

# 碳青霉烯类耐药革兰阴性菌联合药敏试验及报告专家共识

丁丽<sup>1</sup>, 陈佰义<sup>2</sup>, 李敏<sup>3</sup>, 倪语星<sup>4</sup>, 单斌<sup>5</sup>, 苏丹虹<sup>6</sup>, 孙自镛<sup>7</sup>, 王明贵<sup>1</sup>, 杨启文<sup>8</sup>,  
喻华<sup>9</sup>, 俞云松<sup>10</sup>, 张利侠<sup>11</sup>, 张嵘<sup>12</sup>, 朱德妹<sup>1</sup>, 卓超<sup>6</sup>, 胡付品<sup>1</sup>

关键词: 碳青霉烯类耐药革兰阴性菌; 肉汤微量稀释法; 琼脂稀释法; 纸条法; 纸片扩散法; 联合药敏试验

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1009-7708(2023)01-0080-11

DOI: 10.16718/j.1009-7708.2023.01.013

## Expert consensus on antimicrobial synergy testing and reporting of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria

DING Li, CHEN Baiyi, LI Min, NI Yuxing, SHAN Bin, SU Danhong, SUN Ziyong, WANG Minggui, YANG Qiwen, YU Hua, YU Yunsong, ZHANG Lixia, ZHANG Rong, ZHU Demei, ZHUO Chao, HU Fupin (Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Key Laboratory of Clinical Pharmacology of Antibiotics of the National Health Commission, Shanghai 200040, China)

### 1 前言

碳青霉烯类抗菌药物包括亚胺培南、美罗培南和厄他培南等,是治疗多重耐药革兰阴性菌所致感染最有效的抗菌药物之一。随着该类物质在临床的广泛使用,碳青霉烯类耐药细菌(carbapenem-resistant organisms, CRO)的检出率呈逐年上升趋势,其中以肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌为代表。CHINET 中国细菌耐药监测网 2021 年监测结果显示,我国临床分离肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药率分别为 23.1%、23% 和 71.5%<sup>[1-2]</sup>。由于

CRO 通常还携带对其他抗菌药物耐药的基因,呈广泛耐药甚至全耐药的特征,使临床的抗感染治疗面临无药可用的困境,导致感染患者的高病死率。CRO 感染治疗面临的困境急需实验室开展联合药敏试验<sup>[3-11]</sup>,多药联合治疗可延长抗菌药物的使用寿命<sup>[12]</sup>,体外联合药敏试验证实两药呈协同或相加作用的联合,能有效改善 CRO 感染患者的病死率。联合药敏试验可通过两药/多药组合分析不同药物之间的协同抗菌活性,在筛选针对 CRO 菌株所致感染的精准抗感染治疗方案中发挥重要作用。为规范碳青霉烯类耐药革兰阴性菌联合药敏试验及报告,上海市微生物学会微生物耐药防

基金项目:国家重点研发计划(2021YFC2701800, 2021YFC2701803);上海市2021年度“科技创新行动计划”抗菌新药药物敏感试验流行病学折点制定技术标准建立(21DZ2200800);CHINET中国细菌耐药监测网(2018QD100)。

作者单位:1.复旦大学附属华山医院抗生素研究所,国家卫健委抗生素临床药理重点实验室,上海 200040;  
2.中国医科大学第一附属医院;  
3.上海交通大学医学院附属仁济医院;  
4.上海交通大学医学院附属瑞金医院;  
5.昆明医科大学第一附属医院;

6.广州医科大学附属第一医院;  
7.华中科技大学同济医学院附属同济医院;  
8.中国医学科学院北京协和医院;  
9.四川省医学科学院,四川省人民医院临床医学检验中心;  
10.浙江大学医学院附属邵逸夫医院;  
11.陕西省人民医院;  
12.浙江大学医学院附属第二医院。

第一作者简介:丁丽(1994—),女,硕士,技师,主要从事新型抗菌药物体外药理学评价和细菌耐药机制研究。

通信作者:胡付品, E-mail: hufupin@fudan.edu.cn。

控专委会、CHINET 中国细菌耐药监测网和上海市细菌真菌耐药监测网组织专家对上述问题进行了讨论，撰写了专家共识并对联合药敏试验方法和结果报告进行了推荐，以期对各医疗机构开展针对 CRO 菌株的联合药敏试验及报告提供帮助。

## 2 CRO 的定义及耐药机制

碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌 (carbapenem-resistant *Enterobacterales*) 定义为满足以下任意一个条件<sup>[13]</sup>：①对亚胺培南、美罗培南、厄他培南或多利培南任何一种碳青霉烯类抗菌药物耐药者。对于天然对亚胺培南敏感性降低的细菌 (如摩根菌属、变形杆菌属和普罗威登菌属等)，需参考除亚胺培南外的其他碳青霉烯类抗菌药物的药敏结果；②产生碳青霉烯酶。碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌 (carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, CRPA) 和碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌 (carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB) 定义为对亚胺培南、美罗培南或多利培南任何一种碳青霉烯类抗菌药物耐药者<sup>[14]</sup>。产生碳青霉烯酶是肠杆菌目细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药最主要的机制<sup>[15]</sup>，包括 A 类丝氨酸碳青霉烯酶 (以 KPC 酶为主)、B 类金属  $\beta$  内酰胺酶 (以 NDM 型金属酶为主) 和 D 类丝氨酸碳青霉烯酶 (以 OXA-48 型酶为主)。铜绿假单胞菌对碳青霉烯类耐药的主要机制包括 AmpC 酶高表达合并外膜渗透屏障、外排泵高表达以及产生碳青霉烯酶 (包括 KPC 型碳青霉烯酶和金属  $\beta$  内酰胺酶) 等。鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药的主要机制是天然产生 OXA-23、OXA-24 或 OXA-51 型酶。

## 3 开展联合药敏试验的时机

仅当药敏试验结果显示细菌对常规所有测试的抗菌药物均耐药，或临床医师有特殊治疗需求时，开展联合药敏试验筛选可能的多药联合治疗方案。开展联合药敏试验的时机参考图 1。

## 4 联合药敏的方法及其局限性

当前临床微生物实验室常规采用的药敏试验方法包括肉汤微量稀释法、肉汤宏量稀释法、琼脂稀释法、E 试验法、自动化药敏仪器和纸片扩散法。除纸片扩散法为定性检测方法外，其余均为定量检测方法。联合药敏试验方法包括肉汤微量稀释棋盘法、琼脂稀释棋盘法、纸条法 (包括 E

