

·淋球菌感染及耐药专题·标准与指南·

淋球菌抗菌药物敏感性检测指南



扫一扫下载指南原文

中国疾病预防控制中心性病控制中心撰写组

通信作者:尹跃平,Email:yiny@ncstdlc.org;徐文绮,Email:xuwq@ncstdlc.org

【摘要】 淋病奈瑟球菌(淋球菌)对抗菌药物耐药已成为全球重要的公共卫生问题之一,因此,开展对淋球菌临床分离株的药物敏感性检测及耐药性监测至关重要。中国疾病预防控制中心性病控制中心在 2007 年制定了《淋球菌耐药监测实施指南》,现行的 2019 年版指南是根据 WHO 淋球菌耐药监测指南以及美国临床和实验室标准研究所(CLSI)的标准和最新研究进展进行了修订,并首次引入微量肉汤稀释法。该版指南详述了每种药物敏感性检测方法的实验流程、结果解释标准和注意事项。该指南将会根据最新的技术研究进展定期更新。

【关键词】 奈瑟球菌,淋病;药物敏感性检测;指南

基金项目:“十三五”国家科技重大专项(2018ZX10101001-004-003);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-3-021)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4149.2019.04.005

Chinese guidelines for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*

Drafting Group of National Center for STD Control, China CDC

Corresponding authors: Yin Yueping, Email:yiny@ncstdlc.org; Xu Wenqi, Email:xuwq@ncstdlc.org

【Abstract】 Gonococcal antimicrobial resistance has become an important public health problem worldwide, and it is crucial to monitor the antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae*. In 2007, the first edition of guidelines for antimicrobial susceptibility testing of gonorrhea was formulated by National Center for STD Control, China CDC. The current 2019 edition of the guideline is revised on the basis of WHO guideline, standard from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the latest research results. In the 2019 edition, microdilution method is introduced for the first time. The procedures, results interpretation criteria and points for attention for each method are detailed in this version of guidelines. This guideline will be updated regularly according to the latest technical advantages.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Antimicrobial susceptibility testing; Guideline

Fund program: National Science and Technology Major Project of China during the 13th Five-Year Plan Period (2018ZX10101001-004-003); Chinese Academy Medical Sciences Initiative for Innovative Medicine (2016-I2M-3-021)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4149.2019.04.005

淋病奈瑟球菌(淋球菌)药物敏感性检测的方法主要有定性检测和定量检测两大类。定性检测包括纸片扩散法;定量检测包括琼脂稀释法、梯度扩散法(E-test)和微量肉汤稀释法。

一、纸片扩散法

纸片扩散法又称 Kirby-Baure 纸片扩散法(K-B 法),该法操作简单,适合临床分离单个菌株对多种不同抗菌药物的敏感性检测,指导临床用药。

此外,该检测结果与临床治疗的关系包括敏感、中介和耐药。

(1)敏感表示感染可以使用推荐剂量(常规剂量)的该抗

菌药物进行治疗,失败的可能性小于 5%,禁忌证除外。

(2)中介表示药物浓度在生理性浓集部位具有治疗效果,或高于常规剂量也可有临床疗效。

(3)耐药是指常规剂量抗菌药物不能抑制被测菌的生长,其临床疗效并不可靠,临床治疗的失败率大于 15%。

纸片扩散法是将 1.5×10^8 CFU/mL 接种平板 [Mueller-Hinton(MH)琼脂基础培养基+5%的脱纤维羊血;或 GC 琼脂基础培养基+1%生长添加剂或+10%脱纤维羊血]后,贴加纸片,经 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $(5 \pm 1)\%$ CO_2 、70%~80%湿度环境中培养 16~20 h 后,测量抑菌圈直径(非抑菌环径)。参照美国临床和

实验室标准研究所(CLSI)M100 淋球菌抑菌圈直径解释标准和相对应折点值判断敏感、中介和耐药^[1]。

检测过程中需注意以下几点:

