

• 检验技术与方法 •

青霉素 Etest 法评价肺炎链球菌苯唑西林的纸片筛选试验*

罗湘蓉¹, 李成瑶², 袁 军^{1△}, 李红凌¹, 金婷婷¹, 胡方芳¹

(1. 贵州省人民医院中心实验室, 贵州贵阳 550002; 2. 遵义医学院检验系, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 青霉素 Etest 法评价肺炎链球菌苯唑西林的纸片筛选试验。方法 对临床分离的 96 株肺炎链球菌非脑膜炎株, 用 Etest 作为测定青霉素敏感性的标准方法, 评价苯唑西林的纸片筛选试验的灵敏度和特异性。结果 96 株肺炎链球菌非脑膜炎株, 用 Etest 测定青霉素敏感株(PSSP)为 96.9%(93/96), 青霉素中度敏感株(PISP)为 3.1%(3/96), 未发现青霉素耐药株(PRSP)。苯唑西林纸片法初筛出 16 株 PSSP, 灵敏度为 17.2%, 特异性为 100.0%。苯唑西林纸片法与 Etest 方法比较, 差异有统计学意义($\chi^2=77, P<0.01$)。结论 苯唑西林纸片法作为肺炎链球菌非脑膜炎株青霉素注射剂敏感性的初筛方法灵敏度低, 大部分肺炎链球菌必须用 Etest 等 MIC 方法检测。

关键词:肺炎链球菌; 脑膜炎; 苯唑西林

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)16-2210-02

Evaluation of oxacillin disk test for screening *Streptococcus pneumoniae* by penicillin Etest method*Luo Xiangrong¹, Li Chengyao², Yuan Jun^{1△}, Li Honglin¹, Jin Tingting¹, Hu Fangfang¹

(1. Central Laboratory, Guizhou Provincial people's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

2. Department of Laboratory, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: Objective To evaluate the oxacillin disk screening test for screening *Streptococcus pneumoniae* by the penicillin Etest method. **Methods** 96 clinically isolated non-meningitis strains of *Streptococcus pneumoniae* were collected. The sensitivity and specificity of the oxacillin disc screening test was evaluated by the penicillin Etest method as a standard method for detecting the penicillin susceptibility. **Results** Among 96 non-meningitis strains of *Streptococcus pneumoniae*, the penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*(PSSP) strains detected by the penicillin Etest method accounted for 96.9%(93/96), the penicillin intermediate *Streptococcus pneumoniae*(PISP) strains accounted for 3.1%(3/96) and no penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*(PRSP) strain was found. But 16 PSSP strains were detected by the oxacillin disc screening test with the sensitivity of 17.2% and the specificity of 100.0%, respectively. The difference between the oxacillin disc screening test and the penicillin Etest method was statistically significant($\chi^2=77, P<0.01$). **Conclusion** The oxacillin disc screening test has the low sensitivity for preliminarily screening non-meningitis strains of *Streptococcus pneumoniae*. Most of *Streptococcus pneumoniae* must be detected by the minimum inhibitory concentration(MIC) methods such as the penicillin Etest method.

Key words: streptococcus pneumoniae; meningitis; oxacillin

肺炎链球菌(SP)是大叶性肺炎、脑膜炎、支气管炎的主要病原菌之一。治疗 SP 感染, 历史沿袭的首选药物是青霉素 G。CLSI^[1-2]推荐用苯唑西林纸片法作为 SP 青霉素药敏的初筛方法。本研究将 Etest 试条测定青霉素 MIC 作为标准方法, 评价苯唑西林纸片初筛方法的灵敏度、特异性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集贵州省人民医院 2011 年 12 月至 2012 年 11 月分离的 96 株 SP 非重复临床菌株, 均为非脑膜炎分离株。其中 85 株来自痰标本, 8 株来自分泌物标本, 2 株来自血液标本, 1 株来自肺泡灌洗液标本。质控菌株为肺炎链球菌 ATCC49619。

