论著·基础研究

K-B 法对自动化检测流感嗜血杆菌对氨苄西林药敏误差的校正作用*

王战豪[1]，王晓蕾[2]，胡　俊[2]，杨莉莉[1]，谢　江[2]，刘华伟[1]，曹　敏[2]，郭元彪[2△]
（成都市第三人民医院/西南交通大学附属医院：1. 临床检验部；2. 实验医学研究部，成都 610000）

摘　要：目的　以肉汤稀释法为参考方法，观察纸片扩散（K-B）法对自动化微量肉汤稀释（ATB）法产生误差的校正作用。**方法**　收集 228 株流感嗜血杆菌（HI），采用肉汤稀释法、K-B 法、ATB 法同时检测 HI 对氨苄西林的敏感性，观察 3 种实验方法药敏结果的一致性，分析 K-B 法对 ATB 法产生误差的校正作用。**结果**　K-B 法和 ATB 法与肉汤稀释法的一致率分别为 77.19%、70.18%，二者联合可将一致率提高至 86.0%，明显高于 ATB 法（$\chi^2=16.600$，$P=0.000$）；ATB 法的重大误差率（42.0%）明显高于 K-B 法（10.0%，$\chi^2=13.306$，$P=0.001$），K-B 法与 ATB 法的次要误差率和极重大误差率差异均无统计学意义（$\chi^2=1.208$，$P=0.272$；$\chi^2=1.182$，$P=0.227$）；K-B 法可校正 ATB 法 76.19% 的重大误差和 53.57%的极重大误差，K-B 法对 ATB 法次要误差的校正能力较弱。**结论**　K-B 法可合理校正 ATB 法产生的药敏误差，ATB 法判定为氨苄西林耐药且 β-内酰胺酶阴性菌株的菌株，建议采用 K-B 法进行校正，而 ATB 法判定为氨苄西林敏感且 β-内酰胺酶阳性的菌株，则务必采用 K-B 法进行校正。

关键词：流感嗜血杆菌；　氨苄西林；　β-内酰胺酶；　纸片扩散法；　药物敏感试验
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.001　　**中图法分类号：**R446.5/R378.4
文章编号：1673-4130(2018)04-0385-04　　**文献标识码：**A

Correction of Kirby-Bauer disc diffusion assay to the errors of automated ampicillin susceptibility test for Hemophilus influenzae*

WANG Zhanhao[1], *WANG Xiaolei*[2], *HU Jun*[2], *YANG Lili*[1], *XIE Jiang*[2], *LIU Huawei*[1], *CAO Min*[1], *GUO Yuanbiao*[2△]
(1. *Department of Laboratory Medicine*; 2. *Medical Research Center, the Third People's Hospital of Chengdu/Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan* 610000, *China*)

Abstract: Objective　Broth dilution method was used as a reference method to observe the capability of Kirby-Bauer disc diffusion assay (K-B) for correcting automated ampicillin susceptibility detection of Hemophilus influenzae (HI). **Methods**　A total of 228 HI strains isolated were collected, broth dilution assay, K-B and automated microdilution broth test (ATB) were used to determine the susceptibility of HI to ampicillin. Analyze the essential agreements of the three methods and the correction of K-B to the errors of ATB. **Results**　The essential agreement of K-B or ATB with broth dilution method were 77.19%, 70.18% respectively, combination of K-B and ATB could make the essential agreement increase up to 86.0%, which was significantly higher than ATB ($\chi^2=16.600$, $P=0.000$). Major error of ATB (42.0%) was higher than that of K-B (10.0%) ($\chi^2=13.306$, $P=0.001$), but very major error and minor error showed no significant difference between the two methods ($\chi^2=1.208$, $P=0.272$; $\chi^2=1.182$, $P=0.227$), meanwhile, 76.19% of major error of ATB could be corrected by K-B. For the very major error of ATB, 53.57% could be corrected by K-B. However, the corrective capability of K-B to minor error of ATB was relative low. **Conclusion**　K-B test could correct some errors generated by ATB. For the β-lactamase negative strains which were judged as ampicillin resistance by ATB, K-B test should be used to correct the errors by ATB. Moreover, it is necessary to apply K-B to confirm ampicillin sensitivity of the β-lactamase positive strains which were judged as ampicillin susceptible by ATB.

