论文

以梯度平板法改进药敏试验方法及其药物浓度质量控制

王杰^{1,2†}, 张庆^{1†}, 李璐璐¹, 胡明¹, 骆延波¹, 齐静^{1,2}, 张印¹, 刘玉庆^{1,2*}

1. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所山东省动物疫病防治与繁育重点实验室, 济南 250100;

2. 山东大学生命科学学院, 济南 250100

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: liuiqing@163.com

收稿日期: 2017-04-17; 接受日期: 2017-05-25; 网络发表日期: 2017-06-12

国家自然科学基金(批准号: 81271886, 31672609)、山东省农业重大应用技术创新项目(批准号: SDAIT-11-09)、山东省农业科学院农业创新工程(批准号: CXGC2016A10)和山东省自然科学基金(批准号: ZR2014CP021)资助

摘要 药敏试验是临床选择敏感抗生素的精确检测工作, 其成败在于质量控制的可靠性和最低抑菌浓度(MIC)的精确性、前瞻性. 本文结合质控试验和药敏试验对梯度平板法进行验证, 梯度平板法所测得的MIC与微量肉汤稀释法和琼脂稀释法测得的MIC结果一致, 且因为线性设置的药物浓度, MIC更加精确, 能推算抗菌药物的原始浓度, 更好地保证质控试验的可靠性. 同时, 按照美国临床实验室标准委员会或欧盟药敏试验委员会的敏感(S), 中介(I)以及抗药(R)范围标准设置0-S, S-R, R-8R这样3个线性梯度, 首先判断菌株敏感性范围, 然后精确测定细菌群落的MIC值, 并能有效分离出抗性菌株, 预警该抗生素使用后可能出现的抗药性, 进而指导临床抗菌药物的选择和应用. 梯度平板的主要困难在于手工制备的繁琐和不稳定性, 如果自动化生产即用型梯度平板, 将便利临床药敏试验, 改进抗药性筛选技术.

关键词 药敏试验, 质量控制, 梯度平板法, 琼脂稀释法, 微量肉汤稀释法, 最低抑菌浓度(MIC)

药敏试验的精确性是指导临床用药的关键^[1], 为此, 美国临床实验室标准委员会(Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI)和欧盟药敏试验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)都对药敏试验作了严格的质量控制要求, 包括培养基(pH、离子、添加剂、保藏)、培养条件(温度、气体、时间等)、药物及其浓度, 都用标准菌株进行验证^[2-5]. 在采用Mueller-Hinton(MH)培养基且培养体系稳定、接种量固定、质控菌株具有可重复的遗传

稳定性后, 药物的浓度质控就成为焦点^[6].

药物的质控一般采用与待检菌株相近的标准菌株通过纸片扩散法测定抑菌圈直径或者微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 如果95%的测定值落在允许范围, 且MIC大多数接近允许范围的中间值, 则表明药物浓度合格^[7].

在质控可靠的前提下要将MIC或抑菌圈与药敏试验折点值(breakpoint)比较, 作检测结果的解释: 小于S(susceptible)为敏感, 表明由检测菌株引起的感染能

引用格式: 王杰, 张庆, 李璐璐, 等. 以梯度平板法改进药敏试验方法及其药物浓度质量控制. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 740-749
Wang J, Zhang Q, Li L L, et al. Improve antibiotic susceptibility test and its quality control by linear-gradient plate (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2017, 47: 740-749, doi: 10.1360/N052017-00048

被针对此种感染和感染种群的推荐剂量抗菌药物所抑制; 大于R(resistant)为抗药, 表明抗药性菌株不能被抗菌药物使用正常剂量达到的正常浓度所抑制, 和/或MIC落入特殊的细菌抗药机制容易出现的范围(如 β -内酰胺酶), 并且在临床治疗上的效果不可靠; 而设置了中介I(intermediate)指由分离株引起的感染部位药物浓集或者可以采用高剂量的药物时进行治疗. 同时提供一个“缓冲区”, 以避免小的、不可控的、技术性的因素引起的标准解释的重大偏差^[2-5,8].

由于非线性的浓度设置^[9], 纸片扩散法^[10]和肉汤或琼脂稀释法^[11]仍然不能测定准确的MIC, 也不能预测使用该抗生素可能出现的抗药性. 这些局限性不是靠修订方法和折点值能解决的^[12,13]. 本文利用大肠杆菌比较微量肉汤稀释法、琼脂稀释法和梯度平板法^[14,15]对几种主要抗生素的质控结果, 确定可靠的梯度平板质控方法, 以梯度平板改进常规的药敏试验和判定方法.