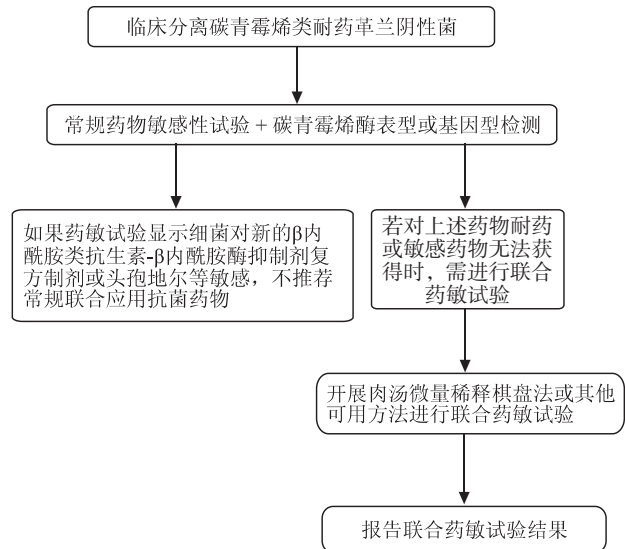


图 1 联合药敏试验时机及结果报告流程

试验条和 MTS 条)、纸片扩散法和联合杀菌曲线等<sup>[16-21]</sup>。肉汤微量稀释棋盘法和琼脂稀释棋盘法是联合药敏试验的标准参考方法，但该方法操作繁琐且基本为手工操作，导致常规实验室开展的可操作性差。因此，操作简单灵活的纸条法和纸片法不失为常规实验室联合药敏可选择的方法。

专家共识一：联合药敏试验是临床微生物室常规药敏试验的补充，仅对多重耐药菌如碳青霉烯类耐药革兰阴性菌或临床医师有特殊治疗需求的耐药菌株进行联合药敏试验，其他菌株不建议常规开展联合药敏试验。

专家共识二：联合药敏试验方法首选肉汤微量稀释棋盘法，若实验室无法开展肉汤微量稀释棋盘法，可以纸条法或纸片扩散法替代。但需注意的是，纸条法或纸片扩散法结果仅供参考，如需确认应采用肉汤微量稀释棋盘法。

## 5 联合药敏试验结果判读

常用部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FIC) 为判断依据<sup>[18-19]</sup>，即①  $FIC \leq 0.5$ ：协同作用，提示两种药物联合后的抗菌活性显著大于各单药；②  $FIC > 0.5 \sim 1$ ：相加作用，提示两种药物联合后的抗菌活性较各单药稍有增加；③  $FIC > 1 \sim 2$ ：无关作用，提示两种抗菌药物的活性均不受另一种药物的影响；④  $FIC > 2$ ：拮抗作用，提示一种抗菌药物的活性被另一种抗菌药物削弱。

FIC 指数计算公式：

$$\text{FIC 指数} = \frac{\text{联合时甲药的 MIC}}{\text{甲药的 MIC}} + \frac{\text{联合时乙药的 MIC}}{\text{乙药的 MIC}}$$

专家共识三：在进行联合药敏试验前，应先进行单药的药敏试验，优先选择敏感的抗菌药物进行联合，或以两药 MIC 值为中心，上下 3~4 个浓度进行交叉联合，开展联合药敏试验。

## 6 联合药敏试验方案推荐

由于不同种类的抗菌药物对产生不同碳青霉烯类菌株的体外抗菌活性不同，不同耐药菌由于耐药机制的差异导致其对抗菌药物的敏感性不同。因此，应根据不同的 CRO 菌株制定不同的抗感染治疗方案。如头孢他啶-阿维巴坦对于产 KPC 酶或 OXA-48 型酶肠杆菌目细菌具有高度抗菌活性，但对于产金属酶菌株需联合氨基糖苷类；替加环素对碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌和鲍曼不动杆菌具有高度抗菌活性，但对铜绿假单胞菌无抗菌活性；而多黏菌素（包括多黏菌素 B 和黏菌素）对上述

三种耐药菌均具有高度抗菌活性（天然耐药菌株除外）。除此之外，磷霉素对肠杆菌目细菌具有较强抗菌活性，但对铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌基本无抗菌活性；阿米卡星对 CRO 菌株具有一定抗菌活性，需根据药敏试验情况而定；而头孢哌酮-舒巴坦（尤其是舒巴坦加大剂量）对于 CRAB 仍具有一定抗菌活性<sup>[22-23]</sup>。基于此，实验室在开展针对 CRO 菌株的联合药敏试验时，需根据不同耐药菌的特征而设计针对性的多药联合药敏试验方案。

专家共识四：各实验室应根据本院 CRO 菌株耐药机制，制定不同联合药敏试验的抗菌药物组合。

专家共识五：对于新 β 内酰胺类抗生素-β 内酰胺酶抑制剂复方制剂，如头孢他啶-阿维巴坦、美罗培南-韦博巴坦和亚胺培南-瑞来巴坦等，若药敏试验结果显示对该类复方制剂敏感，可直接用于敏感菌所致感染的治疗，无需开展联合药敏试验。

专家共识六：对于不同 CRO 菌株联合药敏试验抗菌药物的选择，应参考临床抗感染治疗指南或专家共识确定，具体参考表 1<sup>[22-30]</sup>。

表 1 CRO 联合药敏试验抗菌药物组合推荐

细菌	说明
碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌 (CRE)	1. 如果药敏试验显示细菌对头孢他啶-阿维巴坦、美罗培南-韦博巴坦、亚胺培南-瑞来巴坦和头孢地尔等敏感，则推荐常规联合应用抗菌药物 2. 如果细菌对上述药物耐药或无法获得这些药物，建议以多黏菌素、替加环素和头孢他啶-阿维巴坦为基础，联合氨基糖苷类、磷霉素、碳青霉烯类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类（适用于产金属酶菌株）等联合进行药敏试验，筛选可用的多药联合治疗方案
碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌 (CRPA)	1. 如果药敏试验显示细菌对头孢他啶-阿维巴坦、头孢洛扎-他唑巴坦、美罗培南-韦博巴坦、亚胺培南-瑞来巴坦和头孢地尔等敏感，则不推荐常规联合应用抗菌药物 2. 如果细菌对上述药物耐药或无法获得这些药物，建议以多黏菌素和头孢他啶-阿维巴坦为基础，联合氨基糖苷类、磷霉素、碳青霉烯类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类（适用于产金属酶菌株）等进行联合药敏试验，筛选可用的多药联合治疗方案
碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌 (CRAB)	1. 如果药敏试验显示细菌对头孢哌酮-舒巴坦、氨苄西林-舒巴坦和头孢地尔等敏感，或当增加舒巴坦剂量时显示敏感，则不推荐常规联合应用抗菌药物 2. 如果细菌对上述药物耐药或无法获得这些药物，建议以多黏菌素、替加环素为基础，联合氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢哌酮-舒巴坦、氨苄西林-舒巴坦或氟喹诺酮类等进行联合药敏，筛选可用的多药联合治疗方案

## 7 联合药敏试验方法学简介、优缺点和结果判读 (表 2)

### 7.1 肉汤微量稀释棋盘法

肉汤微量稀释棋盘法<sup>[16-17]</sup>用于测定抗菌药物抑制或杀灭微生物的最低浓度，通常以 mg/L 为单位。抗菌药物 A 和抗菌药物 B 经倍比系列稀释后，以不同浓度组合进行混合，经过孵育后阅读单药

及两药联合后的 MIC。肉汤微量稀释法使用的 96 孔微量板在最终接种完成后通常每孔中液体终体积为 0.1 mL，细菌终浓度为  $5 \times 10^5$  CFU/mL。作为参考方法，肉汤微量稀释棋盘法可精确测定细菌对抗菌药物的敏感性，明确两药之间是否存在协同、相加、无关和拮抗作用（图 2 和图 3）。但该方法比较耗时，工作量且对方法学技术要求高，因此一般仅用于科学研究，常规实验室通常较少开展。