Key words: Haemophilus influenzae;　ampicillin;　β-lactate;　Kirby-Bauer disc diffusion assay;　drug sensitivity test

---

*　**基金项目：**四川省科技厅应用基础项目（2013JY0121）；国家自然科学基金项目（31500077）。
作者简介：王战豪，男，技师，主要从事临床检验方面的研究。　△　**通信作者**，E-mail：guo.ybiao@yahoo.com。
本文引用格式：王战豪，王晓蕾，胡俊，等. K-B 法对自动化检测流感嗜血杆菌对氨苄西林药敏误差的校正作用[J]. 国际检验医学杂志，2018，39(4)：385-388.

16%～23%的社区性肺炎来自流感嗜血杆菌(HI)的感染，而对氨苄西林耐药的 HI 菌株也在逐年增加[1-4]。准确测定 HI 对临床常用抗菌药物氨苄西林的敏感性，对指导临床用药、控制耐药菌株增加具有非常重要的意义。在对 HI 的药敏试验中，虽然，E-test 法、纸片扩散(K-B)法与肉汤稀释法有着较好的一致性，也是临床常用的方法，但是，由于成本较高、操作步骤相对繁琐、不能全自动化等原因，其临床应用具有局限性，正逐渐被自动化微量肉汤稀释(ATB)法所替代[5-6]。目前，基于微量肉汤稀释法的 ATB 法被更为广泛地应用于 HI 的药敏试验中，尤其在基层医院[7-8]。但是，大部分 ATB 法检测试剂盒提供的药物浓度折点很少，同时，有的药物折点与美国临床和实验室标准协会(CLSI)M100-S26 文件推荐的抗菌药物折点不一致[9]。所以 ATB 法的检测结果可能存在误差，该如何校正呢？K-B 法在临床中的应用基础相对广泛，技术要求相对简单，因此，本研究拟以肉汤稀释法为参考方法，探讨在 HI 的氨苄西林药敏试验中，K-B 法对 ATB 的校正能力，以期获得切实有效的校正方法，提高 ATB 法检测的准确性。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　HI 来源于 2013－2014 年成都市第三人民医院、成都市妇女儿童中心医院、德阳市中心医院、都江堰市医疗中心 4 家医院。所有菌株的接种和培养严格按照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》[10]进行。标本采用选择性培养基，即血平板和嗜血杆菌巧克力平板进行初步的筛选培养。挑取典型的 HI 菌落进一步分离培养，并取菌落涂片，进行革兰染色后，再进行初步鉴定。之后，再次用卫星试验、Ⅴ因子、Ⅹ因子及Ⅴ＋Ⅹ因子纸片鉴定分离的 HI。按 ATB E2pression 鉴定/药敏系统的操作规程及所述方法进行最终的鉴定[11-12]。

1.2　试剂　血平板、嗜血杆菌巧克力平板和琼脂平板购自重庆庞通生物技术有限公司；Ⅴ因子、Ⅹ因子、Ⅴ＋Ⅹ因子纸片、头孢硝基酚纸片、氨苄西林药敏纸片购自英国 Oxoid 公司；ATB 嗜血杆菌药敏试验板条购自法国 BioMérieux 公司；NH 鉴定条购自赛默飞世尔生物有限公司。

1.3　肉汤稀释法药敏试验

1.3.1　最小抑菌浓度(MIC)孔板的制备　将 100 μLHTM 标准肉汤加入无菌 96 孔聚苯乙烯板每排的第 1～10 孔中。然后，依次将 32.00、16.00、8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25 μg/mL 的药液加入 96 孔板的第 1～8 孔，每孔加 100.00 μL 药液；第 9 孔为阴性对照；第 10 孔为阳性对照。冰冻干燥后密封，－20 ℃以下保存备用。确保整个试验过程无菌操作。

1.3.2　菌悬液的制备及菌落计数　挑取处于对数生长期的新鲜单克隆 HI 菌落于 0.9%无菌生理盐水中，使其乳化形成约 5×10^6 CFU/mL 的菌悬液。将准备好的 5×10^6 CFU/mL 的菌悬液，倍比稀释至终浓度为 5×10^2 CFU/mL；取 100 μL 稀释后的菌悬液至无菌空平皿中，最后，再向空平皿中加入 16～20 mL 46 ℃左右的琼脂，摇匀后制成平板。将平板置于 37 ℃，5% CO_2 孵箱孵育 24～48 h。最后做菌落计数，根据 CLSI M07-A8 文件确认 MIC 孔板内接种的菌量在规定范围内。

1.3.3　加样　5×10^6 CFU/mL 的菌悬液制备后 15 min 内，用连续加样单枪向制备好的 MIC 孔板中加入 10 μL 菌悬液，每孔含菌量约为 5×10^4 CFU。将孔板置于 37 ℃，5% CO_2 孵箱孵育 18～24 h。根据 CLSI 2016 年标准[13]判读并记录药敏结果。