1 材料与方法

1.1 菌株

药敏试验的质控菌株*E. coli* ATCC25922、临床分离大肠杆菌26和27号菌株.

1.2 培养基

Mueller-Hinton Borth (MHB) 液体培养基、Mueller-Hinton Agar (MHA) 固体培养基等.

1.3 药物

氨苄西林、四环素、庆大霉素、环丙沙星, 质控范围^[14](H-L, high-low)分别为8-2, 2-0.5, 1-0.25, 0.015-0.004 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, 购自中国兽医药品监察所.

1.4 仪器与设备

梯度平板、药敏检测仪、96孔板培养板、药物检测板、离心管、移液器、玻璃培养皿、恒温摇床(ZWY-100H, 上海智城分析仪器制造有限公司)、紫外-可见光分析仪(Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, 美国)、II级A型生物安全柜(SW-CJ-1F, 苏州安泰空气技术有限公司)、电子天平(BP190S, 赛多利斯, 德国)、干燥箱(DHG-9145A, 上海精宏实验设备有限公司)、气浴恒温振荡器(HZQ-X100, Scinetific Industries, 美国)、电热恒温培养箱(HH.B11.420, 上海

一恒科学仪器有限公司)、高压蒸汽灭菌锅(JP61M/HV-85, Hirayama, 日本).

1.5 方法

微量肉汤稀释法参照CLSI标准^[14], 琼脂稀释法参照CLSI并采用96点阵药敏检测仪进行试验; 梯度平板法参照^[12,13]文献方法.

(1) 制备接种菌群. 取ATCC 25922于MHB培养基中, 37°C, 200r/min振荡培养12h; 于MHA培养基上划线, 37°C培养16h后, 从MHA板上挑取单菌落, 再次接种于MHB培养基中, 37°C, 200r/min振荡培养12h, 用MHB培养基稀释至 A_{600} 为0.08~0.1, 菌群数量约为 10^8 cfu/mL.

(2) 配制储存药物. 取4种抗生素标准纯品, 均配制为320 $\mu\text{g/mL}$ 母液和160R药液^[14], 药物配好后-20°C冷冻保存, 备用.

(3) 微量肉汤稀释法质控及药敏试验. CLSI标准中ATCC 25922对以下4种抗生素的质控范围和折点值如表1所示.

在96孔培养板横向的第2~12列每孔加入100 μL MHB肉汤培养基, 在第一孔中加入200 μL 稀释好的药液, 然后用八道移液器从第1列的每孔中吸取100 μL 液体到第2列, 吹打混匀, 再从第2列吸取100 μL 到第3列, 吹打混匀, 依次倍比稀释到第11列, 混匀后从第11列中吸取100 μL 弃掉, 第12列作空白对照.

根据 A_{600} 将ATCC25922菌液在玻璃培养皿中用MHB液体培养基稀释到 10^5 cfu/mL, 然后在96孔培养板中每孔加入100 μL 稀释好的菌液. 37°C培养箱中静置培养12h后, 观察澄清孔的最低浓度MIC. 重复6次, 看MIC是否在质控范围内. 药物浓度分布、质控范围如表2所示.

使用质控合格的药物, 对ATCC 25922进行药敏试验, 测其MIC. 在96孔培养板竖向的第2~8行每孔加入100 μL MHB肉汤培养基, 在第1行的每孔中加入200 μL 稀释好的药液, 然后用八道移液器从第1行吸取100 μL

表1 ATCC 25922对应药物的R值及质控范围($\mu\text{g/mL}$)

药物名称	S	I	R	MIC
氨苄西林	≤ 8	16	≥ 32	2~8
四环素	≤ 4	8	≥ 16	0.5~2
庆大霉素	≤ 4	8	≥ 16	0.25~1
环丙沙星	≤ 1	2	≥ 4	0.004~0.016