表 2 不同联合药敏试验方法学简介、结果报告、抗菌作用、优缺点、结果判读和推荐级别

方法	结果报告种类	抗菌作用	优点	缺点	推荐级别
肉汤微量稀释棋盘法	协同、相加、无关和拮抗作用	抑菌	金标准方法, 可进行多种药物多种浓度组合测试	操作复杂、需自配试剂 (如有商品化试剂可部分解决问题)	推荐 (高)
琼脂稀释棋盘法	协同、相加、无关和拮抗作用	抑菌	金标准方法, 可进行多种药物多种浓度组合测试	操作复杂、需自配试剂	有条件的实验室可推荐
纸条优加法	仅报告协同作用	抑菌	非金标准方法, 操作简单, 可同时测定多种药物组合	结果判读无参考标准、报告种类少	推荐 (中)
纸条交叉法	协同、相加、无关和拮抗作用	抑菌	非金标准方法, 操作简单, 可同时测定多种药物组合	仅适用于特定的细菌, 如产金属酶肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌	推荐 (高)
常规纸片扩散法	协同、相加、无关和拮抗作用	抑菌	非金标准方法, 操作简单, 可同时测定多种药物组合	结果判读无参考标准、报告种类少	推荐 (中)
纸片优加法	仅报告协同作用	抑菌	非金标准方法, 操作简单, 可同时测定多种药物组合	结果判读无参考标准、报告种类少	推荐 (低)
改良纸片优加法	仅报告协同作用	抑菌	非金标准方法, 操作简单、低成本, 可同时测定多种药物组合	结果判读无参考标准、报告种类少	推荐 (中)
肉汤纸片洗脱法	仅报告协同作用	抑菌	非金标准方法、操作简单、低成本, 可同时测定多种药物组合	结果判读无参考标准、报告种类少	推荐 (高)
联合杀菌曲线	仅报告协同和拮抗作用	杀菌	金标准方法, 测定两药杀菌效应	操作复杂、需自配试剂、结果判读无参考标准	有条件的实验室可推荐

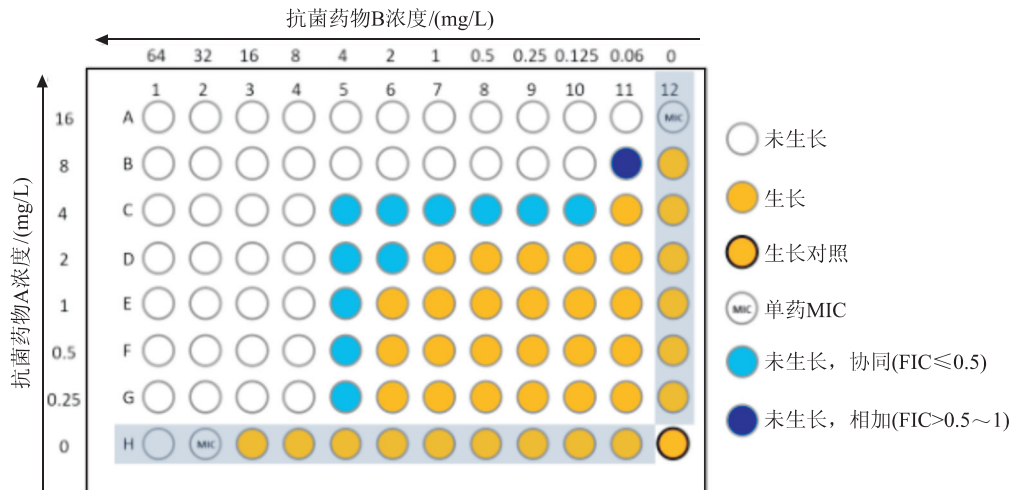


图 2 肉汤微量稀释棋盘法协同、相加示意图

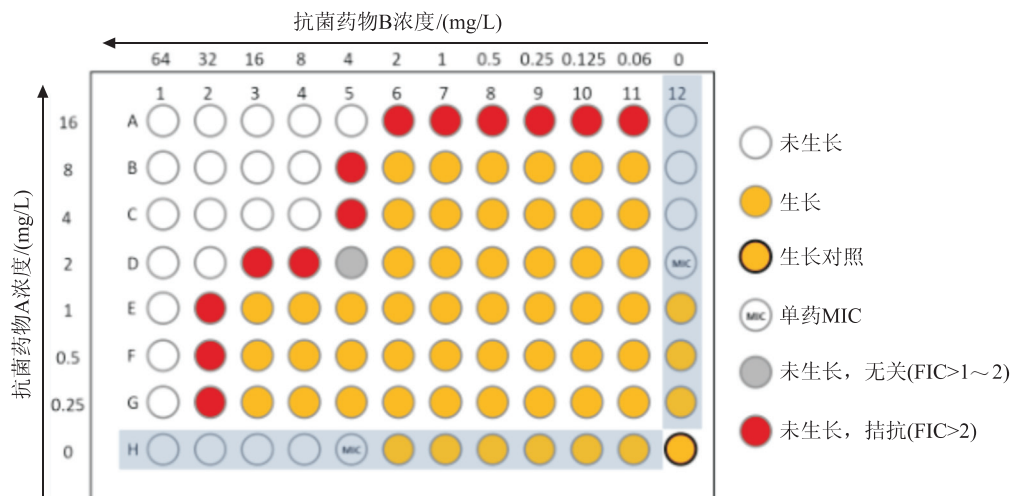


图 3 肉汤微量稀释棋盘法无关、拮抗示意图

## 7.2 琼脂稀释棋盘法

琼脂稀释棋盘法<sup>[31]</sup>是将两种抗菌药物分别配制成单独的不同浓度的溶液,之后以不同的两药药物浓度组合加入到每一块琼脂平板中,配置成含抗菌药物浓度成倍比系列稀释的药物平板。使用多点接种器将制备好的细菌菌悬液点种到琼脂表面,经 35°C 16~20 h 培养后,肉眼观察细菌生长,以未见细菌生长平板的最低药物浓度为 MIC (图 4)。其优点是每个平板可同时测定多株细菌,可直接观察受试菌生长是否良好或污染等。但该方法与肉汤微量稀释棋盘法一样比较耗时,工作量大且对方法学技术要求高,因此一般仅用于科学研究,常规实验室通常较少开展。

