

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.14.001

E-test 法在自动化检测流感嗜血杆菌对氨苄西林
药物敏感性试验误差中的校正作用*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 探讨 E-test 法在自动化检测流感嗜血杆菌(Hi)氨苄西林体外药物敏感性试验中的校正作用。**方法** 采集 227 株 Hi 菌株,根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)的判定标准,以肉汤稀释法药物敏感性试验为参考方法,采用 E-test 法、自动化微量肉汤稀释法(ATB 法)同时检测临床分离的 Hi 对氨苄西林的敏感度,观察 3 种方法药物敏感性结果的一致性,分析 E-test 法对 ATB 法误差的校正作用。**结果** 与肉汤稀释法相比,E-test 法和 ATB 法的一致率均为 70.48%,两者联合可将检测的一致率提高至 87.67%,显著高于 ATB 法($\chi^2=20.247, P<0.001$);ATB 法的重大误差率(42.00%)显著高于 E-test 法(6.00%),差异有统计学意义($P=0.002$),E-test 法的次要误差率显著高于 ATB 法($\chi^2=10.018, P=0.002$),二者的极重大误差率差异无统计学意义($\chi^2=0.604, P=0.437$);E-test 法可校正 ATB 法 71.43%的重大误差、62.96%的极重大误差以及 6.84%的次要误差。**结论** 对于 Hi 氨苄西林药物敏感性试验,E-test 法可合理校正 ATB 法所产生的部分药物敏感性误差。如果 ATB 法判定为氨苄西林敏感且 β -内酰胺酶阳性的菌株,建议采用 E-test 法进行校正。

关键词:流感嗜血杆菌; 氨苄西林; β -内酰胺酶; 药物敏感性试验

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)14-2029-04

Errors of automated ampicillin susceptibility test for Haemophilus influenzae
conditionally corrected by E-test assay*WANG Zhanhao¹, WANG Xiaolei², HU Jun², YANG Lili¹, XIE Jiang²,
LIU HuaWei¹, CAO Min², GUO Yuanbiao^{2△}(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Laboratory Medical Research Center, the Third
People's Hospital of Chengdu/Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong
University, Chengdu, Sichuan 610000, China)

Abstract: Objective To observe the capability of E-test for correcting automated ampicillin susceptibility detection of Haemophilus influenzae(Hi). **Methods** A total of 227 Hi isolates were collected. According to the standards of CLSI, broth dilution assay was regarded as a reference method. E-test and an automated microdilution broth test(ATB) were used to determine Hi susceptibility to ampicillin. Agreement rate of the three methods and the correction of E-test to the errors of ATB were analyzed. **Results** The essential agreement of E-test or ATB to broth dilution method was 70.48%, combined detection of E-test and ATB made the essential agreement up to 87.67% ($\chi^2=20.247, P<0.001$). Major error of ATB(42.0%) was significantly higher than that of E-test(6.0%) ($P=0.002$). Minor error of E-test was significantly higher than that of ATB($\chi^2=10.018, P=0.002$). But very major error showed no significant difference between the two methods($\chi^2=0.604, P=0.437$). While, 71.43% of major error, 62.96% of the very major error and 36.84% of the minor error of ATB could be corrected by E-test. **Conclusion** For Hi ampicillin susceptibility tested by ATB-like automated microdilution broth assays, E-test could correct part of the errors produced by ATB. Moreover, it is necessary to apply E-test to confirm ampicillin sensitivity of the isolates with β -lactamase positive.

Key words: Haemophilus influenzae; ampicillin; β -lactate; antibiotic susceptibility test

流感嗜血杆菌(Hi)是呼吸道感染的重要致病菌之一^[1-2]。近年来由于抗菌药物的广泛使用,Hi对氨苄西林的耐药率呈明显上升趋势^[3-4]。因此,及时正

确地检出对氨苄西林耐药的 Hi,对预防及控制耐药菌株暴发流行至关重要。临床工作中,尤其在基层医院,基于微量肉汤稀释法的自动化微量肉汤稀释法(ATB

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31500077);四川省科技厅应用基础项目(2013JY0121)。

