

“CHINET 中国细菌耐药监测网”技术方案

(2020 年版)

细菌性感染遍布于内、外、妇、儿等临床各科，针对病原菌正确选用抗菌药是治疗有效的关键。进行细菌耐药监测，为临床提供合理用药依据，是世界卫生组织为遏制细菌耐药性发生发展的战略措施。根据我国卫生部卫办医发〔2012〕84号《抗菌药临床应用管理办法》要求，二级以上医院应当建立临床微生物室，开展细菌耐药监测工作。由于不同地区的二级医院的科室设置、收治的感染和病种、病原菌及其对抗菌药的敏感性等与三级医院不同，因此有必要同时对二级医院、三级医院，包括儿童医院开展细菌耐药性监测。“CHINET中国细菌耐药监测网”从2005年建网初期的8所医院，发展目前已有50所医疗机构参与（PC端：www.chinets.com；移动端：m.chinets.com），年监测菌株数量达20万株。为进一步做好细菌耐药监测工作，在历年技术方案基础上，结合当前耐药菌的发展趋势及合理用药指导原则，整理形成“CHINET中国细菌耐药监测网”技术方案。

本技术方案适用于“CHINET中国细菌耐药监测网”和“上海市细菌真菌耐药监测网”各成员单位。各成员单位按此技术方案中要求的药敏试验材料、监测方法和判断标准进行细菌耐药监测并向临床报告药敏试验结果。

一. 方法学

采用纸片扩散法（Kirby-Bauer）、自动化仪器法、微量稀释法或 E-test，所有药敏试验方法应遵循以下原则。

1. 药敏试验方法必须遵循 CLSI 文件当年规定的原则和质控要求；
2. 采用自动化仪器法的单位，须按技术方案要求补充仪器未包含的抗菌药品种；
3. 自动化仪器药敏卡上的抗菌药浓度范围须覆盖 CLSI 判断标准。

二. 抗菌药监测品种

1. **肠杆菌目细菌**：阿米卡星、庆大霉素、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦*、头孢唑啉、头孢呋辛、头孢西丁、头孢噻肟（或头孢曲松）、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星（或左氧氟沙星）、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、呋喃妥因、磷霉素**、多黏菌素 B 或黏菌素***、替加环素****、头孢他啶/阿维巴坦*****。

备注：

*参考头孢哌酮的标准（纸片扩散法抑菌圈直径≤15mm 耐药、16-20mm 中介、≥21mm

敏感；稀释法 MIC $\geq$ 64 μ g/ml 耐药、32 μ g/ml 中介、 $\leq$ 16 μ g/ml 敏感)；

**报告尿标本分离大肠埃希菌的磷霉素药敏试验结果；其他细菌建议积累监测资料。

***黏菌素和多黏菌素 B 为等效药物，黏菌素 MIC 结果可预报多黏菌素 B 的结果。

****按 FDA 判断标准报告药敏试验结果 (MIC 为敏感 $\leq$ 2mg/L、耐药 $\geq$ 8mg/L；纸片法抑菌圈直径 $\geq$ 19mm 为敏感、 $\leq$ 14mm 为耐药)；因自动化仪器或纸片扩散法在检测替加环素对病原菌的敏感性时可能会出现假中介和假耐药结果，在报告此结果前需采用其他方法进行复核确认，包括肉汤微量稀释法、MTS 法和纸片扩散法 (含替加环素复敏液)。

*****对于头孢他啶-阿维巴坦抑菌圈直径为 20-22 mm 的菌株，需用 MIC 试验确认，以避免报告假敏感或假耐药结果。

2. **沙门菌属和志贺菌属细菌：**氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢曲松*、左氧氟沙星** (或环丙沙星)、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、氯霉素和阿奇霉素***

备注：

* $\leq$ 16 岁骨骼系统未发育完全的小儿应报头孢曲松的结果；

**注意要使用喹诺酮类药物对沙门菌属的判断标准

***阿奇霉素 CLSI 目前仅有对伤寒沙门菌的判断标准，其他沙门菌属和志贺菌属细菌仅限于 ECV 折点

3. **铜绿假单胞菌：**阿米卡星、庆大霉素、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦*、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、多黏菌素 B 或黏菌素**、头孢他啶-阿维巴坦

备注：

*参考头孢哌酮 (2010 年 CLSI M100-S20) 的标准 (纸片法抑菌圈直径 $\leq$ 15mm 耐药、16-20mm 中介、 $\geq$ 21mm 敏感；稀释法 MIC $\geq$ 64 μ g/ml 耐药、32 μ g/ml 中介、 $\leq$ 16 μ g/ml 敏感)；

**目前 CLSI 仅有 MIC 法判断标准，不宜采用纸片扩散法和琼脂稀释法；肉汤微量稀释法所用 96 孔 U 型底药敏板不可用吐温-80 包埋处理。

4. **不动杆菌属：**阿米卡星、庆大霉素、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦*、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星或左氧氟沙星、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、米诺环素、多黏菌素 B 或黏菌素**、替加环素***

备注：

*参考头孢哌酮的标准(纸片扩散法抑菌圈直径 $\leq 15\text{mm}$ 耐药、 $16\text{-}20\text{mm}$ 中介、 $\geq 21\text{mm}$ 敏感; 稀释法 $\text{MIC} \geq 64\mu\text{g/ml}$ 耐药、 $32\mu\text{g/ml}$ 中介、 $\leq 16\mu\text{g/ml}$ 敏感);

**目前 CLSI 仅有 MIC 法判断标准。

***按 FDA 判断标准报告药敏试验结果 (MIC 法 $\leq 2\text{mg/L}$ 敏感、 $R \geq 8\text{mg/L}$ 耐药; 纸片法抑菌圈直径 $\geq 16\text{mm}$ 敏感、 $\leq 12\text{mm}$ 耐药)

5. **嗜麦芽窄食单胞菌**: 头孢他啶*、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、左氧氟沙星、米诺环素、氯霉素 *

备注:

*目前 CLSI 仅有 MIC 法标准。

6. **洋葱伯克霍尔德菌**: 头孢他啶、美罗培南、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、米诺环素、氯霉素*、左氧氟沙星*

备注:

