒸馏水	
莫匹罗星 (mupirocin)	蒸馏水	
萘夫西林 (nafcillin)	蒸馏水	
萘啶酸 (nalidixic acid)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再缓缓加入最小体积量的 1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解,最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
奈替米星 (netilmicin)	蒸馏水	
呋喃妥因 (nitrofurantoin)	先用最少量的二甲基甲酰胺溶解,再用 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=8.0) 将原液总体积补齐	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=8.0)
诺氟沙星 (norfloxacin)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再缓缓加入最小体积量的 1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解,最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
氧氟沙星 (ofloxacin)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再缓缓加入最小体积量的 1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解,最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
苯唑西林 (oxacillin)	蒸馏水	
青霉素 (penicillin)	蒸馏水	
哌拉西林 (piperacillin)	蒸馏水	
多粘菌素 B (polymyxin B)	蒸馏水	蒸馏水
quinupristin-dalfopristin	蒸馏水	
利福平 (rifampicin)	甲醇	蒸馏水
司帕沙星 (sparfloxacin)	蒸馏水	
舒巴坦 (sulbactam)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=6.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH=6.0)
磺酰胺 (sulphonamide)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再缓缓加入最小体积量的 1 mol/L NaOH 溶液直至样品溶解,最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
替考拉宁 (teicoplanin)	蒸馏水	

表 1 (续)

抗菌剂	溶 剂	稀 释 剂
telavancin	二甲基亚砷	蒸馏水
泰利霉素 (telithromycin)	冰醋酸 ^a	蒸馏水
四环素 (tetracycline)	蒸馏水	
替卡西林 (ticarcillin)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)	0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH=6.0)
替加环素 (tigecycline)	蒸馏水	蒸馏水
妥布霉素 (tobramycin)	蒸馏水	
甲氧苄啶 (trimethoprim)	先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再缓缓加入最小体积量的 0.1 mol/L 的乳酸或 0.1 mol/L 的盐酸直至样品溶解,最后用蒸馏水将原液总体积补齐	蒸馏水
甲氧苄啶盐(如乳酸盐) (trimethoprim, if lactate)	蒸馏水	
丙大观霉素 (trospetomycin)	蒸馏水	
万古霉素 (vancomycin)	蒸馏水	

注 1: 关于表 1 中溶剂及稀释剂的信息主要是经 CLSI(即 NCCLS)许可来源于其 M100-S16 文件(抗菌剂敏感性试验执行标准;第 16 版信息增刊)。由于该部分信息是定期更新的,所以请实验操作者经常查阅可从 CLSI(即 NCCLS,940 West Valley Road, Suite 1 400, Wayne, PA 19 087, USA.)获得的最新版本。

注 2: 关于所选抗菌剂原液的溶剂及稀释剂的更详细的信息,请参考欧洲药典和美国药典。

- ^a 如果用冰醋酸作为溶剂,具体的溶解步骤为:先加入原液总体积的一半的蒸馏水,再逐滴加入冰醋酸直至抗菌剂完全溶解,乙酸在原液中的终浓度不应超过 2.5 mg/L,冰醋酸即 99%(体积分数)的乙酸。
- ^b 每 1.5 mg Ceftobiprole 原液的配制:先加入二甲基亚砷与冰醋酸按体积比 10:1 混合的混合液 110 μL,用涡旋振荡器剧烈振荡 1 min,振荡结束 15 min 后用蒸馏水稀释至总体积 1.0 mL。
- ^c 粘菌素(Colistin)在抗菌剂敏感性试验中的具体形式为粘杆菌素硫酸盐,而不是粘杆菌素的甲基磺酸盐。
- ^d Dalbavancin 起始原液的配制浓度应不超过 1 600 mg/L,中间的 100×原液浓度的储存液应用二甲基亚砷稀释起始原液获得,最终原液为用补加有 0.002%(体积分数)的聚山梨醇酯-80 的阳离子调整过的 Mueller-Hinton 肉汤(CAMHB),从而使得最终二甲基亚砷在每孔中的浓度不会超过 1%。
- ^e 拉氧头孢磷酸氢二铵盐非常稳定,但其中的拉氧头孢几乎全部以 R 型异构体存在,而拉氧头孢的临床应用形式为 R 型与 S 型异构体的等摩尔混合物,故拉氧头孢磷酸氢二铵盐用 0.04 mol/L 的 HCl 充分溶解后应静置反应 1.5 h~2.0 h,使其中的 R 型拉氧头孢转化为 R 型与 S 型的等摩尔混合物。

3.3.3 工作液的配制

试验用抗菌剂工作液浓度范围的选择取决于试验菌株和抗菌剂本身这两方面的因素,所选浓度范围对于相应的参考菌株来说,必须能够确定所有可能得出的终点 MIC 值。抗菌剂工作液倍比稀释系列通常应用 Mueller-Hinton 肉汤配制并围绕 1 mg/L 展开。工作液系列不应通过逐步稀释获得。根据表 2 所述程序,如果抗菌剂溶液没有在指定储存条件下的稳定性信息,所有工作液均应当天配制当天用完。

