

抗生素抑(殺)菌效果的體外測試

陳怡心¹ 莊銀清^{1,2}

奇美醫學中心 1 醫學研究部 2 內科部

前 言

臨牀上用來評估某特定抗生素對病原菌的療效，在體外(*in vitro*)最直接方便的測定方式，即是測定菌株抗生素感受性。體外試驗有非常多種，舉凡紙錠擴散試驗(disk-diffusion test)、最低抑菌濃度測定(minimum inhibitory concentration; MIC)、最低殺菌濃度測定(minimum bactericidal concentration; MBC)、棋盤格殺菌試驗(checkerboard test)、殺菌時間曲線試驗(time-kill curves test)。每個地區使用抗生素狀況和其它地區並不完全相同，因此本土菌株抗藥性狀況可能會與其它地區有差異，不適合完全依據國外用藥經驗，國內有必要監視菌株抗生素感受性狀況。依據美國臨床微生物檢驗室標準委員會(National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS)指出紙錠擴散試驗是使用最普遍和快速的方法，但紙錠擴散試驗技術並不是最好的方法，它之所以被普遍採用是因為簡單與經濟。紙錠擴散試驗僅能提供定性資料，對大多數感染的治療可提供適當的指引[1]，然而當治療藥物劑量必須調整、試驗結果模稜兩可時，則必須操作能有定量資料的感受性試驗—即 MIC，依據 NCCLS 標準執行抗微生物劑感受性試驗方法測定。所以適當的實驗室體外試驗提供抗生素 MIC 值，不僅知道抗生素對病原菌的最小抑制濃度，還可再以 time-kill test 配合抗生素 MIC 的範圍，觀察不同的抗生素及不同的抗生素濃度對病原菌生長抑制的情形，並且可以有助於臨床醫師用藥的參考，再者若發現體外試驗的結果抗生素對病原菌有良好的抑制情況，將可進一步提供 MIC 值初步來作為動物實驗的設計(如圖一)。

MIC 試驗—(agar dilution 的材料與方法)

將各種抗生素加入 Mueller-Hinton medium 中，分別配成不同標準濃度(0.00375 $\mu\text{g/mL}$ -128 $\mu\text{g/mL}$)的 MH plate。將所試驗的病原菌接種於 MH broth 培養 37°C，隔夜後取 100 μL 於增殖試管培養基(Tryptone soy broth; TSB)增菌，增菌後在配製好含有不同濃度抗生素的 MH plate 上點菌，進行 MIC 試驗。判讀 MIC 值以不長菌的抗生素 MH plate 為準。若病原菌有許多株時則需要計算 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 值(將所有測試菌的 MIC 值由低至高排列，可以抑制一半或 90% 菌數的 MIC，即為 MIC₅₀ 及 MIC₉₀)。操作 MIC 試驗必須同時也執行標準菌株(例如 *E. coli* 25922 之 MIC)來比對抗生素的準確性範圍，看是否與 NCCLS 所提供的相同[2]。

MIC₅₀ 和 MIC₉₀

MIC₅₀ 是指可以抑制百分之五十測試菌之最低抗生素濃度

MIC₉₀ 是指可以抑制百分之九十測試菌之最低抗生素濃度

MIC 和接種菌量效應(inoculum size effect)關係：

臨床上感染的病原菌以體外試驗所測得的 MIC 值為參考來治療 病人時，經常發現效果不佳，原因在於這類病原菌在較高菌量下具有 較高的 MIC 值，這是因為這類細菌對於某些抗生素具有接種菌量效 應 (Inoculum size effect)現象。這時需要在體外試驗操作中提高接種 菌量，在操作 Time-kill 試驗時一般接種菌量為 5×10^5 CFU/mL，若發 現可能有 inoculum size effect 現象時，則需要提高菌量到 5×10^7 CFU/mL 來操作，所測得的 MIC 值才能模擬病人身上的狀況。

在實驗室中，操作 MIC 試驗亦可提供動物實驗上的設計。首先 必須先試驗選用的抗生素對病原菌的最小抑制濃度，以此來推算在動 物體內所給予的藥量。但是抗生素在體內作用反應的情形常常很難去 評估是否能完全抑制病原菌，抗生素的選擇和病人的預後受到許多因 素影響，包括抗生素藥物動力學性質、藥物毒性和病人身體狀況等。 其中藥物動力學：藥動學(pharmacokinetics; PK)/藥效學 (pharmacodynamic; PD)依據抗生素作用方式主要分為濃度依賴殺 菌(concentration-dependent killing)和時間依賴殺菌(time-dependent killing)二種；一個是要把藥量維持在 MIC 濃度之上讓在有效濃度的作用下提高 MIC，另一個是延長藥物在體內作用時間[3]。皆有提供 MIC 在動物實驗上 價值的所在，進一步若要看抗生素合併情形可再操作 Time-kill 輔助動物實驗。

