

• 经验交流 •

婴幼儿无乳链球菌的感染分布及药物敏感性分析*

钟华敏,关小珊,谢永强,黄莲芬,黄钰君,刘海英
(广州市妇女儿童医疗中心检验科,广东广州 510120)

摘要:**目的** 了解广州地区婴幼儿无乳链球菌(GBS)的感染分布及其耐药情况,为临床预防感染及合理使用抗菌药物提供依据。**方法** 按照《临床检验操作规程》对该院 2011 年 1 月至 2014 年 5 月 3 岁以下的婴幼儿临床送检标本进行分离和鉴定,对所分离的 GBS 以纸片扩散(K-B)法进行药敏试验并分析耐药情况,同时用双纸片法(D 试验)检测其大环内酯类耐药表型。用 Whonet5.6 进行数据分析。**结果** 共检出 93 株 GBS,其中分离自 7 d 以内的新生儿 42 株,分离自 7 d 至小于 3 月的婴儿 44 株,分离自 3 月至 3 岁的幼儿 7 株,按照标本来源分布不同,其中 50 株来源于血标本,14 株来源于脑脊液,11 株来源于新生儿胃液,6 株来源于呼吸道标本,其余分别来自中段尿(6 株)、尿道外阴分泌物(4 株)及伤口创面分泌物(2 株)。对检出的 93 株 GBS 药敏结果显示,对青霉素、头孢曲松、万古霉素、利奈唑胺均敏感,对氧氟沙星中度敏感,对红霉素、克林霉素、四环素、复方磺胺甲噁唑的耐药率分别为 82.8%、74.2%、55.9%、44.1%。D 试验阳性率(即诱导型耐药)为 2.6%。**结论** 临床医生重视婴幼儿 GBS 的检测可有效预防其危害性,实验室准确报告其药敏结果,对指导临床医师合理选择使用抗菌药物提供了重要的理论依据。

关键词: 婴幼儿; 无乳链球菌; 感染; 药敏
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.061 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2015)19-2907-03

无乳链球菌(GBS)属于链球菌属 B 血清群,为一种常见的有荚膜革兰阳性菌,能够引起新生儿细菌性脑膜炎、败血症、肺炎及妇女妊娠期感染病症,具有发病率高和病死率高的特点。据统计,GBS 感染是美国新生儿感染疾病中居第 1 位的死因,20 世纪 70 年代病死率曾高达 50%。目前,国内对 GBS 的报道集中在成人感染 GBS 的耐药性分析和孕妇带菌筛查方面,而对婴幼儿 GBS 感染的研究极少,新生儿 GBS 感染的临床特征研究也是近年来才有少量的报道。为了解本院检出的 GBS 对婴幼儿的感染及治疗情况,本研究分析了本院 2011 年 1 月至 2014 年 5 月 3 岁以下的婴幼儿临床分离的 GBS 菌株分布情况及抗菌药物的敏感性,希望对临床治疗及预防用药起到指导作用。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2011 年 1 月至 2014 年 5 月本院住院和门诊 3 岁以下的患儿做细菌培养及鉴定的各种临床标本,按照《全国临床检验操作规程(第 2 版)》进行病原菌的分离和鉴定。

1.2 菌株鉴定与药敏试验 患儿血标本及脑脊液等无菌体液标本接种于 BACTECTM FX 全自动血培养仪配套的 BD 树脂培养瓶进行增菌培养,如有细菌生长则进行分纯培养;其余标本划线接种于血琼脂平板及万古巧克力培养基(迪景),置 CO₂ 孵育箱,37℃培养 18~24 h,挑取可疑菌落做 CAMP 试验,必要时 Oxoid 的链球菌血清鉴定试剂盒做确证试验。鉴定为 GBS 后,采用含 5%羊血的 Mueller-Hinton 琼脂(迪景)进行纸片扩散(K-B)法药敏试验。药敏纸片包括青霉素、头孢曲松、万古霉素、利奈唑胺、氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、四环素、红霉素、克林霉素等抗菌药物,均为英国 Oxoid 公司产品。药敏判读、解释参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)2014 年版的 M100-S24 的标准^[1]。