*目前 CLSI 仅有 MIC 法标准。

7. **其他非肠杆菌目细菌***: 阿米卡星、庆大霉素、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦**、头孢噻肟 (或头孢曲松)、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、氯霉素、多黏菌素 B (或黏菌素)

备注:

*纸片法结果不可靠, 需用 MIC 方法测定;

**参考头孢哌酮的标准(纸片扩散法抑菌圈直径 $\leq 15\text{mm}$ 耐药、 $16\text{-}20\text{mm}$ 中介、 $\geq 21\text{mm}$ 敏感; 稀释法 $\text{MIC} \geq 64\mu\text{g/ml}$ 耐药、 $32\mu\text{g/ml}$ 中介、 $\leq 16\mu\text{g/ml}$ 敏感);

8. **流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌***: 氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦 (或阿莫西林/克拉维酸)、头孢呋辛、头孢曲松 (或头孢噻肟) **、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、左氧氟沙星 (或莫西沙星) **、阿奇霉素**和氯霉素。

备注:

*药敏试验受条件限制的单位, 须检测 β -内酰胺酶, 菌株保存后统一运送至中心实验室进行抗菌药敏感性试验; β -内酰胺酶阴性但氨苄西林耐药株亦需统一运送至中心实验室进行复核确认。

**罕见耐药菌株。发现此类耐药菌株需再次菌种鉴定, 并用 MIC 方法测定。如确认需将菌株保存后统一运送至中心实验室进行复核确认。

9. **卡他莫拉菌***: 阿莫西林-克拉维酸、头孢呋辛**、头孢曲松 (或头孢噻肟) ***、甲

氧苄啶/磺胺甲噁唑、左氧氟沙星***、阿奇霉素***、克林霉素**、氯霉素

备注:

*药敏试验受条件限制的单位, 须检测 β -内酰胺酶, 菌株保存后统一运送至中心实验室进行抗菌药敏感性试验;

**目前仅有 MIC 法药敏试验判断标准;

***目前仅有 MIC 法敏感标准, 罕见耐药株;

10. 淋病奈瑟菌属*: 青霉素、头孢曲松、头孢克肟、四环素、环丙沙星、大观霉素

备注:

*无需常规药敏试验, 但在治疗失败时应考虑进行药敏试验。

11. 脑膜炎奈瑟球菌*: 青霉素、头孢曲松或头孢噻肟、美罗培南、阿奇霉素**、米诺环素**、环丙沙星**、氯霉素**、利福平**

备注:

*分离到此菌株应按生物安全条例立即送上级 CDC 临床微生物实验

**仅适用于脑膜炎球菌感染密切接触者预防, CLSI 的标准不适用于侵袭性脑膜炎球菌感染者治疗

12. 葡萄球菌属: 庆大霉素、青霉素*、头孢西丁(苯唑西林**)、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、红霉素、克林霉素(含 D 试验)、万古霉素***、利奈唑胺****、左氧氟沙星、利福平和磷霉素*****

备注:

*青霉素抑菌圈直径 $\geq 29\text{mm}$ 或 $\text{MIC} \leq 0.12\mu\text{g/mL}$ 时, 报告结果前需进行青霉素酶诱导试验;

**不同葡萄球菌属细菌检测甲氧西林耐药菌株时, 需选择合适的抗菌药物(参考表 2)。

***万古霉素对葡萄球菌属的药敏需采用稀释法测定 MIC;

****对于万古霉素、利奈唑胺不敏感的菌株需重复鉴定和药敏试验, 不敏感菌株需统一运送至中心实验室进行复核确认。

*****目前 CLSI 无该抗菌药判断标准, 建议积累监测资料;

13. 肠球菌属*: 庆大霉素(120 μg /片)、氨苄西林、左氧氟沙星、万古霉素**、利奈唑胺**、呋喃妥因***和磷霉素***。

备注:

*除高浓度庆大霉素和链霉素外，该属细菌不适宜进行对氨基糖苷、头孢菌素类、克林霉素和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑体外药敏试验。虽然它们中的某些菌株可表现体外药敏试验时的敏感性，但在临床上并不有效，故不应该向临床报告敏感。

**对万古霉素或利奈唑胺不敏感的菌株需重复菌种鉴定和药敏试验，包括 MIC 测定（E-test 或标准肉汤微量稀释法）以及耐药基因分子分型，亦可将菌株统一运送至中心实验室统一进行复核确认。

***药敏试验报告仅限于尿液标本分离的粪肠球菌

14.肺炎链球菌：青霉素(苯唑西林 1 μ g /片) *、阿莫西林-克拉维酸**、头孢噻肟***、头孢曲松***、美罗培南***、红霉素、克林霉素、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑、左氧氟沙星或莫西沙星、万古霉素、利奈唑胺、氯霉素、利福平、。

备注：

*当 1 μ g /片苯唑西林的抑菌圈直径 $\geq$ 20mm 时报告该菌对青霉素敏感，若 $\leq$ 19mm 时，需测定青霉素 MIC 值；

**目前 CLSI 只有 MIC 判断标准；

***分离自脑脊液的肺炎链球菌，应同时采用稀释法或 Etest 测定青霉素、头孢噻肟、头孢曲松和美罗培南以及万古霉素等抗生素的 MIC 值。

15. β -溶血性链球菌*：青霉素、头孢曲松、红霉素、克林霉素、万古霉素、利奈唑胺、左氧氟沙星、氯霉素

备注：

* β -溶血包括具有 A(化脓链球菌)、C 或 G 群抗原形成较大菌落的化脓性链球菌和具有 B 群(无乳链球菌)抗原的菌株。对来自围产期妇女阴道分泌物的 B 群(无乳链球菌)要求进行“D 试验”，并将“D 试验”结果报告临床。

16. 草绿色链球菌*：青霉素**、头孢曲松、万古霉素、利奈唑胺、红霉素、克林霉素、左氧氟沙星、氯霉素

备注：

*具有 A、C、F 或 G 群抗原(咽峡炎链球菌，以前称为米勒链球菌)形成较小菌落 β -溶血的菌株被考虑分到草绿色菌群，应使用草绿色菌群解释标准；草绿色菌群也包括缓症链球菌、口腔链球菌、血液链球菌、唾液链球菌、中间型链球菌、星座链球菌、变异链球菌和牛链球菌；

