

• 论 著 •

一种用于细菌药物敏感试验的快速纸片扩散法的建立^{*}王恒秋¹, 刘雨峰¹, 王 双², 胡志方¹

(韶关市中医院:1. 检验科;2. 内科三区, 广东韶关 512031)

摘要:目的 建立一种快速纸片扩散(K-B)法用于细菌药物敏感试验(AST)。方法 快速K-B法是在低倍镜下快速观测抑菌环直径并获得AST结果的K-B法, 快速K-B法和K-B法不同在于在不同时间点检测细菌抑菌环直径, 比较两种方法对金黄色葡萄球菌、其他葡萄球菌、大肠埃希菌、肠杆菌科其他细菌、铜绿假单胞菌和其他非发酵菌的抑菌环直径平均检出时间, 各观测时间抑菌环直径检出率。计算快速K-B法、K-B法与标准K-B法的符合率并进行比较。结果 快速K-B法与K-B法对6种细菌(菌龄相同)抑菌环直径平均检出时间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。两种方法对大于或等于72 h菌龄的6种细菌抑菌环直径平均检出时间均大于菌龄小于或等于48 h的细菌, 差异有统计学意义($P<0.05$)。同种方法对6种小于或等于48 h菌龄的不同细菌抑菌环直径平均检出时间比较差异均有统计学意义($P<0.05$), 同种方法对6种大于或等于72 h菌龄的不同细菌抑菌环直径平均检出时间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。快速K-B法与标准K-B法对抑菌环直径检测的符合率为88.89%~100.00%, K-B法与标准K-B法符合率为100.00%。结论 快速K-B法获得AST时间比自动细菌鉴定仪和标准K-B法均快, 标准K-B法进行AST, 无需等待18~24 h观测抑菌环直径, 只要肉眼可见抑菌环, 即可测试其直径而获得AST结果。

关键词:快速纸片扩散法; 抑菌环; 药物敏感试验**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.009**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2015)02-0165-03**A rapid Kirby-Bauer method in antimicrobial susceptibility test^{*}**Wang Hengqiu¹, Liu Yufeng¹, Wang Shuang², Hu Zhifang¹

(Shaoguan City Hospital of TCM:1. Department of Clinical Laboratory;

2. Area Three of Internal Medicine Department, Shaoguan, Guangdong 512031, China)

Abstract: Objective To establish a rapid method of Kirby-Bauer(K-B) for antimicrobial susceptibility test (AST). **Methods** Rapid K-B method was a K-B method observing bacteriostatic ring diameter at low magnification. K-B and K-B method were used to detect the bacteriostatic ring diameter at different time point. The average checkout time of *Staphylococcus aureus*, other *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, other *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria fermentation, the detection rate of bacteriostatic ring diameter at different observation time, the coincidence rates of standard K-B method, and rapid K-B method were compared. **Results** The average checkout time of two methods on 6 kinds of bacteria bacteriostatic ring diameter (≤ 48 h and ≥ 72 h) had statistically significant differences ($P<0.05$). The average checkout time of the bacteria younger than 48 hours were significant higher than those of bacteria older than 72 h ($P<0.05$). The average checkout time of the different bacteria with age younger than 48 h by same method had significant difference ($P<0.05$). The average checkout time of the different bacteria with age older than 72 h by same method had no significant difference ($P>0.05$). Compared with the standard K-B method, the coincidence rate of rapid K-B method was 88.89%~100.00%, that of K-B method was 100.00%. **Conclusion** Rapid K-B method was faster on obtaining the AST than the standard K-B method and automatic bacteria identification. Standard K-B method for AST, should not wait for 18~24 h to observe bacteriostatic ring diameter, as long as it is visible to the naked eyes could test its diameter and get AST results.

Key words: rapid Kirby-Bauer method; bacteriostatic ring; antimicrobial susceptibility test

细菌药物敏感试验(AST)是细菌对抗菌药物敏感度的体外试验, 在细菌对抗菌药物的敏感度、临床抗菌治疗和细菌耐药性变迁的研究中具有重要意义。虽然目前许多三级甲等医院配制了自动细菌鉴定仪, 但是由于其价格昂贵, 二级甲等及以下级别的医院的临床细菌实验室(以下简称细菌室)仍然采用纸片扩散(K-B)法, 该方法通常需要18~24 h才能获得AST结果, 为了较快地获得AST结果, 满足临床尤其是重症和多重感染患者的需求, 本研究建立了快速K-B法。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 865株细菌全部分离自2013年1月至2014年9月本院门诊和住院患者的血液、痰液、粪便、尿液、咽拭纸、