1.2 仪器与试剂 CO₂ 培养箱: 购自 Thermo 公司。哥伦比亚血平板及含 5% 羊血的 MH 平板: 购自广州迪景公司; 青霉素 Etest 试条: 购自法国梅里埃公司; 青霉素、苯唑西林药敏纸片及奥普托欣纸片: 购自英国 OXOID 公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养与鉴定 按《全国检验操作规程》(第 3 版)进行^[3]。

1.3.2 Etest 方法 按参考文献[3]进行操作。参照 CLSI2012

年青霉素注射剂的折点^[2]判断结果。对于非脑膜炎分离株, 青霉素 MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ 为青霉素敏感肺炎链球菌(PSSP), MIC=4 $\mu\text{g/mL}$ 为青霉素中度敏感肺炎链球菌(PISP), MIC ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ 为青霉素耐药肺炎链球菌(PRSP)。PISP 与 PRSP 均为青霉素不敏感肺炎链球菌(PNSP)。

1.3.3 苯唑西林纸片法初筛 按参考文献[3]进行操作。采用 CLSI 2012 年颁布的标准判读结果^[2]。抑菌环直径大于或等于 20 mm 的 SP 为 PSSP, 抑菌环直径小于或等于 19 mm 的 SP, 苯唑西林纸片法不能判断青霉素的敏感性, 要根据青霉素的 Etest 结果判断青霉素的敏感性。为便于统计, 本研究将苯唑西林抑菌环直径小于或等于 19 mm 分离株, 按 PNSP 处理。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计分析, 率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青霉素 Etest 结果 96 株 SP 非脑膜炎株青霉素 MIC₅₀ 为 0.75 $\mu\text{g/mL}$, MIC₉₀ 为 1.5 $\mu\text{g/mL}$, PSSP 为 93 株(96.9%), PISP 为 3 株(3.1%), PRSP 为 0 株。

2.2 苯唑西林纸片初筛法与青霉素 Etest 方法比较 青霉素 Etest 法检出 93 株 PSSP, 苯唑西林纸片法初筛出其中 16 株,

* 基金项目: 贵州省卫生厅科学技术基金(gzkwj2012-1-106); 贵州省科技计划课题(黔科合 LS 字[2012]030 号)。 作者简介: 罗湘蓉, 女, 副主任技师, 主要从事临床微生物耐药性及耐药机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: 99430junyuan@163.com。

灵敏度为 17.2%,特异性为 100.0%。苯唑西林纸片法与青霉素 Etest 方法比较,差异有统计学意义($\chi^2=77, P<0.01$)。见表 1。

Etest 方法	苯唑西林纸片法		合计
	PSSP	PNSP	
PSSP	16	77	93
PNSP	0	3	3

3 讨 论

SP 是儿童感染性疾病,尤其是小儿肺炎的常见病原菌,治疗 SP 感染,历史沿袭的首选药物是青霉素 G。2008 年,CLSI 对 SP 非脑膜炎株的青霉素折点值进行了重大调整,这种调整使 SP 非脑膜炎株对青霉素的敏感率大幅度提高^[4-7]。折点改变后,PSSP 菌株明显增多,PISP 和 PRSP 明显减少^[4-7]。美国 CDC 对 6 423 株 SP 非脑膜炎株进行研究,发现折点修改后 PSSP 从 74.7%上升为 93.2%,PISP 从 15.0%下降为 5.6%,PRSP 从 10.3%下降为 1.2%^[4]。本研究中,96 株 SP 非脑膜炎株中,PSSP 高达 93 株(96.9%),与其他报道的 93.2%^[4]、92.2%^[5]接近,比浙江报道的 85.9%和 85.5%高^[6]。青霉素仍能作为治疗 SP 非脑膜炎株感染的首选药物。对 SP 引起的呼吸道感染等额外感染性疾病,青霉素 G 仍是一价廉而有效的一线药物。

