

抗生素敏感性試驗

細菌組：王裕仁

UCL



抗生素概論

- 由微生物所產生，具有抑制其它微生物生長或生存的一種代謝產物
- 人工合成
- 施用的方式：口服、針劑、直接塗抹
- 用途：醫學、生命科學、農牧業、腫瘤

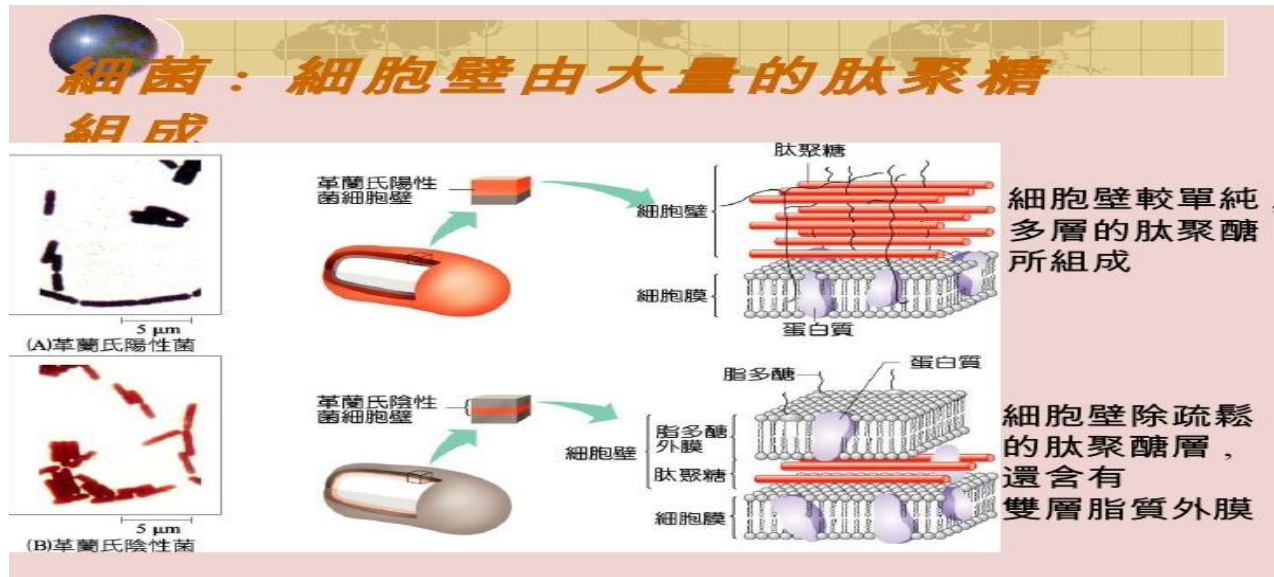


抗生素機轉和分類

(一)破壞細胞壁的合成

- 細胞壁作用：

細胞質的濃度常大於生存環境中溶液的濃度，所以滲透壓差使得細胞外水份不斷擴散進入細胞內，而細胞壁的存在則可防止細菌因為不斷膨脹而使細胞膜破裂導致細菌死亡

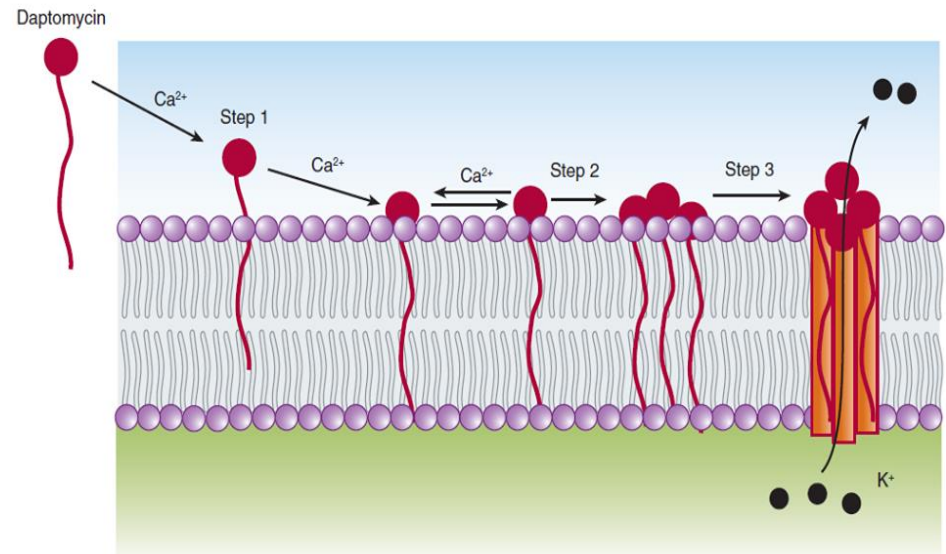


(一)破壞細胞壁的合成

- 1. β -lactams :
 - 抑制細胞壁的交聯步驟，使得新生的細胞壁鬆散
 - Penicillins
 - Cephalosporins
 - Carbapenems
- 2. Glycopeptides :
 - 阻止轉醣酶、肽基轉移酶的作用，使得新生的細胞壁鬆散
 - Vancomycin, **VA**

(二)和細菌的細胞膜作用

- 破壞或是嵌入細胞膜增加其通透性使有用物質流出
- 打開離子通道，使細菌電解質失衡而死
- Polymyxins：Bacitracin、PolymyxinB、Colistin，**CL**
- Daptomycin：**DAP**