Checkerboard 試驗—(broth microdilution 的材料與方法)

為一種測試抗生素合併使用 效果的體外試驗，在 96 孔洞中操作肉湯 微量稀釋方法(如圖二)。(一)把待測的某二種抗生素 A 及 B 各別稀 釋好不同濃度的 MIC 範圍。(二)在 96 孔洞中加入抗生素 A 及 B 依不 同 MIC 濃度，各 $25 \mu\text{L}$ 合併混合均勻。(三)另調 $50 \mu\text{L}$ 菌液(濃度約 1×10^6 CFU/mL)加 到 96 孔洞中，使每個孔洞總體積為 $100 \mu\text{L}$ 。(四)置於 37°C 培養箱培養隔夜後，判讀其合併抑制濃度的範圍。由此合併抑制範 圍可求出微量抑制濃度指數(fractional inhibitory concentration index; FIC index)[4]。此公式用以初步測試某二種抗生素 A 及 B 合併是否 具有協同性作用(synergy)、加成性作用(additive)、無效性作用 (indifference)、拮抗性作用(antagonism)(如表一)。

Fractional Inhibitory Concentration(FIC)：

$$\text{FICA} = \text{MIC of drug A in combination}/\text{MIC of drug A alone}$$

$$\text{FICB} = \text{MIC of drug B in combination}/\text{MIC of drug B alone}$$

$$\text{FICindex} = \text{FICA} + \text{FICB}$$

Time-kill curves 試驗—(broth macrodilution 的材料與方法)

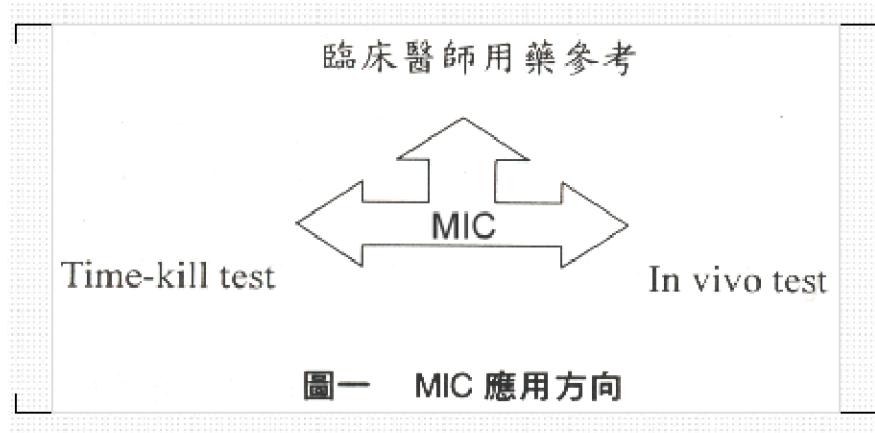
為一種肉湯大量稀釋方法，先以 agar dilution 的方式初略估計所 測試的抗生素對病原菌的 MIC 值，再依照不同 MIC 值範圍配合不同 抗生素合併進行 Time-kill，接種菌量約為 5×10^5 CFU/mL。之後在各 個時間點 0 、

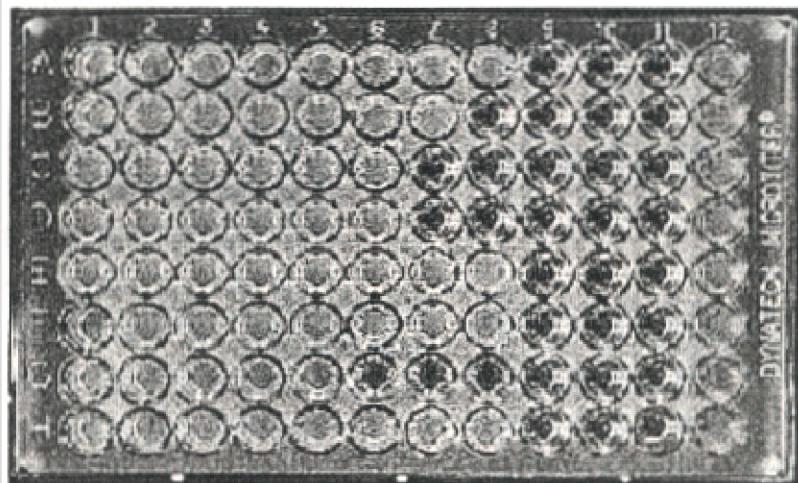
2、4、6、8、12、24、30、36、48 小時，塗菌液在 LB agar plate 上，置於 37°C 培養箱培養 24 小時最後菌落數以 log₁₀/CFU 表示 畫成曲線圖[5](如圖三)。