## 7.3 纸条法

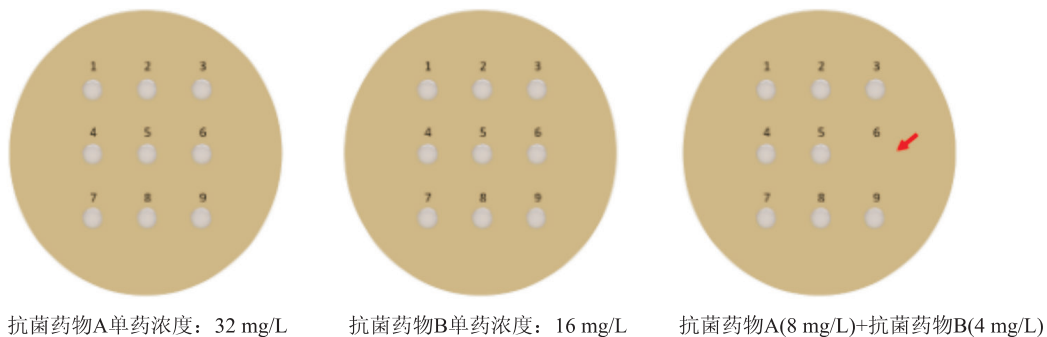
纸条法<sup>[17, 21, 32-34]</sup>亦称梯度扩散法,所用材料名称为 E 试验条 (Epsilon meter, E-test) 和 MIC 测试条 (MIC test strip, MTS),是一种商品化的定量测定细菌对抗菌药物敏感性的方法。它结合了稀释法和扩散法的原理和特点,操作同纸片扩散法一样简便易行,结果又如同稀释法一样,可获得定量的 MIC 值,结果准确,重复性好。纸条法包

括两种:①纸条优加法,操作时在一块已涂布菌液的 MHA 平板上贴上含抗菌药物 A 和抗菌药物 B 的纸条;在另一块已涂布菌液的 MHA 平板上先贴上含抗菌药物 A 的纸条,30 min 后,待抗菌药物 A 完全渗透入琼脂中后移去纸条,再在相同的位置覆盖贴上抗菌药物 B。过夜孵育后阅读抗菌药物 A 单药、抗菌药物 B 单药以及抗菌药物 A 和抗菌药物 B 堆叠后的 MIC (图 5)。②纸条交叉法:抗菌药物 A 和抗菌药物 B 纸条垂直交叉放置 (单药 MIC 处交叉,因此需提前测定单药 MIC),孵育后阅读联合后抗菌药物 A 和抗菌药物 B 的 MIC,计算 FIC 指数,判断两药是否存在协同、相加、无关和拮抗作用 (图 6)。纸条法具有操作简单的特点,且结果容易阅读。

专家共识七:两药协同定义为该菌对抗菌药物 A 和抗菌药物 B 单药均为耐药,但抗菌药物 B 在抗菌药物 A 存在时表现为敏感或中介。

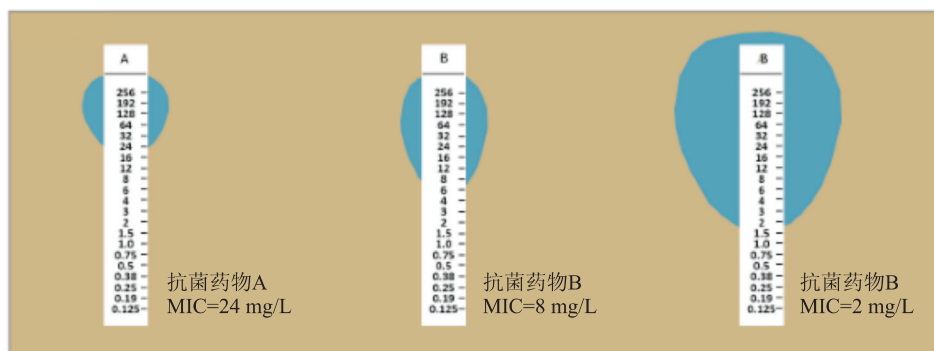
## 7.4 纸片扩散法<sup>[16-17]</sup>

7.4.1 常规纸片扩散法 将含有定量抗菌药物的纸片贴在已接种测试菌的琼脂表面上,纸片中的药物吸收琼脂中的水分后向纸片周围扩散,随着



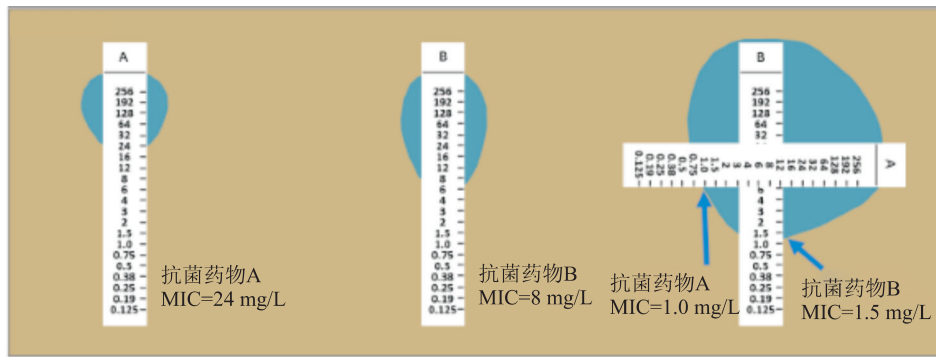
数字代表细菌编号。箭头所示 6 号菌:  $FIC=8/32+4/16=0.5$ , 协同。

图 4 琼脂稀释棋盘法示意图



抗菌药物 A 单药 MIC=24 mg/L (耐药), 抗菌药物 B 单药 MIC=8 mg/L (耐药), 当抗菌药物 A 存在时抗菌药物 B 的 MIC=2 mg/L (敏感), 两药联合呈协同作用。

图 5 纸条优加法联合药敏试验



抗菌药物 A 单药 MIC=24 mg/L，抗菌药物 B 单药 MIC=8 mg/L，抗菌药物 A 联合 MIC=1.0 mg/L，抗菌药物 B 联合 MIC=1.5 mg/L， $FIC=1/24+1.5/8=0.23$ ，两药联合呈协同作用。

图 6 纸条交叉法联合药敏试验

扩散距离的增加抗菌药物的浓度呈对数减少，在纸片的周围形成递减浓度梯度。在纸片周围抑菌浓度范围内的测试菌不能生长，而抑菌浓度范围外的菌株则继续生长，从而在纸片的周围形成抑菌圈。操作时将两张不同抗菌药物的药敏纸片以一定的距离

放置，参考距离为一张纸片的边缘距离另外一张纸片的抑菌圈边缘 3~4 mm。经过孵育后根据两药间的抑菌圈扩大或缩小等现象，判断两药是否存在协同、相加、无关或拮抗现象（图 7 和图 8）。纸片扩散法具有操作简单且价格低廉的特点，但缺点