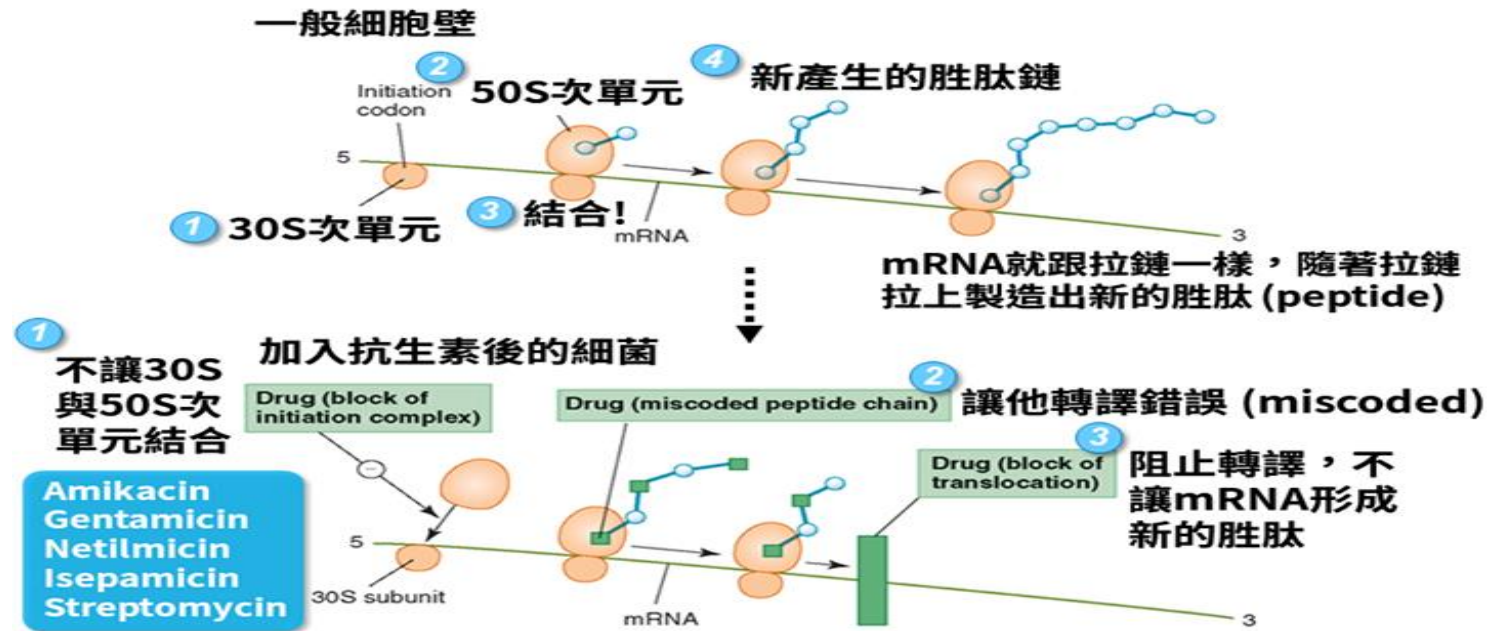


(三)抑制蛋白質的合成

- 和細菌核糖體、tRNA、mRN作用，使細菌所需的蛋白質或酵素生成出錯，甚至無法產生蛋白質

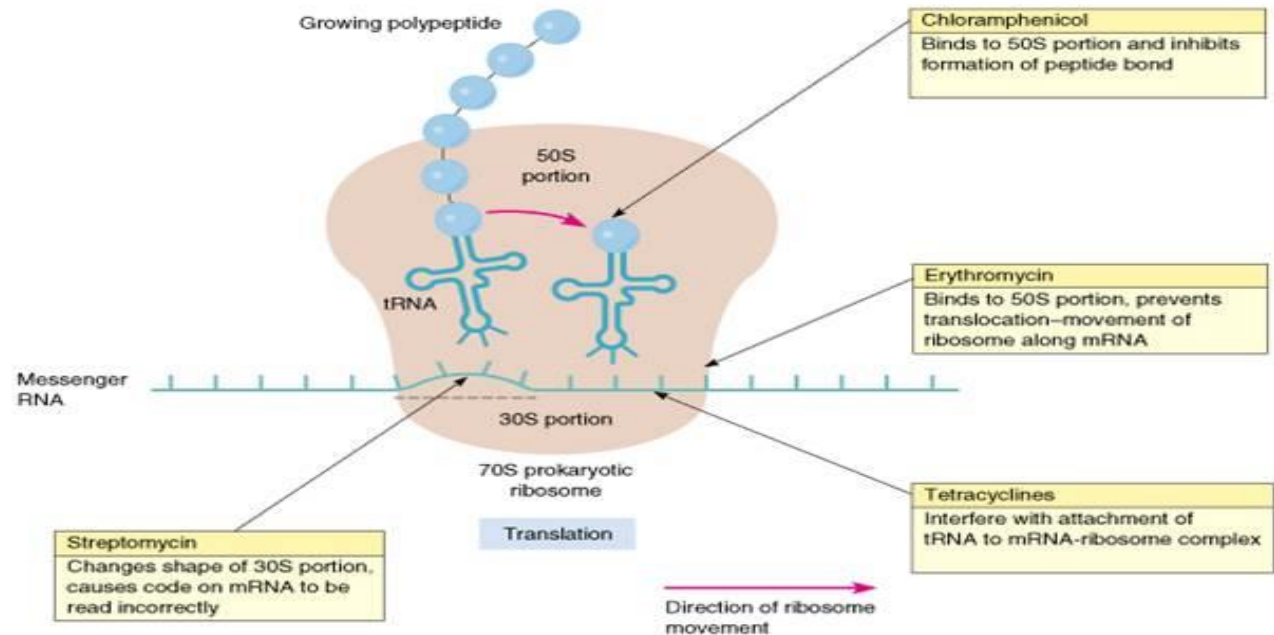
抑制蛋白質合成的抗生素機轉

the New England Journal of Stupid



