

“CHINET 中国细菌耐药监测网”技术方案

(2022 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71所医疗机构参与（PC端：

www.chinets.com；移动端：m.chinets.com），年监测菌株数量超过25万株。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，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。

此技术方案适用范围于“CHINET中国细菌耐药监测网”和“上海市细菌真菌耐药监测网”成员单位，各成员单位按照此监测方案，采用标准的药敏试验方法进行细菌耐药监测。

一. 方法学

采用纸片扩散法、自动化仪器法、肉汤微量稀释法或 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 抗菌药物判断标准。

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、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、黏菌素（多黏菌素 E）或多黏菌素 B、替加环素、头孢他啶/阿维巴坦。

备注：

- (1) 泌尿道标本分离的大肠埃希菌需要加做磷霉素药敏试验，建议碳青霉烯类耐药菌株加做磷霉素药敏试验；

- (2) 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；建议 MIC \leq 2 μ g/mL 报告为敏感，而非中介。
 - (3) 替加环素药敏试验判断标准参考标准：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）。
 - (4) CLSI 规定头孢他啶-阿维巴坦抑菌圈（30 μ g/20 μ g）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。亦可参考 EUCAST 标准，选择头孢他啶-阿维巴坦（10 μ g/4 μ g），判断标准为抑菌圈直径 \geq 13mm 为敏感、 \leq 12mm 为耐药。
 - (5) 关于超广谱 β 内酰胺酶（Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs）和碳青霉烯酶检测要求：各实验室常规无需检测细菌是否为产 ESBL，除非基于感染控制和流行病学调查研究目的。对于碳青霉烯类耐药菌株，应采用表型或基因型检测方法，对细菌产生的碳青霉烯酶进行检测、报告及结果注释。
 - (6) 头孢哌酮-舒巴坦药敏试验参考标准：纸片扩散法抑菌圈直径 \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；
- 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：

- (1) $<$ 16 岁骨骼系统未发育完全的小儿应报头孢曲松的结果；
 - (2) 注意要使用喹诺酮类药物对沙门菌属的判断标准
 - (3) 阿奇霉素 CLSI 目前仅有对沙门菌伤寒血清型和副伤寒 A-C 血清型的判断标准，和仅对志贺菌属细菌的折点
- 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、黏菌素（多黏菌素 E）或多黏菌素 B、头孢他啶-阿维巴坦。

备注：

- (1) 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；建议 MIC \leq 2 μ g/mL 报告为敏感，而非中介。
- (2) 头孢哌酮-舒巴坦药敏试验参考标准：纸片扩散法抑菌圈直径 \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；

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、黏菌素（多黏菌素 E）或多黏菌素 B、替加环素。

备注：

- (1) 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；建议 MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ 报告为敏感，而非中介。
 - (2) 替加环素药敏试验判断标准参考标准：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。
 - (3) 头孢哌酮-舒巴坦药敏试验参考标准：纸片扩散法抑菌圈直径 $\leq 15\text{mm}$ 耐药、 $16-20\text{mm}$ 中介、 $\geq 21\text{mm}$ 敏感；稀释法 MIC $\geq 64\mu\text{g/ml}$ 耐药、 $32\mu\text{g/ml}$ 中介、 $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ 敏感。
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。
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。
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、黏菌素（多黏菌素 E）或多黏菌素 B。

备注：

- (1) 此类细菌指的是除包括铜绿假单胞菌之外的假单胞菌属、和除不动杆菌属、嗜麦芽窄食单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌复合群的其他非苛养、葡萄糖不发酵革兰阴性菌；
 - (2) 头孢哌酮-舒巴坦药敏试验参考标准：纸片扩散法抑菌圈直径 $\leq 15\text{mm}$ 耐药、 $16-20\text{mm}$ 中介、 $\geq 21\text{mm}$ 敏感；稀释法 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：