表 2 肉汤法质控试验中孔板药物浓度的分布^{a)}

药物列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
氨苄西林	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	空白
四环素	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	空白
庆大霉素	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	空白
环丙沙星	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005	空白
氨苄西林	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	空白
四环素	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	空白
庆大霉素	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	空白
环丙沙星	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.016	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005	空白

a) 粗体为药物质控范围

表 3 微量肉汤稀释法药敏试验中 96 孔板浓度的分布 (μg/mL)^{a)}

行 药物	氨苄西林	四环素	庆大霉素	环丙沙星
1	16	8	2	0.125
2	8	4	1	0.0625
3	4	2	0.5	0.0312
4	2	1	0.25	0.016
5	1	0.5	0.125	0.008
6	0.5	0.25	0.0625	0.004
7	0.25	0.125	0.0312	0.002
8	空白	空白	空白	空白

a) 粗体为药物质控范围

液体到第2行, 吹打混匀, 再从第2行吸取100μL到第3行, 吹打混匀, 依次倍比稀释到第7行, 混匀后从第7行中吸取100μL弃掉, 第8行作空白对照。

在 96 孔培养板中每孔加入 100μL 稀释好的 10⁵cfu/mL 的菌液。37℃ 培养箱中静置培养 12h 后, 观察澄清孔的最低浓度 MIC。每种药做 12 个平行, 观察统计 MIC 分布频率。药物浓度分布如表 3 所示。

(4) 琼脂稀释法药敏试验 ATCC25922 的 MIC。将储存药物稀释到相应浓度, 取 2mL 稀释好的药加入 18mL 的 45℃~50℃ 的 MHA 培养基中, 迅速混匀, 倾倒入药物检测板, 药板终浓度如表 4, 每个浓度各 3 个重复。

表 4 琼脂稀释法药敏试验中药物检测板浓度的分布 (μg/mL)^{a)}

药物	1	2	3	4	5
氨苄西林	16	8	4	2	1
四环素	4	2	1	0.5	0.25
庆大霉素	2	1	0.5	0.25	0.125
环丙沙星	0.312	0.016	0.008	0.004	0.002

a) 粗体为药物质控范围

30 个 2mL 离心管中分别加入 1mL 生理盐水, 各挑入 *E. coli* ATCC25922 单菌落, 振荡器震匀。向 96 孔板中各孔对应加入 200μL 菌液。之后用灭菌的 96 点阵接种仪沾取孔板中的菌液, 一一对应接种于药物检测板上, 37℃ 培养箱中倒置培养 12h 后观察结果。

(5) 梯度平板法质控试验。将储存药物稀释到一定浓度, 取 1mL 稀释好的药物溶液加入 15mL 的 45℃~50℃ 的 MHA 培养基中作 16 倍稀释, 混匀倾倒入梯度平板斜面。低浓度的药物培养基倾倒入于梯度平板中, 梯度平板倾斜一定角度, 使其底面高端刚好浸没琼脂, 待凝固后, 将梯度平板放平, 将另一份高药物浓度的 16mL 琼脂培养基倾倒入于上面, 凝固, 室温静置 14h, 药物扩散平衡形成均匀连续线性浓度的梯度平板(图 1A 和 B)。

图 1 线性梯度平板(网络版彩图)

质控试验制备相对特殊的梯度平板, 下层琼脂为无药MHA, 上层为高出质控范围2个梯度的药物琼脂, 使其形成0~2H的梯度平板(12个重复).

取过夜培养的ATCC 25922菌液, 用MHB培养基稀释至 A_{600} 值0.08~0.1, 菌浓度约为 10^8 cfu/mL. 每格200 μ L均匀涂布(仅是铺开)于制备的梯度平板上, 置于37 $^{\circ}$ C培养12h后, 观察实验结果. 根据菌苔分界线处的刻度按线性关系计算菌株的MIC值.

为探索梯度平板上接种高于 10^5 cfu/mL的不同浓度菌液后菌落形成的MIC分界线规律, 利用相对特殊的梯度平板来探索, 下层琼脂为无药MHA, 上层为高出质控范围2个梯度的药物琼脂, 使其形成0~2H的梯度平板(3个重复). 以抗生素氨苄西林为例, 菌液浓度分别为 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/mL, 每格200 μ L均匀涂布于制备的梯度平板上, 置于37 $^{\circ}$ C培养12h后, 观察实验结果.

制备相对含量为70%, 50%, 40%的储存药物, 稀释相应倍数后倒药物梯度平板, 重复(6)试验(各3个重复), 检验是否可以根据菌落分界线倒推出药物相对含量.

