

- rat epididymis[J]. *Histochem Cell Biol*, 1998, 109(5-6): 431-447.
- [10] Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1998, 53: 119-136.
- [11] Moore HD. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage [J]. *Andrologia*, 1998, 30(4-5): 233-239.
- [12] Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation [J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 61(1): 7-17.
- [13] Cooper TG. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1998, 53: 119-136.
- [14] Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit [J]. *Asian J Androl*, 2007, 9(4): 483-491.
- [15] Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, et al. Relationship between the association of rat epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56(2): 180-188.
- [16] Lamontagne N, Légaré C, Gaudreault C, et al. Identification and characterization of P31m, a novel sperm protein in *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59(4): 431-441.
- [17] Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, et al. Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Proteomics*, 2005, 5(4): 1003-1012.
- [18] Li JY, Wang HY, Liu J, et al. Transcriptome analysis of a cDNA library from adult human epididymis [J]. *DNA Res*, 2008, 5(3): 115-122.

(收稿日期: 2010-04-27)

## K-B 纸片扩散法药敏试验

谭 瑶, 赵 清 综述, 舒为群, 陈 浩 审校(第三军医大学军事预防医学院环境卫生教研室, 重庆 400038)

**【关键词】** 药敏试验; 纸片扩散法; 耐药监测

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.070

中图分类号: R446.5; R969.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)20-2290-02

细菌的耐药性和抗生素的合理使用是全球广泛关注的问题。其中细菌对抗生素敏感试验(以下简称药敏试验)在延缓和控制细菌耐药性、合理使用抗生素方面发挥着重要作用。它能对抗生素临床治疗的效果进行预测、监测耐药量、减少治疗错误。目前药敏试验的方法主要有: Kirby-Bauer 法(以下简称 K-B 纸片扩散法)、稀释法、E test 法以及运用全自动微生物分析仪(Vitek、Microscan、Sensititre ARIS、ATB 等)进行药敏测试。其中由 Bauer 和 Kirby 所建立的纸片琼脂扩散法, 即 K-B 纸片扩散法是各国临床微生物学实验室广泛采用的药敏试验方法<sup>[1]</sup>。

早在 1993 年美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)法规指出, K-B 纸片扩散法适用于快速生长的细菌, 它们包括肠杆菌科、葡萄球菌科、假单胞菌属、不动杆菌属、产单核细胞李斯特菌和某些链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎球菌等稍加修改也适用, 但对苛养菌、厌氧菌、真菌、分枝杆菌等应遵照 NCCLS 的其他文件规定进行药敏试验<sup>[2]</sup>。我国于 1995 年开始采用 NCCLS 1993 年和 1994 年关于药敏纸片法文件中的实验方法, 实现了国内耐药监测方法的标准化。虽然 K-B 纸片扩散法是 WHO 推荐使用的药敏试验方法, 但该方法与其他方法相比有其自身的优点和不足。

### 1 K-B 纸片扩散法的特点

**1.1 K-B 纸片扩散法的优点** 药敏试验具有重复性较好、操作简便、试验成本相对较低、结果直观、容易判读、便于基层开展的优点。在头孢西丁纸片法检测 *mecA* 基因介导的耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)试验中, 头孢西丁纸片扩散法的特异性优于苯唑西林纸片扩散法、苯唑西林琼脂稀释法, 无假阳性出

现, 与 *mecA* 基因检测完全相符<sup>[3]</sup>。有文献报道头孢西丁纸片扩散试验可用于检测各种表型的 MRSA, 尤其对低水平、异质性耐药的 MRSA, 其敏感性高于苯唑西林琼脂稀释法和 VITEK2 系统检测<sup>[4]</sup>。进口的细菌自动快速监测仪、细菌抑菌圈测定系统虽然仪器先进可靠, 自动化程度高, 但这些仪器设备昂贵, 并且需要专业技术人员操作, 试验的仪器设备必须要有专用生物试剂, 价格较高, 不利于基层医院使用。