- (1) 药敏试验受条件限制的单位，须用产色头孢菌素法（头孢硝噻吩）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。
- (2) 罕见耐药菌株，如头孢曲松或头孢噻肟耐药菌株和氟喹诺酮类耐药菌株等，需进行菌种复核鉴定及药敏试验以确认。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：

- (1) 药敏试验受条件限制的单位，须如嗜血杆菌属一样采用产色头孢菌素法（头孢硝噻吩）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；

- 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：

- (1) 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：

- (1) 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

- 12. 葡萄球菌属：**庆大霉素、青霉素、头孢西丁（或苯唑西林）、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、左氧氟沙星和利福平。

备注：

- (1) 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；

- (2) 不同葡萄球菌属细菌检测甲氧西林耐药菌株时，需选择合适的检测方法（表 2）。

- (3) 万古霉素对葡萄球菌属的药敏需采用稀释法测定 MIC；

- (4) 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。

- (5) 对红霉素耐药，且对克林霉素敏感或中介的菌株，报告克林霉素结果前需采用纸片扩散法进行“D”试验或稀释法检测克林霉素诱导耐药性，根据检测结果报告克林霉素药敏试验结果。

- 13. 肠球菌属：**庆大霉素（ $120\mu\text{g}/\text{片}$ ）、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：

- (1) 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类、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。

(2) 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。

(3) 呋喃妥因和磷霉素药敏试验报告仅限于泌尿道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（含 D 试验）、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：

(1) 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；

(2) 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（含 D 试验）、万古霉素、利奈唑胺、左氧氟沙星、氯霉素

备注：

(1) 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。

(2) 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：

(1) 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；

(2) 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. 需监测的主要临床分离菌（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暂时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. streptococcus</i> β -hemolytic group	β -溶血性链球菌
<i>S. streptococcus</i> viridans 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：按以下表2方法测定葡萄球菌属对甲氧西林的敏感性。

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 (24 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

^a由归类于葡萄球菌属（上表中未列出或未鉴定到种水平）引起严重感染的菌株，苯唑西林MIC为1-2 µg/mL时，建议检测*mecA*或*PBP2a*，因为这些是检测甲氧西林（苯唑西林）耐药性最可靠的方法（见2021年M100 31th 表2C 葡萄球菌属注释[18]）。最近的数据表明，头孢西丁纸片扩散试验可能不能可靠地适用于“属于葡萄球菌属（以上表中未列出或未鉴定到种水平）”的所有菌种（如溶血葡萄球菌）。

2. 葡萄球菌青霉素酶诱导试验

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°C~37°C孵育16h~18h后，如抑菌圈边缘清晰锐利（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。如果抑菌圈边缘如沙滩样，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），对万古霉素耐药菌株需增加利奈唑胺或替考拉宁稀释法药敏，或分子生物学检测耐药基因。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。

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3）。

表3. 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的肠杆菌目细菌、碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌等，凡药敏试验结果确认为碳青霉烯类耐药的菌株，建议补充替加环素（铜绿假单胞菌除外）、多黏菌素和头孢他啶-阿维巴坦（鲍曼不动杆菌除外）药敏试验，必要时进行联合药敏试验，以筛选有效的联合治疗方案。对于碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌，应进行碳青霉烯酶的检测并报告。

7. 黏菌素（或多黏菌素B）药敏试验判断标准

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。过去五年，新抗菌药物尤其是针对碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌和多重耐药铜绿假单胞菌所致感染的药物不断被批准上市。然而，这些昂贵的新药在许多国家无法获得，且这些新药对产金属酶菌株和多重耐药鲍曼不动杆菌无效。因此，全球仍需要多黏菌素用于临床治疗此类耐药菌所致感染。虽然 CLSI 自 2020 年起更改了多黏菌素药敏试验报告规则，仅可报告“中介”