(6) 梯度平板法药敏试验. 配制160R浓度的药物溶液, 在MHA梯度平板的三格中分别制备每个药物如下3个范围的梯度平板: 0-S, S-R, R-8R, 各4个重复. 4种药物的S, I和R值见表1. 在平板表面均匀涂布200 μ L菌液, 3株菌液浓度均为 10^8 cfu/mL培养12h, 观测菌苔边缘线, 并计算MIC.

据梯度平板上菌落生长情况可知在菌体MIC分界线以上零星会有一些单菌落生长, 以26号大肠杆菌与抗生素四环素为例挑取菌落MIC分界线以上的单菌落摇菌, 再以梯度平板相同的方法测定其MIC分界线以上的单菌落菌体的MIC, 37 $^{\circ}$ C培养12h, 观测对比菌苔边缘线变化情况.

2 结果与分析

2.1 3种方法的质控试验结果

微量肉汤稀释法和琼脂稀释法质控试验测定的ATCC 25922 MIC频率分布和质控范围如表5所示, 琼脂稀释法更为灵敏和准确, 有上下的波动; 而微量肉汤稀释法^[15]由于主观的判断, 容易趋同; 梯度平板法测定的MIC更为稳定和准确.

图2A~D为肉汤倍比稀释法测得氨苄西林、四环素、庆大霉素、环丙沙星对ATCC 25922的MIC, 其具体MIC分布频率如表5所示.

图3中A~D为琼脂稀释法测定的氨苄西林、四环素、庆大霉素、环丙沙星对ATCC 25922的MIC.

药物浓度为0~2H的氨苄西林、四环素、庆大霉素、环丙沙星梯度平板上ATCC 25922的生长情况分别如图4A~D所示, 其MIC分布频率如表5所示.

从图4A~D可以计算得其ATCC 25922的MIC相应值分别为: 氨苄西林: $8\mu\text{g/mL} \div 7.6\text{cm} \times 2.6\text{cm} = 2.736\mu\text{g/mL}$, 为理论值 $4\mu\text{g/mL}$ 的68%; 四环素: $2\mu\text{g/mL} \div 7.6\text{cm} \times 3.5\text{cm} = 0.921\mu\text{g/mL}$, 为理论值 $1\mu\text{g/mL}$ 的92%; 庆大霉素: $1\mu\text{g/mL} \div 7.6\text{cm} \times 3.7\text{cm} = 0.486\mu\text{g/mL}$, 为理论值 $0.5\mu\text{g/mL}$ 的97%; 环丙沙星: $0.032\mu\text{g/mL} \div 7.6\text{cm} \times 1.2\text{cm} = 0.005\mu\text{g/mL}$, 为理论值 $0.008\mu\text{g/mL}$ 的63%; 以氨苄西林为例, 每格接种200 μ L不同浓度的ATCC 25922菌液, 菌液浓度分别为 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/mL, 均匀涂布后梯度平板上菌体生长情况如图5所示, 每平板接种浓度在 10^5 cfu/mL以上时, 其MIC结果均相同. 实际上对于一个单菌落群体, 其MIC也是呈现正态分布, 边缘线是其峰值, 在接种量大的时候, 峰值明显, 高MIC的峰尾也容易出现抗药性菌落, 即表现为MIC菌落分界线以上单菌落增多.

表5 3种方法测定的氨苄西林、四环素、庆大霉素、环丙沙星MIC频率分布^{a)}

药物浓度 (μg/mL)	微量肉汤稀 释法 MIC频率	琼脂稀释法 MIC频率	梯度平板法 MIC(μg/mL)
氨苄西林			2.736
16			
8	2	5	
4	10	283	
2			
1			
四环素			0.921
4			
2			
1	12	282	
0.5		6	
0.25			
庆大霉素			0.486
2		3	
1		16	
0.5	12	259	
0.25			
0.125			
环丙沙星			0.005
0.032			
0.016			
0.008	12	282	
0.004		6	
0.002			
合计	12	288	

a) 粗体为药理论值

2.2 梯度平板法确定药物浓度

制备相对含量为70%, 50%, 40%的储存药物, 稀释相应倍数后倒药物梯度平板, 根据菌落分界线倒推药物浓度(图6).