表 2 肉汤稀释法敏感性试验中抗菌剂工作液稀释系列的配置方法

抗菌剂原液浓度/(mg/L)	原液体积/mL	肉汤体积 ^a /mL	工作液终浓度/(mg/L)
5 120	1	9	512
512	1	1	256
512	1	3	128
512	1	7	64
64	1	1	32
64	1	3	16
64	1	7	8
8	1	1	4
8	1	3	2
8	1	7	1
1	1	1	0.5
1	1	3	0.25
1	1	7	0.125
^a 稀释所用的肉汤即敏感性试验所用的肉汤。为了保持必要的浓度,在稀释抗菌剂之前,所有补加成分均应提前加好。			

3.3.4 微量稀释盘的制备

微量稀释盘每孔加入 2 倍的所需终浓度的抗菌剂工作液 50 μL,或每孔加入 100 μL 所需终浓度的抗菌剂工作液。

至少应保留一个加入 50 μL 或 100 μL 不含抗菌剂的培养基的孔以作为每株试验菌的生长对照。同样,还应设置一个仅加入 100 μL 无抗菌剂培养基但不接种的阴性对照孔。

3.3.5 微量稀释盘的储存

充装好的微量稀释盘可以立即使用,也可以储存起来,但储存时间最多不应超过 3 个月。除非稀释盘中的抗菌剂在温度高于-60 ℃时是稳定的,否则制备好的稀释盘应密封于塑料袋中迅速置于温度在-60 ℃以下的环境中进行储存。

尽管稀释盘中抗菌剂在冷冻状态下可稳定数月。但有些抗菌剂(如克拉维酸和亚胺培南)比其他抗菌剂更不稳定,必须在-60 ℃以下保存。此外,稀释盘不应存放于可自动除霜的冰箱里,融化的抗菌剂溶液不应被复冻,因为反复冻融可加速某些抗菌剂(特别是β-内酰胺类抗生素)的降解。

3.4 接种菌液的制备

3.4.1 概述

接种菌液的标准对于肉汤稀释法抗菌剂敏感性试验结果的准确性和可重复性是非常关键的。因此,每个分离菌株都应按照本参考程序进行纯度检测和可视的菌落计数。

接种菌液可通过稀释菌株的肉汤培养物或选取经非选择性琼脂培养基(可根据培养菌株的不同加入适宜的添加剂)培养过夜的菌落用肉汤或生理盐水直接悬浮而成。不论用哪种方法,培养过夜均建议从非选择性琼脂培养基上挑取 4~5 个纯培养菌落来进行,从而避免漏掉非典型的变异株。

接种菌液的终浓度应该为 5×10⁵ CFU/mL[2×10⁵ CFU/mL~8×10⁵ CFU/mL]。

3.4.2 肉汤增菌法

用无菌接种环从非选择性琼脂培养基上挑取 3~5 个菌落,转种至肉汤(如大豆胰蛋白酶消化肉汤或脑心浸提液肉汤)中,前提是肉汤不影响受试抗菌剂的作用。接种后的肉汤置 34 ℃~37 ℃环境中孵

育直到浊度大于等于 0.5 麦氏标准(McFarland standard),必要时可用无菌生理盐水或肉汤调节菌液浊度至 0.5 麦氏标准;这一步也可用分光光度计(波长选取 625 nm,1 cm 光径的比色杯,吸光度在 0.08~0.13 之间)或经校准过的合适的比浊仪来实现;此外,还可以通过调节菌悬液的浊度,使得透过菌悬液和 0.5McFarland 标准比浊管观察同一黑色线条获得相同清晰度来完成(菌悬液应用与 0.5McFarland 标准比浊管相同大小的试管盛装)。其他测量重复性好的方法也可以使用。

注:0.5McFarland 标准比浊管的配制:将 0.5 mL 整数倍体积的 0.048 mol/L 的 BaCl_2 溶液[即 11.72 g/L 的 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液]用 0.18 mol/L 的 H_2SO_4 溶液补至总体积为 100 mL,边加边均匀搅拌以维持均匀的浊度。

3.4.3 直接菌悬液法

用无菌接种环从非选择性琼脂培养基上挑取 3~5 个菌落(如果不需要更长的孵育时间,一般划线接种后的非选择性琼脂培养基在 34 °C~37 °C 环境中孵育 18 h~24 h 即可进行此步),悬于无菌肉汤(如大豆胰蛋白酶消化肉汤或脑心浸提液肉汤)或生理盐水中,按 4.4.2 中所描述的方法,调节菌悬液浊度至 0.5 麦氏标准。