和“耐药”，无“敏感”分类，但由于目前我国很多新抗菌药物无法获得，多黏菌素是仅有的对碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌具有抗菌活性的药物之一，建议临床微生物实验室参考“多黏菌素药物敏感性检测及临床解读专家共识”报告多黏菌素药敏试验结果（表 4）。

表 4. 多黏菌素 E 和多黏菌素 B 药敏试验解释和推荐 MIC 判断标准

菌种	解释分类和 MIC 折点 ($\mu\text{g/mL}$) [†]		注释
	敏感	耐药	
肠杆菌目细菌*	≤ 2	≥ 4	按 CLSI 要求附加注释
铜绿假单胞菌	≤ 2	≥ 4	按 CLSI 要求附加注释
鲍曼不动杆菌	≤ 2	≥ 4	按 CLSI 要求附加注释

*：在肠杆菌目中摩根菌科（包括变形杆菌属、摩根菌属、普罗威登菌属）和黏质沙雷菌等多黏菌素天然耐药，无需测试多黏菌素的敏感性；

†：必须使用可靠的方法检测多黏菌素的 MIC。多黏菌素 E 和多黏菌素 B 的药物敏感性结果等效，可相互推导，即一种药物可推导另一种药物的敏感性；

8. 替加环素药敏试验规范及判断标准

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；文献报道其对多重耐药革兰阳性球菌和革兰阴性杆菌（铜绿假单胞菌除外）均具有良好的抗菌活性。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。建议可采用含复敏液替加环素纸片方法，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 μL 替加环素复敏液（此浓度的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（图 1）。

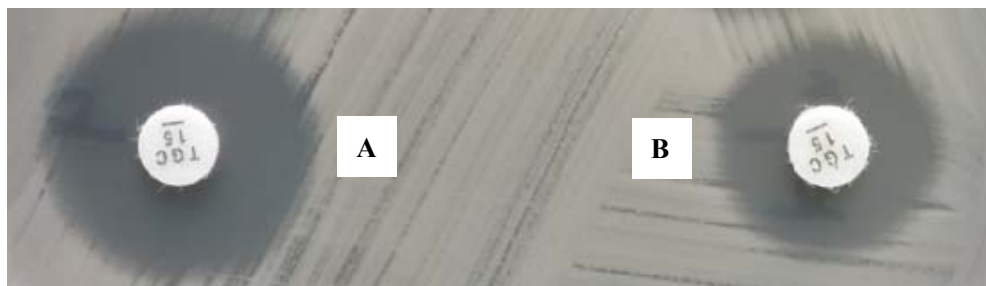


图 1. 纸片扩散法检测肺炎克雷伯菌对替加环素的敏感性

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

9. 头孢他啶-阿维巴坦药敏试验规范及判断标准

体外药敏试验结果显示，头孢他啶-阿维巴坦对产A类丝氨酸碳青霉烯酶（以KPC酶为主）和D类丝氨酸碳青霉烯酶（以OXA-48酶为主）菌株具有高度抗菌活性，为治疗上述耐药细菌所致感染的有效抗菌药物之一。目前，CLSI制定了头孢他啶-阿维巴坦对肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌的药敏试验判断标准，并特别指出如头孢他啶-阿维巴坦对肠杆菌目细菌的抑菌圈直径为20-22mm时，应采用MIC法确认，以避免报告假敏感或假耐药结果。研究显示，采用头孢他啶-阿维巴坦纸片扩散法药敏试验测定细菌对该β内酰胺类-酶抑制剂合剂的敏感性时，可能会出现假耐药现象，其中细菌接种菌量过高以及抑菌圈直径是否精确测量是重要影响因素。在阅读头孢他啶-阿维巴坦抑菌圈直径时，建议忽略抑菌圈内薄雾状生长，但抑菌圈内散在菌落需视为生长（图2）。