1.3 GBS 大环内酯类耐药表型测定 采用双纸片法(D 试验)检测对任何一种大环内酯类耐药的 GBS 的耐药表型,红霉素纸片(15 μg)和克林霉素纸片(2 μg)间隔 15~20 mm 贴于均匀涂布 1.5×10⁸ CFU/mL 菌液的 5%羊血水解酪蛋白(MH)琼

脂平板上,35℃孵育 18~24 h。若细菌对红霉素和克林霉素均耐药,则为组成型耐药(cMLS 型);若对红霉素耐药,靠近红霉素纸片处克林霉素抑菌圈减少(截平),报告 D 试验(克林霉素诱导试验)阳性,则为诱导型耐药(iMLS 型);若对红霉素耐药而克林霉素敏感,靠近红霉素处克林霉素抑菌圈无减少,则为主动外排所致耐药(即 M 型耐药)。

1.4 质量控制 全程采用大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 及铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为药敏试验质量控制菌株,由卫生部药品和生物制品检定所提供。

1.5 统计学处理 采用世界卫生组织细菌耐药监测中心推行的 Whonet5.6 软件进行数据处理及统计学分析。

2 结果

2.1 GBS 检出情况 共检出 93 株 GBS(同一患者同一部位重复分离的菌株按一株计算),其中分离自小于 7 d 的新生儿 42 株,占 45%(42/93),分离自 7 d 至小于 3 月的婴儿 44 株,占 47%(44/93),分离自 3 月至 3 岁的幼儿 7 株,占 7%(7/93)。93 株分离株中按照标本来源分布不同,其中 50 株来源于血液标本,14 株来源于脑脊液,11 株来源于新生儿胃液,6 株来源于呼吸道标本,6 株来源于中段尿,其他标本包括尿道外分泌物(4 株)及伤口创面分泌物(2 株),见表 1。

表 1 93 株 GBS 的检出情况[n(%)]			
标本种类	<7 d 婴儿	7 d 至小于 3 月婴儿	3 月至 3 岁幼儿
血液	31(33.3)	19(20.4)	0(0.0)
脑脊液	4(4.3)	10(10.8)	0(0.0)
胃液	7(7.5)	4(4.3)	0(0.0)
呼吸道	0(0.0)	4(4.3)	2(2.1)
中段尿	0(0.0)	5(5.4)	1(1.1)
其他	0(0.0)	2(2.2)	4(4.3)
合计	42(45.2)	44(47.3)	7(7.5)

* 基金项目:广州市医药卫生科技一般引导项目(201102A213023)。

2.2 药敏试验结果 93 株 GBS 全部进行链球菌药物敏感试验,对 9 种抗菌药物进行耐药性分析显示,未发现青霉素、头孢曲松、万古霉素和利奈唑胺的耐药株,对左氧氟沙星的耐药率为 10.8%,而对红霉素、克林霉素、四环素和复方磺胺甲噁唑的耐药率相对较高,分别为 82.8%、74.2%、55.9%和 44.1%。见表 2。

表 2 GBS 对 9 种抗菌药物的敏感性[n(%)]			
抗菌药物	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
青霉素	93(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢曲松	93(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
万古霉素	93(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
利奈唑胺	93(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
左氧氟沙星	80(86.0)	3(3.2)	10(10.8)
红霉素	10(10.8)	6(6.5)	77(82.8)
克林霉素	20(21.5)	4(4.3)	69(74.2)
四环素	41(44.1)	0(0.0)	52(55.9)
复方磺胺甲噁唑	50(53.8)	2(2.2)	41(44.1)

2.3 大环内酯类耐药表型 93 株 GBS 中 77 株表现为对大环内酯类抗菌药物中的至少一种耐药,采用 D 试验检测其耐药表型显示 69 株表现为 cMLS 型耐药,占 89.6%,仅有 2 株为 iMLS 型耐药,占 2.6%,6 株为主动外排型耐药(M 型耐药),占 7.8%。

