

快速 K-B 法细菌药物敏感试验抑菌环直径改变规律及对判断结果的影响

王恒秋¹ 刘雨峰¹ 王双² 胡志方¹

基金项目:2014 年韶关市科技计划(医学类)项目(2014CX/Ka07)

作者单位:512031 韶关市,韶关市中医院检验科¹,心内科²

【摘要】 目的 探讨快速 K-B 法细菌药物敏感试验(antibiotic susceptibility test, AST)抑菌环直径改变的规律以及对判断结果的影响。方法 收集我院 2013 年 1 月-2014 年 9 月分离自门诊和住院患者的菌株 865 株,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,其他肠杆菌 302 株,铜绿假单胞菌 26 株,其他非发酵菌 71 株。采用快速 K-B 法进行 AST,菌株的菌龄分别为 ≤ 48 h, 72 h, 96 h 及 ≥ 120 h,于进行 AST 后 2 h,2.5 h,3 h,3.5 h 和 4 h 测量抑菌环改变情况,并进行统计学分析。结果 6 类细菌的抑菌环直径改变率差异无统计学意义($P > 0.05$);相同菌龄的不同菌种抑菌环直径改变率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。相同菌种不同菌龄的菌株抑菌环直径改变率差异均有统计学意义($P < 0.05$),不同菌种相同观测时间的抑菌环直径改变率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。同一菌种不同观测时间的抑菌环直径改变率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同菌种的抑菌环直径改变率在相同观测时间的分布差异均无统计学意义($P > 0.05$);而同一菌种的抑菌环直径改变率在各观测时间的分布差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 细菌抑菌环直径的改变率与菌种无关,与菌龄相关,抑菌环直径改变对 AST 判断结果基本无影响。

【关键词】 快速;K-B 法;细菌;抑菌环;药物敏感试验;菌龄

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2014.04.008

Fast drug sensitive test K-B method bacteriostatic ring diameter change rule and the influence to the judging results

WANG Heng-qiu¹, LIU Yu-feng¹, WANG Shuang², et al. ¹Department of Clinical Laboratory, Shaoguan City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoguan 512031, China ²Department of Cardiology, Shaoguan City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoguan 512031, China

【Abstract】 Objective To explore rapid K-B method, antibiotic susceptibility test (AST) bacteriostatic ring diameter change rule and the influence to the judging results. **Methods** 865 strains bacteria were collected from outpatients and inpatients in our hospital from January 2013 to September 2014. Including 109 strains *Staphylococcus aureus*, 218 strains other *Staphylococcus*, 139 strains *Escherichia coli*, 302 strains other *Enteric bacilli*, 26 strains *Pseudomonas aeruginosa* and 71 strains other non-fermenting bacteria. AST were detected by fast K-B method. The cell age of bacteria were ≤ 48 h, 72 h, 96 h and ≥ 120 h, respectively. Bacterial inhibition ring were measured in 2 h, 2.5 h, 3 h, 3.5 h and 4 h after AST, and all data analyzed statistically. **Results** The difference of bacterial inhibition ring change rates in 6 kinds of bacteria had no statistical significance ($P > 0.05$). The differences of bacterial inhibition ring change rates in different strains of same cell age all had no statistical significance ($P > 0.05$). The differences of bacterial inhibition ring change rates of different cell age in same strains all had statistical significance ($P < 0.05$). At the same observation time, the differences of bacterial inhibition ring change rates in different strains all had no statistical significance ($P > 0.05$). At different observation time, the differences of bacterial inhibition ring change rates in same strains all had statistical significance ($P < 0.05$). At the same observation time, the distribution differences of bacterial inhibition ring change rates in different strains all had no statistical significance ($P > 0.05$). At different observation time, the distribution differences of bacterial inhibition ring change rates in the same strains all had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Bacteria bacteriostatic ring diameter change rate has no correlation with the strain, but has correlation with cell age. Bacteriostatic ring diameter can not influence the judging results of AST.

【Key words】 Quickly; K-B method; Bacteria; Bacteriostatic ring; Drug sensitive test; Cell age

细菌药物敏感试验(antibiotic susceptibility test, AST)对临床合理使用抗生素、细菌耐药的监测以及研究细菌耐药的机制意义重大。虽然目前许多三级甲等医院的临床微生物实验室配备了微生物自动鉴定仪,但是,由于其价格昂贵,许多二级甲等医院及以下级别医院微生物实验室仍然运用纸片扩散(K-B)法进行 AST。K-B 法获得 AST 结果的时间通常为 18 h-24 h,不能满足重症感染和多重感染患者急需 AST 结果的需要。本实验室创建了快速 K-B 法,在 4.2 h 内即能够获得 AST 结果。但是,用于 AST 的细菌的菌龄对抑菌环直径有影响,导致 AST 结果不准确。因此,选择合适菌龄的菌株进行 AST 对报告结果的准确性十分重要。本文研究旨在探讨常见菌种不同菌龄及不同时间对抑菌环直径改变的影响,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 收集 2013 年 1 月-2014 年 9 月分离自我院门诊和住院患者的菌株共 865 株,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,其他肠杆菌科细菌 302 株,铜绿假单胞菌 26 株,其他非发酵菌 71 株。标本类型为血液、痰液、粪便、尿液、咽拭子、分泌物、白带、脓液等。