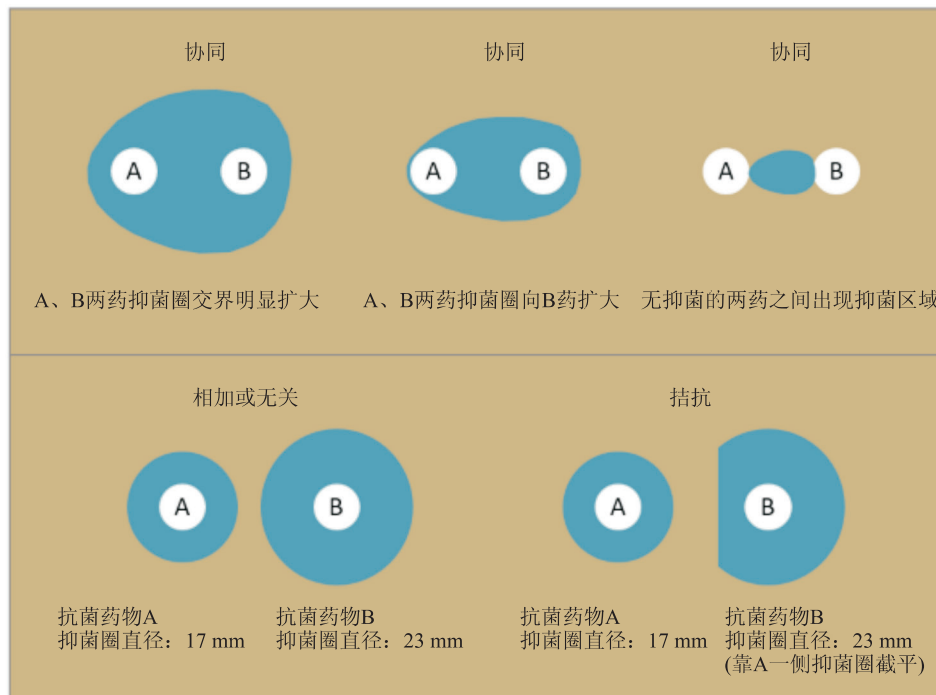


图 7 纸片扩散法联合药敏试验图示

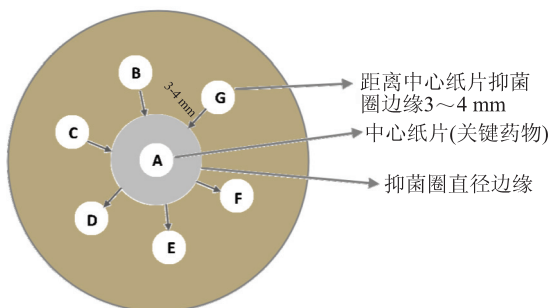


图 8 纸片扩散法联合药敏试验两药敏纸片距离示意图

是结果不易阅读。纸片扩散法联合药敏试验两药敏纸片的距离可参考图 8。若常规纸片扩散法联合药敏试验结果模糊，难以判断，建议使用其他方法（如肉汤微量稀释棋盘法、纸条法）进行确认。

优先选择敏感的抗菌药物 A 作为关键药物与其他抗菌药物进行联合，如头孢他啶-阿维巴坦、替加环素或多黏菌素。

**7.4.2 纸片优加法** 纸片优加法<sup>[32]</sup>为常规纸片扩散法的改良方法。实验时按图示先将 2 张含抗菌

药物 A 单药和 1 张含抗菌药物 B 单药纸片贴在已接种菌液的 MH 琼脂表面, 3 张纸片间的中心距离为 25 mm。放置 30 min 后, 待纸片中的抗菌药

物完全渗透入琼脂中后, 按图示移去一张 A 纸片, 再在相同的位置上覆盖贴上抗菌药物 B 单药纸片。经孵育后阅读抑菌圈直径, 见图 9。

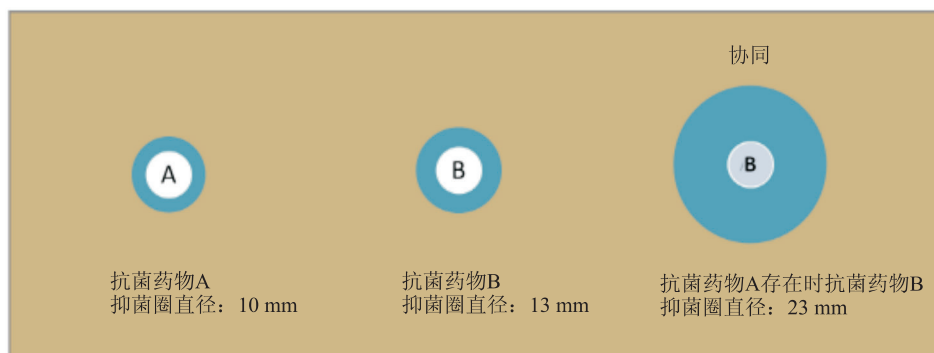


图 9 纸片优加法联合药敏试验示意图

专家共识八: 两药协同定义为抗菌药物 A 和抗菌药物 B 单药均为耐药, 但抗菌药物 B 在抗菌药物 A 存在时表现为敏感或中介 (即两药联合的抑菌圈直径明显大于任何单药抑菌圈直径)。

**7.4.3 改良纸片优加法** 本方法与纸片优加法原理相似, 目的为增加有效抗菌药物的含量, 达到加大剂量实现抑菌或杀菌的目的, 如常可用此法增加头孢哌酮-舒巴坦对 CRAB 的抗菌活性。操作

方法同常规纸片扩散法, 唯一的不同之处为多张同一抗菌药物纸片紧邻贴在一起, 以实现该区域该抗菌药物浓度加量的目的。由于舒巴坦对鲍曼不动杆菌存在杀菌活性, 增加舒巴坦剂量可明显提高鲍曼不动杆菌对头孢哌酮-舒巴坦的敏感率<sup>[22]</sup>, 可尝试以头孢哌酮-舒巴坦为基础联合舒巴坦的联合药敏试验方案。见图 10。

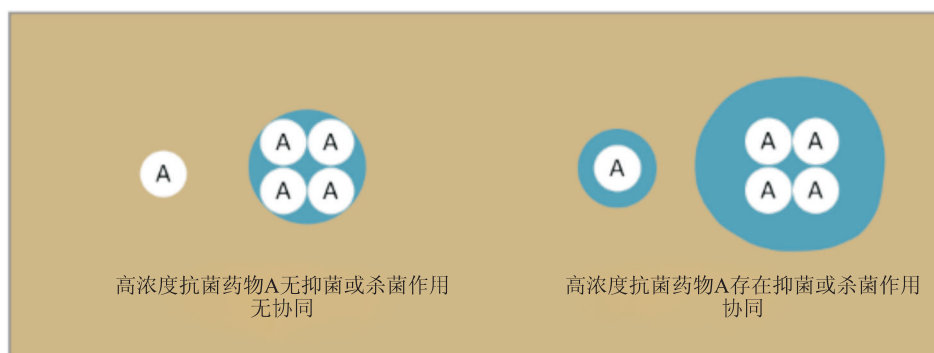


图 10 改良纸片优加法 [适用于鲍曼不动杆菌与头孢哌酮-舒巴坦 (2:1)]

**7.4.4 肉汤纸片洗脱法** 肉汤纸片洗脱法<sup>[32]</sup>为改良肉汤稀释法, 包括两种方法。

①常规肉汤纸片洗脱法: 此方法为两种不同抗菌药物的联合。实验时在 4 根无菌试管中分别加入 2 mL 的 CAMHB 肉汤, 分别标记为 C、A、B 和 A+B 管, 其中 C 管为生长对照, A 管放入 1 张抗菌药物 A 药敏纸片, B 管放入 1 张抗菌药物 B 药敏纸片, A+B 管同时放入抗菌药物 A 和抗菌药物 B 药敏纸片, 轻轻涡旋 30 s, 室温 (23±2) °C 孵育至少 30 min 使纸片中的抗菌药物完全扩散入肉汤中 (不可超过 60 min) (参考 CLSI 黏菌素肉

