

· 基础论著 ·

实验室自制 MH 琼脂培养基与商品药敏琼脂平板比较分析及意义

聂庆东 张秀梅 黄鹤 刘长德

【摘要】 目的 比较实验室自制 MH 琼脂培养基与商品药敏琼脂平板在 3 种质控菌株药敏试验中的结果差异并探讨其临床意义。**方法** 应用琼脂纸片扩散法(K-B 法)随机检测质控菌株的抑菌环直径。**结果** 3 种质控菌株在自制和商品培养基药敏试验结果行 t 检验,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。抗菌药物抑菌环直径的差异将对耐药、中介、敏感的折点判定产生影响。**结论** 不同 MH 琼脂培养基对药敏试验结果判定的影响有重要的临床意义。

【关键词】 琼脂;MH;琼脂扩散;质控菌株;药物敏感试验

Significance and comparative analysis on self-made Muller-Hinton agar plates and the commercial MH plates NIE Qing-dong, ZHANG Xiu-mei, HUANG He, LIU Chang-de. Clinical Laboratory, Tsinghua University Hospital, Beijing 100084, China

Corresponding author: NIE Qing-dong, Email: qdn8@163.com

【Abstract】 Objective To compare the differences of antibacterial susceptible test results between self-made Mueller-Hinton agar plates and the commercial MH plates through three kinds of quality-control strains and discuss the clinical significance. **Methods** Diameters of inhibition zone of quality-control strains' grown plates were measured by agar diffusion method (Kirby-Bauer method) randomly. **Results** T test results of antibacterial susceptible test on self-made Mueller-Hinton agar plates and commercial MH plates were significantly different ($P < 0.01$). Difference of the diameter of inhibition zone will affect the determination of the turning point of drug resistance, intermediate and susceptibility. **Conclusions** Clinical significance of determination on susceptible test result by different MH agar plates is very important.

【Key words】 Agar, MH; Agar diffusion; Quality-control strains; Antimicrobial susceptibility test

体外药物敏感试验结果正确与否对抗菌药物的选择至关重要,WHO 所推荐的琼脂纸片扩散法(改良 Kirby-Bauer 法,K-B 法)是应用标准的方法学原理,根据抑菌环直径大小与最低抑菌浓度的相关性,结合临床上已知敏感或耐药菌株的状态,得到可靠的药敏结果。K-B 法操作简单、重复性好、价格便宜,为普通临床微生物实验室常规方法^[1],而且我国已经统一操作规程,可在各级医院的细菌室中使用,是适合国情的药敏试验方法^[2]。但 K-B 法抗菌药物敏感试验受培养基质量、细菌接种量、琼脂平板厚度、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^[3]。MH 琼脂(Muller-Hinton agar,MHA)是 WHO 所推荐的最适用于 K-B 法测定细菌对抗菌药物敏感性的培养基。国内外大量有关药物敏感试验的研究数据是以 MHA 作为培养基进行试验得出的^[4]。本研究通过对本实验室自制的 MHA 培养基与商品 MHA 平板培养基加以比较分析,进而讨论 K-B 法质量问题中药敏培养基的影响因素,以提高药敏试验结果的准确性,为临床合理用药提供可靠依据。

材料与方法

一、试验材料

1. 培养基:A 组为北京陆桥技术有限责任公司 MHA 干粉;青岛金典生化器材有限公司提供环氧乙烷灭菌 90 mm 平皿;B 组为天津金章一次性 MHA 平板。试验中 MH 琼脂干粉和 MH 琼脂平板均为有注册证和合格证的产品。

2. 药敏纸片:北京天坛生物制品股份有限公司。

3. 质控菌株:纸片扩散法中,最常用的质控菌株^[5]:大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 ATCC27853。

二、实验方法

1. 药敏纸片质量鉴定:药敏纸片的质量十分重要,使用过程中若保存不当,许多品种的药效会很快下降,导致广谱或者超广谱假性耐药菌株增多^[6]。(1)片间差:为衡量不同纸片含药量是否均一的指标。测定方法:以新鲜传代质控菌株接种自制和商品生产的 MHA 平板上,一块平板上贴 6 张相同纸片。35℃ 过夜培养后,记录 6 个抑菌环直径,其最大和最小差不大于 1~2 mm。(2)准确度:判定纸片的实际含药量与标量是否一致。取 6 个直径的平均值与质控标准比较,可初步判断准确度,并通过日间质量进一步确认。(3)纸片保存:药敏纸片置于(-20℃ 以下)冰箱保存,取出后置于室内 10 min 以上使用,以防潮解。

