

• 检验技术与方法 •

用纸片扩散法和微量稀释法进行药物敏感性测定的比较

晋 兴¹, 武爱荣¹, 黄 波¹, 周 娜¹, 曹义战^{2△}

(1. 西安高新医院检验科, 陕西西安 710075; 2. 第四军医大学唐都医院急诊科, 陕西西安 710038)

摘要:目的 探讨纸片扩散法和微量稀释法用于临床常见葡萄球菌和肠杆菌的药物敏感性测定的相关性和一致性,为抗菌药物的选用提供参考依据。方法 收集2011年3月至2012年2月临床分离的97株葡萄球菌和86株肠杆菌,用纸片扩散法与微量稀释法对以上临床分离的菌株进行药物敏感性测定,分析两种方法的差异。结果 纸片扩散法和微量稀释法对葡萄球菌和肠杆菌药物敏感性测定结果比较,差异均无统计学意义($P < 0.05$);但个别药物敏感性测定结果不在可接受范围内。结论 纸片扩散法和微量稀释法用于微生物药物敏感性测定的一致性较好,应注意个别药物敏感性测定结果不在可接受范围内。

关键词:药物敏感性测定, 微生物; 纸片扩散抗菌试验; 微量稀释法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.029

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)03-0322-03

Comparative evaluation of the disk diffusion with the microdilution assay for testing the drug sensitivity

Jin Xing¹, Wu Airong¹, Huang Bo¹, Zhou Na¹, Cao Yizhan^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Gaoxin hospital, Xi'an, Shanxi 710075, China; 2. Department of Emergency, Tangdu hospital, the Fourth military medical university, Xi'an, Shanxi 710038, China)

Abstract: Objective To compare and analyze drug sensitivity results of the disk diffusion (K-B) method and the microdilution (MIC) method in detection of clinically common staphylococcus and enterobacteria, and provide the basis and references for the clinical use of antibiotics. **Methods** 97 staphylococcus isolates and 86 enterobacterial isolates were collected from May 2011 to February 2012. Drug sensitivity of 7 clinically commonly used antibiotics against G⁺ bacteria antibiotics and 8 antibiotics against G⁻ bacteria were performed using both K-B and MIC methods according to the CLSI standard. Data were analyzed using WHONET 5.6 software. **Results** The results from K-B method are highly consistent with those from the MIC method both on staphylococcus drugs and 8 enterobacteria drugs. **Conclusion** The K-B method and MIC method had high consistence in detecting the drug sensitivity. However, attention still needs to be paid to a few difference between them.

Key words: drug sensitivity assay, microbe; disk diffusion antimicrobial tests; microdilution method

临床微生物实验室的微生物药物敏感性测定报告可以指导抗菌药物的使用,其结果的准确性非常重要。目前,一般临床微生物实验室的微生物药物敏感性测定普遍采用的方法是纸片扩散法和全自动或半自动仪器分析法(微量稀释法),这两种方法的一致性如何,是值得每一个临床实验室关注的问题。

1 材料与方法

1.1 标本来源 细菌菌株分离自西安高新医院住院患者送检的各类临床标本,包括97株葡萄球菌和86株肠杆菌。葡萄球菌又包括金黄色葡萄球菌84株、表皮葡萄球菌6株、溶血葡萄球菌4株、中间葡萄球菌1株、人型葡萄球菌2株。肠杆菌中有肺炎克雷伯菌26株、大肠埃希菌60株。本研究中的细菌经VITEK32全自动微生物细菌鉴定仪鉴定确认。

1.2 质控菌株 金黄色葡萄球菌ATCC25923和大肠埃希菌ATCC25922购自卫生部临床检验中心。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器 微生物浊度比浊仪、VITEK32全自动微生物细菌鉴定仪由法国梅里埃生物有限公司生产。

1.3.2 药敏纸片 包括万古霉素(30 μg/片)、替考拉宁(30 μg/片)、利奈唑胺(30 μg/片)、左氧氟沙星(15 μg/片)、红霉素(15 μg/片)、克林霉素(2 μg/片)、头孢唑啉(30 μg/片)、哌拉西林/他唑巴坦(分别为100、10 μg/片)、头孢哌酮/舒巴坦(分别为75、30 μg/片)、美罗培南(10 μg/片)、亚胺培南(10 μg/片)、