Time-kill curves 與後抗生素效應(post-antibiotic effect; PAE)關係 所謂 PAE 指的是細菌與抗生素短暫接觸後在抗生素被清除的情況下細菌生長仍受抑制的現象。研究發現許多抗生素的抗菌活性與藥物的高峰濃度密切相關，有明顯的濃度效應，體內抗生素不必始終維持在有效血中藥物濃度之上。在 PAE 期中的細菌許多特徵產生了改變，使得在治療中可以延長給藥間隔，減少用藥劑量。time-kill curve 為抗生素殺菌曲線，若此抗生素具有 PAE 現象可以觀察出細菌生長抑制的現象。

結論

以往對於病人感染時，臨床醫師常會依照經驗投藥或仰賴細菌室以 Disk diffusion test 做抗生素感受性試驗的結果來治療病人病況。但是一旦遇到抗藥性菌株或病人治療過程復發導致用藥劑量可能需要調整時，MIC 試驗就顯得重要。如何把實驗室體外試驗操作的數據應用在臨牀上用藥的參考及動物實驗的設計，實為重要。首先在操作所有體外試驗：MIC、Time-kill、Checkerboard、Disk diffusion 時，必須結果要差異不大且有臨床上的意義所在[6](表二)。倘若適時提供這些體內試驗數據能幫助臨床醫師解決用藥的困擾和反覆投藥造成抗藥性的問題時，這些實驗室試驗相對就有提供的價值所在。

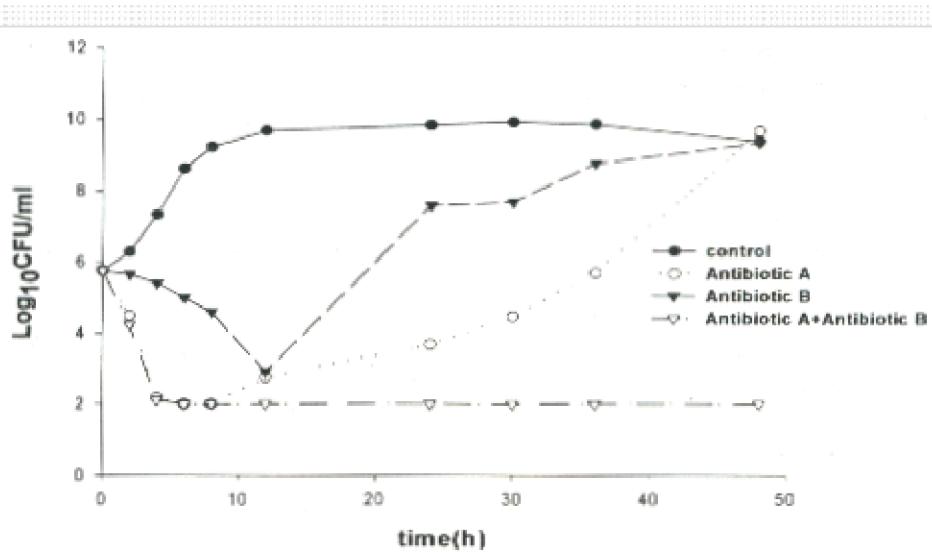




圖二 Checkerboard

表一 FIC index 的判斷標準

Index	Synergy	Additive	Indifference	Antagonism
FIC	<0.5	0.5-≤1	1-≤4	>4



圖三 Time-kill curves

表二 體外試驗各種方法的優缺點與應用

	優 點	缺 點	應 用
MIC	定量化	過程繁複	pharmacokinetics/pharmacodynamic (PK/PD) 和 MIC 之關聯性 臨床醫師用藥參考 體內試驗(動物實驗)設計
Checkerboard	易操作	只初略看出抑制活性	藥物合併的參考
Disk-diffusion	簡單、快速	無法做到定量 試驗結果模稜兩可(抑制環難判斷)	篩檢大量病原菌的感受性試驗藥物合併的參考【雙紙錠擴散試驗(Double disk diffusion)】
Time-kill	較能看出抑制趨勢	時間消耗太長	可觀看後抗生素效應(post-antibiotic effect; PAE)現象 藥物合併的參考 體內試驗(動物實驗)設計

參考文獻

- 行政院衛生署：腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)之抗藥趨勢。疫情報導 2004;20:245-53.
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clin Microbiol Infect 2000;6:509-15.
- Ebert SC: Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antibiotic selection. Pharmacy Therapeutics 2004;29:244-53.
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin Microbiol Infect 2000;6:503-08.
- Ko WC, Lee HC, Chuang YC: In vitro and in vivo combinations of cefotaxime and minocycline against *Aeromonas hydrophila*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1281-3.
- White RL, Burgess DS, Manduru M: Comparison of three different in vitro methods of detecting: time-kill, checkerboard, and E test. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:1914-8.