(三)抑制蛋白質的合成

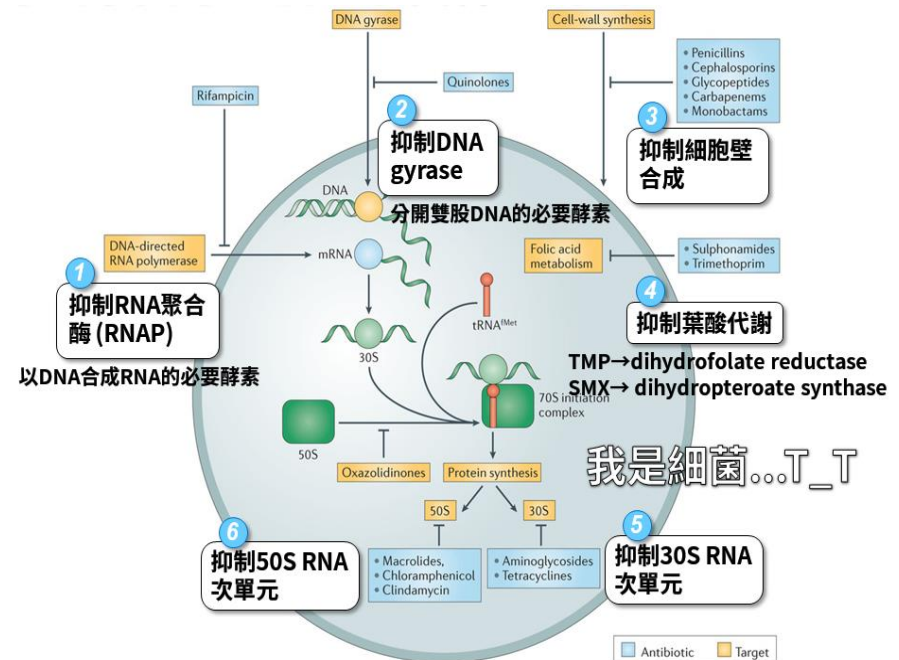
- Aminoglycosides：它們與30S核糖體結合並破壞 mRNA-核糖體的初始複合物，進而抑制蛋白質的合成
- Tetracyclines：抑制聯結胺基酸的tRNA和核糖體的A Site結合，進而抑制蛋白質的合成



