

楊采菱

國家衛生研究院 臨床研究組

CLSI 是「臨床與實驗室標準協會(Clinical and Laboratory Standards Institutes)」的簡稱，CLSI 原名為「國家臨床實驗室標準委員會[National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS)]」，是一個臨床實驗室測試標準制定單位，在 1969 年成立，經過了 30 多年後，在 2005 年改名為 CLSI 之原因如下：一、其會員分佈於世界各國，去除“全國”比較可以準確反映它的全球性；二、其主要性質為教育，現已擴展成多樣化且包括十個不同專業的委員會，故將“委員會”改成“協會”；三、除了制定實驗室測試標準外，又含括其他領域，如：呼吸照護及呼吸成像，故改為臨床與實驗室。有鑒於上述因素，新命名可反映這些變化，並可更準確的顯示其性質與任務。

CLSI 所制定的許多臨床微生物實驗室相關標準(準則)中，以 M2、M7、及 M100-S 系列與嗜氧細菌抗藥測試最有直接關係，M2 為抗微生物劑感受性紙錠測試法標準，M7 為抗微生物劑感受性稀釋測試法標準。M100-S 為抗微生物劑感受性測試標準副刊，須配合 M2 及 M7 一起使用。M100-S 之判讀準則只有在按照 M2 及 M7 所定的標準測試方法(包含菌株處理與濃度、培養基、培養溫度與時間等)所得到的結果才可確鑿。M2 與 M7 準則每三年更新一次，最新一版是 2006 年的 M2-A9 及 M7-A7 [1,2]。M100-S 則每年更新，更新部份在 M100-S 文章及表內以粗體顯示。

此報告除說明 2008 年 M100-S18 (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Information Supplement)的主要改變及更新重點[3]，同時強調過去幾年 M100-S 標準中主要致病菌的重要注意事項。

### M100-S18

M100-S18 主要內容呈現順序為：更新摘要、紙錠擴散及稀釋測試方法。表一與表二介紹紙錠擴散(disk diffusion)測試方法的一系列表(Tables 1, 1A, 2A-2J, 3, 3A-3C)，及稀釋測試方法[以下簡稱 MIC(minimum inhibitory concentrations, 最小抑制濃度)]的一系列表(Tables 1, 1A, 2A-2L, 3, 3A-3F, 4-6)。M100-S18 後段有五個重要附錄(Appendix)，附錄 A 為 *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* 及 *Proteus mirabilis* 的 ESBL 篩選及確認測試方法；附錄 B 是金黃色葡萄球菌  $\beta$ -lactamase、oxacillin 抗藥性、用 ceftiofur 測試 mecA-導致的 oxacillin 抗藥性、萬古黴素感受性降低、及誘導式 clinda-mycin 抗藥性測試；附錄 C 為凝固陰性之葡萄球菌  $\beta$ -lactamase、用 ceftiofur 測試 mecA-導致的 oxacillin 抗藥性、及誘導式 clindamycin 抗藥性測試；附錄 D 為腸球菌對高濃度 aminoglycoside 及 vancomycin 抗藥性測試；附錄 E 為少見或不尋常抗生素感受性結果確認之建議。

### M100-S18

M100-S18 中「表一與表二介紹」特別指出，每一菌種所建議的那些抗生素應測試及報告是依照美國食品及

藥物局(FDA)所核准的藥物分類。表 1 及 1-A 中各菌種下建議的抗生素分為 4 個測試/報告群(Test/Report Group)，A、主要測試/報告群為例行測試及報告的藥物；B、主要測試/選擇性報告群為例行測試，但可依抗藥性、檢體、感染情況等選擇性報告的藥物；C、加測/選擇性報告群為因地方性或流行性抗藥菌加測或替代測的藥物；U 群為檢體來自尿液時加測的藥物。這些藥的分群考量包含：藥物臨床效應、抗藥程度、可減少抗藥性產生、藥價、FDA 准許用之臨床症狀及目前專家一致認可的首選及替代藥物。但在此需強調，不同國家應按各國相關管制單位所核准的臨床抗生素藥物為準，而且每一個醫院需各自選擇那些抗生素要測試及報告，臨床微生物實驗室應與醫院感染科醫師、藥局、藥事及感控委員會諮詢討論一起決定。