汤纸片洗脱试验)<sup>[35]</sup>。然后准备 0.5 麦氏浊度待测菌悬液, 用移液器分别在在 C、A、B 和 A+B 管中加入 10 μL 的 0.5 麦氏浊度待测菌悬液, 最终接种菌量为 7.5×10<sup>5</sup> CFU/mL, 35 °C 孵育 16~20 h 后观察各管中的细菌生长情况 (图 11)。注意: 本方法每试管中肉汤的体积需按每片药敏纸片中所含抗菌药物的量和该菌对该抗菌药物的耐药判断标准而定, 溶液中抗菌药物最终浓度应≥中介标准。如该菌对抗菌药物的耐药标准为≥16 mg/L, 药敏纸片中所含抗菌药物的量为 30 μg/片, 则每管中 CAMHB 肉汤的含量应为 2 mL。以纸片中抗

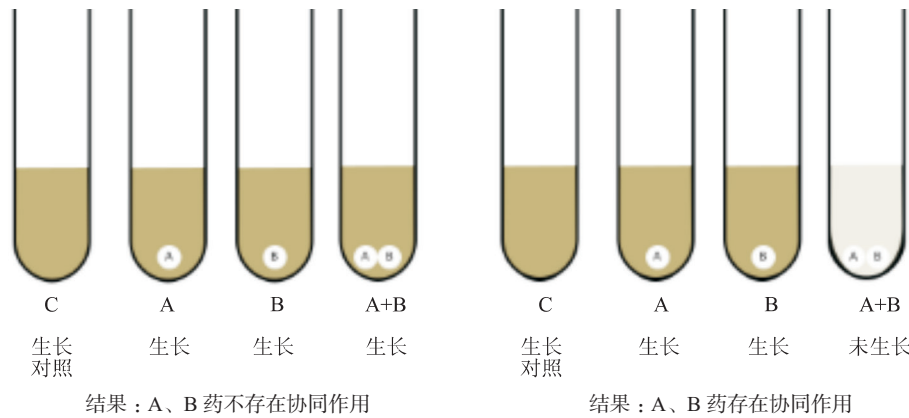


图 11 常规肉汤纸片洗脱法示意图

菌药物完全溶解入肉汤中计算，2 mL 肉汤中该抗菌药物的浓度为 15 mg/L（近似于耐药标准）。

专家共识九：若 C、A 和 B 管中细菌均生长，但 A+B 管无细菌生长，报告抗菌药物 A 和抗菌药物 B 联合“存在协同作用”。

专家共识十：若 C、A、B 和 A+B 管中的细菌均生长，报告抗菌药物 A 和抗菌药物 B “不存在协同作用”。

举例：如该菌为产金属酶肺炎克雷伯菌，抗菌药物 A 所含药物为头孢他啶-阿维巴坦，抗菌药物 B 所含药物为氨曲南。结果显示单药时细菌均生长，但两药联合后细菌生长被抑制，呈现协同抑菌或杀菌作用。

②改良肉汤纸片洗脱法：此方法为单种抗菌药物增加剂量的试验。实验时在 4 根无菌试管中分别加入 2 mL 的 CAMHB 肉汤，分别标记为 C、A、A×2 和 A×3，其中 C 管为生长对照，A 管放

入 1 张抗菌药物 A 药敏纸片，A×2 管放入 2 张抗菌药物 A 药敏纸片，A×3 管放入 3 张抗菌药物 A 药敏纸片，轻轻涡旋，室温孵育至少 30 min 使纸片中的抗菌药物完全扩散入肉汤中（不可超过 60 min）（参考 CLSI 黏菌素肉汤纸片洗脱试验）<sup>[35]</sup>。然后吸取 10 μL 的 0.5 麦氏浊度待测菌悬液分别加入 C、A、A×2 和 A×3 管中，最终接种菌量为  $7.5 \times 10^5$  CFU/mL，35°C 孵育 16~20 h 后观察各管中的细菌生长情况（图 12）。注意：本方法每试管中肉汤的体积需按每片药敏纸片中所含抗菌药物的量和该菌对该抗菌药物的耐药判断标准而定，溶液中抗菌药物最终浓度应  $\geq$  中介标准。如该菌对抗菌药物的耐药标准为  $\geq 16$  mg/L，药敏纸片中所含抗菌药物的量为 30 μg/片，则每管中 CAMHB 肉汤的含量应为 2 mL。以纸片中抗菌药物完全溶解入肉汤中计算，2 mL 肉汤中该抗菌药物的浓度为 15 mg/L（近似于耐药标准）。

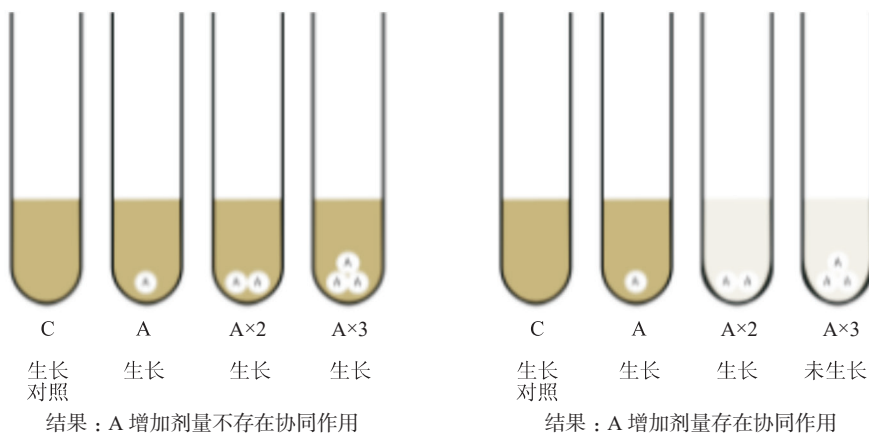


图 12 改良肉汤纸片洗脱法示意图

专家共识十一：若 C 和 A 管细菌均生长，但 A×2 和 A×3 管细菌均未生长，报告抗菌药物 A 增

加剂量“存在协同作用”。

专家共识十二：若 C、A、A×2 和 A×3 管细菌均



生长, 报告抗菌药物 A 增加剂量“无协同作用”。

### 7.5 联合杀菌曲线<sup>[16-17, 24, 36-37]</sup>

通过检测暴露于单药或联合药物不同时间段时的细菌存活数, 评估不同药物间的协同或拮抗作用(图 13)。协同通常定义为: 与最具抗菌活性的

单药相比, 联合用药后细菌数呈 $\geq 2 \log_{10}$  CFU/mL 级别的下降; 拮抗通常定义为: 与最具抗菌活性的单药相比, 联合用药后细菌数呈 $\geq 2 \log_{10}$  CFU/mL 级别的上升。