(四) 抑制核酸合成及作用

- 使細菌繁殖受阻，或是間接導致合成蛋白質的過程受阻
- Quinolones：抑制DNA gyrase
- Rifampin，**RA**：抑制RNA聚合酶

<i>Quinolones</i>
Ciprofloxacin， CIP
Levofloxacin， LVX
Moxifloxacin， MXF
Norfloxacin， NOR
Ofloxacin， OFX



(五)抑制葉酸的代謝

- 細菌需自行製造合成DNA所需的葉酸，故抑制葉酸合成便可抑制細菌合成
- Sulfonamide：
PABA(p-aminobenzoic acid)是合成葉酸所需的重要受質，此抗生素會和PABA作競爭性的結合

Sulfonamide

Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TMP-SMX)，

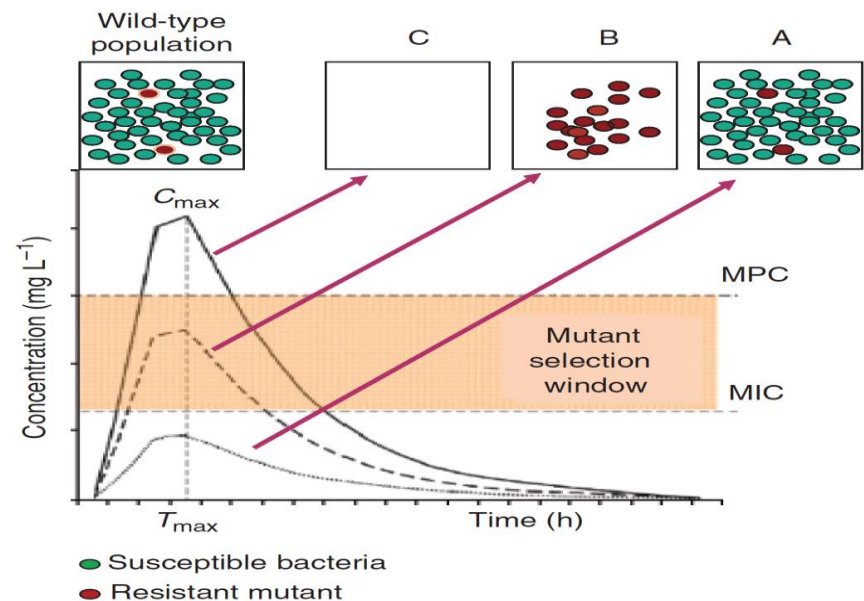
SXT



抗藥性細菌

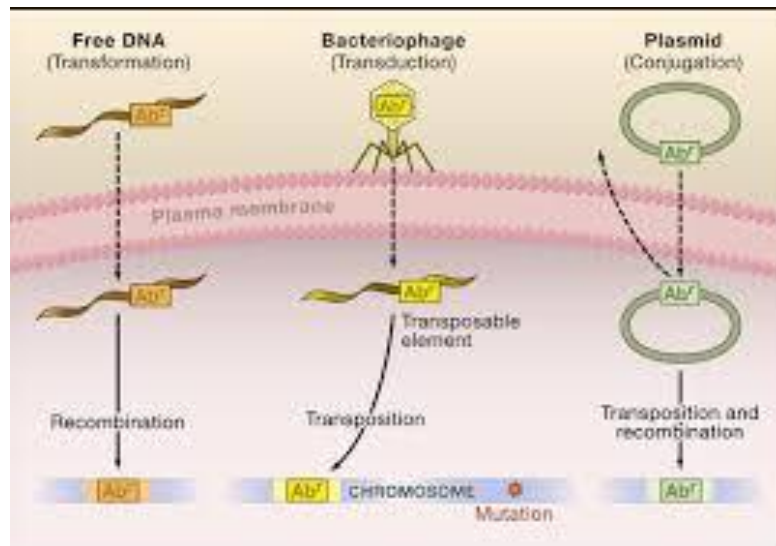
(一) 抗藥性細菌的產生

- 只要使用抗生素，就非常有機會使抗藥性細菌產生
- 使用較會篩選出抗藥性細菌的抗生素。例如：使用第三代Cephalosporins較容易篩選出產生ESBL菌株
- 抗生素濃度低於MPC (Mutation prevention concentration)