**对分离自血液与正常无菌部位(如，脑脊液、血液、骨)的草绿色链球菌，应该用 MIC

法测试氨苄西林和青霉素的 MIC 值。

三. 监测菌种要求

1. 需监测的临床分离菌（表 1），必须鉴定到种；
2. 葡萄球菌属细菌必须明确属甲氧西林（苯唑西林）耐药或敏感的属性；
3. 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌和奇异变形杆菌应明确头孢曲松或头孢噻肟的敏感性；
4. 肺炎链球菌须明确其对青霉素的敏感性；
5. 结核分枝杆菌和厌氧菌不列入细菌耐药监测范围

表 1. 建议监测的细菌

英文名称	中文名称
<i>Acinetobacter</i> spp.	不动杆菌属
<i>Burkholderia cepacia</i>	洋葱伯克霍尔德菌
<i>Citrobacter</i> spp.	枸橼酸杆菌属
<i>Enterobacter</i> spp.	肠杆菌属
<i>Enterococcus</i> spp.	肠球菌属
<i>Escherichia coli</i>	大肠埃希菌
<i>Haemophilus influenzae</i>	流感嗜血杆菌
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	副流感嗜血杆菌
<i>Klebsiella</i> spp.	克雷伯菌属
<i>Moraxella catarrhalis</i>	卡他莫拉菌
<i>Morganella</i> spp.	摩根菌属
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	淋病奈瑟菌
<i>Neisseria meningitidis</i> **	脑膜炎奈瑟菌
<i>Proteus</i> spp.	变形杆菌属
<i>Providencia</i> spp.	普罗威登菌属
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	铜绿假单胞菌
<i>Salmonella</i> spp.	沙门菌属
<i>Serratia</i> spp.	沙雷菌属
<i>Shigella</i> spp.	志贺菌属
<i>Staphylococcus aureus</i>	金黄色葡萄球菌
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	凝固酶阴性葡萄球菌（血液等无菌部位）
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (urine)	腐生葡萄球菌（尿液）
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	嗜麦芽窄食单胞菌
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	肺炎链球菌
<i>S.treptococcus</i> β -hemolytic group	β -溶血性链球菌
<i>S.treptococcus viridans</i> group	草绿色链球菌（血液等无菌部位）

四. 特殊耐药菌检测要求（不包含分子生物学检测方法）

1. 苯唑西林耐药葡萄球菌（MRS）（表2）：*mecA*基因介导的苯唑西林（OXA）耐药性（金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌）按照纸片扩散法或稀释法药敏试验操作步骤，行30μg/片头孢西丁（FOX）纸片法对受试葡萄球菌的药敏试验，或头孢西丁或苯唑西林的稀释法药敏试验；33-35℃孵育16~18h，结果按下表所列报告：

表 2. 检测葡萄球菌属对甲氧西林（苯唑西林）耐药性的方法

微生物	检测甲氧西林（苯唑西林）耐药葡萄球菌属的方法				
	头孢西丁 MIC	头孢西丁纸片扩散法	苯唑西林 MIC	苯唑西林纸片扩散法	苯唑西林盐琼脂
金黄色葡萄球菌	是 (16-20 h)	是 (16-18 h)	是 (24 h)	否	是 (24 h)
路邓葡萄球菌	是 (16-20 h)	是 (16-18 h)	是 (24 h)	否	否
表皮葡萄球菌	否	是 (16-18 h)	是 (24 h)	是 (16-18 h)	否
假中间葡萄球菌	否	否	是 (24 h)	是 (16-18 h)	否
施氏葡萄球菌	否	否	是 (24 h)	是 (16-18 h)	否
其他葡萄球菌(除外上述菌种)	否	是 ^a (24 h)	是 ^a (24 h)	否	否

备注：苯唑西林MIC折点可能高估其他葡萄球菌的耐药性，某些苯唑西林MIC在0.5-2μg/mL的菌株，*mecA*可为阴性。分离自严重感染患者苯唑西林MIC在0.5-2μg/mL的菌株，可检测*mecA*或PBP2a。*mecA*或PBP2a阴性的菌株应报告甲氧西林（苯唑西林）敏感。

2. 葡萄球菌中青霉素酶诱导试验

青霉素抑菌圈直径为≥29mm或MIC值为≤0.125μg/ml的菌株，需进行青霉素酶诱导试验。具体操作：将受试菌用无菌接种环在MH药敏平板上均匀按4区划线，在第1区和第2区的交界处贴上10μg/片的青霉素纸片。33℃~37℃孵育16h~18h后，如抑菌圈边缘清晰，如同“绝壁（cliff现象）”，或边缘有菌苔堆积者为β内酰胺酶产生株；亦可进行头孢硝噻吩试验显示红色，即为诱导酶试验阳性。如果抑菌圈边缘如同“沙滩”模糊，头孢硝噻吩试验不显示颜色变化者，即为诱导酶阴性。诱导酶试验阳性者，即使青霉素体外试验敏感也要修正报告为耐药。

3. 万古霉素和利奈唑胺耐药革兰阳性球菌

对万古霉素或利奈唑胺等不敏感的革兰阳性球菌，需重复菌株的鉴定和采用稀释法进行药敏试验（含Etest），对VRE菌株需增加利奈唑胺或替考拉宁稀释法药敏。如果确认为耐药者需保存，集中送中心实验室进行复核确认（表3）。

表3. 万古霉素和利奈唑胺耐药革兰阳性球菌

抗菌药（方法）		金葡萄菌		凝固酶阴性葡萄球菌		肠球菌属	
		敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药
万古霉素	纸片法	无	无	无	无	≥17mm	≤14mm*
	稀释法	≤2μg/ml	≥16μg/ml	≤4μg/ml	≥32μg/ml	≤4μg/ml	≥32μg/ml*
替考拉宁	纸片法					≥14mm	≤10mm*
	稀释法					≤8μg/ml	≥32μg/ml
利奈唑胺	纸片法	≥21mm	≤20mm	≥21mm	≤20mm	≥23mm	≤20mm
	稀释法	≤4μg/ml	≥8μg/ml	≤4μg/ml	≥8μg/ml	≤2μg/ml	≥8μg/ml