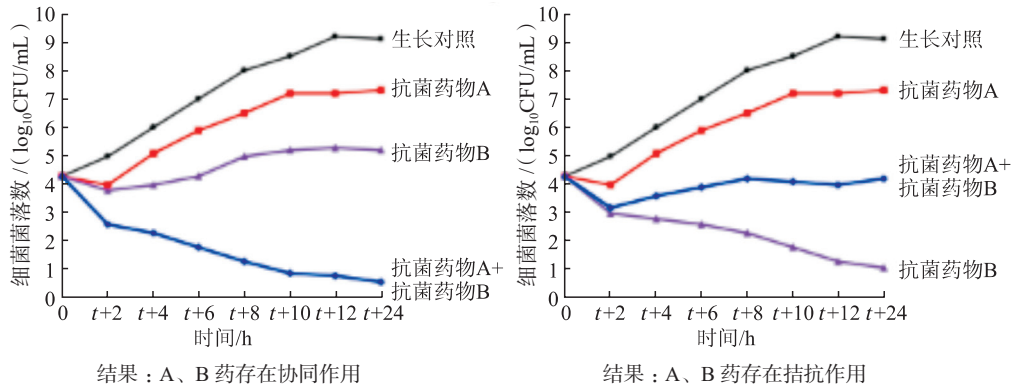


图 13 两药联合杀菌曲线示意图

## 8 联合药敏试验结果报告及相关注释

不同联合药敏试验方法所得结果, 报告格式略有差异。

以出现协同作用为例, 当采用金标准方法进行联合药敏试验时, 若抗菌药物 A 和抗菌药物 B 两药呈现协同作用, 可报告: 抗菌药物 A 和抗菌药物 B 联合存在协同作用。当采用非金标准方法

进行联合药敏试验时, 若抗菌药物 A 和抗菌药物 B 两药呈现协同作用, 可报告: 抗菌药物 A 和抗菌药物 B 联合可能存在协同作用。

专家共识十三: 采用肉汤微量稀释棋盘法及纸条交叉法联合药敏试验, 可根据 FIC 指数判断两药协同、相加、无关和拮抗结果。若采用其他方法开展联合药敏试验, 仅根据结果报告两药是否存在协同作用。见图 14、图 15。

### XX 医院检验科联合药敏试验报告单

姓名:	XXX	病区:	40 病区	病历号:	999999	样本编号:	03
性别:	男	科室:	ICU	临床诊断:	肺炎	条形码:	6860221
年龄:	32	床号:	18	送检医生:	XXX	标本种类:	腹水
申请项目: 联合药敏试验							

细菌: 肺炎克雷伯菌。

碳青霉烯酶检测结果: NDM 型金属酶基因阳性。

联合药敏试验结果(肉汤微量稀释棋盘法): 头孢他啶-阿维巴坦联合氨基糖苷类存在协同作用, 头孢他啶-阿维巴坦联合阿米卡星、多黏菌素 E (或多黏菌素 B) 联合替加环素存在相加作用, 替加环素联合阿米卡星存在无关作用。

药敏试验结果:

组别	抗菌药物联合	单药 MIC/(mg/L)	联合后 MIC/(mg/L)	部分抑菌浓度指数	结果判断
1	头孢他啶-阿维巴坦 氨基糖苷类	64	2	0.09	协同
		16	1		
2	头孢他啶-阿维巴坦 阿米卡星	64	32	1	相加
		64	32		
3	多黏菌素 B 替加环素	1	0.5	1	相加
		0.5	0.25		
4	多黏菌素 E 替加环素	1	0.5	1	相加
		0.5	0.25		
5	替加环素 阿米卡星	1	1	1.13	无关
		64	8		

结果判断标准: FIC $\leq$ 0.5: 协同; FIC $>$ 0.5~1: 相加; FIC $>$ 1~2: 无关; FIC $>$ 2: 拮抗。

采样时间: 2022.2.13 10:08; 接收时间: 2022.2.13 10:30; 报告时间: 2022.2.16 15:08

本检验结果仅对该标本负责; 检验者: XXX; 审核者: XXX

图 14 联合药敏试验结果报告格式参考图示(肉汤微量稀释棋盘法)

## XX 医院检验报告单

姓名:	XXX	病区:	3 病区	病历号:	888888	样本编号:	03
性别:	男	科室:	神经外科	临床诊断:	肺炎	条形码:	6860221
年龄:	63	床号:	13	送检医生:	XXX	标本种类:	痰

细菌:肺炎克雷伯菌。

碳青霉烯酶检测结果:KPC 型碳青霉烯酶阳性。

联合药敏试验结果(纸片洗脱法):①头孢他啶-阿维巴坦单药或联合磷霉素;②多黏菌素 E(或多黏菌素 B)联合磷霉素;③替加环素联合磷霉素;④替加环素联合多黏菌素 E(或多黏菌素 B);结果显示上述抗菌药联合可能存在协同作用。

药敏试验结果:

序号	抗菌药物	判断标准	抑菌圈直径/ mm	结果 解释	序号	抗菌药物	判断标准	抑菌圈直径/ mm	结果 解释
1	厄他培南	≤18R, ≥22S	6	耐药	11	氟曲南	≤17R, ≥21S	6	耐药
2	亚胺培南	≤19R, ≥23S	6	耐药	12	阿米卡星	≤14R, ≥17S	6	耐药
3	美罗培南	≤19R, ≥23S	6	耐药	13	庆大霉素	≤12R, ≥15S	6	耐药
4	头孢吡肟	≤18R, ≥25S	6	耐药	14	环丙沙星	≤21R, ≥26S	6	耐药
5	头孢他啶	≤17R, ≥21S	6	耐药	15	左氧氟沙星	≤16R, ≥21S	6	耐药
6	头孢噻肟	≤22R, ≥26S	6	耐药	16	甲氧苄啶-磺胺甲噁唑	≤10R, ≥16S	6	耐药
7	头孢唑肟	≤14R, ≥18S	6	耐药	17	磷霉素	≤12R, ≥16S	16	敏感
8	头孢唑林	≤19R, ≥23S	6	耐药	18	替加环素	≤14R, ≥19S	22	敏感
9	头孢吡肟-舒巴坦	≤15R, ≥21S	6	耐药	18	多黏菌素 E	≤2S, ≥4R	1 mg/L*	敏感
10	派拉西林-他唑巴坦	≤17R, ≥21S	6	耐药	20	头孢他啶-阿维巴坦	≤20R, ≥21S	23	敏感

\*药敏试验方法为肉汤微量稀释法。

采样时间:2022.2.11 10:08;接收时间:2022.2.11 10:30;报告时间:2022.2.13 15:08

本检验结果仅对该标本负责;检验者:XXX;审核者:XXX

图 15 联合药敏试验结果报告格式参考图示(纸片洗脱法)

## 9 质量控制

目前国际上无专用的联合药敏试验质量控制要求,建议可按照 CLSI 文件推荐的稀释法(MIC 测定)或纸片扩散法的质控要求<sup>[35]</sup>,规范联合药敏试验所涉及的稀释法和纸片扩散法等重要方法学的操作步骤、材料、试剂和质控菌株的要求进行质控,各实验室宜根据自己实验室的条件,针对所选择的联合药敏方法进行质量控制或性能验证,仅在所有涉及的联合药敏试验环节均在控的前提下,方可开展联合药敏试验。

### 参考文献

- [1] CHINET 数据云. CHINET 中国细菌耐药监测网 [EB/OL]. [2022-04-18]. <http://www.chinets.com>.
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4): 377-387.
- [3] MIKHAIL S, SINGH N B, KEBRIAEI R, et al. Evaluation of the synergy of ceftazidime-avibactam in combination with meropenem, amikacin, aztreonam, colistin, or fosfomycin against well-characterized multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(8): e00779-19.
- [4] ALVES P H, BOFF R T, BARTH A L, et al. Synergy of polymyxin B, tigecycline and meropenem against carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex isolates[J]. Diagn

Microbiol Infect Dis, 2019, 94(1): 81-85.