头孢吡肟(30 μg/片)、头孢他啶(30 μg/片)、环丙沙星(5 μg/片)、阿米卡星(30 μg/片),所有药敏纸片均由英国OXOID公司生产,试验期间所有药敏纸片均在有效期内。

1.3.3 培养基 纸片扩散法所用的水解酪蛋白琼脂(MHA)由北京奥博星生物技术有限责任公司生产。微量稀释法革兰阳性葡萄球菌所用的DL-96STAPH和革兰阴性菌所用的DL-96E,均来自珠海迪尔生物工程有限公司。试验期间所有药敏板卡的使用均在厂家注明的产品有效期内。

1.4 方法

1.4.1 纸片扩散法 参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准文件中需氧菌的纸片法药物敏感性测定^[1],同时以质控菌株作为对照,并根据2010年CLSI的判断标准判读结果并记录。

1.4.2 微量稀释法 严格按照珠海迪尔生物工程有限公司说明书操作,药物敏感性测定结果由计算机打印。全部质控结果均在CLSI标准M100-S18的可接受质控范围内^[2]。

1.4.3 纸片扩散法与微量稀释法的比较 参照CLSI M23-A2^[3]文件计算标准一致率(CA)、微小错误率(MIE)、重大错误率(ME)、非常重大错误率(VME)。VME≥1.5%, ME≥3%或者MIE≥10%为不可接受的结果。CA以纸片扩散法为参考方法进行计算,计算公式为 CA =

和参考方法判定结果解释符合的检测数量 $\times 100\%$ 。MIE 计算公式为 $MIE = \frac{\text{一般错误的检测数量}}{\text{总检测数量}} \times 100\%$, 一般错误是指参考方法的结果为敏感(S)或耐药(R), 实验方法的结果为中介(I), 或者参考方法为 I, 实验方法为 S 或 R。ME 计算公式为 $ME = \frac{\text{严重错误的检测数量}}{\text{总检测数量}} \times 100\%$, 严重错误指参考方法为 S 实验方法为 R。VME 计算公式为 $VME = \frac{\text{极严重错误的检测数量}}{\text{总检测数量}} \times 100\%$, 极严重错误指参考方法为 R, 实验方法为 S。

2 种方法的微生物药物敏感性测定结果依据 CLSI(M2-A9, 2006) 标准^[4] 进行判断。

1.5 统计学处理 采用 WHONET5.6 统计分析软件, 计数资料以率表示, 率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 质控结果 微量稀释法检测最低抑菌浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), 纸片扩散法检测抑菌环的直径长度(mm), 每批实验均设有质控菌株。金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 大肠杆菌 ATCC25922, 在 CLSI 标准下全部质控结果均在可接受指控范围内。见附表 1、2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 纸片扩散法和微量稀释法的比较 用两种方法对 97 株葡萄球菌进行药物敏感性测定的结果, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。两种法对 86 株肠杆菌进行药物敏感性测定结果, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 两种方法对 97 株葡萄球菌进行药物敏感性测定的结果[n(%)]

抗菌药物	纸片扩散法			微量稀释法		
	S	I	R	S	I	R
万古霉素	91(93.82)	5(5.15)	1(1.03)	93(95.87)	3(3.10)	1(1.03)
替考拉宁	92(94.85)	4(4.12)	1(1.03)	94(96.91)	3(3.09)	0(0.00)
左氧氟沙星	51(52.58)	4(4.12)	42(43.30)	47(48.45)	4(4.12)	46(47.43)
利奈唑胺	95(97.94)	2(2.06)	0(0.00)	91(93.82)	5(5.15)	1(1.03)
红霉素	10(10.31)	7(7.22)	80(82.47)	10(10.31)	6(6.14)	81(83.51)
克林霉素	36(37.12)	4(4.12)	57(58.76)	37(38.14)	4(4.12)	56(57.74)
头孢唑啉	47(48.45)	3(3.10)	47(48.45)	42(43.30)	2(2.06)	53(54.64)

表 2 两种方法对 86 株肠杆菌进行药物敏感性测定的结果[n(%)]