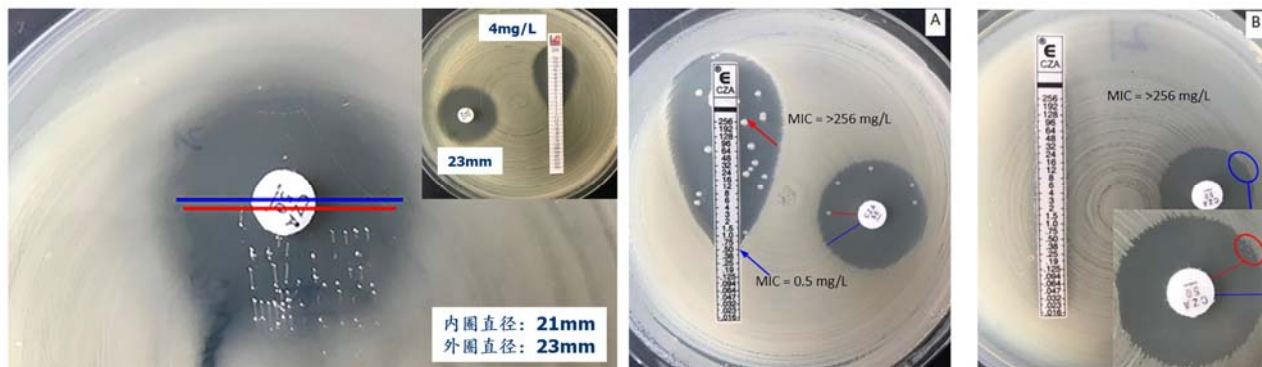


图2. 头孢他啶-阿维巴坦对肺炎克雷伯菌抑菌圈直径测量

左：忽略薄雾状生长；A和B抑菌圈内散在菌落视为生长

10. 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包括碳青霉烯类在内的β内酰胺类抗菌药（氨基糖苷类对金属酶稳定除外）。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。本研究推荐可采用酶抑制剂增强试验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) 制备试剂：甲液：3-氨基苯硼酸溶液 (APB) (30mg/mL)；乙液：EDTA 溶液 (0.1mol/L)。其中 APB 为 A 类丝氨酸型碳青霉烯酶抑制剂，EDTA 为金属酶抑制剂。
- 2) 实验步骤：按 CLSI 推荐的纸片扩散法进行。将待测菌调制成 0.5 麦氏浊度菌悬液，均匀涂布于 MH 琼脂平板上，随后贴 4 张碳青霉烯类抗菌药物纸片（一般为亚胺培南或美罗培南）于琼脂表面。一张纸片不加任何液体，一张纸片滴加 APB 溶液（终浓度 300 μ g/片，初始浓度为 30 mg/mL 的溶液可滴加 10 μ L）、一张纸片 EDTA 溶液（终浓度 292 μ g/片，初始浓度 0.1 mol/L 的溶液可滴加 10 μ L）、最后一张同时滴加 APB 溶液（终浓度 300 μ g/片）和 EDTA 溶液（终浓度 292 μ g/片）。过夜孵育后量取纸片抑菌圈直径。
- 3) 结果判断：结果判读如下（图 3）：①添加 APB 溶液的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药纸片相差 ≥ 5 mm，即可判断该受试菌株产 A 类碳青霉烯酶（图 1A）；②添加 EDTA 溶液的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药纸片相差 ≥ 5 mm，即可判断该受试菌株产生 B 类碳青霉烯酶（图 1B）；③如仅同时添加 APB 和 EDTA 的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药纸片相差 ≥ 5 mm，可判断该受试菌株同时产 A 类碳青霉烯酶和 B 类金属 β 内酰胺酶（图 1C）；④如含酶抑制剂的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药相差均 < 5 mm，可判断该菌不产 A 类或 B 类碳青霉烯酶，其耐药机制可能为产生 OXA-48 型碳青霉烯酶，或产生 ESBL 和/或 AmpC 酶合并膜孔蛋白的下调或缺失。