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。

法)更为广泛地应用于 Hi 的药物敏感性试验^[5-6]。但是,大部分 ATB 法试剂盒提供的药物浓度折点较少,有的甚至仅有 1 个判读敏感浓度孔。一旦抗菌药物敏感、耐药判读折点发生变化,则有可能导致判读结果错误,对临床用药产生误导^[7]。因此,校正 ATB 法在实际工作中产生检测结果的误差具有重要的意义。

目前,虽然肉汤稀释法为药物敏感性试验的标准参考方法,但是其操作过程繁琐,试验要求严苛,故临床实际工作中较少应用。E-test 法与肉汤稀释法有着较好的一致性,操作简便,技术要求相对较低。因此,本研究拟用肉汤稀释法为参考方法,探讨在 Hi 的氨苄西林药物敏感性试验中,E-test 法对 ATB 法的校正能力,以期获得切实有效的校正方法,提高自动化药物敏感性鉴定法检测的准确性。

1 资料与方法

1.1 材料来源 Hi 来源于 2013—2014 年四川成都、都江堰、德阳地区的 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 2 版)》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。之后,挑取典型的 Hi 菌落进一步分离培养,并取菌落涂片并革兰染色进行初步鉴定。然后再次用卫星试验、V 因子、X 因子及 V + X 因子纸片鉴定分离的流感嗜血杆菌。按 ATB Expression 鉴定/药物敏感性系统的操作规程及所述方法进行最终的鉴定^[8-9]。

1.2 主要试剂 嗜血杆菌巧克力平板和血平板(重庆庞通生物技术有限公司);药物敏感性培养基:水解酪蛋白胨(MH)肉汤(英国 Oxoid 公司)加流感嗜血杆菌添加剂;V 因子、X 因子及 V + X 因子纸片(英国 Oxoid 公司);ATB 的 Hi 药物敏感性试验板条(法国 BioMérieux 公司);E-test 的 Hi 氨苄西林药物敏感性试纸条(法国梅里埃公司)。

1.3 方法

1.3.1 最小抑菌浓度(MIC)孔板制备 将 HTM 标准肉汤加入孔板的第 1~10 孔中,每孔加 100 μL 。然后,将倍比稀释后不同浓度的氨苄西林药物溶液分别加到灭菌的 96 孔聚苯乙烯板中,第 1~8 孔加药液,每孔 100 μL ;第 9 孔作为阴性对照(孔中无抗菌药物和细菌),第 10 孔作为阳性对照(孔中无抗菌药物,但有细菌)。冰冻干燥后密封,-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存备用。整个试验过程保证无菌操作。

1.3.2 菌悬液制备及菌落计数 挑取处于对数生长期的新鲜单克隆 Hi 菌落于无菌生理盐水中,使其乳化成约 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 $^{\circ}\text{C}$ 左右的 HTM 琼脂,摇匀后制成平板。将平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$,

5% CO_2 孵箱孵育 24~48 h。最后,进行菌落计数,确认 MIC 孔板内接种菌量在规定的范围内。

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 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱孵育 18~24 h。根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)2016 年标准^[10]判读并记录药物敏感性结果。

1.3.4 E-test 法药物敏感性试验 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 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 HTM 平板上反复涂布 3 次,每次旋转平板 60 $^{\circ}$,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,将氨苄西林药物敏感性试纸条(法国梅里埃公司)贴在 HTM 平板上,每个 HTM 平板平行贴 2 条药物敏感性纸条,确保纸条间距满足药物敏感性试验要求,一旦贴在某一位置,不应变动位置。15 min 后,将贴有纸条的 HTM 平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱孵育 18~24 h。药物敏感性结果判读标准依据 CLSI 2016 年标准执行。

1.3.5 ATB 法药物敏感性试验 参照 ATB HAE-MO 嗜血杆菌药物敏感性试验板条的操作说明书对氨苄西林进行药物敏感性试验,用 ATB 细菌鉴定和药物敏感性仪读取结果。药物敏感性结果判读标准依据 CLSI 2016 年标准执行。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 麦氏单位菌悬液,用微量移液器移 50 μL 菌悬液于标准液中,将含菌悬液的试管至震荡仪器上震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 药物敏感性条空白对照孔及含抗菌药物药物敏感性孔,放置 ATB 药物敏感性条于 37 $^{\circ}\text{C}$,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。