分泌物、白带、脓液等标本。其中金黄色葡萄球菌109株, 其他葡萄球菌218株, 大肠埃希菌139株, 肠杆菌科其他细菌302株, 铜绿假单胞菌26株, 其他非发酵菌71株。

1.2 仪器与试剂 细菌鉴定采用珠海迪尔生物工程有限公司生产的DL-96Ⅱ型自动细菌测定系统进行。AST纸片由杭州天和微生物试剂有限公司生产, 在有效期内使用。水解酪蛋白(M-H)琼脂为杭州天和微生物试剂有限公司生产, 平板制作按其说明书执行。

1.3 检测方法 快速K-B法AST按照相关文献的K-B法进行^[1], 采用直接配制菌悬液, 与K-B法不同之处在于对抑菌环观察和测量的时间, 用于AST的菌株菌龄为24、48、72、96 h及大于或等于120 h。对抑菌环直径观测从1 h开始, 用低倍

* 基金项目: 2014年韶关市科技计划(医学类)项目(2014CX/Ka07)。 作者简介: 王恒秋, 男, 副主任技师, 主要从事临床微生物学和临床免疫学研究。

镜(100倍)每隔0.5 h 观察,并测量和记录抑菌环直径(能够观测抑菌环直径的最早时间即为快速K-B法),至肉眼能够观察到抑菌环为止(K-B法),之后每2 h 观察并测量和记录抑菌环直径,至12 h 止,18~24 h (生长较慢的细菌则适当延长)最终观察并测量和记录抑菌环直径(标准K-B法)。

1.4 结果判断 根据抑菌环直径将AST结果判断为敏感(S)、中介(I)和耐药(R),执行试剂生产厂家提供的“产品使用说明书”的判断标准。

1.5 质量控制 质控菌株为金黄色葡萄球菌ATCC25923、大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853,为杭州天和微生物试剂有限公司生产。质控方法按照文献[1]介绍的方法进行。

1.6 统计学处理 采用SPSS19.0统计软件进行处理数据及统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,差异比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法比较 快速K-B法与K-B法对6种细菌(菌龄相同)抑菌环直径平均检出时间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 快速K-B法和K-B法对不同菌龄的6种细菌抑菌环直径平均检出时间比较($\bar{x}\pm s$, h)

病原菌	≤48 h 菌龄			F	P	≥72 h 菌龄			F	P
	n	快速K-B法	K-B法			n	快速K-B法	K-B法		
金黄色葡萄球菌	84	3.08±0.76*	4.48±0.98*	107.04	<0.05	25	3.46±0.73	5.02±1.09	35.35	<0.05
其他葡萄球菌	169	3.56±0.89*	5.06±1.20*	170.36	<0.05	49	4.05±0.86	5.62±1.03	67.08	<0.05
大肠埃希菌	106	3.27±0.78*	4.67±1.01*	127.56	<0.05	33	3.77±0.86	5.20±1.11	34.23	<0.05
肠杆菌科其他细菌	224	3.58±0.98*	5.09±1.09*	237.70	<0.05	78	4.08±1.06	5.65±1.19	75.71	<0.05
铜绿假单胞菌	21	3.90±0.96*	5.45±1.01*	25.98	<0.05	5	4.20±1.15	5.80±1.04	5.33	<0.05
其他非发酵菌	56	4.10±0.85*	5.51±1.05*	61.00	<0.05	15	4.13±0.92	5.60±1.04	16.81	<0.05
F	—	11.59	9.34	—	—	—	2.19	1.90	—	—
P	—	<0.05	<0.05	—	—	—	>0.05	>0.05	—	—

*:与大于或等于72 h 菌龄的细菌比较;—:无数据。

3 讨 论

AST的试验方法目前有稀释法和扩散法。1988年Bi odisk(Sweden)公司推出了E Test药敏方法,已被世界同行公认为第二金标准的药敏方法,这种方法是药敏试验方法的一大变革,但这种方法仅仅是扩散法和稀释法两种方法结合的产物,对结果判读仍需通过肉眼观察抑菌圈直径来进行^[2]。稀释法准确,但K-B法也有较好的准确度,且操作简便,目前仍然是细菌室最常用的AST方法之一。

目前自动细菌鉴定仪在三级甲等医院已得到广泛应用,但是二级甲等医院及以下级别医院配置极少,K-B法仍然是这些医院细菌室的AST方法。自动细菌鉴定仪最快可在6~8 h 获得AST结果,但通常会超过该时间,K-B法则需要18~24 h 甚至更长时间,而快速地获得AST结果对临床抗感染治疗十分重要,尤其对多重感染和重症感染患者,甚至对挽救感染性疾病患者的生命具有关键作用,如果能够创建一种快速K-B法,无疑对AST意义重大。