*糖肽类或利奈唑胺纸片法药敏试验结果观察需注意应用透射光阅读结果，只要抑菌圈内
有1个菌落生长即可判断为耐药。纸片法结果为耐药的菌株需用E-test或稀释法进行确认获
得MIC值，或分子生物学检测耐药基因。

4. 青霉素不敏感肺炎链球菌

按CLSI的要求，以1μg/片苯唑西林纸片药敏试验预测青霉素的敏感性；若苯唑西林抑菌圈
直径≥20mm者即为青霉素敏感菌株（PSSP），抑菌圈直径≤19mm者需采用稀释法或Etest获得
青霉素的MIC值，根据MIC值判断菌株对青霉素的敏感性（表4）。

表4. 肺炎链球菌青霉素敏感性的判断标准

方法学	脑膜炎来源的肺炎链球菌		除脑膜炎来源的其他肺炎链球菌	
1μg/片苯唑西林	抑菌圈≥20mm	PSSP	抑菌圈≥20mm	PSSP
	抑菌圈≤19mm	必须用青霉素E-试验或稀释法再次试验和确认		
青霉素稀释法或Etest	MIC值≤0.06μg/ml	PSSP	MIC值≤2μg/ml	PSSP
	无	无	MIC值= 4μg/ml	PISP
	MIC值≥0.125μg/ml	PRSP	MIC值≥8μg/ml	PRSP

5. B群(无乳链球菌)“D试验”

诱导型克林霉素耐药葡萄球菌中较为多见，在链球菌属细菌中亦有报道。D-试验采用纸
片法原理检测确认革兰阳性菌存在的诱导型克林霉素耐药性。将 0.5 麦氏浊度的受试菌菌液
均匀涂布於 MH 药敏平板，稍晾干；将 15μg/片的红霉素的纸片和 2μg/片克林霉素的纸片贴
于上述平板中；如测试葡萄球菌属，两纸片间距 15mm-26mm；如测试肺炎链球菌和β-溶血链
球菌，两纸片间距 12mm。孵育过夜。如红霉素耐药，且邻近红霉素纸片侧的克林霉素出现
似英文字母 D 字形的抑菌环，即为 D 试验阳性；则提示受试菌为诱导型克林霉素耐药株；反
之为 D 试验为阴性。对分离自围产期妇女阴道分泌物的 B 群(无乳链球菌)进行“D 试验”，其
临床意义在于有些围产期妇女如对青霉素严重过敏，不能采用 β-内酰胺类治疗，此可考虑采
用克林霉素。但是如果受试菌株为诱导型克林霉素耐药者，而在不进行 D-试验的情况下报告
克林霉素敏感，将可能导致治疗失败。

6. 碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌

包括碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌（CRE）和碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌（CRPA）和鲍曼不动杆菌（CRAB）。凡药敏试验结果为碳青霉烯类耐药菌株，建议进行复核确认（表5、表6、表7）。

表5. 碳青霉烯类抗生素对肠杆菌目细菌的判断标准

抗生素*	纸片法（抑菌圈直径）			稀释法（MIC值）	
	（含量）	敏感	耐药	敏感	耐药
亚胺培南**	(10µg/片)	≥23mm	≤19mm	≤1µg/ml	≥4µg/ml
美罗培南	(10µg/片)	≥23mm	≤19mm	≤1µg/ml	≥4µg/ml
厄他培南	(10µg/片)	≥22mm	≤18mm	≤0.5µg/ml	≥2µg/ml

*上述任一碳青霉烯类品种的耐药者均为CRE菌株

**变形杆菌属、摩根菌属、普鲁威登菌属中亚胺培南耐药者，需参考美罗培南和厄他培南的结果；

表6. 碳青霉烯类抗生素对铜绿假单胞菌的判断标准

抗生素	纸片法（抑菌圈直径）			稀释法（MIC值）	
	（含量）	敏感	耐药	敏感	耐药
亚胺培南	(10µg/片)	≥19mm	≤15mm	≤2µg/ml	≥8µg/ml
美罗培南	(10µg/片)	≥19mm	≤15mm	≤2µg/ml	≥8µg/ml
多立培南	(10µg/片)	≥19mm	≤15mm	≤2µg/ml	≥8µg/ml

*上述任一碳青霉烯类品种的耐药者即为碳青霉烯类耐药株

表7. 碳青霉烯类抗生素对不动杆菌属的判断标准

抗生素*	纸片法（抑菌圈直径）			稀释法（MIC值）	
	（含量）	敏感	耐药	敏感	耐药
亚胺培南	(10µg/片)	≥22mm	≤18mm	≤2µg/ml	≥8µg/ml
美罗培南	(10µg/片)	≥18mm	≤14mm	≤2µg/ml	≥8µg/ml
多立培南	(10µg/片)	≥18mm	≤14mm	≤2µg/ml	≥8µg/ml

*上述任一碳青霉烯类品种的耐药者即为碳青霉烯类耐药株

附件 1. 关于磷霉素、黏菌素（或多黏菌素 B）、替加环素、头孢哌酮-舒巴坦药敏试验以及碳青霉烯酶检测方法注意点

一. 磷霉素药敏试验判断标准

1. 本品与其他抗菌药无交叉耐药；文献报道其对产 ESBLs/AmpC 酶等多重耐药株均有较强的抗菌活性。
2. CLSI 已建立的判断标准仅对分离自尿液标本的大肠埃希菌和粪肠球菌。每天的药敏试验需对上述细菌报告磷霉素的敏感性，对于 CLSI 还未建立判断标准的菌株，尚不需要向临床报告，但需要保留药敏结果于 WHONET 资料文件夹内。
3. 如有需要采用 EUCAST 判断标准，则必须按 EUCAST 规范要求执行

附表 1. CLSI 和 EUCAST 关于磷霉素的判断标准

细菌	CLSI				EUCAST			
	K-B		MIC		K-B		MIC	
	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药
大肠埃希菌	≥16	≤12	≤64,	≥256	-	-	≤32	≥64
其他肠杆菌目细菌		-	-		-	-	≤32	≥64
粪肠球菌	≥16	≤12	≤64,	≥256	-	-	-	
葡萄球菌属		-	-		-	-	≤32	≥64