2. 制备 MHA 培养基:托盘天平称取 38 g 干粉琼脂于 1L 蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,121℃、15 min 高压灭菌后冷至 55℃,在生物安全柜水平实验台上倾注琼脂约 25 ml,厚为 4 mm。琼脂凝固后,检测 pH 值符合 7.2~7.4,琼脂平板应放 4℃ 保存,7 天内用完。

3. 制备菌液:用接种环挑取新鲜菌落,悬浮于生理盐水中,振荡混匀。为保证药敏试验的准确度和精密度,采用法国生物梅里埃 ATB 比浊仪比浊至 0.5 麦氏单位。

4. 接种平板:制备好的接种菌液必须在 15 min 内使用。用灭菌的棉拭子蘸取已校正的菌液,再将多余的菌液在液面上的管壁内轻轻旋转挤出,然后涂布在 MHA 培养基整个表面共 3 次,每次旋转平皿 60°,最后沿平皿周边绕两圈,保证涂布均匀。

5. 贴药敏纸片:须待平板上的水分被琼脂完全吸收后再用无菌镊子贴纸片(纸片间距 25 mm,距离平皿边缘 16 mm),在 15 min 内放 35℃ 恒温孵箱培养。

6. 孵育:平板在孵箱内单独摆放,孵育 18 ~ 24 h 后,读取药敏结果。

7. 判定结果:用游标卡尺测量抑菌环直径,以肉眼见不到细菌明显生长为限。质控菌株无蔓延生长现象。

三、统计学处理

计量数据取平均值,差异性比较采用 Paired-Samples T-Test,数据分析应用 SPSS 13.0 软件。数据来源于随机 50 天的 A 组和 B 组随机药敏试验结果。统计学标准以 $0.001 \leq P \leq 0.01$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、实验数据和统计结果

1. 不同 MH 琼脂培养基的质量控制:选取氨基糖苷类、头孢类、氟喹诺酮类、 β -内酰胺酶抑制剂复合物药敏纸片,通过 50 次随机重复性试验,质控菌株在 A 组和 B 组 MH 培养基上得到的抑菌环直径均符合《全国临床检验操作规程》^[7] 的允许范围,表明不同 MH 琼脂培养基检测抗菌药物敏感试验的准确性有质量保证(表 1)。

表 1 K-B 法检测抗菌药物敏感性试验准确性的质控菌株抑菌环直径允许范围(mm)

抗菌药物	纸片含药量 (μg)	大肠埃希菌 (ATCC25922)	金黄色葡萄球菌 (ATCC25923)	铜绿假单胞菌 (ATCC27853)
头孢吡肟	30	31 ~ 37	23 ~ 29	24 ~ 30
头孢唑肟	75	28 ~ 34	24 ~ 33	23 ~ 29
头孢噻肟	30	29 ~ 35	25 ~ 31	18 ~ 22
头孢他啶	30	25 ~ 32	16 ~ 20	22 ~ 29
头孢曲松	30	29 ~ 35	22 ~ 28	17 ~ 23
左氧氟沙星	5	29 ~ 37	25 ~ 30	19 ~ 26
环丙沙星	5	30 ~ 40	22 ~ 30	25 ~ 33
诺氟沙星	10	28 ~ 35	17 ~ 28	22 ~ 29
庆大霉素	10	19 ~ 26	19 ~ 27	16 ~ 21
哌拉西林/他唑巴坦	100/10	24 ~ 30	27 ~ 36	25 ~ 33

2. 不同 MH 琼脂培养基所得药敏直径比较分析:质控菌株在 A 组自制与 B 组商品 MHA 培养基上随机 50 天进行药敏试验,对得到的 50 组药敏试验数据行 t 检验,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(表 2 ~ 表 4)。表明不同 MH 琼脂培养基检测抗菌药物抑菌环直径的差异将对耐药、中介、敏感的折点判定产生影响。

表 2 大肠埃希菌的 A 组与 B 组药敏抑菌环直径(mm)比较($n = 50$)