3 讨 论

GBS 又称 B 群链球菌,属 β 溶血性链球菌,约 1/5 的健康成年女性生殖道携带 GBS,其携带者可能无症状。但该菌会作为条件致病菌感染孕产妇,主要通过产道上行扩散感染子宫和胎膜,使带菌孕妇易发生早产、流产,胎儿发育不良、死胎、胎膜早破等,也可引起绒毛羊膜炎、败血症、泌尿系感染等。特别是母体围产期 GBS 定植是新生儿疾病的主要危险因素,分娩时 GBS 易感染新生儿,引起新生儿肺炎、败血症和脑膜炎等常见疾病。且新生儿的 GBS 感染临床进展迅速,具有发病迅速、病死率高的特点,是新生儿的主要死亡原因,已引起广大学者的关注。有研究表明,产前 GBS 定植阳性的孕妇,其婴儿出现早发型 GBS 疾病的概率是阴性妇女的 25 倍。因此采取积极有效的预防和治疗措施对降低围生期感染具有重要意义。

目前多根据发病时间、致病菌型及临床特征,将新生儿 GBS 感染分为早发型感染和晚发型感染 2 种类型。早发型感染多发生在出生后 7 d 内(不含 7 d),占新生儿 GBS 感染的 75%,出生后 6 h 发病者占 50%。母婴垂直传播是其主要传播途径。主要临床表现为肺炎和败血症,可合并脑膜炎。如未得到及时有效的治疗,可导致严重的并发症及后遗症,例如呼吸循环衰竭、代谢紊乱、神经系统后遗症等,其中前两者是 GBS 感染死亡的主要原因。晚发型感染多见于出生后 7 d 至小于 3 个月的足月儿。主要表现为脑膜炎,常呈隐匿型发病。临床表现有发热、昏睡、颅内高压等,如伴发败血症则预后较差^[2]。本研究中检出的 93 株 GBS,其中有 71 株均来自患儿的血液、脑脊液和胃液等无菌体液标本,而成人 GBS 多为泌尿生殖道感染,其感染方式有很大区别,其中有 42 例为早发型感染病例,可看出绝大多数的新生儿 GBS 感染方式与母婴垂直传播关系密切,其次为院内感染。

近 20 年来,西方国家对 GBS 进行了大量研究,多数学者认为 GBS 是围产期感染的首要病原菌之一。在美国 GBS 感染是导致新生儿发病和致死的主要细菌感染。国内对 GBS 的报道集中在成人泌尿生殖道感染及围产期带菌筛查方面,对新生儿 GBS 感染的报道极少,新生儿 GBS 感染的临床特征研究也是近年来才有少量的报道,特别是婴幼儿的临床感染病例,报道的感染率也明显低于美国等西方国家,然而这并不能说明国内感染率低,这与临床重视程度及实验室检测水平有很大关系。而本院近几年也检测出多例 GBS 感染的血培养阳性新生儿,且检出率呈逐年上升趋势。有文献报道,GBS 已成为国内新生儿感染性疾病的主要致病菌^[3],但引起的后果并不如西方国家严重,病死率低于国外报道^[4],预后较好,可能与如下方面有关:(1)国内新生儿可从母体获得较高滴度的 GBS 抗体,大多数可达保护水平;(2)国内 GBS 的血清基因等分型可能与国外存在差异,毒力不尽相同;(3)个体间防御力存在差异;(4)国内抗菌药物使用范围较大,可能使 GBS 感染程度有所下降。

据文献报道,GBS 一般耐药现象不严重,美国临床和实验室标准化协会(CLSI)推荐临床可不需进行药敏试验,经验性用青霉素类抗菌药物治疗^[5]。但对于婴幼儿,特别是新生儿这一特殊群体的用药情况,还是应当进行综合分析,谨慎用药。本研究对 GBS 的药敏结果进行了分析,为使临床更安全有效地治疗和预防该菌的感染提供依据。