1.3.6 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 麦氏单位。加入 NH 鉴定条(赛默飞世尔生物有限公司)并放置普通孵箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。通过吡啶试验、尿素酶试验和鸟氨酸脱羧酶试验反应的不同将 Hi 分为 8 种(I~VIII)生物型。通过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。

1.3.7 药物敏感性质控 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; E-test 法检测 Hi(ATCC49247) 对氨苄西林的 MIC 值为 2~8 μg/mL; 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 MIC 值在以上范围内, 才能记录试验结果。

1.3.8 体外药物敏感性方法结果的一致性分析 本研究以肉汤稀释法为参考方法, 分析 E-test 法和 ATB 法的体外药物敏感性试验法与该标准的一致性。观察指标如下: 一致率, 为 E-test 法、ATB 法与肉汤稀释法在体外测试所得敏感(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 E-test 法或 ATB 法的结果为 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, 为肉汤稀释法为 S 而其他方法结果为 R 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 而其他方法结果为 I 的例数加上肉汤稀释法结果为 I 而其他方法结果为 R 或 S 的例数除以总例数。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 对数据进行分析。计数资料采用百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。其中, 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 检验进行方法

的一致性分析(Kappa \geq 0.75, 一致性好; Kappa \geq 0.4 且 Kappa $<$ 0.75, 一致性一般; Kappa $<$ 0.4, 一致性较差); 以线性回归检验肉汤稀释法与 E-test MIC 值的相关性。以 $P<$ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATB 法、E-test 法与肉汤稀释法的药物敏感性结果一致性比较 检测 227 株 Hi 对氨苄西林的药物敏感性结果: S, 50 株; I, 19 株; R, 158 株。E-test 法药物敏感性结果: S, 68 株; I, 37 株; R, 122 株。ATB 法药物敏感性结果: S, 63 株; I, 0 株; R, 164 株。统计结果显示, 肉汤稀释法与 E-test 法的 MIC 值呈正相关($r=$ 0.612)。E-test 法与肉汤稀释法检测结果的一致性一般(Kappa = 0.460), 一致率为 70.48%; ATB 法与肉汤稀释法检测结果的一致性较差(Kappa = 0.323), 一致率为 70.48%。将两种方法结合可将检测的一致率提高至 87.67%, 显著高于单独的 E-test 法或 ATB 法($\chi^2=$ 20.247, $P<$ 0.001)。结果误差方面, ATB 法的重大误差率(42.0%)显著高于 E-test 法(6.0%), 差异有统计学意义($P=$ 0.002); E-test 法的次要误差率显著高于 ATB 法, 差异有统计学意义($\chi^2=$ 10.018, $P=$ 0.002); 二者的极重大误差率差异无统计学意义($\chi^2=$ 0.604, $P=$ 0.437), 见表 1。

表 1 E-test 法、ATB 法与肉汤稀释法药物敏感性结果一致性的比较($n=227$)

药物种类	方法	结果	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
氨苄西林	E-test 法	S	39	7	22	70.48(160/227)	18.50(42/227)	6.00(3/50)	13.92(22/158)
		I	8	7	22				
		R	3	5	114				
	ATB 法	S	29	7	27	70.48(160/227)	8.37(19/227)	42.00(21/50)	17.09(27/158)
		I	0	0	0				
		R	21	12	131				
P						0.002	0.002	0.437	

2.2 E-test 法对 ATB 法产生的重大误差结果的校正 总体上, ATB 法有 71.43%(15/21) 的重大误差率可被 E-test 法校正。被校正的菌株中, β -内酰胺酶阴性菌株占 93.33%(14/15); 而未被校正的菌株中, β -内酰胺酶阴性占 66.67%(4/6), 二者结果差异无统计学意义($P=$ 0.184)。从生物学分型来看, 校正和未校正菌株以 I 型和 IV 型为主, 且差异无统计学意义($P=$ 0.299)。

2.3 E-test 法对 ATB 法产生的极重大误差结果的校正 ATB 法有 62.96%(17/27) 的极重大误差可被 E-test 法校正。被校正的菌株中, β -内酰胺酶阳性菌株占 70.59%(12/17), 显著高于未被校正的菌株(1/10)($P=$ 0.004)。从生物学分型来看, 校正和未校正菌株以 I 型和 IV 型为主, 且差异无统计学意义($P=$