对于所有细菌来说,最终接种液中活菌的准确浓度取决于过夜培养细菌的生长状态,尤其是苛养菌(如肺炎链球菌),培养时间较长可能会严重降低菌悬液中的活菌数量。

对于常见的细菌,按上述方法正确调节至 0.5 麦氏标准的菌悬液的细菌量约相当于 1×10^8 CFU/mL。

按上述步骤制备好的 0.5 麦氏标准初始菌液还需要用肉汤及微稀释盘孔中的抗菌剂工作液稀释成活菌浓度为 5×10^5 CFU/mL [2×10^5 CFU/mL~ 8×10^5 CFU/mL]的终溶液(即微稀释盘孔中的最终工作菌液)。具体的稀释步骤取决于所用试验菌株(的活菌计数)和接种方法。对许多革兰氏阴性细菌(如大肠埃希菌)而言,稀释步骤为先将 0.1 mL 标准菌悬液(0.5 麦氏标准, 1×10^8 CFU/mL)加到 9.9 mL 肉汤中,得到 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液(1:100 倍稀释),再将 50 μL 此浓度的菌悬液加入到微稀释盘孔中等体积(50 μL)抗菌剂工作液中,菌液的终浓度即为 5×10^5 CFU/mL。如果微稀释盘孔中事先已经装有 100 μL 抗菌剂工作液,则应制定适宜的稀释步骤使得最终工作菌液活菌浓度达到 5×10^5 CFU/mL,但必须确保向微稀释盘孔中加入的菌悬液体积不超过 5 μL 。而对于革兰氏阳性细菌来说,应按预试验中活菌计数结果对 0.5 麦氏标准的菌液进行较少的稀释。

3.5 微量稀释盘的接种

为了使每孔的活菌浓度数保持恒定,按标准操作程序配制的接种菌液应该在 30 min 内接种至微量稀释盘上。对于每孔抗菌剂工作液量为 50 μL 的稀释盘,每孔应接种 50 μL 菌液;而对于每孔抗菌剂工作液量为 100 μL 的稀释盘,则每孔接种的菌液体积最多不应超过 5 μL 。

试验菌株的初始菌液应进行活菌计数,以确保每孔最终工作菌液的活菌浓度约为 5×10^5 CFU/mL。具体即:稀释盘接种完成后迅速从生长对照孔中取 10 μL 用 10 mL 的肉汤或生理盐水稀释,再取此稀释终液 100 μL 涂布到适宜的琼脂平板表面,过夜孵育后进行菌落计数,每个平板菌落数量应该在 20~80 之间,如果菌落数量超出此范围,则该菌株的试验结果不能被采用。

3.6 微量稀释盘的孵育

接种好的微量稀释盘在孵育之前,应密封于聚乙烯袋中、或用密封盖或粘胶封条封住,以防止最终工作菌液在孵育过程中失水浓缩。为防止孵育不均匀,稀释盘叠放时高度不应超过 5 块。

如果没有其他特殊要求,接种好的微量稀释盘应在 34 °C~37 °C 的环境中孵育(18±2)h。注意不要在富含 CO_2 的环境中孵育。

3.7 结果的判读

只有当受试菌株在微量稀释盘的生长对照孔中充分生长(即阳性生长对照孔底部出现沉淀或液体混浊时)、未接种的或阴性生长对照孔没有细菌生长、接种菌液符合纯培养且活菌浓度符合要求,才可进行结果判读。每孔试验菌株的生长量和阳性生长对照孔进行比较, MIC 值即为能完全抑制细菌可见生长的最低抗菌剂浓度。

3.8 MIC 结果可能不能反映抗菌剂真实活性的特殊情况及其处理

在某些情况下,抗菌剂的 MIC 值不能真正反映其抗菌活性,因此对于这些抗菌剂试验结果的解释应做适当的修改以便于临床应用。有些情况下,参考方法需做修改,如改变孵育条件或调整培养基等。另外,用标准参考稀释法进行试验时,细菌的某些耐药机制,如 β -内酰胺酶、外排泵的表达和药物作用靶位的改变不一定总能表达,针对这些情况,对 MIC 结果的解释应慎重,或提供其他信息以指导临床抗感染用药。表 3 所列的几种抗菌剂-细菌组合应引起特别的关注。