**1.2 K-B 纸片扩散法的缺点** K-B 纸片扩散法虽然是一种传统、经典的药敏试验方法, 但随着计算机的发展为细菌检验自动化奠定了良好基础, 全自动微生物分析仪的推广和应用, K-B 纸片扩散法出现药敏试验假耐药、受人为因素影响较大、试验耗时长缺点也渐渐体现出来, 同时快速性、准确性方面存在不足。

尽管半自动细菌鉴定和药敏分析系统有诸多优点, 但是半自动细菌鉴定和药敏分析系统是一种不连续稀释, 通过检测浊度判读药敏结果, 并且对药物的选择缺乏灵活性, 在检测一些特殊菌株的耐药性时可靠性欠佳, 因此目前在临床工作中尚不能完全取代纸片扩散法。

### 2 K-B 纸片扩散法的操作技术要点

K-B 纸片扩散法受培养基的质量、细菌接种量、培养基、药敏纸片的质量、纸片含药的准确性和均匀性等诸多因素的影响较大<sup>[5]</sup>, 但是至今未对其做出明确的规范。现将纸片扩散法的操作技术要点总结如下, 为实现 K-B 纸片扩散法标准化提供参考。

#### 2.1 菌液浓度

**2.1.1 菌液浓度判定标准** 对于任何细菌的药敏试验, 将提

纯的细菌配制成适当浓度是得到正确结果的基本保证。若菌液浓度过高,会出现该菌对所有药物耐药的结果。相反,菌液浓度过低,则会出现该菌对所有药物均敏感的结果。有文献报道,菌液浓度越大,抑菌圈越小。原菌液和 10 倍稀释菌液之间相差幅度最大,约为其他浓度的 2 倍。继续稀释,抑菌圈变化幅度变小,每差 10 倍,抑菌圈相差约 1.3 mm<sup>[6]</sup>。根据 NCCLS 法规规定,接种的菌量应稀释到浓度为 0.5 麦氏比浊管,相当于  $5 \times 10^{7-8}$  cfu/mL<sup>[2]</sup>。

**2.1.2 菌液浓度测定方法** 使用分光光度计测定新鲜培养物菌悬液的吸光度来确定菌液浓度是最为精确的方法,国家细菌耐药性监测网的三级甲等医院的微生物实验室绝大多数用此方法来原因确定药敏试验的菌液浓度,部分中、小实验室则采用麦氏比浊法。使用自配麦氏比浊管的实验室,应注意经常更换新的比浊管。在使用分光光度计测定时检测波长的选择上,截至目前,国内外的相关报道尚不多见。有研究分别作 405、450、492、510、540、620、690 nm 7 个波长的测定,发现其中 620 nm 对细菌有较大吸收,而对细菌外的成分无吸收,或者很低吸收,是易于观察生长菌与被抑菌的代表指标<sup>[7]</sup>。本实验室对大肠埃希菌的标准菌株进行药物敏感试验分别作 490、600、620 nm 3 个波长的测定,以及后续药敏试验,结果一致。

**2.2 细菌接种量** 细菌接种量是药敏试验结果产生较大偏差的原因之一,余修中<sup>[8]</sup>在 K-B 纸片扩散法药敏试验菌液量的规范研究中提出固定接种 0.35 mL 菌液量的规范。到目前为止,NCCLS 推荐使用的仍是采用无菌棉拭子蘸取菌液,在管壁上挤压去掉多余菌液,用棉拭子涂布整个 M-H 培养基表面,对接种菌量未做客观要求。鉴于上述情况,建议在进行药敏试验用棉拭子涂布时,尽量保证选用同一品牌、大小相同的棉拭子,以减少误差。

### 2.3 培养基

**2.3.1 培养基的种类** 进行细菌药敏试验所用的培养基种类较多。在大多数情况下,采用 WHO 统一要求的 M-H 培养基进行的药敏试验效果较好。张彩芳和张爱君<sup>[6]</sup>研究表明,选国产和进口的共 5 种琼脂,均表现出琼脂浓度越大、抑菌圈直径越小的相同规律。有研究证明 3 种不同 M-H 培养基进行纸片扩散法,实验结果相同。