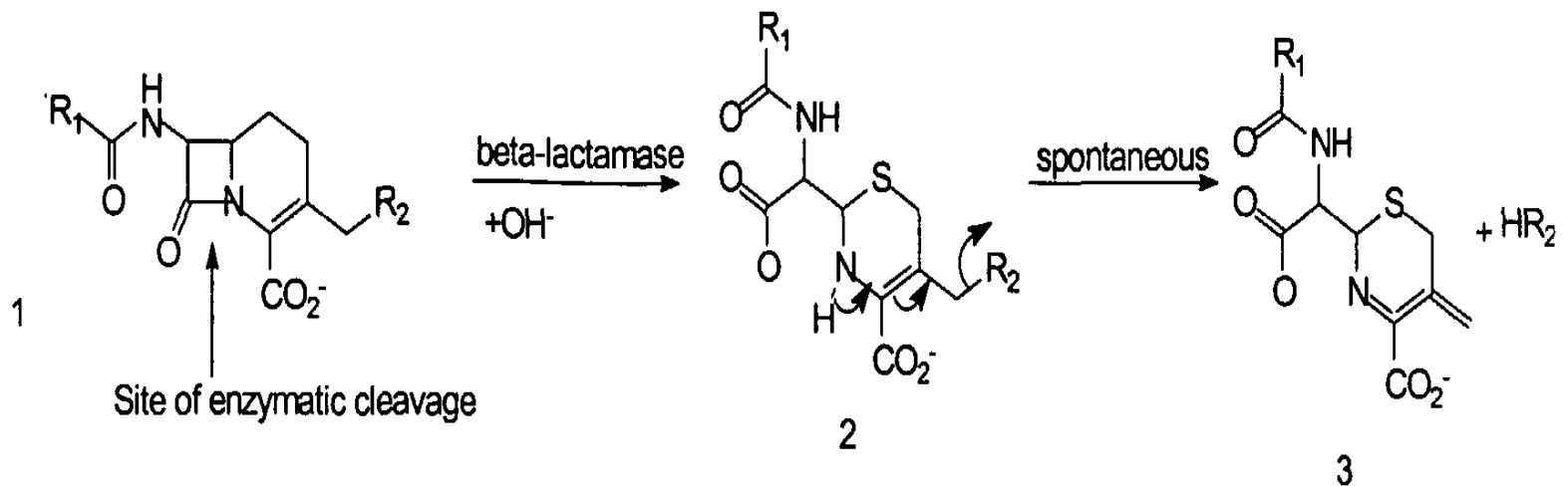
(二) 抗藥性基因的產生與獲得

- 自然突變
- 抗生素使用
- 細菌間彼此交換染色體DNA
- 由噬菌體將外界的抗藥性基因帶入體內
- 藉由質體交換抗藥性基因



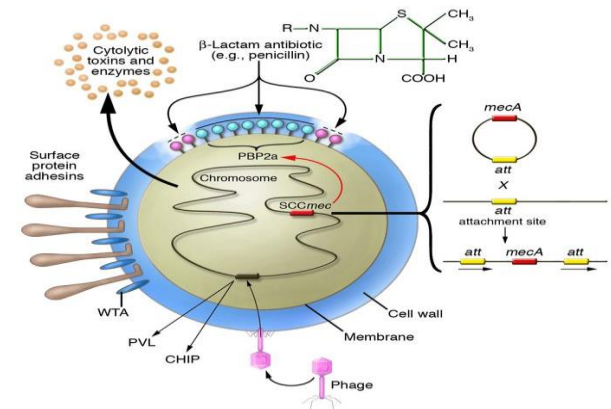
(三) 抗藥性機轉

- **A.** 細菌產生一種或多種**酵素**來**水解**或**修飾**進入細菌體內的**抗生素**使其失去活性
- Ex: β -lactamase 可以分解 β -lactams 類的**抗生素**



(三) 抗藥性機轉

- **B.** 細菌因為突變或是產生酵素使**抗生素的作用位置**產生變化
- Ex1： β -lactams類抗生素可與青黴素結合蛋白 (penicillin binding protein ; PBP) 結合，但 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 產生新的結合位置 **PBP2a** 使得Methicillin無法與之結合而失去殺菌效力