仅以ATCC 25922对氨苄西林为例分析: 以梯度平板法测得的MIC为2.736 μg/mL, 据此可推测出梯度平板上最高点的药物浓度: 70%含量的最高点药物浓度: $2.736 \mu\text{g/mL} \div 3.1 \text{ cm} \times 7.6 \text{ cm} = 6.7 \mu\text{g/mL}$; 50%含量的最高点药物浓度: $2.736 \mu\text{g/mL} \div 3.9 \text{ cm} \times 7.6 \text{ cm} = 5.33 \mu\text{g/mL}$;

40%含量的最高点药物浓度: $2.736 \mu\text{g/mL} \div 4.9 \text{ cm} \times 7.6 \text{ cm} = 4.24 \mu\text{g/mL}$. 由于倒板时与培养基做了16倍稀释, 在此之前储存药物稀释了2倍, 此时3种储存药物浓度为214, 171, 136 μg/mL, 是320 μg/mL的67%, 53%, 43%, 与之前的稀释含量相符. 同理可以计算出其他药物的百分含量.

2.3 梯度平板法药敏试验

梯度平板的三格中分别制备每个药物如下3个范围的梯度平板: 0-S, S-R, R-8R, ATCC 25922在其药板上的生长情况如图7所示.

从图7可以计算得其ATCC 25922的MIC相应值分别为: 氨苄西林: $8 \mu\text{g/mL} \div 7.6 \text{ cm} \times 2.6 \text{ cm} = 2.736 \mu\text{g/mL}$; 四环素: $4 \mu\text{g/mL} \div 7.6 \text{ cm} \times 1.8 \text{ cm} = 0.947 \mu\text{g/mL}$; 庆大霉素: $4 \mu\text{g/mL} \div 7.6 \text{ cm} \times 0.9 \text{ cm} = 0.474 \mu\text{g/mL}$. 与之前梯度平板法测得的MIC值很接近. 由于环丙沙星对ATCC 25922的MIC非常小, 而S值相对较大, 所以基本没有菌落生长, 没有形成明显分界线.

26号大肠杆菌在其0-S, S-R, R-8R药板上的生长情况如图8所示.

从图8可以明显看出大肠杆菌菌群群落的MIC分界线, 计算26号大肠杆菌的MIC, 并确定MIC在折点值的范围: 四环素: $16 \mu\text{g/mL} + (8 \times 16 - 16) \mu\text{g/mL} \div 7.6 \text{ cm} \times 1.1 \text{ cm} = 32.21 \mu\text{g/mL}$, R; 庆大霉素: $4 \mu\text{g/mL} + (16 - 4) \mu\text{g/mL} \div 7.6 \text{ cm} \times 3.9 \text{ cm} = 10.16 \mu\text{g/mL}$, I; 环丙沙星: $4 \mu\text{g/mL} + (8 \times 4 - 4) \mu\text{g/mL} \div 7.6 \text{ cm} \times 2.8 \text{ cm} = 12.84 \mu\text{g/mL}$, R.

挑取26号大肠杆菌菌落MIC分界线以上的单菌落摇菌, 梯度平板法再测其MIC分界线以上的单菌落菌体的MIC, 其菌体的MIC变化生长情况如图9所示, 结果显示26号大肠杆菌菌落MIC分界线以上的单菌落的MIC分界线升高, 其MIC值增大, 四环素抗性增加.

同理其他大肠杆菌菌株与其他几种抗生素药物的MIC变化也是如此. 通过梯度平板法药敏试验可以预测抗药性的发展趋势和程度, 如庆大霉素菌苔离散, 表明使用S到R的浓度会筛选出大量抗性较高且抗性不同的菌株.

3 讨论与结论

3.1 质量控制

一系列质控试验是药敏试验的基石, 在 CLSI和

图2 A~D肉汤倍比稀释法测得的氨苄西林、四环素、庆大霉素、环丙沙星对ATCC 25922的MIC(网络版彩图)

图3 琼脂稀释法测定的氨苄西林、四环素、庆大霉素、环丙沙星对ATCC 25922的MIC(网络版彩图)

A: 1, 2, 4 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄西林药板上ATCC 25922菌落; B: 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素药板上ATCC 25922菌落; C: 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素药板上ATCC 25922菌落; D: 0.002, 0.004, 0.008 $\mu\text{g/mL}$ 环丙沙星药板上ATCC 25922菌落

EUCAST标准中以较大篇幅强调, 其基础方法是微量肉汤稀释法, 衍生了纸片扩散法^[2-5]. 本实验之前已经验证过了梯度平板中药物浓度呈均匀的线性关系, 垂直于琼脂坡面方向药物形成连续的线性梯度, 而上层琼脂表面以一定角度与其相交, 表面药物必然形成线性梯度^[14].