抗菌药物	纸片扩散法			微量稀释法		
	S	I	R	S	I	R
哌拉西林/他唑巴坦	72(83.72)	3(3.49)	11(12.79)	72(83.72)	3(3.49)	11(12.79)
头孢哌酮/舒巴坦	70(81.40)	11(12.79)	5(5.81)	69(80.24)	12(13.95)	5(5.81)
美罗培南	84(97.68)	1(1.16)	1(1.16)	81(94.19)	5(5.81)	0(0.00)
亚胺培南	83(96.52)	2(2.32)	1(1.16)	83(96.51)	3(3.49)	0(0.00)
头孢吡肟	44(51.16)	5(5.81)	37(43.03)	47(54.65)	3(3.49)	36(41.86)
环丙沙星	50(58.14)	6(6.98)	30(34.88)	50(58.14)	3(3.49)	33(38.37)
头孢他啶	52(60.47)	4(4.65)	30(34.88)	49(56.98)	3(3.49)	34(39.53)
阿米卡星	71(82.56)	3(3.48)	12(13.96)	70(81.40)	5(5.81)	11(12.79)

表 3 两种方法对 97 株葡萄球菌的微生物药物敏感性测定结果的比较[n(%)]

抗菌药物	CA	MIE	ME	VME
万古霉素	87(89.69)	8(8.25)	1(1.03)	1(1.03)
替考拉宁	89(91.75)	7(7.22)	0(0.00)	1(1.03)
左氧氟沙星	85(87.63)	8(8.25)	4(4.12)	0(0.00)
利奈唑胺	89(91.75)	7(7.22)	1(1.03)	0(0.00)
红霉素	82(84.54)	11(11.34)	1(1.03)	3(3.09)
克林霉素	78(80.41)	8(8.25)	5(5.15)	6(6.19)
头孢唑啉	89(91.76)	5(5.15)	3(3.09)	0(0.00)

2.3 两种方法用于 97 株葡萄球菌药物敏感性测定的比较 葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、头孢唑啉的敏感性的测定, 两种方法的差异均在可接受范围内, 一致性较好; 对左氧氟沙星($ME = 4.12\%$)、红霉素($MIE = 11.34\%$ 、 $VME = 3.09\%$)、克林霉素($ME = 5.15\%$ 、 $VME = 6.19\%$)的敏感性的测定, 两种方法的差异在不可接受范围, 一致性稍差。见表 3。

2.4 两种方法用于 97 株葡萄球菌药物敏感性测定的比较 肠杆菌对哌拉西林/他唑巴坦、美罗培南、亚胺培南、头孢吡肟、阿米卡星的敏感性的测定, 两种方法的差异在可接受范围, 一致性较好; 对头孢哌酮/舒巴坦($MIE = 12.80\%$)、头孢他啶($ME = 4.65\%$)、环丙沙星($ME = 4.65\%$)的敏感性的测定, 两种方法的差异在不可接受范围, 一致性稍差。见表 4。

表4 两种方法对86株肠杆菌的微生物药物敏感性
测定结果的比较[n(%)]

抗菌药物	CA	MIE	ME	VME
哌拉西林/他唑巴坦	78(90.71)	6(6.97)	1(1.16)	1(1.16)
头孢哌酮/舒巴坦	73(84.88)	11(12.80)	1(1.16)	1(1.16)
美罗培南	81(94.17)	4(4.65)	0(0.00)	1(1.16)
亚胺培南	80(90.03)	5(5.81)	0(0.00)	1(1.16)
头孢吡肟	76(88.37)	8(9.31)	2(2.32)	0(0.00)
头孢他啶	75(87.21)	7(8.14)	4(4.65)	0(0.00)
环丙沙星	72(83.73)	9(10.46)	4(4.65)	1(1.16)
阿米卡星	76(88.37)	8(9.31)	2(2.32)	0(0.00)

3 讨论

目前临床微生物实验室的微生物药物敏感性测定普遍采用纸片扩散法^[5]和全自动或半自动仪器分析法(微量稀释法)^[6],这就面临着两种方法结果的一致性问题以及药物敏感性测定报告和耐药监测数据是否可以通用的问题。因此,分析两种方法的相关性,对于提高报告结果的准确性和可靠性非常重要^[7-8]。