1.4　K-B 法药敏试验　挑选处于对数生长期的新鲜单克隆 HI 菌落，将 HI 溶于 0.9%无菌生理盐水中，用比浊仪将菌液调整至 0.5 个麦氏单位。用无菌棉签浸入调节好的 HI 悬液，将多余 HI 悬液在管壁上挤出，在琼脂平板上反复涂布 3 次，每次旋转平板 60°，最后沿平板周围涂两圈，保证涂布均匀。平板在室温下干燥 3～5 min 后，将氨苄西林药敏纸片贴在琼脂平板上，各纸片中心相距应大于 24 mm，纸片距平板内缘应大于 15 mm，一旦贴在某一位置，不再变动位置。15 min 后，将贴有纸片的琼脂平板置于 37 ℃，5% CO_2 孵箱孵育 18～24 h。用游标卡尺量取最小抑菌圈直径，根据 CLSI 2016 年标准判读并记录药敏结果。

1.5　ATB 法药敏试验　参照 ATBTM HAEMO 嗜血杆菌药敏试验板条的操作说明书对氨苄西林进行药敏试验，用 ATB 细菌鉴定和药敏仪读取结果。药敏结果判断依据 CLSI 2016 年标准[13]执行。具体操作步骤如下：挑选处于对数生长期的新鲜单克隆 HI 菌落，配制成 0.5 个麦氏单位的菌悬液，用微量移液器移 50 μL 菌悬液于标准液中，将含菌悬液的试管放至振荡仪器上振荡，使其充分混合均匀，用微量移液器将 135 μL 菌悬液分别加样于 ATB 药敏条空白对照孔及含抗菌药物药敏孔，将 ATB 药敏条放置于 37 ℃，5% CO_2 孵箱孵育 18～24 h，结合空白对照，根据加样孔中是否有细菌生长判断 HI 对其敏感性，若 HI 生长判读为耐药，无 HI 生长则判读为敏感。

1.6　药敏质控　依据 CLSI 2016 年标准，肉汤稀释法检测 HI(ATCC49247)对氨苄西林的 MIC 值为2～8 μg/mL；K-B 法检测大肠埃希菌(ATCC25922)对氨苄西林的最小抑菌圈直径为 15～22 mm；ATB 法检测标准 HI(ATCC49247)对氨苄西林的 MIC 值为2～8 μg/mL；每次实验质控菌株的最小抑菌圈直径或 MIC 值在以上范围内，才能记录实验结果。

1.7　药敏结果的一致性分析　本研究以肉汤稀释法为参考方法，分析 K-B 法和 ATB 法的药敏结果与肉汤稀释法的一致性。分析参数如下：一致率为 K-B 法或 ATB 法与肉汤稀释法所得敏感(S)、中介(I)、耐药(R)结果一致的例数除以总例数；极重大误差率为 K-B 法或 ATB 法结果为 S，而肉汤稀释法结果为 R 的例数除以肉汤稀释法结果为 R 的例数；重大误差率为 K-B 法或 ATB 法结果为 R，而肉汤稀释法为 S 的例数除以肉汤稀释法结果为 S 的例数；次要误差率为肉汤稀释法结果为 R 或 S 而 K-B 法或 ATB 法结果为 I 的例数，加上肉汤稀释法结果为 I 而 K-B 法或 ATB 法结果为 R 或 S 的例数除以总例数。

1.8　生物学分型及 β-内酰胺酶检测　挑选处于对数生长期的新鲜单克隆 HI 菌落，将 HI 溶于 0.9%无菌生理盐水中，用比浊仪将菌液调整至 3 个麦氏单位。加入 NH 鉴定条并放置普通孵箱 37 ℃孵育 4 h。通过显色反应，根据赛默飞世尔生物有限公司细菌鉴定软件判断结果。通过吲哚试验、尿素酶试验和鸟氨酸脱羧酶试验反应的不同，按文献[10]所述方法将 HI 分为 8 种(Ⅰ～Ⅷ)生物型。采用头孢硝基酚显色反应法检测 HI 的 β-内酰胺酶。将头孢硝基酚纸片用无菌水湿润，涂适量 HI 于湿润的纸片上。10 min 后观察纸片颜色，若纸片显示红色，β-内酰胺酶为阳性；若纸片不变色，β-内酰胺酶则为阴性。