抗菌药物	A 组		B 组		t 检验	
	$\bar{x} \pm s$	cv%	$\bar{x} \pm s$	cv%	t	P
头孢吡肟	32.30 \pm 0.64	2.00	33.82 \pm 0.44	1.29	-14.098	0.000
头孢哌酮	31.54 \pm 0.76	2.41	32.30 \pm 0.46	1.43	-6.971	0.000
头孢噻肟	31.88 \pm 0.33	1.03	33.64 \pm 0.56	1.67	-28.847	0.000
头孢他啶	29.64 \pm 0.56	1.90	30.80 \pm 0.49	1.61	-14.965	0.000
头孢曲松	30.36 \pm 0.56	1.85	31.06 \pm 0.93	3.00	-7.000	0.000
左氧氟沙星	31.14 \pm 0.90	2.90	33.08 \pm 0.94	2.85	-23.414	0.000
环丙沙星	33.62 \pm 0.53	1.58	34.82 \pm 0.80	2.30	-10.186	0.000
诺氟沙星	30.88 \pm 0.48	1.55	32.06 \pm 0.42	1.32	-13.267	0.000
庆大霉素	22.82 \pm 0.90	3.92	23.92 \pm 0.63	2.64	-9.012	0.000
哌拉西林/他唑巴坦	26.90 \pm 1.02	3.77	27.90 \pm 0.70	2.53	-5.754	0.000

表 3 金黄色葡萄球菌的 A 组与 B 组药敏抑菌环直径(mm)比较($n = 50$)

抗菌药物	A 组		B 组		t 检验	
	$\bar{x} \pm s$	cv%	$\bar{x} \pm s$	cv%	t	P
头孢吡肟	25.70 \pm 0.71	2.75	27.22 \pm 0.68	2.49	-10.589	0.000
头孢哌酮	27.80 \pm 0.99	3.56	28.84 \pm 0.58	2.00	-11.744	0.000
头孢噻肟	27.62 \pm 1.14	4.13	29.66 \pm 0.48	1.61	-13.268	0.000
头孢他啶	17.82 \pm 0.77	4.34	18.90 \pm 0.42	2.20	-9.498	0.000
头孢曲松	24.92 \pm 1.50	6.00	26.70 \pm 0.68	2.53	-8.699	0.000
左氧氟沙星	26.98 \pm 0.91	3.39	28.26 \pm 0.80	2.84	-8.313	0.000
环丙沙星	25.52 \pm 1.05	4.13	26.82 \pm 1.19	4.44	-7.172	0.000
诺氟沙星	25.22 \pm 0.79	3.13	26.04 \pm 0.90	3.47	-5.662	0.000
庆大霉素	24.00 \pm 1.09	4.53	25.34 \pm 0.77	3.05	-8.477	0.000
哌拉西林/他唑巴坦	30.24 \pm 1.08	3.57	32.00 \pm 1.18	3.68	-9.794	0.000

表 4 铜绿假单胞菌的 A 组与 B 组药敏抑菌环直径(mm)比较($n = 50$)

抗菌药物	A 组		B 组		t 检验	
	$\bar{x} \pm s$	cv%	$\bar{x} \pm s$	cv%	t	P
头孢吡肟	26.62 \pm 0.85	3.21	27.88 \pm 0.39	1.38	-9.908	0.000
头孢哌酮	26.02 \pm 1.04	4.00	27.26 \pm 0.60	2.20	-8.757	0.000
头孢噻肟	19.26 \pm 0.78	4.04	20.38 \pm 0.50	2.41	-10.245	0.000
头孢他啶	26.06 \pm 0.98	3.75	27.62 \pm 0.64	2.30	-15.051	0.000
头孢曲松	19.78 \pm 0.51	2.56	21.46 \pm 0.50	2.35	-19.138	0.000
左氧氟沙星	23.30 \pm 0.84	3.60	24.04 \pm 0.67	2.78	-9.925	0.000
环丙沙星	29.00 \pm 0.76	2.61	30.10 \pm 0.36	1.21	-10.199	0.000
诺氟沙星	28.46 \pm 1.01	3.56	29.72 \pm 0.86	2.89	-9.038	0.000
庆大霉素	18.68 \pm 0.68	3.66	20.02 \pm 0.47	2.36	-14.398	0.000
哌拉西林/他唑巴坦	29.24 \pm 0.77	2.64	30.46 \pm 0.65	2.12	-8.028	0.000