表 3 特殊试验情况

抗菌剂种类	受试菌株种属	备 注
氨基糖苷类 (aminoglycosides)	肠球菌属	对于野生型粪肠球菌和屎肠球菌,庆大霉素和妥布霉素的 MIC 中值范围在 8 mg/L~16 mg/L,链霉素的 MIC 中值范围在 8 mg/L~32 mg/L。通常,氨基糖苷类抗菌剂和作用于细菌细胞壁的抗菌剂(如青霉素类、碳青霉烯类和糖肽类)联合使用具有协同效应,但对于对氨基糖苷类抗菌剂高耐药(MIC>500 mg/L)的肠球菌而言,则无协同效应。因此,在进行此类抗菌剂-细菌敏感性试验时,浓度稀释范围应设计得足够大,从而能检测到高水平耐药,试验过程中,庆大霉素的孵育时间应为 24 h,链霉素应为 48 h。
β -内酰胺类 (β -lactams)	所有细菌	如果细菌产生某些 β -内酰胺酶,则 MIC 值可能不能用来预测该抗菌剂的疗效。因此,对 MIC 结果的解释要慎重。
甲氧西林 (methicillin) 苯唑西林 (oxacillin)	葡萄球菌属	肉汤微量稀释法检测 mecA 基因介导的耐药可能不可靠,下面的各种关于试验方法的修改可能有助于这类耐药的检测: —在肉汤中加入 NaCl,使其终浓度达到 20 g/L; —试验孵育时间不少于 24 h; —孵育温度在 30 °C~35 °C 之间; —用直接菌悬液法制备接种菌液,而不用肉汤增菌法。 检测 mecA 基因是检测甲氧西林/苯唑西林耐药性的参考方法。
达托霉素 (daptomycin)	所有细菌	培养基中 Ca^{2+} 的终浓度应补充到 50 mg/L。
磷霉素 (fosfomycin)	所有细菌	肉汤微量稀释法的检测结果可能不可靠。应选琼脂稀释法作为参考方法 ^{[5][9]} ,试验用琼脂培养基中应补充终浓度为 25 mg/L 的 6-磷酸-葡萄糖。
糖肽类 (glycopeptides)	所有细菌	为保证 MIC 结果的稳定可靠,接种后应孵育 24 h 后判读结果。
糖肽类 (glycopeptides)	金黄色葡萄球菌	肉汤微量稀释法不能可靠的检测出耐糖肽类抗菌剂的中介金黄色葡萄球菌。
环甘氨酸类 (glycylcyclines) 替加环素 (tigecycline)	所有细菌	培养基必须新鲜配制,12 h 内使用。
林可酰胺类 (lincosamides)	所有细菌	如果细菌可诱导产生甲基化酶(MLS _B 耐药),则 MIC 结果可能不能预测临床的实际疗效。
磺胺类和甲氧苄啶 (sulphonamides and trimethoprim)	所有细菌	MIC 值是指与生长对照孔比较,能抑制 80%细菌生长的最低药物浓度。

4 质量控制

试验结果的质量应通过同时进行的质控菌株的敏感性试验(见表4)来监测。储存质控菌株应以冻干粉形式保存或在 $\leq -60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中冷冻保存,质控菌株的工作培养物可通过参考菌株的储存培养物在非选择性琼脂培养基上连续传代培养两次获得。工作培养物只能再传代一次,且使用时间不能超过一周。每个MIC测定日至少应选取两株相同类型的质控菌株和日常标本共同进行培养和抗菌剂敏感性试验,且各质控菌株对各抗菌剂的MIC检测结果应该在表4规定的范围内。

表4 质控菌株的MIC(mg/L)范围

抗菌剂	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 ^a NCTC 12973 ^b CIP 103429 ^c DSM 2569 ^d	粪肠球菌 ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	大肠埃希菌 ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	大肠埃希菌 ATCC 35218 DSM 5564	肺炎链球菌 ATCC 49619 NCTC 12977
阿米卡星 (amikacin)	1~4	64~256	0.5~4	1~4	—	—
阿莫西林/克拉维酸 (amoxicillin/clavulanic acid)(固定比例2:1)	0.12/0.06~ 0.5/0.25	0.25/0.12~ 1.0/0.5	2/1~8/4	—	4/2~16/8	0.03/0.015~ 0.12/0.06
阿莫西林 ^a (amoxicillin)	0.25~1	—	4~16	—	—	0.03~0.12
氨苄西林 (ampicillin)	0.5~2	0.5~2	2~8	—	—	0.06~0.25
氨苄西林/舒巴坦 (ampicillin/sulbactam) (固定比例2:1)	—	—	2/1~8/4	—	8/4~32/16	—
阿奇霉素 (azithromycin)	0.5~2	—	—	—	—	0.06~0.25
阿洛西林 (azlocillin)	2~8	1~4	8~32	2~8	—	—
氮曲南 (aztreonam)	—	—	0.06~0.25	2~8	—	—
羧苄青霉素 (carbenicillin)	2~8	16~64	4~16	16~64	—	—
头孢克洛 (cefaclor)	1~4	—	1~4	—	—	1~4
头孢孟多 (cefamandole)	0.25~1	—	0.25~1	—	—	—
头孢唑啉 (cefazolin)	0.25~1	—	1~4	—	—	—
头孢地尼 (cefdinir)	0.12~0.5	—	0.12~0.5	—	—	0.03~0.25
头孢托仑 (cefditoren)	0.25~2	—	0.12~1	—	—	0.015~0.12

表 4 (续)