M100-S18 內表一(Table 1)列的是非挑剔性菌種，表一 A (Table 1-A)列的是挑剔性菌種，表一 B(Table 1-B)列的是生恐菌，此報告不討論 Table 1-B 菌種相關測試。M100-S18 內 disk diffusion 的表一(Table 1 & 1A)中添列了只能用 MIC 方法測試抗敏性的藥物，包含：Staphylococcus spp.、Enterococcus spp.、Streptococcus spp. Beta-hemolytic group 下的 daptomycin；Streptococcus spp. Viridans group 下的 ampicillin 及 penicillin；Acinetobacter spp.下的 colistin 及 polymyxin，這些藥物後加註「MIC method only」。M100-S18 另一更新是刪除一些在 M100-S17 (2007 年) disk diffusion 及 MIC 表一(Table 1 & 1A)中的藥物，包含 cefmetazole、gatifloxacin、kanamycin、loracarbef、mezlocillin 等 15 個抗生素，ticarcillin 亦被刪除(除了 P. aeruginosa -從 A 測試/報告群移至 B 群)。刪除這些藥物的原因包含：有些藥物在美國已不供給或已很少使用或因抗藥性增加及治療策略的改變。

在 M100-S18 表一(Tables 1 & 1A)中有些藥物的測試/報告群(Group)改變了，如：Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter spp.,及 non-Enterobacteriaceae 下 tobramycin 從 B 群移到 A 群。藉此說明測試/報告群中有兩種以上的藥物列於同一格子內及有無” or” 之差異，以 M100-S18 表一 P. aeruginosa 的測試/報告 A 群為例，gentamicin 跟 tobramycin 列於同一格，表示此兩種藥物的臨床效用及抗敏測試判讀準則相似，可選擇兩種藥物都測試或只測試其中一種；但只有當藥物之間有” or” 時，則表示一種藥物的測試結果可用來預測另一種藥物的抗敏性(如：Staphylococcus spp.下之 azithromycin or clarithromycin or erythromycin)，而且除特殊情況，一般應只報告有測試的藥物結果。

## M100-S18 表二說明

M100-S18 的 disk diffusion 及 MIC 測試方法下每一種菌的表二中，除了各種抗生素的抗敏判讀準則(Interpretive Standards)，亦包含測試條件(菌濃液及培養皿，溫度及時間等)(Testing Conditions)、最少應做的品管建議(Minimal QC Recommendations)、一般註明(General Comments)及各藥物判讀準則旁的註明(Comments)。另外，表一中已刪除的有些藥物仍然列於表二中，因為有些藥物在其他國家仍有使用，有些藥物仍用於監測及流行病學調查，而有些藥可能會再被准許或推薦使用。

M100-S18 另一更新是添加測量抑制圈大小的說明，此資料在 M2-A 文獻中一直都有，但為增加測試者的注意，將此說明加於 disk diffusion 表二中的” 一般註明”，這些說明重點為：一、當測量抑制圈時，除了特殊菌種之幾個抗生素以外，其他皆應以反射燈光判讀(培養基盤子向下對著黑色背景，燈光從上往下)，但當判讀 Staphylococcus 的 oxacillin 抑制圈或 Staphylococcus 及 Enterococcus 的 vancomycin 及 linezolid 抑制圈時，則應將盤子向上對著燈光，讓燈光透過盤子來判讀；二、在判讀抑制圈之邊緣時，以肉眼可看到無明顯生

長為界，不是依靠其他器材(如放大鏡)判讀；三、Proteus 應忽略遊走(swarming)的部分；四、判讀磺胺劑抗生素時，以 80%生長處為抑制邊緣。

## 主要細菌之測試重點

以下對 Enterobacteriaceae、Non-Enterobacteriaceae、Staphylococcus spp.、Enterococcus spp.、Streptococcus pneumoniae 及其他 Streptococcus spp. 尚未討論到的 M100-S18 更新部份及近年較重視的幾個重點做個簡述。