本文结合质控试验和药敏试验对梯度平板法进

行验证, 梯度平板法所测得的MIC与肉汤倍比稀释法和琼脂稀释法测得的MIC结果一致, 且因为线性设置的药物浓度, MIC更加精确. 从杀菌动力学角度看, 随着抗生素的浓度线性提高, 存活的菌量呈S型下降曲线, 而不是线性或者垂直阶梯形^[9]. 因此MIC应该是杀菌曲线的拐点到0的较窄范围, 但接种量超过1000 cfu无法在药物平板上计数菌落, 而梯度平板是较为稳定

图4 药物浓度为0~2H的梯度平板上ATCC 25922的菌苔生长情况(网络版彩图)

图5 氨苄西林药物浓度为0~2H的梯度平板上不同浓度ATCC 25922的菌苔生长情况(网络版彩图)

A~D的接种浓度分别为 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 cfu/mL

和简易的方法, 不受接种量限制^[6], 能清晰地展示离散的抗药性菌落。

梯度平板展示了菌群所有可能的MIC分布, 包括高于群体MIC的抗性离散菌落; 但是在肉汤或者琼脂稀释法中, 这些离散菌落就是代表了群体的MIC, 也存在一定的不稳定性, 加上倍比稀释的梯度设置, 所以要不同程度地高于梯度平板中的MIC。

粗略统计CLSI质控标准允许范围^[3,4], 抑菌圈范围差值为6, 7, 8mm的约各占30%; 实际上抑菌圈直径和药物浓度是非线性关系, 这种设置本身凭感觉制定, 仅是定性的方法, 比MIC粗放。MIC允许范围为3个倍比

梯度的约占75%, 4个倍比梯度的占25%; MIC是较为精确的定量方法, 它的误差源于两个方面: (i) 浊度的判断不是很客观明晰; (ii) 倍比稀释跨度较大且不均匀^[16]。如99%, 50%, 25%含量的3个头孢西丁样品都配制成4096 μ g/mL的溶液, 经过倍比稀释到4, 2, 1 μ g/mL, 测定MIC也落在允许范围1~4 μ g/mL, 按照CLSI质控准则都是100%含量的合格药物; 但是实际上无法判定3个药物到底原始浓度是多少, 况且还有浊度的模糊性干扰。之所以没有太大问题, 可能药物一般质量都不错, 或许错了也不自知, 将错就错了。因此, 本文精确地测定MIC, 推算药物的原始浓度, 能更好地保证质控

图 6 相对含量为70%, 50%, 40%的储存药物稀释相应倍数后倒药物梯度平板, ATCC 25922的生长情况(网络版彩图)

图 7 ATCC 25922在浓度梯度为0-S, S-R, R-8R的药板上的生长情况(网络版彩图)

图 8 26号大肠杆菌在浓度梯度为0-S, S-R, R-8R的药板上的生长情况(网络版彩图)

图9 26号大肠杆菌在四环素浓度梯度为0-S, S-R, R-8R的药板上菌体MIC的变化情况(网络版彩图)

A: 梯度平板上26号大肠杆菌原始菌体MIC分界线分布情况; B: 梯度平板上26号大肠杆菌原始菌体MIC分界线以上一单菌落(箭头所指)MIC分界线变化情况

试验的可靠性。

3.2 梯度平板药敏试验

梯度平板法测定细菌群落的MIC虽然不能像肉汤倍比稀释法那样快捷找到MIC范围,但其提供了连续线性梯度,具有显著优点和重要用途。所以梯度平板法在改进质控试验同时,设置0-S, S-R, R-8R这样3个线性梯度,首先判断菌株敏感性范围,同时精确测定

细菌群落的MIC值,并能有效分离出抗性菌株,预警该抗生素使用后可能出现的抗药性,进而指导临床抗菌药物的选择和应用。

梯度平板的主要困难在于手工制备的繁琐和不稳定性,如果按照CLSI或EUCAST的S, I, R范围标准自动化生产即用型梯度平板,将便利临床药敏试验,改进抗药性筛选技术,在《遏制细菌耐药国家行动计划》中发挥作用^[17]。