抗菌剂	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 ^a NCTC 12973 ^b CIP 103429 ^c DSM 2569 ^d	粪肠球菌 ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	大肠埃希菌 ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	大肠埃希菌 ATCC 35218 DSM 5564	肺炎链球菌 ATCC 49619 NCTC 12977
头孢吡肟 (cefepime)	1~4	—	0.015~0.12	1~8	—	0.03~0.25
头孢他美 (cefetamet)	—	—	0.25~1	—	—	0.5~2
头孢克肟 (cefixime)	8~32	—	0.25~1	—	—	—
头孢美唑 (cefmetazole)	0.5~2	—	0.25~1	>32	—	—
头孢尼西 (cefonicid)	1~4	—	0.25~1	—	—	—
头孢哌酮 (cefoperazone)	1~4	—	0.12~0.5	2~8	—	—
头孢噻肟 (cefotaxime)	1~4	—	0.03~0.12	8~32	—	0.03~0.12
头孢替坦 (cefotetan)	4~16	—	0.06~0.25	—	—	—
头孢西丁 (cefoxitin)	1~4	—	2~8	—	—	—
头孢泊肟 (cefpodoxime)	1~8	—	0.25~1	—	—	0.03~0.12
头孢丙烯 (cefprozil)	0.25~1	—	1~4	—	—	0.25~1
头孢他啶 (ceftazidime)	4~16	—	0.06~0.5	1~4	—	—
头孢布烯 (ceftibuten)	—	—	0.12~0.5	—	—	—
头孢唑肟 (ceftizoxime)	2~8	—	0.03~0.12	16~64	—	0.12~0.5
ceftobiprole	0.25~1	0.06~0.5	0.03~0.12	1~4	—	0.004~ 0.003
头孢曲松 (ceftriaxone)	1~8	—	0.03~0.12	8~64	—	0.03~0.12
头孢呋辛 (cefuroxime)	0.5~2	—	2~8	—	—	0.25~1
头孢力新 ^b (cephalexin ^b)	—	—	4~16	—	—	—
头孢噻吩 (cephalothin)	0.12~0.5	—	4~16	—	—	0.5~2

表 4 (续)

抗菌剂	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 ^a NCTC 12973 ^b CIP 103429 ^c DSM 2569 ^d	粪肠球菌 ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	大肠埃希菌 ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	大肠埃希菌 ATCC 35218 DSM 5564	肺炎链球菌 ATCC 49619 NCTC 12977
氯霉素 (chloramphenicol)	2~16	4~16	2~8	—	—	2~8
西诺沙星 (cinoxacin)	—	—	2~8	—	—	—
环丙沙星 (ciprofloxacin)	0.12~0.5	0.25~2	0.004~0.015	0.25~1	—	—
克拉霉素 (clarithromycin)	0.12~0.5	—	—	—	—	0.03~0.12
克林沙星 (clinafloxacin)	0.008~0.06	0.03~0.25	0.002~0.015	0.06~0.5	—	0.03~0.12
克林霉素 (clindamycin)	0.06~0.25	4~16	—	—	—	0.03~0.12
粘菌素 (colistin)			0.25~1	0.25~2		
dalbavancin	0.03~0.12	0.03~0.12				0.008~0.03
达托霉素 ^e (daptomycin ^e)	0.25~1	1~4	—	—	—	0.06~0.5
地红霉素 (dirithromycin)	1~4	—	—	—	—	0.06~0.25
多尼培南 (doripenem)	0.015~0.06	1~4	0.015~0.06	0.12~0.5	—	0.03~0.12
强力霉素 (doxycycline)	0.12~0.5	2~8	0.5~2	—	—	0.015~0.12
依诺沙星 (enoxacin)	0.5~2	2~16	0.06~0.25	2~8	—	—
厄他培南 (ertapenem)	0.06~0.25	4~16	0.004~0.015	2~8	—	0.03~0.25
红霉素 (erythromycin)	0.25~1	1~4	—	—	—	0.03~0.12
法罗培南 (faropenem)	0.03~0.12		0.25~1			0.03~0.25
氟罗沙星 (fleroxacin)	0.25~1	2~8	0.03~0.12	1~4	—	—
夫西地酸 ^e (fusidic acid ^e)	0.06~0.25	1~4	—	—	—	—
加雷沙星 (garenoxacin)	0.004~0.03	0.03~0.25	0.004~0.03	0.5~2	—	0.015~0.06

表 4 (续)