### Enterobacteriaceae (腸桿菌科)

M100-S18 Enterobacteriaceae 的表二(2A)中，多加了一段有關 carbapenem 抗藥性的註明，包含 KPC(Klebsiella pneumoniae carbapenemases)等水解 carbapenem 的  $\beta$ -lactamases[4]，特別強調有些地區的 Enterobacteriaceae 帶有這些 carbapenemases 時，實驗測試仍可為感受性(susceptible)，但病人使用 carbapenem 治療可能失敗，並指出當 Enterobacteriaceae 菌對 extended-spectrum cephalosporins 有抗藥性時，如其 carbapenem (meropenem、imipenem、ertapenem)之 MIC 為 2 或 4 ug/ml 時，可能帶有 KPC 類或其他 carbapenemase，臨床微生物實驗室應提高警覺。

附錄 A (Appendix A)篩選及確定 E. coli、K. pneumoniae、K. oxytoca 及 P. mirabilis 是否為具廣效性乙內酰胺[extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL)]菌表中，強調需測試不只一種藥物，以增加篩選敏感度；在確認 ESBL 的菌時，亦需使用 cefotaxime 及 ceftazidime 兩種藥物，因為有些菌只有 cefotaxime 是陽性，有的只有 ceftazidime 是陽性，如果只測其中一種，會漏掉一些具 ESBL 之菌。附錄 A 也強調確認為具 ESBL 的菌需將其抗敏報告中所有 penicillins 類，頭孢子素及 aztreonam 都改為抗藥性(resistant)(可參考詞彙表 I-抗生素主分類及亞分類)。

### Non-Enterobacteriaceae

Non-Enterobacteriaceae 中，只有 P. aeruginosa、Acinetobacter spp.、Burkholderia cepacia、及 Stenotrophomonas maltophilia 有 disk diffusion 測試準則，其他的只有用 MIC 測試方法的結果可信。因為 Acinetobacter spp.之抗藥問題，表一中 Acinetobacter spp.測試/報告群的抗生素在 2008 年(M100-S18)將原在 B 群的 5 種藥物 (ampicillin-sulbactam, ciprofloxacin、levofloxacin、gentamicin、tobramycin)移至 A 群，且於 C 群增加了 colistin 及 polymyxin B (MIC methods only)。另一更新是 2007 年前的 MIC 表中 P. aeruginosa 及其他 non-Enterobacteriaceae 之判讀準則放在同一個表內，當一個藥物在不同菌有不一樣的判讀標準時則分開列，2008 年 M100-S18 的 MIC 表則將 P. aeruginosa (2B-1)及 Non-Enterobacteriaceae (2B-5)分開。Non-Enterobacteriaceae 指的菌是 Pseudomonas spp.及其他非挑剔性葡萄糖非發酵性的革蘭氏陰性桿菌(但不包含上述有 disk diffusion 準則之菌及 B. mallei 與 B. pseudomallei，這些菌各自有測試準則)。

### Staphylococcus spp. (葡萄球菌)

在 Staphylococcus spp.的表一測試/報告群中，有幾種藥物(azithromycin、clarithromycin、erythromycin、clindamycin、trimethoprim-sulfamethoxazole)從 B 群移到 A 群，C 群的幾種藥物(daptomycin、doxycycline、tetracycline、rifampin)則移到 B 群，

這些改變是為配合美國疾病管制局 2006 年的一個文獻對治療社區抗甲氧苯青黴素金黃色葡萄球菌 [methicillin (或 oxacillin) resistant *S. aureus*, 簡稱 MRSA] (CA-MRSA)的建議[5], 此建議在台灣之適用還待評估, 因為台灣 MRSA 對其中些抗生素之抗藥性較高。

M100-S18 表二 C (Table 2C)的”一般註明”內多增加一項, 指出葡萄球菌  $\beta$ -lactamase、oxacillin 抗藥性、使用 cefoxitin 測試 mecA-導致的 oxacillin 抗藥性、萬古黴素感受性降低、及誘導式 clindamycin 抗藥性測試之說明, 列於附錄 B(*S. aureus*)及附錄 C[凝固?陰性之葡萄球菌(Coagulase negative staphylococci, 簡稱 CoNS)]。附錄 B 及附錄 C 將一些過去的 appendix 及表二內的註明合併, 亦有更新。附錄 B 及 C 偵測  $\beta$ -lactamase 及附錄 B 中有些測試亦適用於 *S. lungdunensis* 的說明, 在此不予討論。