1.2 仪器与试剂 使用 DL-96 II 型细菌测定系统(珠海迪尔生物工程有限公司生产)进行菌种鉴定。AST 纸片和 M-H 琼脂平板均为杭州天和微生物试剂有限公司产品,均在有效期内使用。

1.3 AST 快速 K-B 法 AST 按照文献^[1]的 K-B 法进行,采用直接调制菌悬液法制备接种菌液。从 2 h 开始,用低倍镜(100 倍)每隔 0.5 h 观察并测量和记录抑菌环直径,至肉眼能够观察到抑菌环为止;之后每 2 h 观察并测量和记录抑菌环直径,至 12 h 止;至 24 h(生长缓慢的细菌则适当延长时间)最终观察并

测量和记录抑菌环直径。用于 AST 的菌株的菌龄为 ≤ 48 h、72 h、96 h、 ≥ 120 h。

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 质控菌株 质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853,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]进行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行处理,计数资料的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各菌种抑菌环直径改变和不同菌龄抑菌环直径改变情况 在 6 种常见的菌种中,菌龄为 ≤ 48 h、72 h、96 h 和 ≥ 120 h 的同一菌种之间抑菌环直径改变率随着时间的延长逐渐降低,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05);而不同菌种间相同菌龄的菌株抑菌环改变率差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),结果见表 1。

2.2 6 类常见菌种不同观测时间的抑菌环直径改变情况 分别于 AST 后 2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 及 4 h 时观测各菌种出现抑菌环的菌株数,至 24 h 最终观察并测量记录所有菌株的抑菌环直径改变情况。如表 2 所示,同一菌种不同时间的抑菌环直径改变率比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),且观测时间越短,抑菌环直径改变率也越高;而不同菌种相同观测时间的抑菌环直径改变率比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.3 6 类常见菌种抑菌环改变菌株在各观测时间的分布 在观测时间 2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 和 4 h 中,相同菌种在不同观测时间的抑菌环直径改变率均不相

表 1 各种细菌抑菌环直径改变率和不同菌龄抑菌环直径改变率[n(%)]

菌种	株数	抑菌环直径改变	不同菌龄抑菌环直径改变				χ^2 值	P 值
			≤ 48 h	72 h	96 h	≥ 120 h		
金黄色葡萄球菌	109	26(23.85)	18(69.23)	4(15.38)	2(7.69)	2(7.69)	36.72	< 0.05
其他葡萄球菌	218	46(21.10)	33(71.74)	6(13.04)	4(8.70)	3(6.52)	72.00	< 0.05
大肠埃希菌	139	32(23.02)	22(68.75)	5(15.63)	3(9.38)	2(6.25)	44.34	< 0.05
其他肠杆菌	302	61(20.20)	42(68.85)	10(16.39)	5(8.20)	4(6.56)	85.23	< 0.05
铜绿假单胞菌	26	5(19.26)	4(80.00)	1(20.00)	0(0.00)	0(0.00)	11.47	< 0.05
其他非发酵菌	71	15(21.13)	11(73.33)	2(13.33)	1(6.67)	1(6.67)	25.15	< 0.05
χ^2 值	-	0.81	0.44	0.31	0.59	0.43	-	-
P 值	-	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	-	-

同,且差异均有统计学意义(P 均 <0.05);而不同菌种相同时间的抑菌环直径改变率比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05),见表 3。

3 讨论

细菌的耐药性日趋严重,加强细菌耐药性的监测已经迫在眉睫。文献^[2]报道,金黄色葡萄球菌耐药率最高的前 4 位青霉素 G (87.32%)、红霉素 (87.32%)、苯唑西林 (80.28%)、阿奇霉素 (76.06%) 都大于 76%。文献^[3,4]均报道金黄色葡萄球菌有很高的耐药率。文献^[5]报道,多种细菌有很广的耐药谱和很高的耐药率。这些应引起医学界的高度重视。快速 AST 方法的建立,必将为临床抗感染治疗和减缓细菌耐药性的产生发挥积极作用。AST 目前有稀释法和扩散法。稀释法准确,但操作较复杂;K-B 法操作简便,也有较好的准确性,因此是目前微生物实验室最常用的 AST 方法之一。