抗菌剂	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 ^a NCTC 12973 ^b CIP 103429 ^c DSM 2569 ^d	粪肠球菌 ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	大肠埃希菌 ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	大肠埃希菌 ATCC 35218 DSM 5564	肺炎链球菌 ATCC 49619 NCTC 12977
加替沙星 (gatifloxacin)	0.03~0.12	0.12~1.0	0.008~0.03	0.5~2	—	0.12~0.5
gemifloxacin	0.008~0.03	0.015~0.12	0.004~0.015	0.25~1	—	0.008~0.03
庆大霉素 (gentamicin)	0.12~1	4~16	0.25~1	0.5~2	—	—
格帕沙星 (grepafloxacin)	0.03~0.12	0.12~0.5	0.004~0.03	0.25~2.0	—	0.06~0.5
亚胺培南 (imipenem)	0.015~0.06	0.5~2	0.06~0.25	1~4	—	0.03~0.12
卡那霉素 (kanamycin)	1~4	16~64	1~4	—	—	—
左旋氧氟沙星 (levofloxacin)	0.06~0.5	0.25~2	0.008~0.06	0.5~4	—	0.5~2
利奈唑烷 (linezolid)	1~4	1~4	—	—	—	0.5~2
洛美沙星 (lomefloxacin)	0.25~2	2~8	0.03~0.12	1~4	—	—
氯碳头孢 (loracarbef)	0.5~2	—	0.5~2	>8	—	2~8
美西林 (mecillinam)	—	—	0.03~0.25	—	—	—
美洛培南 (meropenem)	0.03~0.12	2~8	0.008~0.06	0.25~1	—	0.06~0.25
甲氧西林 (methicillin)	0.5~2	>16	—	—	—	—
美洛西林 (mezlocillin)	1~4	1~4	2~8	8~32	—	—
米诺环素 (minocycline)	0.06~0.5	1~4	0.25~1	—	—	—
拉氧头孢 (moxalactam)	4~16	—	0.12~0.5	8~32	—	—
莫西沙星 (moxifloxacin)	0.015~0.12	0.06~0.5	0.008~0.06	1~8	—	0.06~0.25
莫匹罗星 ^e (mupirocin ^e)	0.06~0.25	—	—	—	—	—
萘夫西林 (nafcillin)	0.12~0.5	2~8	—	—	—	—

表 4 (续)

抗菌剂	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 ^a NCTC 12973 ^b CIP 103429 ^c DSM 2569 ^d	粪肠球菌 ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	大肠埃希菌 ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	大肠埃希菌 ATCC 35218 DSM 5564	肺炎链球菌 ATCC 49619 NCTC 12977
萘啶酸 (nalidixic acid)	—	—	1~4	—	—	—
奈替米星 (netilmicin)	≤0.25	4~16	≤0.5~1	0.5~8	—	—
呋喃妥因 (nitrofurantoin)	8~32	4~16	4~16	—	—	4~16
诺氟沙星 (norfloxacin)	0.5~2	2~8	0.03~0.12	1~4	—	2~8
氧氟沙星 (ofloxacin)	0.12~1	1~4	0.015~0.12	1~8	—	1~4
奥利万星 (oritavancin)	0.5~2	0.12~1	—	—	—	0.008~0.06
苯唑西林 (oxacillin)	0.12~0.5	8~32	—	—	—	—
青霉素 (penicillin)	0.25~2	1~4	—	—	—	0.25~1
哌拉西林 (piperacillin)	1~4	1~4	1~4	1~8	—	—
哌拉西林/他佐巴坦 (piperacillin/Tazobactam) (他佐巴坦的固定浓度 为 4 mg/L)	0.25/4~2/4	1/4~4/4	1/4~4/4	1/4~8/4	0.5/4~2/4	—
吡哌酸 ^e (pipemidic acid ^e)	—	—	0.5~2	—	—	—
多粘菌素 B (polymyxin B)			0.25~2	0.25~2		
奎奴普丁-达福普汀 (quinupristin-dalfopristin)	0.25~1	2~8	—	—	—	0.25~1
利福平 (rifampicin)	0.004~0.015	0.5~4	4~16	16~64	—	0.015~0.06
司帕沙星 (sparfloxacin)	0.03~0.12	0.12~0.5	0.004~0.015	0.5~2	—	0.12~0.5
链霉素 ^e (streptomycine)	—	—	4~16	—	—	—
磺胺异恶唑 (sulfisoxazole)	32~128	32~128	8~32	—	—	—

表 4 (续)

抗菌剂	金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 ^a NCTC 12973 ^b CIP 103429 ^c DSM 2569 ^d	粪肠球菌 ATCC 29212 NCTC 12697 CIP 103214 DSM 2570	大肠埃希菌 ATCC 25922 NCTC 12241 CIP 7624 DSM 1103	铜绿假单胞菌 ATCC 27853 NCTC 12973 CIP 76110 DSM 1117	大肠埃希菌 ATCC 35218 DSM 5564	肺炎链球菌 ATCC 49619 NCTC 12977
替考拉宁 (teicoplanin)	0.25~1	0.06~0.25	—	—	—	—
telavancin	0.12~1	0.12~0.5	—	—	—	0.002~ 0.015
泰利霉素 (telithromycin)	0.06~0.25	0.015~0.12	—	—	—	0.004~0.03
四环素 (tetracycline)	0.12~1	8~32	0.5~2	8~32	—	0.12~0.5
替卡西林 (ticarcillin)	2~8	16~64	4~16	8~32	—	—
甲氧苄啶-磺胺甲恶唑 (trimethoprim- sulfamethoxazole) (固定比例 1:19)	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	8/152~32/608	—	0.12/2.4~ 1/19
丙大观霉素 (trospoctomycin)	2~16	2~8	8~32	—	—	1~4
曲氟沙星 (trovafloxacin)	0.008~0.03	0.06~0.25	0.004~0.015	0.25~2	—	0.06~0.25
万古霉素 (vancomycin)	0.5~2	1~4	—	—	—	0.12~0.5