本研究建立的快速K-B法对6种细菌(菌龄小于或等于48 h,菌龄大于或等于72 h)抑菌环直径平均检出时间明显早于K-B法,差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明快速K-B法获得AST结果的时间快于K-B法,两者均快于自动细菌鉴定

2.2 两种菌龄的细菌比较 两种方法对大于或等于72 h 菌龄的6种细菌抑菌环直径平均检出时间均大于菌龄小于或等于48 h 的细菌,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.3 不同菌种比较 同种方法对6种小于或等于48 h 菌龄的不同细菌抑菌环直径平均检出时间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),同种方法对6种大于或等于72 h 菌龄的不同细菌抑菌环直径平均检出时间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.4 两种方法与标准K-B法的符合率比较 与标准K-B法抑菌环直径的符合率,≤48 h 菌龄的快速K-B法,金黄色葡萄球菌观测时间2 h 为90.91%,其他葡萄球菌观测时间2 h 为88.89%,2.5 h 为95.00%,大肠埃希菌观测时间2.5 h 为94.74%,肠杆菌科其他细菌观测时间2.5 h 为96.77%,铜绿假单胞菌观测时间4 h 为75.00%,6种细菌其他观测时间均为100.00%。≥72 h 菌龄的快速K-B法,6种细菌所有观测时间均为100.00%。≤48 h 和大于或等于72 h 菌龄的K-B法与标准K-B法抑菌环直径符合率,6种细菌各观测时间均为100.00%。

仪和标准K-B法。

两种方法对大于或等于72 h 菌龄的6种细菌抑菌环直径平均检出时间均大于菌龄小于或等于48 h 的细菌。这可能是菌龄越大细菌生长越慢所致,抑菌环的形成快慢与菌龄呈反比,与细菌生长速度呈正比。这提示用于AST的菌龄应以小于或等于48 h 为宜。

6种小于或等于48 h 菌龄的细菌抑菌环直径平均检出时间,在两种方法中比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。菌种的不同,因为生长速度不同,抑菌环直径平均检出时间也不同,提示抑菌环直径获得时间的快慢由细菌生长速度决定。6种大于或等于72 h 菌龄的细菌抑菌环直径平均检出时间,在两种方法中比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。这可能是因为菌龄老化,各种细菌生长均变缓慢,其生长旺盛期接近所致。

本研究进一步探索发现,快速K-B法与标准K-B法的抑菌环直径高度符合,判断结果也高度一致,结果可靠。≤48 h 和大于或等于72 h 菌龄的K-B法与标准K-B法抑菌环直径符合率,6种细菌各观测时间均为100.00%,表明K-B法与标准K-B法的抑菌环直径完全符合,判断结果也完全一致。提示标准K-B法进行AST时,无需等待18~24 h 观测抑菌环直径,只要肉眼可见抑菌环,就可观测其直径而尽早获得AST结果。

有文献报道了“快速抗菌药物敏感试验方法的建立”，该方法通过测定 6 h 时水解酪蛋白(M-H)液体培养基中蛋白质水平变化得到 AST 结果^[3]，虽然快速(6 h 获得 AST 结果)，但试验方法操作繁琐。也有文献报道了“用显色半固体进行快速细菌药敏试验的方法”，结果显示，氯化三苯甲基四氮唑(TTC)显色半固体琼脂法与 K-B 法同时测定细菌药物敏感度的比较，两种药敏方法敏感度完全相同或基本相同的合计有 509 例，占 96.4%，标准菌株用 TTC 显色半固体琼脂法和 K-B 法进行药敏试验的结果比较，两者药敏抑菌环直径毫米数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)，同时结果显示在 3 h 内有 96.8% 的菌株可得出 AST 结果，5 h 100.0% 的菌株可得出 AST 结果，但该试验方法操作也较繁琐^[4]。另有文献报道了“一种新的细菌药敏试验方法的探讨”^[5]，该方法与文献[4]报道的方法基本一致，结果也近似。文献[6]报道了一种改进的快速 K-B 圆盘敏感度测试法，该方法使用四唑染料的衍生物来增强细菌生长区和抑制区之间的抑菌圈轮廓，6~7 h 可获得 AST 结果，该方法简单，但其获得 AST 结果的时间长于本研究的快速 K-B 法。K-B 法 AST 除了可用于细菌外，还可用于酵母菌^[7]、真菌^[5]，也可用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检测^[8]。