参考文献

- 1 Wheat P F. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 48(suppl 1): 1-4
- 2 刘玉庆,李璐璐,骆延波,等. EUCAST欧盟药敏试验标准. 北京: 中国标准出版社, 2016, 5: 017
- 3 Pragasam A K, Veeraraghavan B, Bakthavatchalam Y D, et al. Strengths and limitations of various screening methods for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae including new method recommended by clinical and laboratory standards institute, 2017: a tertiary care experience. *Ind J Med Microbiol*, 2017, 35: 116
- 4 Edition A S F. CLSI document VET01-A4. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013
- 5 刘玉庆,李璐璐,骆延波,等. 兽医病原菌琼脂稀释法药物敏感性试验规范(DB37T 2806 - 2016). 山东省地方标准, 2016
- 6 Firsov A A, Vostrov S N, Kononenko O V, et al. Prediction of the effects of inoculum size on the antimicrobial action of trovafloxacin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43: 498-502
- 7 李璐璐,骆延波,胡明,等. 抗生素药敏试验国际标准比较. *家禽科学*, 2014, (9): 20-23
- 8 Turnidge J, Paterson D L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 391-408
- 9 Liu Y Q, Zhang Y Z, Gao P J. Novel concentration-killing curve method for estimation of bactericidal potency of antibiotics in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 3884-3891
- 10 陈秀枢. 纸片扩散法抗生素敏感性试验的局限性及其补充方法. *临床检验杂志*, 1994, 12: 2-5
- 11 Bonev B, Hooper J, Parisot J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61: 1295-1301
- 12 刘玉庆,张怀强,胡明,等. 药敏试验方法的局限性及改进的建议. *山东大学学报: 医学版*, 2011, 49: 124-132
- 13 李璐璐,骆延波,齐静,等. CLSI药物敏感性试验标准VET01-A4概述及更新要点. *中国家禽*, 2014, 36: 63-66
- 14 刘玉庆,李靖冉,杜加法,等. 用线性梯度平板准确测定药物敏感性和分离抗药性菌株. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 748-755
- 15 Shimkets L J, Dworkin M, Keller K H. A method for establishing stable concentration gradients in agar suitable for studying chemotaxis on a solid surface. *Can J Microbiol*, 1979, 25: 1460-1467
- 16 张箐,赵俊杰,李运喜,等. 微量肉汤稀释法药敏试验的误差分析. *中国抗生素杂志*, 2016, 41: 858-864
- 17 国卫医发(2016)43号, 遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020年)

Improve antibiotic susceptibility test and its quality control by linear-gradient plate

WANG Jie^{1,2}, ZHANG Qing¹, LI LuLu¹, HU Ming¹, LUO YanBo¹, QI Jing¹,
ZHANG Yin¹ & LIU YuQing^{1,2}

1 Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control and Breeding in Shandong Province, Animal Husbandry and Veterinary Institute, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China;

2 Life Science Academy of Shandong University, Jinan 250100, China

Antibiotic susceptibility test (AST) is a precise clinical experiment of choosing sensitive antibiotics, the success of which mainly depends on the reliability of the quality control, and the perspectiveness and accuracy of Minimum inhibitory concentration (MIC). In this paper, the linear-gradient plate method was verified by quality control test and AST. The result of MIC measured by linear-gradient plate method and by the broth and agar dilution is the same, but the former is more accurate due to the linear-gradient antibiotics concentration, which enables researchers to calculate the antibiotic precise concentration and to guarantee the reliability of quality control test. Meanwhile, according to the ranges of sensitive (S), intermediate (I) and resistant (R) defined by Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) or European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standards, three linear gradients (0-S, S-R, R-8R) were set in gradient plate for AST. The sensitive range of antibiotic concentration for bacteria was estimated firstly, and then MIC was calculated precisely, which can effectively isolate the resistant strains, foresee the early antibiotic resistance after using the antibiotics and guide the selection and application of clinical antibiotics. The major problem of linear-gradient method lies in the cumbersome and instability resulting from the hand-made process. However, if ready-to-use gradient plates could be produced mechanically, they will facilitate the clinical AST and improve resistance screening technology.

antibiotic susceptibility test, quality control, gradient plate method, agar dilution method, broth dilution method, minimal inhibitory concentration

doi: [10.1360/N052017-00048](https://doi.org/10.1360/N052017-00048)