二. 黏菌素（或多黏菌素 B）药敏试验判断标准

1. 目前 CLSI 建立了肠杆菌目、铜绿假单胞菌和不动杆菌属黏菌素和多黏菌素 B 判断标准；
2. 黏菌素和多菌素 B 的药敏试验，CLSI 判断标准仅限于 MIC 测定法，纸片法和 Etest 法均不适宜；
3. 如采用 EUCAST 判断标准，必须按 EUCAST 规范要求执行

附表 2. 黏菌素和多黏菌素 B 判断标准（稀释法）

抗菌药	CLSI						EUCAST					
	铜绿假单胞菌		不动杆菌属		肠杆菌目		铜绿假单胞菌		不动杆菌属		肠杆菌目	
	中介	耐药	中介	耐药	中介	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药
黏菌素	≤2	≥4	≤2	≥4	≤2	≥4	≤2	≥4	≤2	≥4	≤2	≥4
多黏菌素 B	≤2	≥4	≤2	≥4	≤2	≥4	-		-			

三. 替加环素药敏试验判断标准

1. 替加环素是甘氨酸环素类抗菌药，体外抗菌活性强、抗菌谱广；文献报道其对革兰阳性菌中的 MRSA、VRE、PRSP 等以及革兰阴性杆菌中的产 ESBLs/AmpC 酶、CRE 和 XDR 等菌株均有良好的抗菌作用；
2. 尚未发现与其他抗生素存在交叉耐药，不受 β -内酰胺酶（包括 ESBLs）、靶位修饰、大环内酯类外排泵或靶位酶影响（旋转酶/拓扑异构酶）等耐药机制影响；
3. 研究显示，实验室采用自动化仪器或纸片法测定细菌对替加环素的敏感性时，可能会出现假中介或耐药结果，需采用标准的肉汤微量稀释法或替加环素 MTS 法进行复核确认（敏感结果可直接报告）。但由于绝大多数实验室难以开展标准的肉汤微量稀释法，加之替加环素 MTS 条价格较高，导致无法常规开展对“中介”或“耐药”菌株的复核。目前建议采用替加环素纸片添加复敏液的方法，对自动化仪器或常规纸片法显示为中介或耐药的菌株进行复核，操作方法如下。
 - (1) 操作方法同 CLSI 推荐的纸片扩散法，但需在替加环素纸片上滴加 6 μ l/mL 替加环素复敏液（复敏液对革兰阴性杆菌无抑菌活性），过夜孵育后量取抑菌圈直径，按判断标准判断敏感、中介或耐药（附表 3）。

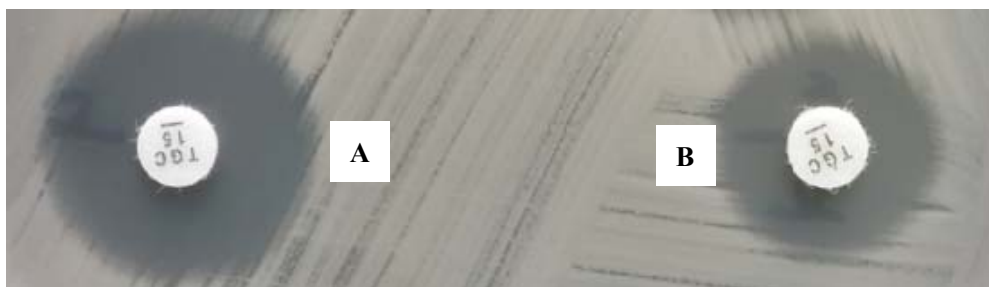


图 1. 纸片扩散法检测细菌对替加环素的敏感性

A.含替加环素复敏液纸片（22mm）；B.不含替加环素复敏液纸片（18mm）；

附表 3. FDA 关于替加环素对临床主要病原菌的判断标准

细菌	MIC(μ g/ml)			抑菌圈直径(mm)		
	S	I	R	S	I	R
金葡菌（含 MRSA）	≤ 0.5	-	-	≥ 19	-	-
肺炎链球菌	≤ 0.06	-	-	≥ 19	-	-
粪肠球菌（含 VSE）	≤ 0.25	-	-	≥ 19	-	-
肠杆菌目细菌	≤ 2	4	≥ 8	≥ 19	15-18	≤ 14
鲍曼不动杆菌	≤ 2	4	≥ 8	≥ 16	13-15	≤ 12

- (2) 上海 9 所医院的多中心研究结果显示，与常规纸片法药敏试验结果相比，含替加环素复敏液纸片法检测结果与标准肉汤微量稀释法结果的一致性更好（附表 4）。

附表 4. 不同方法检测细菌对替加环素的敏感性结果比较

细菌	方法	耐药率	中介率	敏感率
肺炎克雷伯菌 (466 株)	肉汤微量稀释法	0.6	2.4	97.0
	纸片扩散法 (常规)	10.8	36.3	52.9
	纸片扩散法 (复敏液)	1.3	17.8	80.9
鲍曼不动杆菌 (255 株)	肉汤微量稀释法	0	3.5	96.5
	纸片扩散法 (常规)	5.5	38.8	55.7
	纸片扩散法 (复敏液)	0	1.2	98.8

4. 参考文献：(1) 王辉, 倪语星, 陈民钧等. 新型甘氨酸环素类抗菌药替加环素的体外药敏试验操作规程. 中华检验医学杂志, 2009; 32: 1208; (2) 王辉, 俞云松, 王明贵, 倪语星等. 替加环素的体外药敏试验操作规程专家共识. 中华检验医学杂志, 2013; 36: 584.