CLSI^[1-2]认为可用苯唑西林纸片法筛选 SP 青霉素的敏感性。苯唑西林抑菌环直径大于或等于 20 mm,提示 SP 对青霉素敏感;苯唑西林抑菌环直径小于或等于 19 mm,提示 SP 对青霉素可能耐药、敏感或中介,需用 MIC 方法判断 SP 对青霉素的敏感性。2008 年青霉素折点值的重大调整导致 SP 的耐药性结果判读发生根本改变^[4-7],也使得苯唑西林对 SP 非脑膜炎株青霉素注射剂筛选的灵敏度大大降低。本研究中,苯唑西林对 SP 非脑膜炎株 PSSP 筛选的灵敏度只有 17.2%(16/

93),82.8%(77/93)的 SP 非脑膜炎株 PSSP 不能通过苯唑西林纸片法筛选出来,只能通过 MIC 方法进行检测。因此,实验室使用苯唑西林筛选 PSSP 时,对于苯唑西林抑菌环直径小于或等于 19 mm 的 SP,检测青霉素的 MIC 至关重要。Etest 方法操作简单、结果稳定、便于阅读,是检测 SP 青霉素 MIC 的较好方法。

参考文献

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S18 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; eighth informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S22 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

[3] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006.

[4] Centers for disease control and prevention(CDC). Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for Streptococcus pneumoniae-United States, 2006-2007[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2008,57(50):1353-1355.

[5] Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, et al. Impact of new Clinical Laboratory Standards Institute Streptococcus pneumoniae penicillin susceptibility testing breakpoints on reported resistance changes over time[J]. Microb Drug Resist, 2011,17(1):47-52.

[6] 李建平,叶青,沈月芳,等. 2009~2010 年浙江大学儿童医院肺炎链球菌耐药性和血清分型[J]. 中国药理学杂志, 2012,47(10):792-795.

[7] 华春珍,李建平,俞惠民,等. 应用 CLSI 新的折点值标准判读儿童分离的肺炎链球菌非脑膜炎株的耐药性[J]. 中国抗生素杂志, 2012,37(2):137-140.

(收稿日期:2014-03-11)

(上接第 2209 页)

增为阴性,推测是其他 β -内酰胺酶产生的结果^[6]。近年来有学者利用新的 AmpC 酶抑制剂,如 Ro48-1220、LN-2-128 和 Syn2190 等,检测质粒型 AmpC 酶,其准确性都比较高,但这些酶抑制剂在临床比较难获得。本试验通过苯基代硼酸对 AmpC 酶的抑制作用对肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶进行检测,FOX/FOX+PBA 纸片组合的特异性和敏感性都比较高,而 CTT/CTT+PBA 纸片组合检测率比较低,而且双纸片抑制增效试验操作简便,速度快很适用于临床肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶的检测。

可见,对于临床微生物工作者来说,要想正确指导临床有效用药,单单从体外药敏结果判断诱导型 AmpC 酶的耐药性是比较困难的,应该综合考虑到酶的水解特性、诱导剂以及接种物效应等的影响。目前,临床微生物工作者面临着许多困难。一方面,肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶的不断增多,势必影响到临床抗感染的疗效。另一方面,临床实验室在 AmpC 酶检测方法的建立以及对产酶菌株复杂的耐药性认识相对不够,导致不能给临床提供及时、有效的指导。以新 AmpC 酶抑制剂为基础建立的检测方法可能成为检测 AmpC 酶的新方向,临床微生物学工作者应加强这方面研究探讨,进一步应用到其他肠杆菌科 AmpC 酶的检测。

参考文献

[1] 陈东科,张志敏,张秀珍. 三维法检测 β -内酰胺酶的影响因素探讨及方法的改进[J]. 中华检验医学杂志, 2003,26(10):600-604.

[2] 冯福英,兰小鹏,杨湘越,等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒 AmpC 基因型及流行病学分析[J]. 中华检验医学杂志, 2007,30(3):314-318.

[3] CLSI. M100-S22 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2012.

[4] Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Klebsiella spp., Escherichia coli, and Proteus mirabilis[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 4163-4167.

[5] Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002,40(6):2153-2162.

[6] Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-Mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(2):763-765.

(收稿日期:2014-02-18)