细菌的耐药性日趋严重，已经成为医学界的重大难题，加强细菌耐药性的监测已经迫在眉睫。相关文献报道，金黄色葡萄球菌耐药率最高的前 4 位抗菌药物为青霉素 G(87.32%)、红霉素(87.32%)、苯唑西林(80.28%)、阿奇霉素(76.06%)，都大于 76%^[9]。大量文献报道金黄色葡萄球菌有很高的耐药率^[10-11]。相关研究显示，多种细菌有很广的耐药谱和很高的耐药率^[12]。这些应引起医学界的高度重视。

综上所述，快速 K-B 法快速而准确，获得 AST 结果的时间，快速 K-B 法比细菌自动鉴定仪快数小时，比标准 K-B 法快许多，K-B 法虽然较快速 K-B 法慢，但也比细菌自动鉴定仪快 1 h 以上，比标准 K-B 法快许多。标准 K-B 法进行 AST，无需等待 18~24 h 观测抑菌环直径获得 AST 结果，只要肉眼可见

(上接第 164 页)

参考文献

- [1] 张晓东, 脱朝伟, 宋芳吉, 等. 二期梅毒皮肤组织超微结构的研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2000, 14(3): 162-163.
- [2] Salazar JC, Cruz AR, Pope CD, et al. *Treponema pallidum* elicits innate and adaptive cellular immune responses in skin and blood during secondary syphilis: a flow-cytometric analysis[J]. J Infect Dis, 2007, 195(6): 879-887.
- [3] 邹循辉, 樊翌明, 吴志华. 二期梅毒患者细胞免疫水平及与梅毒发病的相关性[J]. 中国热带医学, 2008, 8(3): 393-394.
- [4] 黄小雄, 邹循辉, 樊翌明, 等. 二期梅毒患者外周血 Th1/Th2 及 Tc1/Tc2 的研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2006, 20(8): 469-470.
- [5] Fitzgerald TJ. The Th1/Th2-like switch in syphilitic infection: is it detrimental? [J]. Infect Immun, 1992, 60(9): 3475-3479.
- [6] Leader BT, Godornes C, Vanvoornis WC. CD4(+) lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis[J]. Infect Immun, 2007, 75(6): 3021-3026.

抑菌环，即可测试其直径。

参考文献

- [1] 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: 890-923.
- [2] Luber P, Bartelt E, Genschow E, et al. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1062-1068.
- [3] 李琳, 田青友, 曹蕾. 快速抗生素敏感试验方法的建立[J]. 华北煤炭医学院学报, 2005, 7(3): 280-281.
- [4] 李先斌, 莫丽亚, 赵蕊, 等. 用显色半固体进行快速细菌药敏试验的方法[J]. 实用预防医学, 2006, 13(2): 443-444.
- [5] 李慧. 一种新的细菌药敏试验方法的探讨[J]. 医药世界, 2006, 8(9): 63-64.
- [6] Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW Jr. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1973, 3(3): 418-424.
- [7] 崔健丽, 张辉, 李春霞, 等. 改良纸片扩散法检测 172 株酵母菌对酮康唑的敏感性[J]. 中国抗感染化治疗杂志, 2005, 5(4): 235-236.
- [8] 周美容, 龙伟清, 凌寿坚. 两种检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 K-B 法应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1090-1091.
- [9] 王恒秋, 张广清. 上呼吸道感染儿童金黄色葡萄球菌感染率和药物敏感试验[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(12): 1090-1091.
- [10] 蒋蓉芳, 周黎. 金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(24): 1501-1502.
- [11] 陈月燕, 席云, 肖刚, 等. 葡萄球菌医院感染及耐药谱分析[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(9): 500-503.
- [12] 韩兰芳, 方建平. 化脓性中耳炎的病原菌及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(6): 551-553.

(收稿日期: 2014-11-30)

- [7] Arroll TW, Centurion-Lara A, Lukehart SA, et al. T-cell responses to *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* antigens during the course of experimental syphilis infection[J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4757-4763.
- [8] Wicher V, Zhao J, Dilworth R, et al. Immune abnormalities in Guinea pigs with asymptomatic congenital syphilis[J]. Pediatr Res, 1997, 42(6): 794-798.
- [9] van Voorhis WC, Barrett LK, Koelle DM, et al. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines[J]. J Infect Dis, 1996, 173(2): 491-495.
- [10] 吴志华. 梅毒的病因与发病机理[M]. 2 版. 广州: 广东人民出版社, 2002: 71-84.
- [11] Podwinska J, Zaba R, Chomik M, et al. The ability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of syphilitic patients to produce IL-2[J]. FEMS Immunol Med Mic, 1995, 12(1): 17-27.
- [12] 梁平, 陈宏, 何晓丹, 等. 流式细胞术分析一期梅毒外周血 T 淋巴细胞亚群[J]. 中国医疗前沿, 2013, 8(9): 8-9.

(收稿日期: 2014-09-08)