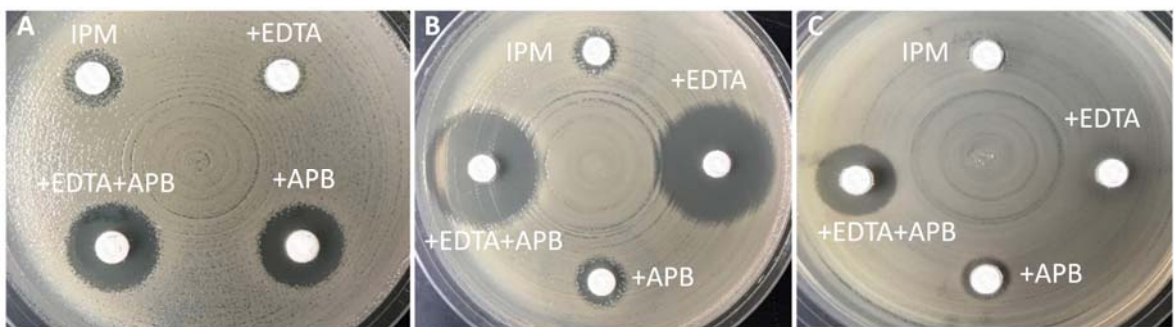


图 3. 碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测 A 类和 B 类碳青霉烯酶

A：产 A 类碳青霉烯酶；B：产 B 类金属 β -内酰胺酶；C：同时产 A 类碳青霉烯酶和 B 类金属 β -内酰胺酶

(2) **酶免疫层析技术快速检测碳青霉烯酶（金标法）**

- 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。

- 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 (10 μ l) 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 4 和图 5)。

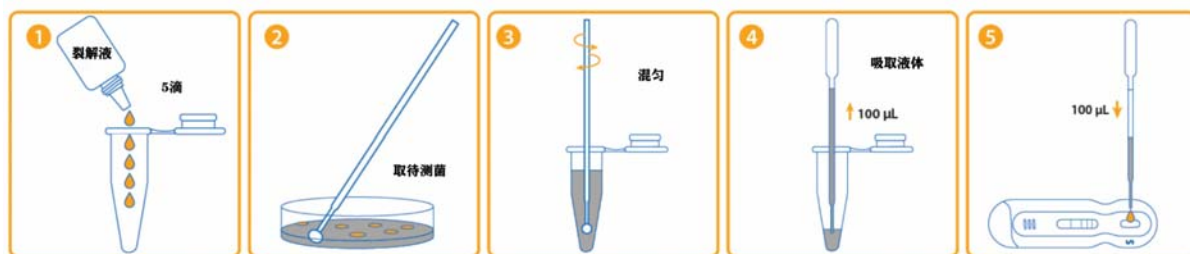


图 4. 免疫金标快速检测碳青霉烯酶操作步骤

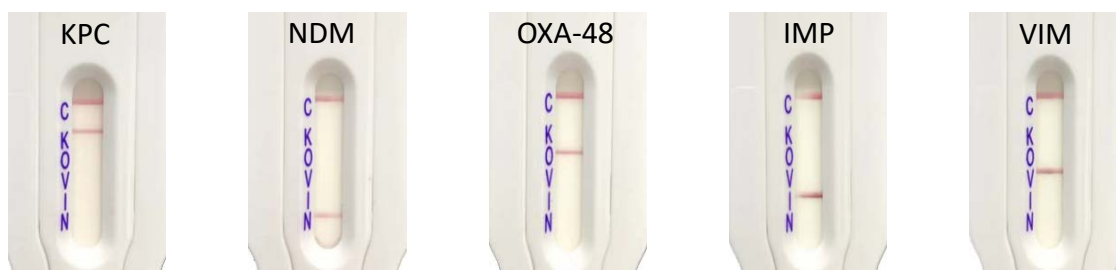


图 5. 免疫金标快速检测碳青霉烯酶结果阅读

(参考样式, 不同产品结果阅读方式有所差异, 请参考产品说明书内容描述)