快速获得 AST 结果是控制感染尤其是控制重症和多重感染的关键。K-B 法获得 AST 结果的时间

较长(通常需要 18-24 h),是大部分综合医院弃用该方法而使用自动细菌鉴定仪的主要原因之一。

有文献^[6]报道了快速抗生素敏感试验方法的建立,该方法虽然快速(6 h 时获得 AST 结果),但试验方法操作繁琐。还有文献^[7,8]报道了用显色半固体进行快速细菌药敏试验的方法,结果显示在 3 h 内有 96.8% 的菌株可得出 AST 结果,5 h 内 100% 的菌株可得出 AST 结果,但该试验方法操作也较繁琐。

本实验室建立了“快速 K-B 法”,3-4 h 即可获得 AST 结果,快于文献^[6]报道的方法,与文献^[7,8]报道的方法获得 AST 结果的时间相近,比自动细菌鉴定仪(6-8 h)也快了許多,且操作简便,即在标准 K-B 法的基础上,增加了采用低倍镜观测抑菌环直径,在细菌接种 M-H 琼脂平板,粘帖药敏纸片孵育后,从 2 h 开始,每隔 0.5 h 观测一次抑菌环,至肉眼可观测抑菌环直径为止。

但在实验过程中,发现菌株的菌龄对抑菌环直径的判读有影响,因此,本文对医院常见菌种的不同

表 2 各观测时间的抑菌环直径改变率

菌种	可观测抑菌环直径株数(n)					抑菌环直径改变率[n(%)]					χ^2 值	P 值
	2 h	2.5 h	3 h	3.5 h	4 h	2 h	2.5 h	3 h	3.5 h	4 h		
金黄色葡萄球菌	12	24	27	30	15	7(58.33)	9(37.50)	6(22.22)	3(10.00)	1(6.67)	15.85	<0.05
其他葡萄球菌	10	23	42	47	40	7(70.00)	16(69.57)	14(33.33)	7(14.89)	2(5.00)	43.19	<0.05
大肠埃希菌	9	21	34	35	21	7(77.78)	13(61.90)	7(20.59)	4(11.43)	1(4.76)	35.30	<0.05
其他肠杆菌	15	37	54	63	54	11(73.33)	21(56.76)	16(29.63)	16(25.40)	3(5.56)	49.26	<0.05
铜绿假单胞菌	0	2	5	5	5	0(0.00)	2(100.00)	1(20.00)	1(20.00)	1(20.00)	-	-
其他非发酵菌	0	5	9	10	13	0(0.00)	4(80.00)	7(77.78)	3(30.00)	1(7.69)	14.69	<0.05
χ^2 值	-	-	-	-	-	1.10	8.00	2.94	2.83	1.91	-	-
P 值	-	-	-	-	-	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	-	-

注:铜绿假单胞菌株数太少,其他非发酵菌在 2 h 时未见抑菌环直径,故未计入比

表 3 抑菌环直径改变菌株在各观测时间的分布[n(%)]

菌种	抑菌环直径改变株数	2 h	2.5 h	3 h	3.5 h	4 h	χ^2 值	P 值
金黄色葡萄球菌	26	7(26.92)	9(34.62)	6(23.08)	3(11.54)	1(3.85)	9.82	<0.05
其他葡萄球菌	46	7(15.22)	16(34.78)	14(30.43)	7(15.22)	2(4.35)	17.78	<0.05
大肠埃希菌	32	7(21.88)	13(40.63)	7(21.88)	4(12.50)	1(3.13)	15.46	<0.05
其他肠杆菌	61	11(18.03)	21(34.43)	16(26.23)	10(16.39)	3(4.92)	18.73	<0.05
铜绿假单胞菌	5	0(0.00)	2(40.00)	1(20.00)	1(20.00)	1(20.00)	-	-
其他非发酵菌	15	0(0.00)	4(26.67)	7(46.67)	3(20.00)	1(6.67)	12.50	<0.05
χ^2 值	-	6.51	0.94	3.89	0.87	2.87	-	-
P 值	-	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	-	-