注：除了有标注的值，MIC 质控范围是经 CLSI(即 NCCLS)许可来源于其 M100-S16 文件(抗菌剂敏感性试验执行标准；第 16 版信息增刊)^[7]。除了肺炎链球菌 ATCC 49619 的 MIC 质控范围是用补加有 2.5%~5% 溶血马血的阳离子调整过的 Mueller-Hinton 肉汤测得的以外，其他所有质控菌株的 MIC 质控范围均是用阳离子调整过的 Mueller-Hinton 肉汤测得的。由于该部分信息是定期更新的，所以请实验操作者经常查阅可从 CLSI(即 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087, USA.) 获得的最新版本，从而得到更新的 MIC 质控范围。

^a ATCC: American Type Culture Collection(美国菌种收藏中心), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA

^b NCTC: National Collection of Type Culture(英国国家菌种收藏中心), Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT, UK

^c CIP: Collection de Institut Pasteur(法国巴斯德研究所菌株收藏中心), 25-28 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 France

^d DSMZ: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 16, D-38124 Braunschweig, Germany(Germany)

^e MIC 范围来源于 EUCAST 发布的 MIC 靶值(Clin. Microbiol. Infec. 9:1-7, 2003)。请登陆 EUCAST 网站 <http://www.eucast.org> 以获得 EUCAST 最新公布的 MIC 质控靶值。

^f 达托霉素(Daptomycin)的 MIC 质控范围是用添加了终浓度为 50mg/L 钙离子的 Mueller-Hinton 肉汤测得的。

附 录 A

(规范性附录)

对于 Mueller-Hinton 肉汤的要求

A.1 概述

除了二价阳离子以外的添加剂及其他附加成分,如果不是细菌生长所必需的,均不用添加。

A.2 非苛养菌的抗菌剂敏感性试验用 Mueller-Hinton 肉汤

A.2.1 概述

非苛养菌的抗菌剂敏感性试验用标准培养基为 Mueller-Hinton 肉汤,相应的基础培养基可按如下配方配制^[10]:

用 300 g 牛肉制备的脱水牛肉浸膏
 酸水解酪蛋白 17.5 g
 玉米淀粉 1.5 g
 加蒸馏水 1 000 mL
 pH 7.2~7.4

A.2.2 添加的阳离子和其他成分

肉汤培养基中应含有足够浓度的阳离子以满足细菌充分生长的需要,同时确保操作者所测得的质控菌株的 MIC 值应在表 4 中所示的相应范围中。

应对新制备批的 Mueller-Hinton 肉汤培养基中的阳离子浓度进行分析,具体方法可采用电感耦合等离子体光谱法(ICP-S)或火焰原子吸收光谱法(FAAS)^[11]。

如需添加钙离子或镁离子,先制备 10 mg/L 的氯化钙溶液(称取 3.68 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 mL 去离子水中)或氯化镁溶液(称取 8.3 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 mL 去离子水中),膜过滤除菌后置于 2℃~8℃ 保存。每升肉汤培养基中加入 0.1 mL 上述 10 mg/L 的阳离子溶液(在 2℃~8℃ 条件下,边加边搅拌混匀),可使阳离子浓度增加 1 mg/L。

实验证明,对大部分抗菌剂-细菌组合来说,调节培养基中的钙离子浓度到 20 mg/L~25 mg/L 和镁离子浓度到 10 mg/L~12.5 mg/L,可获得准确的质控结果^[12,13]。

对于达托霉素,培养基中的钙离子终浓度必须达到 50 mg/L^[11]。

对于亚胺培南及美罗培南这两种碳青霉烯类抗生素,培养基中锌离子的终浓度应小于 3 mg/L^[12]。而其他碳青霉烯类抗生素的抗菌活性对锌离子质量浓度的要求虽然没有文献报道,但可参考该范围。

A.2.3 链球菌的抗菌剂敏感性试验用 Mueller-Hinton 肉汤

链球菌药敏试验所用的阳离子调整过的 Mueller-Hinton 肉汤培养基中还需添加溶血马血至终浓度 2.5%(体积分数)~5%(体积分数)。马血应从有资质的供应商那里获得且产品应有红细胞压积的信息(不少于 30%)。通过无菌操作将去纤维马血和无菌蒸馏水等体积混合,在 -20℃ 条件下反复冻融直到红细胞完全溶解(大约需要 5~7 个循环),离心取上清,即为 50%(体积分数)的溶血马血储存液。