链球菌对大环内酯类耐药的机制包括抗菌靶位改变(甲基化或变异)、主动外排 2 种^[6];编码抗菌靶位甲基化的基因为 erm,表现为对大环内酯类、林克酰胺类、链阳菌素高水平耐药,即 MLS 型耐药;编码主动外排的基因 mefA,表现为对 14、15 元环大环内酯类低度耐药,但对 16 元环大环内酯类、林克酰胺类及链阳菌素无作用,为 M 型耐药。MLS 型耐药可分为 iMLS 和 cMLS 耐药。本研究发现红霉素的耐药率高达 82.8%,克林霉素耐药率为 74.2%,耐药表型研究进一步证明高度耐药的 cMLS 型为本地区 GBS 的主要表型,所占比例达 89.6%,远远高于欧美及周边国家地区,iMLS 型仅占 2.6%,这可能与菌株数量较少有关,至于地区间是否存在 cMLS 或 iMLS 表型差异,有待进一步研究^[7],这种高水平的耐药可能与国内长期不合理用药或重复选择 MLS B 类抗菌药物有关。因此,用大环内酯类药物治疗链球菌等革兰阳性菌感染很难获得满意疗效,临床医师在选用药物时应加以重视。而为了避免临床不合理使用克林霉素,临床实验室对红霉素耐药而克林霉素敏感的药敏试验结果应常规进行 D 试验。而 GBS 对青霉素类、头孢菌素类、糖肽类等抗菌药物均高度敏感,未出现耐药菌株,这与 CLSI 的注释相符^[1],青霉素和其他 β -内酰胺类药物到目前为止 β -溶血链球菌非敏感株尚未见报道。但是与国内某些报道青霉素中介占 13.9%不符合^[8]。在临床用药中,当青霉素和头孢菌素类均敏感时,一般选择前者。而氟喹诺酮类药物对新生儿关节软骨等有损伤,万古霉素具有肾毒性,均不适用于新生儿 GBS 感染的治疗。而 55.9%的菌株对四环素耐药也低于国内报道的 86.9%的耐药率^[9],这可能与本院儿童较少使用此药有关,因此类药物可能影响幼儿牙齿、骨骼的发育,故临床医生使用时应谨慎。因此,笔者认为作为治疗孕妇及婴幼儿 GBS 的感染,除过敏患者外,青霉素应作为首选用药;对低危险性青霉素过敏者可选用头孢唑林等一、二代头孢类药物;对青霉素过敏的高危险者可根据实验室药敏结果选用

红霉素、克林霉素或磺胺类药物。分娩时可用青霉素类或头孢类药物对高危因素的孕妇进行围产期预防性治疗,是防止新生儿发生 GBS 感染较有效的预防措施。

综上所述,笔者认为实验室常规准确报告 GBS 药敏结果对指导临床医师合理选择抗菌药物治疗依然具有重要的临床意义,加强抗菌药物对 GBS 菌株连续药物敏感性监测,了解耐药变迁情况对临床具有重要指导意义。

参考文献

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA, USA; CLSI, 2014.

[2] American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Committee on Fetus, Newborn. Revised guidelines for prevention of early-onset group B streptococcal (GBS) infection[J]. Pediatrics, 1997, 99(3): 489-496.

[3] Yossuck P, Preedisripipat K. Neonatal group B streptococcal infection: incidence and clinical manifestation in Siriraj Hospital[J]. J Med Assoc Thai, 2002, 85(2): 479-487.

• 经验交流 •

[4] Creti R, Berardi A, Baldassarri L, et al. Characteristics of neonatal GBS disease during a multicentre study (2007-2010) and in the year 2012[J]. Ann Ist Super Sanita, 2013, 49(4): 370-375.

[5] Matthew AW. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: sixteenth information supplement[M]. New York: CLSI, 2006: 66-68.

[6] Bingen E, Leclercq R, Fitoussi F, et al. Emergence of group A streptococcus strains with different mechanisms of macrolide resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(5): 1199-1203.

[7] 杨明, 杨永弘, Dmitriev A, 等. B 族链球菌的红霉素耐药基因研究[J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(8): 25-28.

[8] 赵金辉, 王晓岩, 刘晶. B 群无乳链球菌感染及药物敏感性分析[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(11): 1545-1546.

[9] 吴健宁, 林润华, 林健. 孕妇泌尿生殖道 112 例无乳链球菌感染的耐药性分析[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(3): 88-89.