四. 头孢哌酮-舒巴坦药敏试验判断标准

1. 头孢哌酮-舒巴坦系酶抑制剂舒巴坦与第三代头孢菌素头孢哌酮的复合制剂。舒巴坦与头孢哌酮合用后, 可以保护后者不被 β 内酰胺酶, 包括超广谱 β 内酰胺酶 (ESBLs) 水解, 使头孢哌酮的抗菌作用增强, 抗菌谱扩大。对肠杆菌目细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属等均具有良好的抗菌作用
2. 目前 CLSI 没有头孢哌酮-舒巴坦酶抑制剂复合制剂的判断标准, 有研究提示可采用头孢哌酮单药的判断标准解释细菌对头孢哌酮-舒巴坦的敏感性试验的结果 (Barry AL, et al. Tests and Quality Control Guidelines for the Cefoperazone-Sulbactam Criteria for Disk Susceptibility Combination. *J Clin Microbiol*, 1988; 26(1): 13.)。对于肠杆菌目细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属细菌, 稀释法 MIC 判断标准为: ≤ 16 mg/L 为敏感、32 mg/L 为中介、64 mg/L 为耐药; 纸片扩散法抑菌圈直径判断标准为: ≤ 15 mm 为耐药、16-20 mm 为中介、 ≥ 21 mm 为敏感。

五. 肠杆菌目细菌中碳青霉烯酶的检测方法

产生碳青霉烯酶是肠杆菌目细菌对碳青霉烯类耐药最主要的机制。碳青霉烯酶可直接水解破坏碳青霉烯类抗菌药。由于碳青霉烯酶基因大多位于可移动基因元件上, 导致其很容易在不同肠杆菌目细菌以及其他革兰阴性杆菌间转移, 在短时间内可导致大范围的流行播散。目前我国临床分离的 CRE 菌株主要产生 A 类 KPC 型碳青霉烯酶、B 类 NDM 型金属酶和 D 类 OXA-48 型碳青霉烯酶 (如 OXA-181 和 OXA-232 型碳青霉烯酶) 等。

目前实验室检测碳青霉烯酶的方法众多, 不同方法各具特色。主要包括改良 Hodge 试验 (因存在假阳性和假阴性结果, 2018 年 CLSI 文件已取消该方法用于碳青霉烯酶的检测)、Carba_{NP} 试验、改良碳青霉烯灭活试验 (Modified carbapenem Inactivation Method, mCIM)、

酶抑制剂增强试验、免疫金标试验以及分子生物学方法等。本研究推荐可采用以下方法检测肠杆菌目细菌产生的碳青霉烯酶

1. 酶抑制剂增强试验：采用 3-氨基苯硼酸和 EDTA 联合酶抑制剂增强试验法检测肠杆菌目细菌中的碳青霉烯酶，操作简单，结果容易阅读，简要操作步骤如下。

(1) 操作方法同 CLSI 推荐的纸片扩散法；

(2) 以 3-氨基苯硼酸（600 μg/片）和 EDTA（292 μg/片）分别作为 KPC 型碳青霉烯酶和金属β内酰胺酶抑制剂，含酶抑制剂合剂的抑菌圈直径与单药相差≥5mm 以上，即可判断该受试菌株产生 A 类碳青霉烯酶（主要为 KPC 酶）、B 类金属酶或同时产两种类型的碳青霉烯酶（图 2）。

(3) 参考文献：Yohei Doi, Brian A. Potoski, Jennifer M. Adams-Haduch, et al. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β-Lactamase by use of a boronic acid compound. J Clin Microbiol 2008; 46:4083–4086.

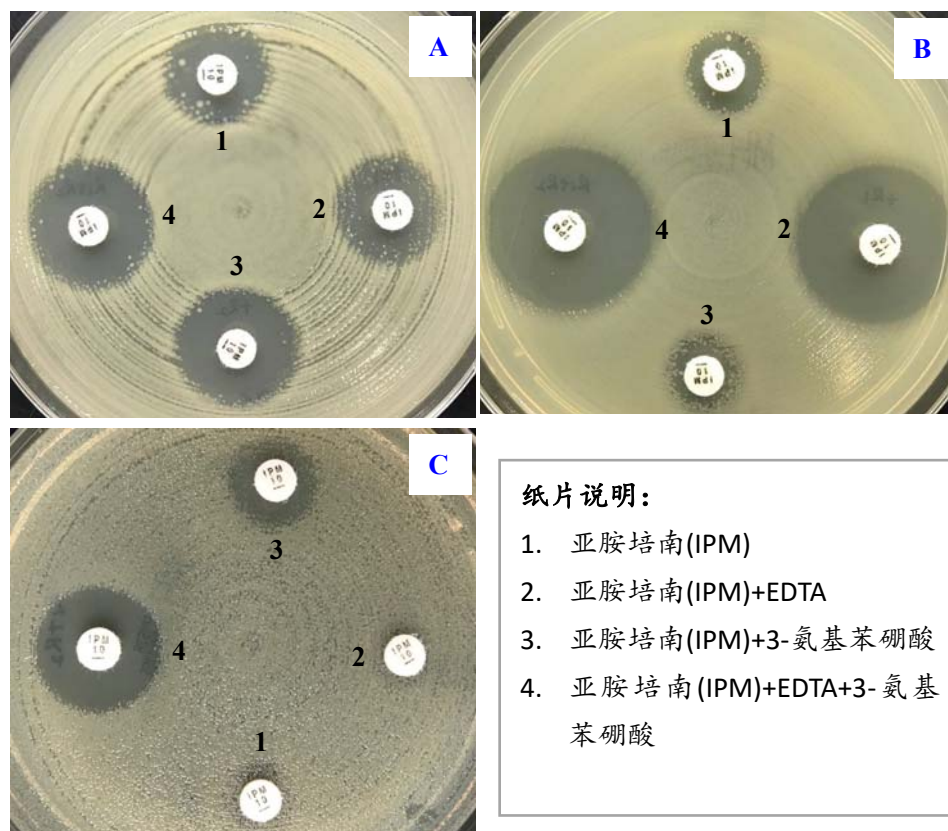


图 2. 3-氨基苯硼酸和 EDTA 联合酶抑制剂增强试验检测碳青霉烯酶

A：产 KPC-2 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌；B：产 NDM-1 型金属酶肺炎克雷伯菌；

C：同时产 KPC-2 型碳青霉烯酶和 NDM-1 型金属酶肺炎克雷伯菌；

2. 免疫金标快速检测碳青霉烯酶

(1) 本方法采用抗原抗体结合技术，可在 15 分钟内快速检测碳青霉烯酶并进行分型，包

括 KPC、NDM、OXA-48、IMP 和 VIM 型碳青霉烯酶结果准确，与测序方法相比，准确率达 95%以上 (J Antimicrob Chemother. 2019; 74(5):1284-1287.)。

