

血培养阳性培养物直接药敏试验的评价*

答 嵘¹, 王 伟^{2△}, 李 芳¹, 袁 晶¹(西安交通大学第一附属医院:1. 检验科;2. 神经外科 710061)

【摘要】 目的 通过对比血培养阳性培养物直接药敏试验与标准药敏试验结果的一致性,探讨血培养直接药敏报告在临床血流感染诊治中的应用价值。**方法** 选取西安交通大学第一附属医院 2014 年 12 月到 2015 年 2 月的血培养阳性标本,在进行标准药敏试验的同时,阳性报警后根据涂片染色结果按照革兰阳性菌和革兰阴性菌采用纸片扩散法进行直接药敏试验。统计直接药敏与标准药敏试验结果的符合率、严重错误率、重大错误率、微小错误率。**结果** 该研究共包括血培养阳性菌株 101 株,药敏试验比对结果 875 个。革兰阳性菌标准符合率为 94.3%,严重错误率为 0.8%,重大错误率为 0.4%,微小错误率为 4.5%;革兰阴性菌标准符合率为 94.1%,严重错误率为 0.0%,重大错误率为 3.7%,微小错误率为 2.2%。革兰阳性菌中利奈唑胺、四环素、替考拉宁、万古霉素,革兰阴性菌中亚胺培南与美罗培南符合率为 100.0%。氟喹诺酮类在革兰阳性菌与革兰阴性菌中均出现微小错误。革兰阳性菌中克林霉素出现严重错误。革兰阴性菌中头孢类抗菌药物符合率偏低,并易出现重大错误。**结论** 利用血培养阳性物采用纸片扩散法进行直接药敏试验不仅能够快速、准确地为临床提供初步药敏结果,更易于在临床广泛使用。

【关键词】 血培养; 直接药敏试验; 评价

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)20-2971-03

Evaluation of direct susceptibility testing for positive blood cultures* DA Rong¹, WANG Wei^{2△}, LI Fang¹, YUAN Jing¹(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

【Abstract】 Objective To explore the diagnostic value of direct susceptibility testing in blood stream infection by comparing the results of direct susceptibility test with standard susceptibility test of positive blood culture. **Methods** Positive blood culture specimens in the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University were collected from December 2014 to February 2015, besides the standard susceptibility testing, according to the results of smear staining, disc diffusion susceptibility tests were carried out for the Gram-positive cocci and Gram-negative rods. Rates of consistency, very major errors, major errors and minor errors of direct susceptibility test compared to standard susceptibility test were analyzed. **Results** Altogether, 101 isolates and 875 organism/antibiotic combinations were evaluated. With regard to Gram-positive cocci, agreement between both methods was found in 94.3% of cases, with 0.8% very major, 0.4% major and 4.5% minor errors. For Gram-negative rods, agreement was found in 94.1% of cases, with 0.0% very major, 3.7% major and 2.2% minor errors. Agreement between both methods was 100.0% for linezolid, tetracycline, teicoplanin and vancomycin in Gram-positive cocci, imipenem and meropenem in Gram-negative rods. Minor errors occurred in fluoroquinolone for Gram-positive cocci and Gram-negative rods. Very major error occurred in clindamycin for Gram-positive cocci. Low consistent rate was found in cephalosporins antibiotics for Gram-negative rods, and major error occurred often. **Conclusion** Using positive blood culture for direct susceptibility test by disc diffusion susceptibility tests can not only provide rapid and accurate preliminary susceptibility results, but also save costs. Therefore, it can be widely used in clinical.

【Key words】 blood culture; direct susceptibility testing; evaluation

全自动血培养系统在临床微生物实验室的广泛应用,大大提高了血培养的敏感性和时效性。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)快速微生物鉴定平台的建立为临床早期经验性抗感染治疗提供了有力保障,血培养直接药敏试验报告将会提高临床目标性抗感染治疗的时效性。目前临床微生物实验室在血培养检测中多能够做到一级报告与三级报告,二级报告仅在临床需要时进行而未常规开展。血培养二级报告虽然也可通过培养物预处理采用肉汤稀释法进行报告,但

是考虑降低成本与简化操作,多采用纸片扩散法进行直接药敏试验,报告抗菌药物的抑菌圈直径^[1-3]。20 世纪 70 年代直接药敏试验(DAST)得到广泛应用,当时标准药敏试验方法为纸片扩散法,而现在大多数大型综合性医院采用仪器进行微量肉汤稀释法检验作为标准药敏试验。直接药敏试验结果与最终药敏结果报告的一致性则是血培养二级报告的关键。本研究拟对血培养阳性标本采用纸片扩散法进行直接药敏试验,并与标准药敏试验结果进行比对,评价直接药敏试验的准确率,为