(1)菌悬液应在 15 min 内使用。

(2)纸片必须放置在有干燥剂的容器内低温保存,只拿出少量放 4 ℃备日常工作用。装纸片的容器从冰箱取出后,必须室温放置 10 min 以上才可打开,以防止潮解。

(3)纸片一旦贴上培养基表面后就不可再移动,每张纸片的间距不小于 24 mm,纸片中心距平皿的边缘不小于 15 mm。直径为 90 mm 的平板所贴纸片不多于 4 张,若同时贴头孢菌素类的则不多于 3 张。直径为 150 mm 的平板所贴纸片不多于 9 张。

(4)在透明抑菌环内有明显单个菌落,都应重新鉴定并重复试验。

(5)使用标准菌株作对照,只有当标准菌株的药敏结果在受控范围内时,检测结果才有效;若发现标准菌株的药敏结果不在受控范围,应认真分析原因后重新检测。

二、琼脂稀释法

琼脂稀释法是淋球菌药物敏感性检测的金标准,可以准确测定抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)值,并可作为其他测定方法的参比法^[2-3],主要用于我国的淋球菌耐药监测项目。但该方法操作较为耗时繁琐,不用于临床样本的常规检测。

琼脂稀释法是先将抗菌药物以倍比稀释的方法加入到培养基(GC 基础培养基+1% Kellogg's 生长添加剂或 1% IsovitaleX/Vitox 或 10%脱纤维羊血)中后,将待测菌接种于含不同浓度的抗菌药物培养基上(每个待测菌接种至培养基表面的菌量为 10^4 CFU),置于 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $(5\pm 1)\%$ CO_2 、70%~80%湿度环境中培养 16~20 h,在适宜的光线下,观察对照培养基上的菌落生长情况。如对照培养基上菌落未生长,则本批实验结果无效;对照培养基上生长良好,则观察含抗菌药物的培养基上菌落生长状况;接种点内有 1 个以上菌落或呈菌苔状为生长;接种点内无任何菌落或呈薄雾印迹为无生长。此外,记录结果时先记录参考菌株的 MIC 值,参考菌株 MIC 值在标准 MIC 值范围内或在标准 MIC 值 ± 1 个浓度梯度范围内表明本次试验有效;参考菌株 MIC 值超出上述范围则表明本次试验无效,需重新测定 MIC 值。根据 WHO 西太区淋球菌抗菌药物敏感性的判断标准对待测菌株进行耐药结果判断^[3]。

检测过程中需注意的有^[4]:

(1)抗菌药物制备时要参考抗菌药物粉的纯度,计算时要按照实际有效重量进行配制。有些抗菌药物不稳定(如青霉素),抗菌药物培养基尽量新鲜配制,配制后尽快使用。

(2)抗菌药物溶解时,不同抗菌药物使用的溶剂会有所不同,配制后的保存方式也会不同,如保存温度、是否需要避光等,要按照试剂生产商的说明操作。

(3)培养基中加抗菌药物时,要保证培养基温度已降至 50 ℃左右,以免高温导致抗菌药物效价降低。

(4)配置的药敏板一旦凝固,则立即用塑料袋包好并放置于 4 ℃保存,其有效性可维持 2 周。配置药敏板的同时需准备不含抗菌药物的平板用做阴性对照。

(5)接种菌液前要确保培养基表面干燥,可以将打开培养皿盖的培养基倒置于培养箱中 15~30 min 预温烘干。

(6)接种时从空白对照培养基开始,从低浓度向高浓度接种菌液,全部接种完成后,要再接种一块空白对照培养基,以保证整个实验没有污染。

三、梯度扩散法(E-test)

E-test 结合了琼脂稀释法和纸片扩散法特点,通过一个含有梯度抗菌药物的塑料薄条构成。当 E-test 试剂条被放在一个已涂淋球菌(菌液浓度 10^8 CFU/mL)的琼脂培养基(GC 基础培养基+1% Kellogg's 生长添加剂或 1% IsovitaleX/Vitox)时,其载体上的抗生素迅速地释放入琼脂介质,从而在试条下方建立了一个抗菌药物浓度的连续梯度,经过孵育后,即可见一个以测试条为中心的对称的椭圆形抑菌环,抑菌环与测试条交叉点上的浓度示数即为 MIC 值。如果抑菌环与测试条交点位于两个示值之间,则读取高浓度的示值。当淋球菌沿试条生长即无椭圆形抑菌环时,E-test 试验值为大于最大浓度(>),当抑菌环延伸至试条下方,与试条无交点时,E-test 试验值为小于最小浓度(<)。如果抑菌环形状不规则或抑菌环不明显,导致无法读数,则实验结果无效。记录结果时先记录参考菌株的 MIC 值,参考菌株 MIC 值在标准 MIC 值范围内或在标准 MIC 值 ± 1 个浓度梯度范围内表明本次试验有效;参考菌株 MIC 值超出上述范围则表明本次试验无效,需重新测定 MIC 值。待测菌株根据 WHO 西太区淋球菌抗菌药物敏感性的判断标准进行耐药结果判断^[3]。