1.9　统计学处理　采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析，计数资料进行配对 χ^2 检验，样本量小于 40 或有格子的期望频数小于 1 时，采用 *Fisher* 精确概率法。运用 *Kappa* 检验做方法的一致性分析，*Kappa*≥0.75 时，表明一致性好；0.75＞*Kappa*≥0.40 时，表明一致性一般；*Kappa*＜0.40 时，表明一致性较差。以线性回归检验肉汤稀释法 MIC 值与 K-B 法抑菌圈直径的相关性。

2　结　　果

2.1　ATB 法、K-B 法与肉汤稀释法药敏结果的一致性比较及误差分析　K-B 法和肉汤稀释法检测由同一组人完成，尽可能降低实验的系统误差。ATB 法实验虽由 4 家不同医院独立完成，但均采用统一的试剂和操作规程，经四格表 χ^2 检验显示，4 家医院 ATB 法实验结果与肉汤稀释法结果的一致率并无统计学意义(P＞0.05)，实验结果具有可比性。

肉汤稀释法、K-B 法、ATB 法检测 228 株 HI 对氨苄西林药物敏感性的结果见表 1。肉汤稀释法的 MIC 值与 K-B 法的最小抑菌圈直径显著相关(r＝－0.760)，见图 1；K-B 法与肉汤稀释法检测结果的一致性一般($Kappa$＝0.548)，一致率为 77.19%；ATB 法与肉汤稀释法检测结果的一致性较差($Kappa$＝0.317)，一致率为 70.18%。经配对 χ^2 检验，K-B 法与 ATB 法的一致率差异无统计学意义(χ^2＝2.895，P＝0.089)，但将两者联合可将检测的一致率提高至 86.0%，明显高于 ATB(χ^2＝16.600，P＝0.000)或 K-B 法(χ^2＝5.837，P＝0.016)。在结果误差方面，ATB 法的重大误差率(42.0%)明显高于 K-B 法(10.0%)(χ^2＝13.306，P＝0.000)；K-B 法与 ATB 法的次要误差和极重大误差率差异均无统计学意义(χ^2＝1.208，P＝0.272；χ^2＝1.182，P＝0.277)。见表 2。

2.2　K-B 法能对 ATB 法的重大误差和极重大误差结果进行校正　ATB 法有 76.19%的重大误差可被 K-B 法校正。被校正的菌株均为 β-内酰胺酶阴性(16/16)，明显高于未被校正(2/5)的菌株，差异有统计学意义(P＝0.008)。

ATB 法有 53.57%(15/28)的极重大误差可被 K-B 法校正。被校正的菌株中，β-内酰胺酶阳性菌株占 86.67%(13/15)，而未被校正的菌株均为 β-内酰胺酶阴性(13/13)，二者结果差异有统计学意义(P＝0.000)。将 β-内酰胺酶与生物学分型结合分析，β-内酰胺酶阳性的Ⅳ型菌株均可被校正(7/7)，明显高于未被校正的菌株(1/9)，二者结果差异有统计学意义(P＝0.001)。

2.3　K-B 法不能对 ATB 产生的次要误差结果进行校正　共有 19 株经肉汤稀释法测定为 I，其中 4 株的 ATB 结果可被 K-B 法校正(仅占21.05%)。在不能校正的菌株中，12 株被 K-B 法判定为 S，3 株为 R；而 ATB 法判定为 S 的则为 7 株，R 为 12 株。校正和未校正菌株间 β-内酰胺酶和生物学分型，差异无统计学意义(P＝0.53，P＝0.458)。

表 1　3 种实验方法检测 HI 对氨苄西林的药敏试验结果(n，n＝228)

方法	药敏结果		
	S	I	R
肉汤稀释法	50	19	159
K-B 法	77	15	136
ATB 法	64	0	164

注：CLSI 对氨苄西林的判读标准，MIC＜2 μg/mL 时判为 S；MIC 为 2～＜4 μg/mL 时判为 I；MIC ≥4 μg/mL 时判为 R

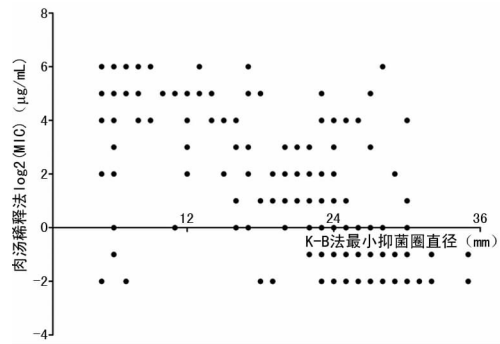

图 1　肉汤稀释法和 K-B 法对氨苄西林的药敏结果的线性相关性分析

表 2　3 种实验方法对氨苄西林药敏结果一致性的比较(n=228)