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000767)。

作者简介:答嵘,女,博士,主管技师,主要从事临床微生物学研究。△ 通讯作者, E-mail:wei_wangdoc@163.com。

常规开展血培养二级报告提供实验室数据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取西安交通大学第一附属医院 2014 年 12 月至 2015 年 2 月的血培养阳性标本共 101 例,其中革兰阳性菌 31 例,革兰阴性菌 70 例。

1.2 仪器与试剂 BacT/ALERT 3D 全自动细菌/分枝杆菌培养检测系统(生物梅里埃,法国),VITEK 2 全自动微生物分析系统(生物梅里埃,法国),VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统(生物梅里埃,法国),VITEK MS 全自动快速质谱微生物检测系统(生物梅里埃,法国),中和抗菌药物需氧瓶、厌氧瓶与小儿瓶(生物梅里埃,法国),血琼脂平板(生物梅里埃,法国),巧克力平板(生物梅里埃,法国),MH 琼脂平板(生物梅里埃,法国)、药敏纸片(OXOID,英国)、鉴定与药敏卡(生物梅里埃,法国)。

1.3 方法

1.3.1 血培养 血培养阳性报警后,取出阳性瓶。无菌抽取瓶中培养液,接种至血平板和巧克力平板,置于 CO₂ 恒温培养箱中 35 ℃ 培养。同时进行涂片染色,进行血培养一级报告。

1.3.2 直接药敏试验 无菌抽取瓶中培养液 0.1 mL 均匀涂布于 MH 平板上,按照染色结果,革兰阳性菌贴环丙沙星、红霉素、克林霉素、左氧氟沙星、利奈唑胺、四环素、替考拉宁、万古霉素纸片,革兰阴性菌贴阿米卡星、头孢吡肟、头孢他啶、环丙沙星、庆大霉素、亚胺培南、美罗培南、左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦纸片。置 35 ℃ 孵育 16~18 h 后用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.3.3 标准药敏试验 阳性瓶培养液于血平板和巧克力平板孵育 24 h 后,按照操作规程制备菌悬液,上机进行细菌生化及药敏试验,并将最终报告发放临床,即三级报告。链球菌通过传统纸片扩散法进行药敏试验。

1.3.4 质量控制 使用标准菌株进行质量控制,上机质控均按照仪器说明书进行,纸片扩散法药敏质控按照临床和实验室标准化协会(CLSI)M100-S23 文件进行。

1.4 标准符合率 运用 CLSI 解释规则,直接药敏和标准药敏试验方法的结果一致,如敏感(S)、中介(I)、耐药(R),为符合。严重错误:直接药敏为 S 而标准药敏为 R。重大错误:直接药敏为 R 而标准药敏为 S。微小错误:直接药敏为 R 或 S 而标准药敏为 I;直接药敏为 I 而标准药敏为 R 或 S。

2 结果

2.1 直接药敏试验中原菌种类 本研究共包括革兰阳性菌 31 株,革兰阴性菌 70 株。革兰阳性菌中,包括金黄色葡萄球菌 8 株、屎肠球菌 8 株、表皮葡萄球菌 7 株、人型葡萄球菌 3 株、化脓链球菌 2 株,以及鹌鸡肠球菌、缓慢葡萄球菌、前庭链球菌各 1 株;革兰阴性菌包括大肠埃希菌 55 株、肺炎克雷伯菌 5 株、鲍曼不动杆菌 3 株、产酸克雷伯菌 3 株、铜绿假单胞菌 2 株、弗氏柠檬酸杆菌 1 株及阴沟肠杆菌 1 株。

2.2 革兰阳性菌药敏试验标准符合率 革兰阳性菌环丙沙星、红霉素、克林霉素、左氧氟沙星、利奈唑胺、四环素、替考拉宁、万古霉素标准符合率见表 1。

2.3 革兰阴性菌药敏试验标准符合率 革兰阴性菌阿米卡星、头孢吡肟、头孢他啶、环丙沙星、庆大霉素、亚胺培南、美罗培南、左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦标准符合率见表 2。

表 1 革兰阳性菌药敏试验标准符合率[n(%)]