附錄 B 測試 *S. aureus* 對 oxacillin (methicillin)抗藥性方法包含用 oxacillin agar dilution 及用 cefoxitin 測 mecA-導致的抗藥性的 disk diffusion 及 MIC 方法。Oxacillin agar dilution 不適用於 CoNS, CoNS 對 oxacillin 抗藥性的 disk diffusion 測試選擇是 cefoxitin。在此要特別指出, 這些 *Staphylococcus spp.*測試法培養時間不同, 但培養溫度皆為 33-35°C (如超過 35°C 可能不會測到 oxacillin 抗藥性)。當報告 cefoxitin 測試的結果時, 應報告為 oxacillin susceptible (S)或 resistant (R)(不是報告 cefoxitin)。用 cefoxitin 測 mecA-導致的抗藥性的 MIC 方法是 2008 年新增, 只適用於 *S. aureus*, 如 cefoxitin MIC 等於或大於 8 ug/mL 則報告 oxacillin R, 等於或小於 4 ug/mL 則報告 oxacillin S。

因為 *S. aureus* 對 vancomycin 感受性降低(或具異混合抗藥性)菌的增加, CLSI 在 2006 年(M100-S16)改變 *S. aureus* vancomycin 的判讀準則, 原來感受性(Susceptible)的 MIC 為小於或等於 4 ug/mL, 改為 2 ug/mL, 中間性(Intermediate)從 8-16 ug/mL 改為 4-8

ug/mL, 抗藥性(Resistant)從大於或等於 32 ug/mL 改為 16 ug/mL。附錄 B 包括使用含 vancomycin 的 BHI agar 測試對 vancomycin 感受性降低的 *S. aureus*, 但是, 一些臨床微生物實驗室不是常規例行使用此方法, 如何找出 *S. aureus* 對 vancomycin 感受性降低(或具異混合抗藥性)之菌, 仍是微生物實驗室的一大問題。過去文獻有提示, 如發現 *S. aureus* 菌落的大小有明顯差異時, 長的較慢較小的菌落也許是 vancomycin 感受性降低之菌[6]。近年來不同國家持續發現, 被對 vancomycin 感受性降低(或具異混合抗藥性)*S. aureus* 感染使用 vancomycin 治療失敗的個案, 台灣亦有應值得注意[7,8]。

附錄 B 及 C 中誘導式 clindamycin 抗藥性部份, 強調測試 clindamycin-S, erythromycin-R 之葡萄球菌時, clindamycin 及 erythromycin 的紙錠(又稱為”D-Test”)距離, 不要超過 15 mm, 以避免假陰性之結果, 並強調判讀時如 clindamycin 抑制圈內菌長的朦朧模糊一層, 即使沒看到”D”形, 仍是陽性。M100-S18 增加了以 MIC 方法測試誘導式 clindamycin 抗藥性方法。當 D-Test 及此 MIC 結果為陽性時, clindamycin 的報告應改為”R”。

#### Enterococcus spp. (腸球菌)

在 *Enterococcus spp.*方面, M100-S18 中主要改變在表一測試/報告 C 群中刪除了 chloramphenicol、erythromycin、tetracycline、rifampin(這些藥劑可用來測試 VRE)部份, 因為近年來有一些新藥物可用於治療 VRE; 另在 B 群加了 daptomycin (MIC method only)。在附錄 D 測試腸球菌對高濃度 aminoglycoside 及 vanco-mycin 抗藥性的方法中, 應注意培養時間之不同, 另外, 當 streptomycin 的結果在 24 小時後如是 S 應再培養 24 小時, 在 48