方法	肉汤稀释法(n)			结果解释[%(n/n)]			
	S	I	R	一致率	次要误差率	重大误差率	极重大误差率
ATB 法							
S	29	7	28	70.18(160/228)	8.33(19/228)	42.00(21/50)	17.61(28/159)
I	0	0	0				
R	21	12	131				
K-B 法							
S	44	12	21	77.19(176/228)	11.40(26/228)	10.00(5/50)	13.21(21/159)
I	1	4	10				
R	5	3	128				
χ^2				2.895	1.208	13.306	1.182
P				0.089	0.272	0.000	0.277

3　讨　　论

本研究结果显示，无论 K-B 法还是 ATB 法，分析 HI 对氨苄西林药敏情况的准确性上均存在不足。ATB 法判定为 R 的菌株中，有 42.0%(21/50)会带来重大误差；判定为 S 的菌株中，有 17.6%(28/159)会带来极重大误差。如果将 ATB 法与 K-B 法联合，则可以将检测结果的总体一致率提高至 86.0%，这说明 K-B 法会对 ATB 法产生的某些误差进行合理校正。ATB 法判定为 R 的菌株，要进一步检测其 β-内酰胺酶；若菌株 β-内酰胺酶为阴性，则建议采用 K-B 法进行校正，数据分析表明，最终有 88.9%(16/18)的结果可以被确认。对 ATB 法判定为 S 的菌株，也要进一步检测其 β-内酰胺酶；如果菌株的 β-内酰胺酶显示为阳性，则务必采用 K-B 法进行校正，统计数据表明，全部(13/13)的校正结果最终可以被确认。

被肉汤稀释法判定为 S 的 19 株菌株中，ATB 法判定为 R 的占 63.2%(12/19)，而 K-B 法判定为 R 的仅占 15.8%(3/19)，二者结果差异具有统计学意义(P=0.007)。以上结果说明，在氨苄西林药敏试验中，K-B 法更容易将对氨苄西林敏感的菌株药敏表型判定为 S。这或许是 K-B 法能够将 ATB 法产生重大误差中 β-内酰胺酶阳性的耐药菌株校正为 S 的原因。

参考文献

[1] SONG J H, HUH K. Community-acquired pneumonia in the Asia-Pacific Region[J]. Semin Resp Crit Care, 2016, 37(6): 839-854.

[2] 赵春江. 2012 年中国成人社区获得性呼吸道感染主要致病菌耐药性的多中心研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(1): 19-22.

[3] TRISTRAM S, JACOBS M R, APPELBAUM P C. Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(2): 368-389.

[4] JANSEN W T, VEREL A, BEITSMA M, et al. Surveillance study of the susceptibility of Hemophilus influenzaeto various antibacterial agents in Europe and Canada[J]. Curr Med Res Opin, 2008, 24(10): 2853-2861.

[5] SADER H S, PIGNATARI A C. E test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing[J]. Sao Paulo Med J, 1995, 112(4): 635-638.

[6] MANOHARAN A, PAI R, SHANKAR V, et al. Comparison of disc diffusion and E test methods with agar dilution for antimicrobial susceptibility testing of Haemophilus influenzae[J]. Indian J Med Res, 2003, 117: 81.

[7] 胡祝富，黄永禄，徐志江，等. ATB 嗜血杆菌药敏试验和肉汤稀释法检测流感嗜血杆菌药物敏感性的比较[J]. 检验医学, 2009, 24(10): 718-720.

[8] 俞增仙，董春富. 评价 ATB 嗜血菌属药敏试验条用于流感嗜血菌药敏试验的可行性[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(2): 292-293.

[9] 肖亚雄，彭宇生，王鹏，等. ATB STREP 5 对肺炎链球菌药敏试验结果判读的缺陷性分析[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(7): 915-916.

[10] 尚红，王毓三，申子瑜，等. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京：人民卫生出版社, 2015.

[11] TIAN G, ZHANG L, LI M, et al. Genotypic characteristics of Hemophilus influenzaeisolates from pediatric pneumonia patients in Chengdu city, Sichuan, China[J]. J Microbiol, 2009, 47(4): 494-497.

[12] TIAN G Z, ZHANG L J, WANG X L, et al. Rapid detection of Hemophilus influenzaeand Haemophilus parainfluenzae in nasopharyngeal swabs by multiplex PCR[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(3): 367-371.

[13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S26[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2016.

(收稿日期：2017-07-22　修回日期：2017-09-28)