抗菌药物	<i>n</i>	符合	严重错误	重大错误	微小错误
环丙沙星	28	21(75.0)	0(0.0)	1(3.6)	6(21.4)
红霉素	31	27(87.1)	0(0.0)	0(0.0)	4(12.9)
克林霉素	31	29(93.5)	2(6.5)	0(0.0)	0(0.0)
左氧氟沙星	31	30(96.7)	0(0.0)	0(0.0)	1(3.3)
利奈唑胺	31	31(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
四环素	31	31(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
替考拉宁	31	31(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
万古霉素	31	31(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
合计	245	231(94.3)	2(0.8)	1(0.4)	11(4.5)

表 2 革兰阴性菌药敏试验标准符合率结果[n(%)]

抗菌药物	<i>n</i>	符合	严重错误	重大错误	微小错误
阿米卡星	70	66(94.3)	0(0.0)	4(5.7)	0(0.0)
头孢吡肟	70	56(80.0)	0(0.0)	10(14.3)	4(5.7)
头孢他啶	70	59(84.3)	0(0.0)	9(12.9)	2(2.8)
环丙沙星	70	69(98.6)	0(0.0)	0(0.0)	1(1.4)
庆大霉素	70	68(97.2)	0(0.0)	0(0.0)	2(2.8)
亚胺培南	70	70(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
美罗培南	70	70(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
左氧氟沙星	70	69(98.6)	0(0.0)	0(0.0)	1(1.4)
哌拉西林/他唑巴坦	70	66(94.3)	0(0.0)	0(0.0)	4(5.7)
合计	630	593(94.1)	0(0.0)	23(3.7)	14(2.2)

3 讨论

血流感染的有效治疗依赖于早期目标性抗感染治疗,而目标性抗感染治疗极大程度地依赖于及时、准确的微生物药敏结果。随着 MALDI-TOF 技术在临床微生物领域的应用,微生物鉴定比传统生化鉴定能够提前 24 h 完成。Machen 等^[4]采用血培养阳性培养物经过过滤处理后直接利用质谱进行鉴定的同时进行药敏试验,能够在血培养阳性报警后 24 h 内完成鉴定与药敏的最终报告。但是质谱仪价格昂贵,目前仅有少数大型综合性三甲医院检验科临床微生物室用于临床标本鉴定。也有学者利用血培养阳性培养物处理后采用 VITEK 2 系统进行鉴定和药敏^[5]。但是利用全自动鉴定药敏仪进行快速药敏试验标本前处理通常操作繁琐,并会增加生物安全风险与检测成本,绝大多数医院并无条件开展。而血流感染治疗重在早期正确使用抗菌药物,所以血培养直接药敏报告对于临床血流感染的目标性抗感染治疗具有重要指导价值。

血流感染时血培养大多为单一致病菌,因此适合于进行直接药敏试验。为了缩短血培养报告的时间,学者们反复强调从血培养阳性瓶取培养物直接进行药敏试验的重要性,血培养分级报告能够缩短患者住院时间、降低罹患难辨梭菌相关腹泻的风险、降低患者平均病死率与感染相关病死率^[6-7]。本研究对革兰阳性菌和革兰阴性菌的直接药敏试验与 VITEK 2 仪器法的标准药敏结果进行比对,革兰阳性菌标准符合率为 94.3%,严重错误率为 0.8%,重大错误率为 0.4%,微小错误率为 4.5%;革兰阴性菌标准符合率为 94.1%,严重错误率为

0.0%, 重大错误率为 3.7%, 微小错误率为 2.2%, 本研究数据与文献报道相似。血培养革兰阴性菌进行直接药敏试验与标准药敏结果比对, 显示纸片扩散法血培养标本直接药敏试验标准符合率 96.2%^[8-9]。陆文香等^[10]通过对 103 份血培养阳性标本进行直接药敏试验, 发现标准符合率 92.6%, 严重错误率 0.2%, 重大错误率 3.1%, 微小错误率 4.1%。保勇等^[11]研究发现血培养革兰阴性菌直接药敏试验测定的标准符合率为 85.0%, 严重错误率为 0.0%, 重大错误率为 6.3%, 微小错误率为 8.6%; 血培养革兰阳性菌直接药敏试验测定的标准符合率为 84.4%, 严重错误率为 0.0%, 重大错误率为 7.0%, 微小错误率为 8.5%。Edelmann 等^[2]研究显示革兰阳性菌标准符合率为 93.9%, 严重错误率为 1.6%, 重大错误率为 1.1%, 微小错误率为 2.6%。革兰阴性菌标准符合率为 91.9%, 严重错误率为 1.2%, 重大错误率为 0.7%, 微小错误率为 6.3%。血培养阳性培养物直接药敏试验在细菌中有一定研究与应用, 但是在真菌血症中研究较少, 需进一步探索。研究表明直接真菌药敏试验可以采用 Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, Ohio) 进行, 40 例中未出现非常重大错误和重大错误, 仅有 4 例微小错误^[12]。上述研究结果均显示利用血培养阳性物进行直接药敏试验与标准药敏试验结果基本一致, 能够用于临床血培养二级报告。