(3) 报告

表型或基因型检测碳青霉烯酶结果报告格式, 可参考表 5。

表 5. 碳青霉烯酶检测结果报告及解释

检测方法	结果报告	结果解释
表型检测	A 类丝氨酸碳青霉烯酶阳性	以 KPC 型碳青霉烯酶为主, 该酶活性可被阿维巴坦抑制; 产酶菌株通常仅对替加环素、多黏菌素或头孢他啶-阿维巴坦敏感
	B 类金属 β 内酰胺酶阳性	以 NDM 型金属酶为主, 该酶活性不能被阿维巴坦抑制; 产酶菌株通常仅对替加环素和多黏菌素敏感, 少数菌株对氨曲南敏感
	D 类丝氨酸碳青霉烯酶阳性	以 OXA-48 型碳青霉烯酶为主 (包括 OXA-181 和 OXA-232), 常见于儿童患者分离的肺炎克雷伯菌, 该酶活性可被阿维巴坦抑制。产酶菌株通常仅对替加环素、多黏菌素或头孢他啶-阿维巴坦敏感
基因型检测	KPC、SME、IMI、NMC、GES	A 类碳青霉烯酶, 其活性可被阿维巴坦抑制, 产酶菌株通常仅对替加环素、黏菌素、头孢他啶-阿维巴坦敏感
	NDM、IMP、VIM、GIM、SPM	B 类金属 β 内酰胺酶, 其活性不能被阿维巴坦抑制, 产酶菌株通常仅对替加环素和多黏菌素敏感, 少数菌株对氨曲南敏感
	OXA-48	D 类碳青霉烯酶, 其活性可被阿维巴坦抑制。产酶菌株通常仅对替加环素、多黏菌素或头孢他啶-阿维巴坦敏感

注：采用 mCIM、酶抑制剂增强试验和酶免疫层析技术，某些 KPC 型碳青霉烯酶新基因亚型可出现假阴性结果。

参考文献

1. 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.
2. 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;
3. 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.
4. 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.
5. 卫生部办公厅. 关于印发《产 NDM-1 泛耐药肠杆菌科细菌感染诊疗指南（试行版）》的通知[EB/OL]. [2020-07-01]. [http : //www. nhc. gov. cn/zwkgzt/pyzgl1/201010/49274. shtml](http://www.nhc.gov.cn/zwkgzt/pyzgl1/201010/49274.shtml).
6. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2013; 51 (9): 2986-90.
7. 陈金云, 傅鹰, 杨青, 等. KPC-2 及 IMP-4 酶介导肠杆菌科细菌碳青霉烯类耐药研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2015; 35 (6): 419-426.
8. Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73 (12): 3523-3526.
9. Glupczynski Y, Evrard S, Huang TD, Bogaerts P. Evaluation of the RESIST-4 K-SeT assay, a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of OXA-48-like, KPC, VIM and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74 (5): 1284-1287.
10. 喻华, 徐雪松, 李敏, 杨启文, 杨青, 张嵘, 褚云卓, 单斌, 郭大文, 胡志东, 简翠, 李轶, 廖康, 刘根焰, 季萍, 金炎, 倪语星, 沈瀚, 苏丹虹, 卓超, 王辉, 魏莲花, 俞云松, 张泓, 张利侠, 周铁丽, 朱镭, 王明贵, 朱德妹, 胡付品. 肠杆菌目细菌碳青霉烯酶的实验室检测和临床报告规范专家共识. 中国感染与化疗杂志 2020; 20 (6): 671-680.
11. Ding L, Shi Q, Han R, Yin D, Wu S, Yang Y, Guo Y, Zhu D, Hu F. Comparison of Four Carbapenemase Detection Methods for *bla*_{KPC-2} Variants. *Microbiol Spectr* 2021; 9 (3): e0095421.