小時再判讀一次。

#### Streptococcus pneumoniae(肺炎雙球菌)

S. pneumoniae 在 M100-S18 中主要改變是 penicillin MIC 的判讀標準，此改變的主要原因為，過去的判讀標準是以 CSF(meningitis)為主，當感染非腦膜炎病患之肺炎雙球菌對 penicillin 只是低程度抗藥性時，使用高劑量 penicillin 治療大多仍然有效。雖然過去 M100-S (M100-S17 前)表二的註明中有強調當引起肺炎個案的 S. pneumoniae 菌的 penicillin MIC 為”intermediate”時，仍可使用高劑量 IV penicillin 治療，但此註明大多被忽略。Disk diffusion 測試 S. pneumoniae penicillin 抗敏性是用 oxacillin，抑制圈大於或等於 20 mm 表示菌株對 penicillin (不是 oxacillin)具感受性，當抑制圈為小於或等於 19 mm 時，則需測試 MIC 來確認，此 disk diffusion 部份 M100-S18 沒改變，但 MIC 部份則依口服性(oral)及注射性(parenteral)[再依腦膜炎(meningitis)及非腦膜炎(nonmeningitis)]分為三個不同的判讀準則。故實驗室在報告結果時會依情況而不同，舉例來說，當一株從血液分離的 S. pneumoniae 菌的 penicillin MIC 為 1 $\mu$ g/mL 時，報告上分為 Penicillin parenteral (nonmeningitis)- “S”，Penicillin parenteral (meningitis) - “R”，Penicillin (oral penicillin V)- “I”。M100-S18 第 126-127 頁上對使用 Penicillin 治療有比較詳細的說明。Streptococcus spp. Other Than S. pneumoniae。

M100-S 表一 A (Table 1-A)列的挑剔性菌種中，M100-S18 改將 Streptococcus spp. Other Than S. pneumoniae 分成 Streptococcus spp. Beta-hemolytic group 及 Streptococcus spp. Viridans group。Beta-hemolytic group 包含大菌落的 Group A、C、G 及 Group B streptococci；但小菌落的 Group A、C、F、G 的  $\beta$ -溶血鏈球菌則分類在 Viridans streptococci 中。它們的判讀標準分開在 disk diffusion 與 MIC 的表 2H-1 及 2H-2 中。Beta-hemolytic group 也有誘導式 clindamycin 抗藥性(“D-Test”)部份，但要強調測試時 clindamycin 及 erythromycin 的紙錠距離不要超過 12 mm(跟葡萄球菌 D-Test 15 mm 不同)，此相關資料在表 2H-1 有說明。

## 其 他

M100-S18 內 disk diffusion 的表一及表二部份還包含 Haemophilus spp.及 Neisseria gonorrhoeae 測試/報告群及判讀標準，MIC 表一及表二內亦有此兩種菌資料，MIC 表二部份還包含 Vibrio cholerae、Helicobacter pylori、Neisseria meningitis 測試及判讀標準，這些標準在 M100-S18 無更新。M100-S18 內還有不少其他抗微生物劑感受性測試之資訊，包含表二中少數抗藥機轉之說明、品質管制(2008 年新增了幾個 MIC QC Range)、抗生素試劑配製、少見或不尋常抗藥結果處理之建議、影響感受性測試結果之因素等，故 M100-S18 除了是抗微生物劑感受性測試之準則標準，也是一個好的參考文獻。最後要指出，M100-S18 第 15 頁增加的一段話中強調，新的 CLSI 抗微生物劑感受性測試判讀標準，應經過各單位相關人員，如：感染科醫師、藥局、藥事委員會及感控委員會一起討論才可採用，CLSI 的 disk diffusion 判讀標準在 M100 出版後即可採用，如果實驗室用的測試設備涵蓋 CLSI 判讀的抗生素濃度，則在經過適當的確認測試後再採用。

## 結 語

臨床微生物實驗室在感染症診斷及感控佔重要的一環，實驗室必須持續更新抗藥測試方法及採用適當報告

的策略，來應對細菌抗藥性的不斷演變。CLSI 的 M100-S 標準以每年更新抗藥測試準則的方式，提供不同國家臨床微生物實驗室一個共通的對策。

## 參考文獻

1. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard-9th Edition. M2-A9. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-7th Edition. M7-A7. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Information Supplement. M100-S18. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. Queenan AM, Bush K: Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-58.
5. Gorwitz RJ, Jernigan DB, Powers JH, et al: Strategies for Clinical Management of MRSA in the Community: Summary of an Experts' Meeting Convened by the Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Available at [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/CAMRSA\\_ExpMtgStrategies.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/CAMRSA_ExpMtgStrategies.pdf).
6. Marlowe EM, Cohen MD, Hindler JF, et al: Practical strategies for detecting and confirming vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*: a tertiary-care hospital laboratory's experience. *J Clin Microbiol* 2001;39:2637-9.
7. Lodise TP, Graves J, Evans A, et al: Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3315-20.
8. Chi CY, Lauderdale TL, Wang SM, et al: Health care-associated endocarditis caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *J Clin Microbiol* 2008;46:810-3.