纸片扩散法是WHO推荐使用的微生物药物敏感性测定方法^[9],其特点是方法易被掌握,操作较简单,测定的药物可随临床需要而调整,易检测出个别特殊耐药株^[10-11]。更重要的是,纸片扩散法微生物药物敏感性测定已有一套完整的质量控制体系,结果比较可靠,是目前微生物实验室最常用方法。全自动或半自动仪器分析法是一种微量肉汤稀释法^[12-13],通过检测浓度来判读结果,但它仅检测两个临界浓度,不属于连续完整地稀释法,不能精确测得药物最低抑菌浓度,属于定性筛选试验,而且仪器法操作更容易受实验体系中液体量、药量、接种菌量、读数以及药敏板卡中抗菌药物药物浓度分布等因素的影响^[14]。微生物药物敏感性测定的药物都是板卡固定模式,无法个性化地满足每个医院临床实际需要,检测一些特殊耐药菌株的耐药性有困难。另外药敏板卡耗费高,药物敏感性测定结果完全依赖仪器判读,室内质量控制难以落实到实际工作中^[15-16]。

2011年本院分离出的致病菌中,所占比例排列前3位的依次是:金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯杆菌,占全部致病菌总数的53.58%。其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌占54.54%,产超广谱β-类酰胺酶大肠埃希菌占53.08%,产超广谱β-类酰胺酶肺炎克雷伯菌占34.45%。比较前3位致病菌纸片扩散法和微量稀释法的药物敏感性测定结果,为临床提供及时、准确的抗菌药物选择依据显得尤为重要。

本研究表明,纸片扩散法和微量稀释法用于菌株对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、头孢唑啉、哌拉西林/他唑巴坦、美罗培南、亚胺培南、头孢吡肟、阿米卡星敏感性检测的一致性较好。但是,ME(反映菌株对该药物的假耐药率):头孢他啶为4.65%,环丙沙星为4.65%,左氧氟沙星为4.12%,克林霉素为5.15%;VME(反映菌株对该药物的假敏感率):红霉素为3.09%,克林霉素为6.19%;MIE:头孢哌酮/舒巴坦为12.80%,不在可接受范围之内。

每个临床微生物实验室都应该结合自己实验室的具体情况做不同药物敏感性测定方法的比对试验,以保证报告的一致性、可靠性和准确性。

参考文献

- Clinical and Laboratory Standard Institute. M2-A9 Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2010.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. M100-S18 Performance standard for antimicrobial disk susceptibility testing [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008.
- National Committee for clinical Laboratory Standards. Decelement of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameter [S]. Wayne, PA: National Committee for clinical Laboratory Standards, 2001.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. M7-A7 Methods for dilution antimicrobial tests for bacteria that grow aerobically [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2006.
- 刘锦燕,项明洁.抗真菌药物敏感性试验方法研究进展[J].检验医学,2009,24(12):927-931.
- 宋晓晶,董岩,张虹,等.微量稀释法检测四种药物对白念珠菌的敏感性分析[J].大连医科大学学报,2010,32(4):462-464.
- Arikan S, Paetznick V, Rex JH. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against Aspergillus and Fusarium isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(9): 3084-3087.
- Kiraz N, Dag I, Oz Y, et al. Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against Candida glabrata [J]. J Microbiol Methods, 2010, 82(2): 136-140.
- 谭瑶,赵清. K-B纸片扩散法药敏试验[J].检验医学与临床,2010,7(20):2290-2291.
- 孙万里,高昆山,官旭俊.纸片法和微量稀释法临床分析[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(2):155-156.
- 蓝锴,张伟铮,罗强,等.不同方法检测黏液型铜绿假单胞菌药物敏感性结果准确性探讨[J].检验医学,2012,27(7):544-548.
- Klare I, Konstabel C, Werner G, et al. Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5): 900-912.
- 马驰,林居纯,陈雅莉,等.禽源金黄色葡萄球菌耐药性监测[J].中国兽医杂志,2010,46(9):10-12.
- 周宁,张建新,樊明涛,等.细菌药物敏感性实验方法研究进展[J].食品工业科技,2012,33(9):459-464.
- Steward CD, Raney PM, Morrell AK, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of Staphylococcus aureus [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1716-1721.
- 朱以军,应华永,卜黎红,等.微量肉汤稀释法检测葡萄球菌属诱导型克林霉素耐药的评价[J].中华医院感染学杂志,2010,20(17):2713-2715.

(收稿日期:2013-12-05)