3. 不同 MH 琼脂培养基所得药敏直径的相关性分析:各质控菌的 A 组和 B 组药敏结果相关性分析显示相关系数 $r > 0.95$,呈高度正相关,两组药敏直径为高度线性相关(表 5)。

表 5 两种药敏培养基检测结果相关性分析($n = 50$)

质控菌	r	P	回归方程
大肠埃希菌	0.956	0.000	$Y = 1.146X - 3.310$
金黄色葡萄球菌	0.952	0.000	$Y = 1.022X + 0.706$
铜绿假单胞菌	0.981	0.000	$Y = 0.942X + 2.284$

注: X 为 A 组培养基, Y 为 B 组培养基

二、试验现象及其临床意义

A 组甲氧苄啶/磺胺甲噁唑药敏纸片在质控菌株大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌中的抑菌环较模糊,存在轻微生长现象;B 组甲氧苄啶/磺胺甲噁唑药敏纸片的抑菌环则清晰可见。B 组抑菌环直径测量更加准确。

铜绿假单胞质控菌株所产生的带荧光的水溶性青脓素与绿脓素结合使培养基呈亮绿色。在 A 组培养基上显色较浅或不显色;在 B 组培养基上产生典型的色素。培养基显色能快速、明确鉴定菌种,为临床实验室实用的鉴定方法^[8]。B 组培养基更有助于细菌的鉴定。

讨 论

两种方法所用质控菌株、菌液浓度、药敏纸片、接种方法、培养条件均相同,因此,药敏直径差异是由于培养基种类和质量不同,以及制备过程中操作者是否按照标准化操作等诸多因素所致。国产 MHA 培养基批次间稳定性差,存在拮抗物质及二价离子等因素的影响^[9]。此外,人为因素也同样不可忽视。

MHA 培养基中含有低量的胸腺嘧啶或胸腺嘧啶核苷,可与磺胺类药物和甲氧苄啶竞争,若过量可能会逆转磺胺类和甲氧苄啶的抑菌效应,抑菌环内出现菌株轻微生长,使抑菌环变小、变模糊甚至消失,从而导致假耐药报告。试验中自制的 MHA 培养基也存在类似问题,所以配制过程中需要严格质量管理,检测合格后方可使用。美国临床试验标准研究所(CLSI)采用 TMP-SMZ 纸片鉴定 MHA 培养基中胸腺嘧啶和胸腺嘧啶核苷水平是否足够低,是否在合格范围之内,对粪肠球菌 ATCC 29212 的抑菌环直径应 ≥ 20 mm 且边缘清晰,此为检测 MHA 培养基是否合格的标准之一^[10]。

MHA 培养基中含有适量的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,可起到溶酶作用,其含量变化可影响氨基糖苷类和四环素对铜绿假单胞菌的抗菌活性,如果其含量过高则会使抑菌环变小;若含量过低则会使得抑菌环变大^[11],所以配制过程要使用蒸馏水或者去离子水,且需要检查金属离子含量、导电率和 pH 值^[12]。

MHA 在配制和使用过程中的人为因素有天平称取粉剂的准确性^[13]、抑菌环测量错误或抄写错误等,以及接种物浓度大小造成抑菌环的假性结果或每个平板

上贴的纸片太多造成抑菌环重叠现象等问题。

MHA 溶化后在室温下的 pH 值为 7.2 ~ 7.4, 接近人体体液的 pH 值^[14]。pH 值过高会使四环素的抑菌环变小, 而氨基糖苷类抗菌药物的抑菌环增大, 相反的现象则表明 pH 过低^[15]。

MHA 培养基的厚度要求约为 4 mm, 厚度过高使含药物纸片的药物半球形扩散的体积加大, 导致假耐药; 反之, 则导致假敏感。

实验室自制或商品培养基均应进行细菌学质控试验, 对所有使用培养基性能的预期结果在使用前要进行证实^[16]。由于我国生产的培养基质量参差不齐^[17], MHA 的合格标准化尤为重要。MHA 的标准化有利于质量失控时及时查找原因和校正错误, 有利于室内质控、室间质控的统计分析, 使细菌药敏试验更有保障, 最终目的是为患者提供优质的服务。