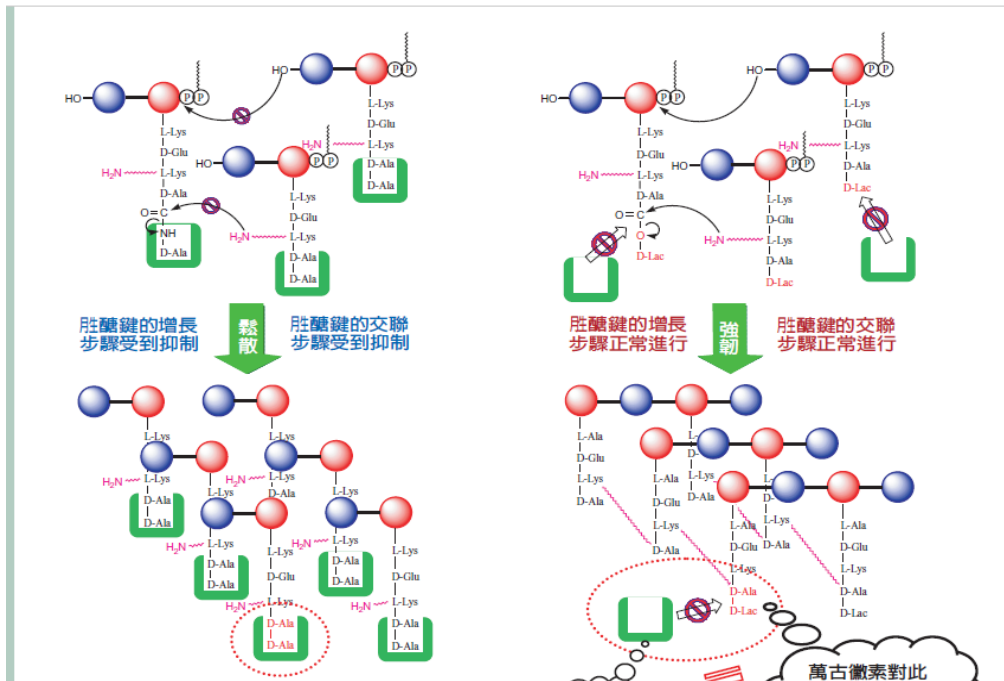


(三) 抗藥性機轉

- Ex2 : Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) 是改變Vancomycin所接合的胺基酸使其親和力下降

Enterococcus

VRE



(三) 抗藥性機轉

- C. 減少抗生素在細菌體內的**濃度**
- 孔洞蛋白 (porin)：革蘭氏陰性菌的外膜上有孔洞蛋白 (porin)，藉由改變孔徑大小、或是使孔洞蛋白生成減少，以此來減少抗生素濃度
Ex：Imipenem 是經由Omp D2 進入綠膿桿菌 (Ps. aeruginosa)，若此菌因突變而喪失此孔洞蛋白時，就可能使其對Imipenem 產生抗藥性
- 發展流出幫浦：以主動運輸的方式將抗生素給打出去 Ex：Tetracyclines

(四)常見抗藥性菌株

- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
- Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)
- Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE)
- Carbapenem resistant enterobacteriaceae (CRE)
- Multidrug-resistant *A. baumannii* (MDRAB)
- vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA)
- vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA)

抗生素敏感性試驗

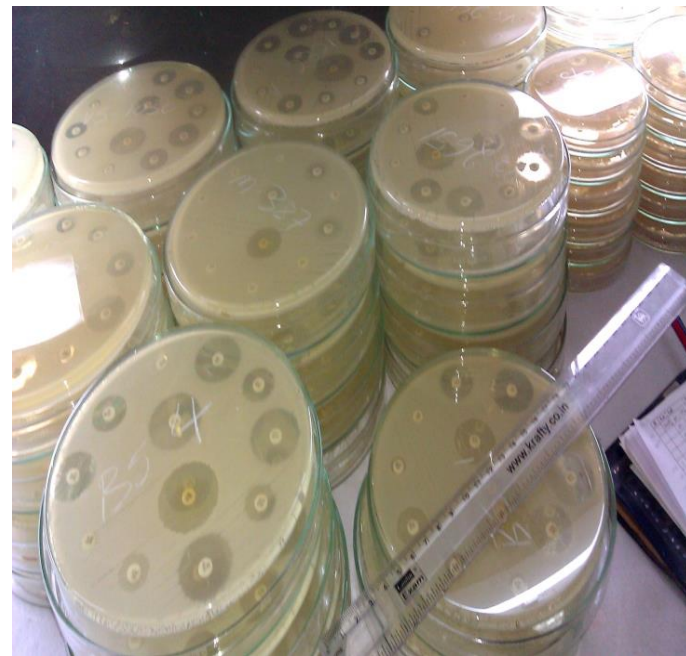
- 根據檢驗培養結果及細菌對抗生素的感受性結果，來提供臨床醫師治療病人時藥物選擇的資料。
- 因為近來細菌抗藥性不斷增加，因此更需要依賴實驗室的藥物敏感性實驗來證實所使用藥物的有效性，或是應停用甚至更改抗生素。