注:铜绿假单胞菌株数太少,其他非发酵菌在 2 h 时未见抑菌环直径,故未计入比

菌龄对 AST 结果的影响进行研究,结果显示,金黄色葡萄球菌、其他葡萄球菌、大肠埃希菌、其他肠杆菌、铜绿假单胞菌和其他非发酵菌的抑菌环直径改变率差异无统计学意义($P > 0.05$),说明各种细菌的抑菌环直径改变率一致,而相同菌龄的不同菌种抑菌环直径改变率差异亦均无统计学意义(P 均 > 0.05),说明细菌抑菌环直径改变率不随菌种的不同而改变;不同菌龄的相同菌种的抑菌环直径改变率比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),说明细菌的抑菌环直径改变率随着菌龄的不同而改变,菌龄越短的细菌抑菌环直径改变率越高(见表 1)。由表 2 可知,不同菌种相同观测时间出现抑菌环的菌株抑菌环直径改变率比较,差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),说明细菌抑菌环直径改变率不随菌种的不同而改变,而同一菌种不同观测时间出现抑菌环的菌株抑菌环直径改变率比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),且在进行 AST 后 2 h 时出现抑菌环的菌株抑菌环改变率最高(铜绿假单胞菌和其他非发酵菌除外),说明抑菌环出现越早(细菌生长越快),其抑菌环改变率越高。由表 3 可见,在不同的观测时间,同一菌种在各观测时间的抑菌环直径改变率比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),说明抑菌环出现越早(细菌生长越快),其抑菌环改变率越高,观测时间为 3 h 以前的抑菌环直径改变率占总抑菌环直径改变率的近 80%。

上述结果表明,不同菌种的抑菌环直径改变率近似,细菌抑菌环直径的改变率与菌种无关,而与菌龄有关,菌龄越短改变率越高。

然而,细菌抑菌环直径改变并不会影响 AST 的结果判断。本文研究结果显示,抑菌环直径发生改变的金黄色葡萄球菌中仅有 3.85%(1/26)的菌株抑菌环直径改变前的直径 < 23 mm,其抑菌环直径改变前的判断结果为“I”,抑菌环直径改变后的判断结果为“S”,AST 判读结果不一致,其余 96.15%(25/26)的菌株抑菌环直径改变前的直径 ≥ 23 mm,其抑菌环直径改变前后的 AST 判读结果一致(均为 S)。此现象可能是因细菌生长较快,而抗菌药在琼脂中渗透较慢,随着抗菌药的逐渐渗透,药片远端琼脂中的药物浓度逐渐增大,最初生长的细菌(尚未形成较大菌落)又被抑制或杀死所致。金黄色葡萄球菌中,菌龄 ≤ 48 h 的菌株的抑菌环直径改变率占抑菌环直径总改变率(69.23%)明显高于菌龄较长的菌株(72 h 为 15.38%,96 h 和 ≥ 120 h 均为 7.69%),这是因

为菌龄 ≤ 48 h 的菌株接种 M-H 琼脂平板后的生长速度快于菌龄较长的菌株。本文研究结果还显示,金黄色葡萄球菌抑菌环直径发生改变的菌株的抑菌环直径均为增大,且 96.15%的菌株直径 ≥ 23 mm,抑菌环直径改变前后的 AST 判读结果一致(均为 S),故不会影响敏感药物的选择。其他葡萄球菌、大肠埃希菌、其他肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和其他非发酵菌的抑菌环直径改变前的直径 < 23 mm 的比例、菌株抑菌环直径改变前的直径 ≥ 23 mm 的比例、菌龄 ≤ 48 h 菌株的抑菌环直径改变率占抑菌环直径总改变率分别为 4.35%、95.65%、71.74%、3.13%、96.87%、68.75%、3.28%、96.72%、68.85%、0.00%、100.00%、80.00%、0.00%、100.00%、73.33%,与金黄色葡萄球菌的结果近似。所有抑菌环直径改变菌株的抑菌环直径均为增大,故不会因为抑菌环直径的改变而将“S”误判为“I”或“R”,亦不会影响敏感药物的选择。由于菌龄较大的菌株生长缓慢,甚至死亡,会导致获得 AST 结果的时间延长,甚至不生长,故应该使用菌龄 ≤ 48 h 的菌株进行 AST。

综上所述,快速 K-B 法 AST 抑菌环直径的改变不受菌种影响,受菌龄和观测时间影响,但影响甚微,基本不影响 AST 结果判断,更不会影响敏感药物的选择,只要在低倍镜下可观测抑菌环,就可尽早的获得 AST 结果。

4 参考文献

- 1 叶应妩,王毓三,申子瑜,主编.全国临床检验操作规程.第 3 版.南京:东南大学出版社,2006,890-923.
- 2 李琳,田青友,曹蕾.快速抗生素敏感试验方法的建立.华北煤炭医学院学报,2005,7:280-281.
- 3 蒋蕊芳,周黎.金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析.检验医学与临床,2008,5:1501-1502.
- 4 侯临平.葡萄球菌的耐药状况及克林霉素耐药株的耐药表型分析.实用检验医师杂志,2012,4:104-107.
- 5 韩兰芳,方建平.化脓性中耳炎的病原菌及耐药性分析.国际检验医学杂志,2008,29:551,553.
- 6 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.实用预防医学,2006,13:443-444.
- 7 李慧.一种新的细菌药敏试验方法的探讨.临床医药,2006,9:63-64.
- 8 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结果分析.国际检验医学杂志,2011,32:1386-1387.

(收稿日期:2014-09-28)

(本文编辑:李霏)