- [5] ELEMAM A, RAHIMIAN J, DOYMAZ M. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3558-3562.
- [6] SANDS M, MCCARTER Y, SANCHEZ W. Synergy testing of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* against tigecycline and polymyxin using an E-test methodology[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(7): 521-522.
- [7] PANKEY G A, ASHCRAFT D S. The detection of synergy between meropenem and polymyxin B against meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* using Etest and time-kill assay[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 63(2): 228-232.
- [8] ABDUL-MUTAKABBIR J C, YIM J, NGUYEN L, et al. *In vitro* synergy of colistin in combination with meropenem or tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(7): 880.
- [9] SAMONIS G, MARAKI S, KARAGEORGOPOULOS D E, et al. Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(5): 695-701.
- [10] MATARACI KARA E, YILMAZ M, ISTANBULLU TOSUN A, et al. Evaluation of the synergy of ceftazidime/avibactam in combination with colistin, doripenem, levofloxacin, tigecycline, and tobramycin against OXA-48 producing *Enterobacterales*[J]. J Chemother, 2020, 32(4): 171-178.
- [11] AL-QURAINI M, RIZVI M, AL-JABRI Z, et al. Assessment of

- In-vitro* synergy of fosfomycin with meropenem, amikacin and tigecycline in whole genome sequenced extended and pan drug resistant *Klebsiella pneumoniae* : Exploring a colistin sparing protocol[J]. Antibiotics ( Basel ), 2022, 11 ( 2 ) : 153.
- [12] TYERS M, WRIGHT G D. Drug combinations : a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century[J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17 ( 3 ) : 141-155.
- [13] Centers for Disease Control and Prevention. CRE technical Information[EB/OL]. [2022-04-18]. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/technical-info.html#Definition>.
- [14] World Health Organization. Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities[EB/OL]. [2022-04-18]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550178>.
- [15] HAN R, SHI Q, WU S, et al. China Antimicrobial Surveillance Network ( CHINET ) Study Group. Dissemination of carbapenemases ( KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM ) among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from adult and children patients in China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10 : 314.
- [16] LORIAN V. Antibiotics in laboratory medicine [M]. Baltimore: Willams and Wilkins, 1980.
- [17] AMETERDAM D. Antibiotics in laboratory medicine [M]. 6th ed. Philadelphia, PA : Wolters Kluwer Health, 2015.
- [18] 汪复, 张婴元, 等. 实用抗感染治疗学 [M]. 3 版. 北京 : 北京人民卫生出版社, 2020.
- [19] ELION G B, SINGER S, HITCHINGS G H. Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites[J]. J Biol Chem, 1954, 208 ( 2 ) : 477-488.
- [20] Emery Pharma. Antimicrobial synergy study – checkerboard testing[EB/OL]. [2022-04-18]. <https://emerypharma.com/solutions/cell-microbiology-services/antimicrobial-synergy-study-checkerboard-testing/>.
- [21] LORIAN V. Antibiotics in laboratory medicine [M]. 3rd edition. Baltimore: Willams and Wilkins, 1991.
- [22] WANG L, CHEN Y, HAN R, et al. Sulbactam enhances *in vitro* activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Acinetobacter baumannii*[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14 : 3971-3977.
- [23] BETROSIAN A P, FRANTZESKAKI F, XANTHAKI A, et al. High-dose ampicillin-sulbactam as an alternative treatment of late-onset VAP from multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Scand J Infect Dis, 2007, 39 ( 1 ) : 38-43.
- [24] POIREL L, KIEFFER N, NORDMANN P. *In vitro* evaluation of dual carbapenem combinations against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71 ( 1 ) : 156-161.
- [25] 中国碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌感染诊治与防控专家共识编写组. 中国碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌感染诊治与防控专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2021, 101 ( 36 ) : 2850-2860.
- [26] CHINESE X D R CONSENSUS WORKING GROUP. Laboratory diagnosis, clinical management and infection control of the infections caused by extensively drug-resistant Gram-negative bacilli : a Chinese consensus statement[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22 ( Suppl 1 ) : S15-25.
- [27] TAMMA P D, AITKEN S L, BONOMO R A, et al. Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriales* ( ESBL-E ), carbapenem-resistant *Enterobacteriales* ( CRE ), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance ( DTR-*P. aeruginosa* ) [J]. Clin Infect Dis, 2021, 72 ( 7 ) : 1109-1116.
- [28] PAUL M, CARRARA E, RETAMAR P, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ( ESCMID ) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli ( endorsed by European society of intensive care medicine ) [J]. Clin Microbiol Infect, 2022, 28 ( 4 ) : 521-547.
- [29] FALCONE M, DAIKOS G L, TISEO G, et al. Efficacy of ceftazidime-avibactam plus aztreonam in patients with bloodstream infections caused by metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriales*[J]. Clin Infect Dis, 2021, 72 ( 11 ) : 1871-1878.
- [30] JI S, LV F, DU X, et al. Cefepime combined with amoxicillin/clavulanic acid : a new choice for the KPC-producing *K. pneumoniae* infection[J]. Int J Infect Dis, 2015, 38 : 108-114.
- [31] CARROLL K C. Manual of clinical microbiology [M]. Newyork: John Wiley and Sons, 2019.
- [32] KHAN A, ERICKSON S G, PETTAWAY C, et al. Evaluation of susceptibility testing methods for aztreonam and ceftazidime-avibactam combination therapy on extensively drug-resistant Gram-negative organisms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2021, 65 ( 11 ) : e0084621.
- [33] DAVIDO B, FELLOUS L, LAWRENCE C, et al. Ceftazidime-avibactam and aztreonam, an interesting strategy to overcome  $\beta$ -lactam resistance conferred by metallo- $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61 ( 9 ) : e01008-17.
- [34] MONOGUE M L, ABBO L M, ROSA R, et al. *In vitro* discordance with *in vivo* activity : humanized exposures of ceftazidime-avibactam, aztreonam, and tigecycline alone and in combination against new delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a murine lung infection model[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61 ( 7 ) : e00486-17.
- [35] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100-S32. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022.
- [36] ZHANG W, GUO Y, YANG Y, et al. Study of *in vitro* synergistic bactericidal activity of dual  $\beta$ -lactam antibiotics against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microb Drug Resist, 2020, 26 ( 3 ) : 204-210.
- [37] YIM H, WOO H, SONG W, et al. Time-kill synergy tests of tigecycline combined with imipenem, amikacin, and ciprofloxacin against clinical isolates of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*[J]. Ann Clin Lab Sci, 2011, 41 ( 1 ) : 39-43.