- 判讀：

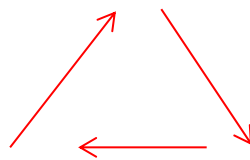
S	抗生素有效，能達到殺死或抑制細菌生長的目的
I	不建議用藥
R	抗生素無效，無法達到殺死或抑制細菌生長的目的

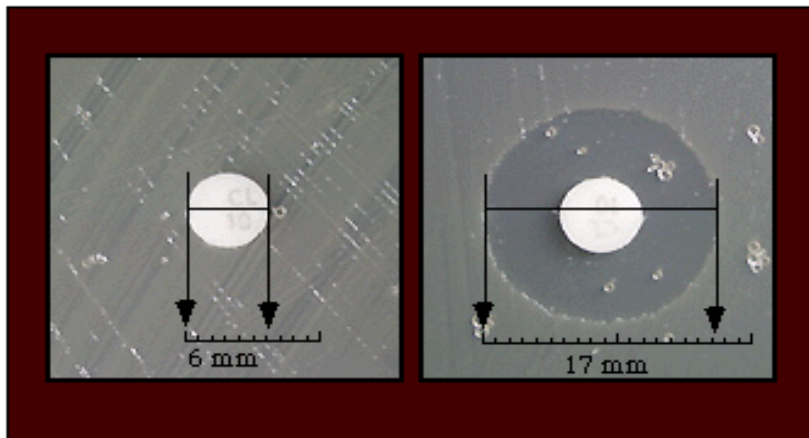
紙錠擴散法

- 是最普遍和快速的方法，但並不是最好的方法，之所以被普遍採用是因為簡單與經濟
- 藉由測量抑制環的大小來測定細菌對抗生素的感受性
- 僅能提供定性資料



紙錠擴散法

- 步驟：
- 1. 使用前將培養基和紙錠回復室溫
- 2. 從培養基挑數顆純種菌落置無菌TSB中，菌液濃度調成McFarland No. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml)
- 3. 以無菌棉棒沾菌液，以三向塗法 ($60^\circ \rightarrow 60^\circ \rightarrow 60^\circ$) 均勻塗在培養基上 
- 4. 靜置15分鐘，再將紙錠貼於培養基上，而後放置溫箱培養，隔天判讀



紙錠擴散法

AST : Enterobacteriaceae Disk & Content	Zone Diameter		
	S	I	R
Ampicillin, AM-10	≥17	14-16	≤13
Cephalothin, CF-30 (U+)	≥18	15-17	≤14
Gentamicin, GM-10	≥15	13-14	≤12
Amikacin, AN-30	≥17	15-16	≤14
Amoxicillin/Clavulanate, AMC-20/10	≥18	14-17	≤13
Cefotaxime, CTX-30	≥22 ≤27ESBL	15-22	≤14
Ciprofloxacin, CIP-5	≥21	16-20	≤15
Imipenem, IPM-10	≥16	14-15	≤13
Trimethoprim-Sulfamethoxazole, SXT-1.25/23.75	≥16	11-15	≤10
Ceftazidime, CAZ-30	≥18 ≤22ESBL	15-17	≤14
Piperacillin/Tazobactam, TZP-100/10	≥21	18-20	≤17
Ofloxacin, OFX (U+)	≥16	13-15	≤12
Nitrofurantoin, F/M-300 (U+)	≥17	15-16	≤14
Chloramphenicol, C-30	≥18	13-17	≤12
Ertapenem, ETP-10	≥19	16-18	≤15
Ampicillin/Sulbactam, SAM-10/10	≥15	12-14	≤11
Cefuroxime, CXM-30	≥18	15-17	≤14
Ceftriaxone, CRO-30	≥21	14-20	≤13
Levofloxacin, LVX-5	≥17	14-16	≤13
Tigecycline, TGC-15	≥19	15-18	≤14