A.2.4 补充性培养基问题

A.2.4.1 概述

目前,还不能发现在需氧菌及兼性厌氧菌抗菌剂敏感性试验及其质量控制中可能出现的所有问题。培养基对试验结果影响的某些数据存在于未发表的资料中,新抗菌剂将对培养基的标准制备提出挑战。操作者应确保其满足标准质量控制参数,对于所出现的新问题应及时沟通交流,从而使该部分内容得以定期更新。

A.2.4.2 磺胺类和甲氧苄啶

对于磺胺类和甲氧苄啶的敏感性试验,试验用培养基中所含的胸腺嘧啶脱氧核苷的质量浓度应小于 0.03 mg/L,这种培养基也适用于其他抗菌剂的敏感性试验。

A.2.4.3 替加环素

替加环素应在 Mueller-Hinton 肉汤培养基制备好后的 12 h 内加入其中制成工作液,分装好的微量稀释盘应立即冻存。

A.2.4.4 Dalbavancin

对于 Dalbavancin 的敏感性试验,试验用阳离子调整过的 Mueller-Hinton 肉汤培养基中还应添加聚山梨醇酯-80 至终浓度为 0.002%(体积分数)。

参 考 文 献

- [1] Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (1966), *Technical recommendations for in vitro susceptibility testing*, Clin Microbiol Infect. 2 (suppl 1): S11-25.
- [2] Deutsches Institut für Normung (1999), *Medical microbiology—Susceptibility testing of pathogens to antimicrobial agents—Part 4 : Evaluation classes of the minimum inhibitory concentration*, DIN, Berlin, pp. 58940-4.
- [3] OLSSON-LILJEQUIST, B. , LARSSON, P. , WALDER, M. and MIORNER, H. (1997), *Antimicrobial susceptibility testing in Sweden III . Methodology for susceptibility testing*, Scand J Infect Dis. 105 (suppl): 13-23.
- [4] ANDREWS, J. M. (2001), *Determination of minimum inhibitory concentrations*, J Antimicrob Chemother. 48 Suppl. S1: 5-16.
(for latest version, see http://www.bsac.org.uk/_db/_documents/Chapter_two.pdf)
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute (2006), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 7th edn. Approved Standard M7-A7, Wayne, PA.
- [6] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2003), *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth microdilution*, EUCAST Discussion.
Document E. Def 5. 1. Clinl Microbiol Infect; 9 (issue 7 insert): 1-10
(see <http://www.escmid.org/Seviware/Script/SvFiles.asp?Ref=359>)
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (2006), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 16th edn. Informational Supplement M100-S16, Wayne, PA.
- [8] ERICSSON, H. M. , SHERRIS, J. C. (1971), *Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study*, Acta Pathol Microbiol Scand. Sect B 217 (suppl): 1-90.
- [9] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2000), *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution*, EUCAST Definitive Document E. Def 3. 1.
(for latest version, see <http://www.escmid.org/sites/science/eucast/pages.asp?m=Programmes>)
- [10] MUELLER, J. H. and HINTON, J. (1941), *A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus*, Proc Soc ExperBiol Med. 48: 330.
- [11] MORRISON, G. H. (1969), *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (14) 28A, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [12] BARRY, A. L. , MILLER, G. H. , THORNSBERRY, C. et al. (1987), *Influence of cation supplements on activity of netilmicin against Pseudomonas aeruginosa in vitro and in vivo*, Antimicrob Agents Chemother. 31:1514-1518.
- [13] BARRY, A. L. , RELLER, L. B. , MILLER, G. H. et al. (1992), *Revision of standards for adjusting the cation content of Mueller-Hinton broth for testing susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides*, J. Clin Microbiol. 30: 585-589.
- [14] FUCHS, P. C. , BARRY, A. L. and BROWN, S. D. (2000), *Daptomycin susceptibility tests : interpretive criteria , quality control and effect of calcium on in vitro tests*, Diag Microbiol Infect Dis.

38: 51-58.

[15] DALY, J. S. , DODGE, R. A. , GLEW, R. H. , SOJA, D. T. , DELUCA, B. A. and HEBERT, S. (1997), *Effect of zinc concentration in Mueller-Hinton agar on susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to imipenem*, J. Clin Microbiol. 35:1027-1029.

[16] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, *Clinical breakpoints and epidemiological cut-off values*.

(for latest version, see <http://www.eschmid.org/sites/science/eucast/pages.asp?m=Programmes>)

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
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

YY/T 0688.1—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.75 字数 46 千字

2009年5月第一版 2009年5月第一次印刷

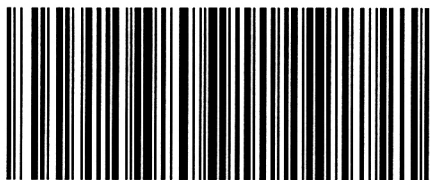
*

书号:155066·2-19612 定价 22.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



YY/T 0688.1—2008