由于 E-test 梯度的稳定性与精确性,所测定的 MIC 值与琼脂稀释法比对后证实具有较好的重现性,在性病检测实验室中可以替代琼脂稀释法进行淋球菌药敏测定。

检测过程中需注意的有:

(1)培养后培养基上要见到足够的菌落生长以及清晰的抑菌环边缘才可进行读数,菌落太稀少或有污染菌落不可进行读数;

(2)若两边交点的数值之差大于 1 个稀释度以上,则需重复试验;

(3)打开包装的 E-test 试纸条应存储在带干燥剂的密封容器中。

四、微量肉汤稀释法

该方法通过利用微孔板中一定浓度的抗菌药物与含有菌株的培养液进行梯度稀释,经适温培养后,以肉眼观察无细菌生长的微孔中所含的最低药物浓度为 MIC。

微量肉汤稀释法快速简便,已广泛用于临床微生物的药物敏感性检测^[5],但淋球菌属于苛养菌,淋球菌药物敏感性的微量肉汤稀释法还处于评估阶段,还未有商品化检测试剂盒。

检测过程中需注意的是:

(1)药敏微孔板应保存在-20℃,不可反复冻融,否则抗菌药物的活性会降低;

(2)微量稀释试验存在一个跳孔现象时应读最高的MIC,出现多个跳孔的药物时需重复测定,不可勉强判定;

(3)对于特殊菌株出现的药敏结果,建议通过琼脂稀释法进行结果复测;

(4)微孔板置放时,不可超过5个叠起;

(5)目前还没有淋球菌微量稀释法的判断标准,主要参考WHO琼脂稀释法的判断标准。

五、产青霉素酶淋球菌的检测

淋球菌可通过质粒介导产生青霉素酶(β -内酰胺酶),使青霉素类失去活性,这一类淋球菌被称为PPNG。目前,青霉素已不用于我国淋病的治疗,PPNG的鉴定仅用于我国的淋球菌耐药监测项目。常用的PPNG检测方法包括头孢硝噻吩显色法、碘量法或纸片酸度法等^[3]。头孢硝噻吩显色法是利用 β -内酰胺酶水解头孢硝噻吩结构上的 β -内酰胺环,从而使头孢硝噻吩纸片(或滴有头孢硝噻吩水溶液的菌体)颜色由黄变红这一原理来完成。后两种方法均是利用 β -内酰胺酶能裂解青霉素的 β -内酰胺环形成青霉噻唑酸,与底物产生颜色反应这类原理来进行的。

检测过程中需要注意的是:

(1)少数产青霉素酶的菌株变色反应较慢,可能会超过1 min;

(2)由于青霉素容易分解,配制的青霉素溶液可分装于试管中,在低温(-20℃)冰箱保存;

(3)碘量法中碘溶液需实验前1 h内新鲜配制,其中碘试

剂需避光保存。

撰写组主要成员:徐文绮 陈绍椿 韩燕 戴秀芹 陈祥生 尹跃平

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 中国疾病预防控制中心性病控制中心性病实验室专家组专家

参 考 文 献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [M]. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically[M]. 10th ed. CLSI standard M07. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [3] World Health Organization. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus[EB/OL]. [2013-07-01]. https://www.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf?ua=1.
- [4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. WS/T 639—2018 抗菌药物敏感性试验的技术要求[S]. 北京:中国标准出版社, 2018. National Health Commission of the People's Republic of China. WS/T 639—2018 Technical specification on antimicrobial susceptibility tests[S]. Beijing: China Standards Press, 2018.

(收稿日期:2019-07-05)