(收稿日期: 2015-07-15)

库尔特 5diff-OV 血细胞分析仪对 4 项血细胞指标检测结果的不确定度分析

陈红波^{1,2}, 明平红³

(1. 清华大学生命科学学院, 北京 100084; 2. 清华大学深圳研究生院基因与抗体治疗技术重点实验室, 广东深圳 518055; 3. 暨南大学附属第三医院珠海市人民医院检验科, 广东珠海 519000)

摘要:目的 对库尔特 5diff-OV 血细胞分析仪检测红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、白细胞(WBC)、血小板(PLT)的不确定度进行分析, 探讨其价值与意义。**方法** 针对 5diff-OV 血细胞分析仪所检测的 RBC、Hb、WBC、PLT 指标, 通过批内重复性、批间重复性检测结果以及室间质评结果等计算各自的批内变异(CV_w)、批间变异(CV_b)和方法偏移(CV_{bias})及其扩展不确定度(U)。**结果** 5diff-OV 检测 RBC、Hb、WBC 时其精密度较高, 检测质量可靠, 但是检测 PLT 质量较差, 不确定度较大。**结论** 评估 5diff-OV 血细胞分析仪对 RBC、Hb、WBC、PLT 测量结果的不确定度的重要前提就是必须具备有效的控制措施及质量保证体系, 以确保结果的稳定性及可靠性。

关键词: 库尔特 5diff-OV 血细胞分析仪; 不确定度; 血细胞; 变异系数

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 19. 062

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2015)19-2909-02

不确定度是由于测量误差的存在, 对被测量值不能肯定的程度。它是反映测量结果质量的指标, 国际上常被用作衡量测量结果价值的度量尺度。不确定度值愈小, 测量结果与被测量的真值愈接近, 使用价值越高; 反之使用价值就越低。因此, 测量结果是否可靠、可用, 在很大程度上取决于测量不确定度的大小, 在报告测量结果的同时必须给出相应的不确定度, 以便于评定其测量结果的可靠性及测量结果之间的可比性。为了探讨库尔特 5diff-OV 血细胞分析仪的检测质量, 本研究参考相关文献的测量不确定度的要求及方法^[1-3], 对暨南大学附属第三医院检验科 5diff-OV 血细胞分析仪所检测的红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、白细胞(WBC)、血小板(PLT)进行不确定度的评估, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 5diff-OV 全自动血细胞分析仪及配套试剂、校准品由贝克曼-库尔特厂家校准并出具校准报告。美国 Bio-Rad 公司生产的高、中、低 3 个水平全血质控品(批号分别为 76943、76942、76941), 2014 年原卫生部全血室间质控品。

1.2 检测方法 实验前再次对 5diff-OV 全自动血细胞分析仪进行常规维护与保养, 然后按常规方法对仪器进行校准及质量控制。将 Bio-Rad 3 个水平质控品各自重复检测 20 次, 2 h 内完成。检测指标包括 WBC、RBC、Hb、PLT 4 项指标。

1.3 统计学处理 采用双侧检验法($P=95\%$), 若有离群值则剔除^[4], 然后分别计算其均值($\bar{x}$)、标准偏差(s)、批内变异系数(CV_w); 收集 2014 年 5 月 1 日至 5 月 31 日每日质控数据并计算批间变异系数(CV_b); 收集 2014 年卫生部室间质评提供的全血质控品的靶值和本室检测值, 计算 3 次结果的百分偏差(d)、其均值($\bar{d}$)及标准差(s), 根据公式 $CV_{bias} = \sqrt{(\bar{d}/2)^2 + (s)^2}$ 计算各项的偏移变异。若置信水平为 95%, $k=2$ 时, 根据公式 $U = \sqrt{CV_w^2 + CV_b^2 + CV_{bias}^2}$ 计算各项的扩展测量不确定度。

2 结果

RBC、Hb、WBC 3 个项目不同水平的 CV_w 、 CV_b 、 CV_{bias} 、 U 均较小, 但是仪器检测 PLT 质量较差, 低、中值的 CV_w 均小于 7, 批内精密度尚可, 但高值 CV_w 大于 7, 见表 1。