药敏结果报告错发成耐药导致临床未对症用药而滥用抗菌药物, 而错发成敏感导致临床用药无效而延误病情。同时, 临床医生就会得出药敏结果不符合临床实际疗效的结论, 对细菌药敏试验结果的信任度随之下降, 也给患者造成不必要的经济负担。各医院间若细菌药敏结果不一致, 会造成各级医院的检验结果无法互认, 使就诊患者产生疑惑, 对医疗信任度也随之降低。

随着抗菌药物的广泛应用, 细菌耐药性也逐渐增强, 因此各个国家、地区准确地监测和评估病原菌的变迁和耐药性的趋势是一项长期而重要的工作。耐药监测不准确使得统计分析结论不真实, 其中监测工作的准确性取决于每个医院的重视程度、人员素质、检测项目、检测水平、样本送检率、规范化统计等综合结果。为减少各种因素的影响, 实验室应建立药敏试验的标准程序(SOP), 采取必要的控制措施, 以统一实验材料、固定实验条件、规范操作程序、加强相互联系与交流、资源共享, 逐步建立全国统一的细菌耐药监测网^[18]。MHA 培养基的质量控制是 SOP 的关键环节之一。

综上所述, 实验室自制 MHA 培养基与商品药敏琼脂平板比较分析结果有着重要的应用价值。只有意识到其存在差异, 才能便于查找原因, 改进工作流程, 从而实现规范化操作; 同时, 也表明细菌药敏试验质量控制的重要性。希望细菌药敏试验数据更加标准化, 并能够得到充分的分析和利用, 进而指导临床加强抗菌药物的应用管理, 促进其合理、安全使用^[19]。

参 考 文 献

- 1 Andrews JM. For the BSAC working party on susceptibility testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother, 2001, 48(Suppl 1): 43-57.
- 2 马翔, 王槐堂. 重视纸片扩散法药敏试验的主要影响因素. 国际检验医学杂志, 2008, 29(04): 383-385.
- 3 倪语星, 王金良, 徐迎春等, 主编. 抗微生物药物敏感性试验规范. 第 2 版. 上海: 科学技术出版社, 2009: 10-11.
- 4 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009.
- 5 马越, 李景云, 金少鸿. 美国临床实验室标准委员会推荐药敏试验操作方法和判断标准(2005 年修订版). 中华医学杂

志,2005,85(17):1182-1184.

- 6 刘国芬, 绪爱君, 孔庆兰. 对细菌检验质量影响因素的分析. 中国误诊学杂志, 2002, 2(8): 1262.
- 7 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程. 第 3 版. 东南大学出版社, 2006: 896-905.
- 8 马翔, 胡汉斌, 易坤, 等. 黏质沙雷菌和铜绿假单胞菌显色琼脂培养基的研制. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 194.
- 9 居建华, 张巧英, 叶虹, 等. 国产 MH 琼脂质量控制的探讨. 上海预防医学, 2008, 20(2): 87-88.
- 10 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010.
- 11 倪芳, 童明庆. 2006 年版 CLSI/NCCLS 有关抗生素敏感试验操作标准的更新要点. 临床检验杂志, 2006, 24(3): 235-239.
- 12 丁士标. 微生物实验室的培养基质量控制浅析. 现代检验医学杂志, 2007, 22(5): 120-121.
- 13 张宏, 刘玉琴. 培养基的正确制备及使用. 基础医学与临床, 2009, 29(4): 446-448.
- 14 闫东辉. 应用 6 种 MH 培养基测试磺胺类药物抑菌圈直径的结果分析. 上海医学检验, 2001, 16(3): 133-135.
- 15 马越, 金少鸿. 细菌耐药监测中质量控制的若干问题. 中华检验医学杂志, 2004, 27(11): 721-723.
- 16 马乐好, 阚方琦. 商品微生物培养基质量状况及其控制. 中国公共卫生, 2007, 23(12): 1535-1536.
- 17 吴清平, 孟凡亚, 蔡芷荷, 等. 微生物培养基质量控制技术和标准. 微生物学通报, 2006, 33(6): 128-132.
- 18 王金良. 我国细菌药敏试验标准化的进程与展望. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 14-15.
- 19 钟初雷, 张国荣, 陈文光. 抗菌药物合理应用系统的建立与应用. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(2): 199-200.

(收稿日期: 2011-02-28)

(本文编辑: 孙荣华)

聂庆东, 张秀梅, 黄鹤, 等. 实验室自制 MH 琼脂培养基与商品药敏琼脂平板比较分析及意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2011, 5(3): 271-277.