- (2) 操作步骤 (不同产品操作步骤有所差异): 往试管中滴加 10 滴细菌裂解液，之后挑取一接种环 (10μl) 新鲜纯培养菌落于裂解液中 (仔细研磨使细菌混悬于液体中)，轻轻混匀后滴加 3-4 滴裂解后的菌液于样品孔中，等待 15 分钟，根据出现的红色线条所在位置判断该菌所产碳青霉烯酶种类 (图 3 和图 4)。

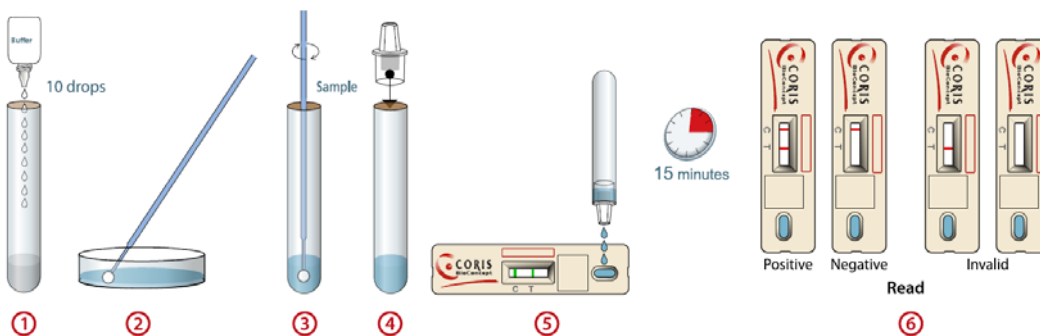


图 3. 免疫金标快速检测碳青霉烯酶操作步骤

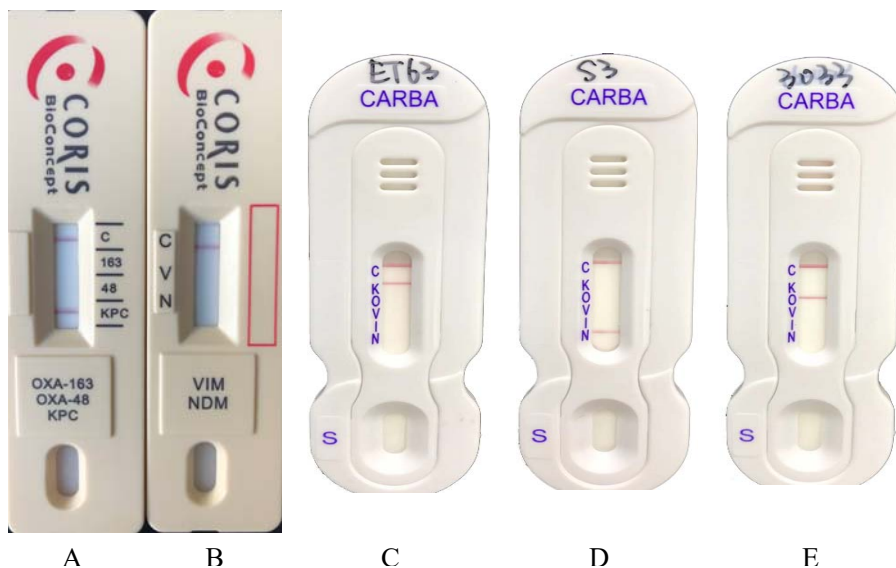


图 4. 免疫金标快速检测碳青霉烯酶

- A. KPC 型碳青霉烯酶阳性; B. 碳青霉烯酶阴性; C. KPC 型碳青霉烯酶阳性; D. NDM 型金属酶阳性; E. OXA-48 型型碳青霉烯酶阳性;

3. 报告

开展碳青霉烯酶检测试验的实验室，建议在药敏试验报告单报告检测到的碳青霉烯酶类型，至少需要区分为丝氨酸碳青霉烯酶或金属 β -内酰胺酶；有条件者可进一步对各碳青霉烯酶亚型进行检测并报告 (图 5)。

结果:肺炎克雷伯菌				CRE 耐碳青霉烯类肠杆菌 计数: 1×10^4 cfu/ml					
项目名称	方法	折点	结果	结果解释	项目名称	方法	折点	结果	结果解释
丝氨酸碳青霉烯酶			Pos	+	金属β-内酰胺酶			Neg	-
头孢唑肟/舒巴坦	K-B	$\leq 15 \geq 21$	7	R	米诺环素	K-B	$\leq 12 \geq 16$	16	S
替加环素	K-B	$\leq 12 \geq 16$	19	S	氨苄西林/舒巴坦	MIC	$\leq 8 \geq 32$	≥ 32	R
哌拉西林	MIC	$\leq 16 \geq 128$	≥ 128	R	哌拉西林/他唑巴坦	MIC	$\leq 16 \geq 128$	≥ 128	R
头孢唑林	MIC	$\leq 8 \geq 32$	≥ 64	R	头孢唑肟	MIC	$\leq 4 \geq 32$	≥ 64	R
头孢曲松	MIC	$\leq 1 \geq 4$	≥ 64	R	头孢他啶	MIC	$\leq 4 \geq 16$	≥ 64	R
头孢吡肟	MIC	$\leq 2 \geq 16$	≥ 64	R	头孢替坦	MIC	$\leq 16 \geq 64$	≥ 64	R
亚胺培南	MIC	$\leq 16 \geq 32$	≥ 64	R	氨曲南	MIC	$\leq 4 \geq 16$	≥ 64	R
环丙沙星	MIC	$\leq 1 \geq 4$	≥ 16	R	美罗培南	MIC	$\leq 1 \geq 4$	≥ 16	R
庆大霉素	MIC	$\leq 0.25 \geq 1$	≥ 4	R	左氧氟沙星	MIC	$\leq 0.5 \geq 2$	≥ 8	R
妥布霉素	MIC	$\leq 4 \geq 16$	≤ 1	S	阿米卡星	MIC	$\leq 16 \geq 64$	≤ 2	S
复方新诺明	MIC	$\leq 4 \geq 16$	≤ 1	S	味喃妥因	MIC	$\leq 32 \geq 128$	256	R
		$\leq 40 \geq 80$	≥ 320	R					