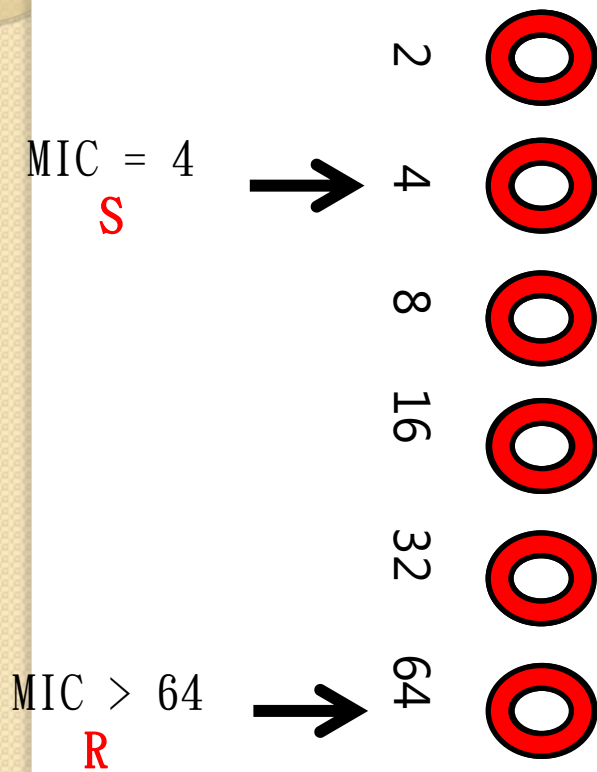
BD Phoenix MIC



- 抗生素最低抑菌濃度
(Minimum inhibitory concentration ; MIC) :
經過培養後，能使細菌的生長受到阻滯並被觀察到的
的抗生素之最小濃度，是利用定量之稀釋法來測定
- Phoenix系統是以連續測量一還原指示劑的變化和細
菌的濁度，來偵測微生物在有抗生素的培養基液中
是否會生長
- 每個試劑組都是由數個抗生素在很廣的範圍中以2倍
稀釋的方式所組成

BD Phoenix MIC

Cefotaxime , CTX	≤ 8 S	16-32 I	≥ 64 R
------------------	-------------------	----------------	--------------------



BD Phoenix MIC

- 步驟：
- 1. 挑選24小時內的新鮮菌落
- 2. 取ID Broth調菌液濃度0.5~0.6
- 3. 先取25 μ l的ID Broth菌液，將剩餘的ID Broth菌液倒入測試盤的ID位置
- 4. 再將剛取的25 μ l ID Broth菌液，加入AST Broth（已事先加入AST Indicator Solution），混合均勻
- 5. 將AST Broth倒入測試盤的AST位置，蓋上蓋子，輸入測試盤序號和檢體序號，就可以放入Phoenix機台中反應，隔天判讀結果



BD Phoenix MIC

AST : Enterobacteriaceae	MIC		
Disk & Content	S	I	R
Amikacin , AN	≤16	32	≥64
Ampicillin , AM	≤8	16	≥32
Ampicillin/Sulbactam , SAM	≤8/4	16/8	≥32/16
Aztreonam , ATM	≤4	8	≥16
Cefazolin , CZ	≤2	4	≥8
Cefepime , FEP	≤8	16	≥32
Cefmetazole , CMZ	≤16	32	≥64
Cefotaxime , CTX	≤8	16-32	≥64
Ceftazidime , CAZ	≤8	16	≥32
Ceftriaxone , CRO	≤1	2	≥4
Ciprofloxacin , CIP	≤1	2	≥4
Ertapenem , ETP	≤0.5	1	≥2
Gentamicin , GM	≤4	8	≥16
Imipenem , IPM	≤1	2	≥4
Levofloxacin , LVX	≤2	4	≥8
Meropenem , MEM	≤1	2	≥4
Piperacillin/Tazobactam , TZP	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Trimethoprim-Sulfamethoxazole , SXT	≤2/38		≥4/76

	紙錠擴散法	Phoenix MIC
優點	<ol style="list-style-type: none"> 1. 簡單操作 2. 經濟實惠 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 簡單操作 2. 定量分析 3. 程式中已內建各種抗藥性的marker，例如：MRSA、ESBL、VRE等
缺點	<ol style="list-style-type: none"> 1. 定性分析 2. 培養皿佔據溫箱空間 3. 判讀主觀性 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 價格相較於紙錠較昂貴 2. 判讀作業相較紙錠擴散法來說更為繁瑣