**2.3.2 培养基的质量** 目前临床多用 4 mm 厚平板,允许 ±1 mm 误差,如此控制平板厚度即可满足试验要求。有研究表明,平板每增厚或减薄 1 mm,抑菌圈相应减小或增大 0.7 mm<sup>[6]</sup>。也有报道提出在选择培养基时,应注意以下 6 个影响药敏试验条件的因素:M-H 培养基配方、国产琼脂粉或进口琼脂粉、琼脂浓度 1.0%~2.0%、pH 7.4 左右、平皿直径 90 mm、4 mm 厚平板、允许 ±1 mm 误差。

**2.4 药敏纸片** 药敏纸片有自制和成品两种,自制纸片时应选用优质纸片,用打孔机(或打孔器)打成直径为 6.00~6.35 mm 的圆纸片,纸片的厚度要求在 1 mm 左右,纸片的厚度过厚或过薄、直径过大或过小均将影响药物的扩散速度和细菌的生长,从而影响药敏试验的结果。

在实际操作中,有两个现象容易忽视,一是纸片吸药液往往不完全,使纸片的药物含量不够;另一个是有些药物在药敏片干燥过程中,药效有所损失。可以通过选择稍厚的滤纸,用 100 片纸片吸干 1 mL 液体的方法来解决。对干燥过程中容易失效的药物应采取现场制作,即将配制好的药液用微量加样器

取 100 μL 加入 10 片备用纸片浸泡,浸泡后马上用于抑菌试验,以减少药敏试验误差,能真实反映药物对致病菌的作用。

### 3 总结

K-B 纸片扩散法药敏试验在细菌学与临床细菌学试验中都是重要而常用的试验技术之一。综合近年研究结果有如下发现。

**3.1** K-B 纸片扩散法具有操作简便、重复性较好、试验成本相对较低、结果直观容易判读、便于向中小城市和边远地区普及的优点。

**3.2** K-B 纸片扩散法是一种定性的药敏试验方法,在判定细菌最小抑菌浓度方面准确性不高;与全自动微生物分析仪相比,耗时长,准确性偏低,存在假耐药的问题。

**3.3** 试验过程受培养基的质量、细菌接种量、培养基、药敏纸片的质量、纸片含药的准确性和均匀性等诸多因素的影响较大,目前尚未规范其影响因素,为了减少各种因素的影响,在实行方法的标准化方面有很多问题有待解决。建议制定统一标准,采取必要的控制措施,以统一试验材料,固定试验条件,减少试验误差,提高 K-B 纸片扩散法结果的准确率。

**3.4** 由于纸片扩散法判断标准以大约 80% 抑制区判读为测量边界,存在一定主观性,对于少数纸片扩散法中介或耐药,而对肉汤稀释法敏感或中介的结果应进一步检测 MIC,以确保结果的准确性<sup>[9]</sup>。

### 参考文献

- [1] Andrews JM. For the BSAC working party on susceptibility testing, BSAC standardized disc susceptibility testing method[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 48(Suppl 1): 43-57.
- [2] 王辉,徐英春,陈民钧. 简要介绍美国 NCCLS 药敏试验纸片扩散法法规(1993 年 12 月版)[J]. 中华医学检验杂志, 1995, 18(1): 60-62.
- [3] 赵瑞珍,陈乾,刘彬,等. 头孢西丁纸片法检测 mecA 基因介导的 MRS[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(7): 839-840.
- [4] Annie F, Bernadette G, Philippe HL, et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with ceftiofloxacin and moxalactam, the VITEK2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 2766-2771.
- [5] 倪语星. 抗微生物药物敏感性试验规范[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [6] 张彩芳,张爱君. 纸片扩散法药敏试验条件的选择[J]. 宁夏医学杂志, 2006, 28(12): 946-947.
- [7] 杜美华,黄本成,李华信. 细菌药敏试验比色法的探讨[J]. 临床军医杂志, 2000, 6(28): 26-27.
- [8] 余修中. K-B 法药敏试验中菌液量的规范[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2002, 9(21): 177-178.
- [9] 池云生,李丽. 对影响细菌药敏试验因素的体会[J]. Chinese General Practice, 2004, 17(12): 1612.