本研究发现直接药敏试验革兰阳性菌中利奈唑胺、四环素、替考拉宁、万古霉素均符合, 革兰阴性菌中仅亚胺培南与美罗培南均符合, 而且这些抗菌药物如果敏感, 抑菌圈直径就显著大于折点, 如果耐药则基本无法观测到抑菌圈。氟喹诺酮类药物包括环丙沙星与左氧氟沙星在革兰阳性菌与革兰阴性菌中均出现微小错误, 抑菌圈直径总是介于折点范围左右, 造成判读为中介, 而标准药敏多为敏感。革兰阳性菌中需注意在直接药敏试验中进行 D 试验, 本研究中有 2 株革兰阳性菌直接法克林霉素抑菌圈显示为敏感, 仪器法 MIC 值也提示敏感, 但是专家系统给出判读为耐药, 直接法进行 D 试验, 验证确实存在诱导耐药, 这是非常需要重视的。革兰阴性菌中头孢类抗菌药物包括头孢吡肟与头孢他啶符合率均在 80%~90%, 重大错误率均在 10% 以上, 提示直接药敏报告中头孢类需注意。

本研究发现采用纸片扩散法进行血培养阳性物直接药敏试验, 革兰阴性菌在孵育 8 h 就可以读取明显的抑菌圈, 而革兰阳性菌中葡萄球菌属在 8 h 时能够看到不明显的抑菌圈, 链球菌则需要 24 h。大部分临床微生物实验室夜间无专业人员处理标本, 而仅有值班人员负责标本接种, 通常血培养阳性瓶在早上集中处理, 涂片染色镜检后进行直接药敏试验, 革兰阴性菌到下午下班前就能够给临床发放初步报告, 比标准报告时间提前 36 h, 革兰阳性菌则在次日早上发放报告, 比标准报告时间提前 24 h, 这为临床及时、准确地目标性抗感染治疗提供了可靠的实验室依据。

本研究结果提示利用血培养阳性物采用纸片扩散法进行直接药敏试验不仅能够快速、准确地为临床提供初步药敏结果, 而且能够节约成本, 操作简便, 易于临床推广。但是对于直接药敏试验中需要注意的问题, 如革兰阳性菌中克林霉素的诱导耐药、革兰阴性菌中头孢类抗菌药物的结果解释等仍需引起实验室重视。总之, 血培养阳性物直接进行药敏试验能够为合理使用抗菌药物提供及时、可靠的指导。

参考文献

- [1] Chapin KC, Musgnug MC. Direct susceptibility testing of positive blood culture by using sensititre broth microdilution plates[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4751-4754.
- [2] Edelmann A, Pietzcker T, Wellinghausen N. Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(2): 202-207.
- [3] Wellinghausen N, Pietzcker T, Poppert S, et al. Evaluation of the Merlin MICRONAUT system for rapid direct susceptibility testing of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 789-795.
- [4] Machen A, Drake T, Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e87870.
- [5] Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJHM, et al. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 7-11.
- [6] Bouza E, Sousa D, Muñoz P, et al. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(8): 1161-1169.
- [7] De Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, et al. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(8): 3734-3738.
- [8] 茹纳丹, 陈刚, 赵圆圆. 革兰阴性菌引起的血培养阳性标本直接细菌鉴定和药敏的应用[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(11): 1025-1028.
- [9] Ling TKW, Liu ZK, Cheng AFB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4705-4707.
- [10] 陆文香, 吴培南, 徐卫东. 血培养三级报告临床应用结果分析[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(5): 380-381.
- [11] 保勇, 史梦, 杨永长, 等. 血培养直接药敏试验对感染性疾病的诊疗价值[J]. 实用医院临床杂志, 2013, 10(6): 107-109.
- [12] Avolio M, Grosso S, Bruschetta G, et al. Direct antifungal susceptibility testing of positive Candida blood cultures by Sensititre YeastOne[J]. New Microbiol, 2009, 32(2): 179-184.