注: 敏感: S 中介: I 耐药: R 剂量依赖性敏感: SDD 野生型: WT 非野生型: NWT KB法单位: mm MIC法单位: ug/ml

评语: 该菌A类(丝氨酸类)碳青霉烯酶检测阳性(主要为KPC型碳青霉烯酶)

图 5a. 某医院采用 3-氨基苯硼酸和 EDTA 酶抑制剂增强试验检测碳青霉烯酶并报告(红色箭头所示), 提示该菌丝氨酸型碳青霉烯酶检测阳性(主要为 KPC 型碳青霉烯酶)。图片由中日友好医院黎斌斌教授提供。

鉴定结果:肺炎克雷伯菌				生长 +				耐药类型:CRE			
抗生素	结果	方法	敏感度	抗生素	结果	方法	敏感度	抗生素	结果	方法	敏感度
碳青霉烯	6	KB	耐药(R)	氨苄西林	≥ 32	MIC	耐药(R)	碳青霉烯	6	KB	耐药(R)
头孢唑肟(注射)	6	KB	耐药(R)	头孢唑肟/舒巴坦	≥ 32	MIC	耐药(R)	氨苄西林/舒巴坦	≥ 32	MIC	耐药(R)
哌拉西林/他唑巴坦	≥ 128	MIC	耐药(R)	氨苄西林/舒巴坦	≥ 32	MIC	耐药(R)	头孢唑肟	≥ 64	MIC	耐药(R)
多粘菌素B	15	KB	耐药(R)	头孢唑林	≥ 64	MIC	耐药(R)	头孢他啶	≥ 64	MIC	耐药(R)
头孢曲松	≥ 64	MIC	耐药(R)	头孢他啶	≥ 64	MIC	耐药(R)	头孢替坦	≥ 64	MIC	耐药(R)
头孢吡肟	≥ 64	MIC	耐药(R)	替加环素	20	KB	敏感(S)	亚胺培南	8	MIC	耐药(R)
美罗培南	6	KB	耐药(R)	亚胺培南	8	MIC	耐药(R)	庆大霉素	≥ 16	MIC	耐药(R)
氨曲南	≥ 64	MIC	耐药(R)	庆大霉素	≥ 16	MIC	耐药(R)	环丙沙星	≥ 4	MIC	耐药(R)
阿米卡星	≤ 2	MIC	敏感(S)	环丙沙星	≥ 4	MIC	耐药(R)	超广谱β内酰胺酶	+		
左氧氟沙星	≥ 8	MIC	耐药(R)	EDTA碳青霉烯灭活eCIM	-			丝氨酸型碳青霉烯酶Ser	+		
复方新诺明	$\geq 16/304$	MIC	耐药(R)	金属β-内酰胺酶	-						
改良碳青霉烯灭活mCIM	+										

评语或备注: 肺炎克雷伯菌对氨苄西林、大环内酯类、四环素类、克林霉素、利福平、替卡西林天然耐药。●耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌ESBL结果已复核

检验时间: 20191031 检验者: 审核者: 打印时间: 2019-11-02 11:21

注: 请妥善保管化验报告, 并于复诊时携带。本报告仅对本次检测标本负责

图 5b. 某医院采用 CLSI 推荐的 mCIM 和 eCIM 试验检测碳青霉烯酶并报告(红色框所示), 提示该菌产生丝氨酸型碳青霉烯酶。图片由上海交通大学医学院附属仁济医院李敏教授提供。

检验项目: 血培养+药敏				2019年5月22日			
检验结果: 肺炎克雷伯菌							
肺炎克雷伯菌 Klebsiella pneumoniae				左侧、右侧报阳时长均为: 13小时			
抗菌药物	KB *	MIC **	敏感度	判读标准	药物分组		
氨苄西林/舒巴坦		≥ 32.0	R	$R \geq 32/16 \ S \leq 8/4$	B		
哌拉西林		≥ 128.0	R	$R \geq 128 \ S \leq 16$	O		
哌拉西林/他唑巴坦		≥ 128.0	R	$R \geq 128/4 \ S \leq 16/4$	B		
头孢唑林		≥ 64.0	R	$R \geq 32 \ S \leq 8$	B		
头孢替坦		≥ 64.0	R	$R \geq 64 \ S \leq 16$	B		
头孢他啶		≥ 64.0	R	$R \geq 16 \ S \leq 4$	C		
头孢曲松		≥ 64.0	R	$R \geq 4 \ S \leq 1$	B		
头孢吡肟		≥ 64.0	R	$R \geq 16 \ S \leq 2$	B		
氨曲南		16.0	R	$R \geq 16 \ S \leq 4$	C		
亚胺培南		8.0	R	$R \geq 4 \ S \leq 1$	B		
美罗培南		8.0	R	$R \geq 4 \ S \leq 1$	B		
阿米卡星		≤ 2.0	S	$R \geq 64 \ S \leq 16$	B		
庆大霉素		≤ 1.0	S	$R \geq 16 \ S \leq 4$	A		
环丙沙星		≥ 4.0	R	$R \geq 4 \ S \leq 1$	B		
左氧氟沙星		≥ 8.0	R	$R \geq 8 \ S \leq 2$	B		
复方新诺明		≥ 320.0	R	$R \geq 2/38 \ S \leq 4/76$	B		
头孢西丁	6		R	$R \leq 14 \ S \geq 18$	B		
头孢唑肟/舒巴坦	6		R	$R \leq 15 \ S \geq 21$	B		
头孢唑林	6		R	$R \leq 19 \ S \geq 23$	A		

耐药表型评语: CRE: 碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌, 经检测该株细菌产NDM型碳青霉烯酶。

多重耐药: 该菌为多重耐药(MDR), 请加强防控措施, 注意接触隔离, 防止播散。

药敏评语: 推荐用药: 头孢曲松与头孢唑肟为等效药物, 头孢曲松的药敏结果可推测头孢唑肟。S(敏感): 采用抗生素的标准给药方案, 治疗成功率高。

图 5a. 某医院采用分子技术检测碳青霉烯酶亚型并报告(红色箭头所示), 提示该菌产生 NDM 型金属β-内酰胺酶。图片由山西省儿童医院朱镛教授提供。