1.000)。

2.4 E-test 法对 ATB 产生的次要误差结果的校正 ATB 法有 6.84% 的次要误差可被 E-test 法校正。共有 19 株经肉汤稀释法测定为药物敏感性 I, 其中 7 株的 ATB 结果可被 E-test 法校正。未被校正的菌株中, 5 株被 E-test 法判定为 R, 7 株为 S; 而 ATB 法判定为 R 的则为 9 株, S 的为 3 株。从生物学分型来看, 被校正菌株中的 I 型菌株所占比例[71.43%(5/7)]显著高于未校正 I 型菌株[16.67%(2/12)], 差异有统计学意义($P=$ 0.037)。校正和未校正菌株间 β -内酰胺酶差异无统计学意义($P=$ 0.263)。

3 讨论

临床工作中, 由于大多自动化药物敏感性鉴定试剂厂家提供的反应孔内抗菌药物浓度是固定的, 同一

种抗菌药物包括 1 个低浓度孔(用于 S 的判读)和 1 个高浓度孔(用于耐 R 的判读),有的仅有 1 个判读 S 的浓度孔,甚至与 CLSI M100-S26 文件推荐的抗菌药物折点不一致,这都暴露出 ATB 法在实际应用的缺陷。本研究 ATB 法结果显示,Hi 对氨苄西林药物敏感性结果的准确性上确实存在不足,可能对临床治疗产生误导。比如,ATB 法判定为氨苄西林 R 的菌株中有 42.00%(21/50)会带来重大误差,判定为氨苄西林 S 的菌株中有 17.09%(27/158)会带来极重大误差。目前,ATB 法联合其他药物敏感性方法纠正其对 Hi 的药物敏感性结果的参考文献较少。本研究以肉汤稀释法为参考方法,初步探讨 E-test 法对 ATB 法药物敏感性结果的校正作用。

结果显示,与肉汤稀释法相比,E-test 法和 ATB 法的一致率均为 70.48%,两者联合可将检测的一致率提高至 87.67%,显著高于 ATB 法($\chi^2 = 20.247$, $P < 0.001$);ATB 法的重大误差率(42.0%)显著高于 E-test 法(6.0%)(Fisher 的精确检验, $P = 0.002$)。E-test 法可校正 ATB 法 71.43% 的重大误差、62.96% 的极重大误差以及 6.84% 的次要误差。统计学分析表明,如果 ATB 法判定为氨苄西林敏感的菌株,一定要做 β -内酰胺酶分析,对于 β -内酰胺酶阳性菌株建议采用 E-test 法进行校正,而且 80.0%(12/15)的结果最终可被确认。

被肉汤稀释法判定为 I 的 19 株菌株中,ATB 法判定为 R 的占 63.2%(12/19),而 E-test 法判定为 R 的仅占 26.3%(5/19),二者结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。这说明,在氨苄西林药物敏感性试验中,E-test 法更容易将 Hi 中介菌株的药物敏感性表型判定为 S。这可能是 E-test 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^[11]。

目前,临床实验室对 Hi 的药物敏感性检测主要采用纸片扩散法,该方法简单易行,但需批量配制 Hi 专用的药物敏感性平板,比较适合标本量大的医院,否则平板容易失效,影响实验结果。虽然 ATB 法有一些不足,但是其操作方便,有效期更长,现在在基层医院的应用较为普遍^[12-13]。结果表明,与肉汤稀释法相比,E-test 法和 ATB 法的一致率均为 70.48%,二者的极重大误差率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.604$, $P = 0.437$),这说明 ATB 法的结果较为可信,而且不同生物学分型菌株之间的药物敏感性结果差异无统计学意义($P > 0.05$),故药物敏感性试验中可不进行菌株的生物学分型。但是,ATB 法的重大误差率(42.0%)显著高于 E-test 法(6.0%),故进一步统计分析了两种方法的重大误差率,并得出以下结论,如

果 ATB 法判定为氨苄西林敏感且 β -内酰胺酶阳性的菌株,建议采用 E-test 法进行校正。

参考文献

- [1] SONG J H, HUH K, CHUNG D R. Community-Acquired pneumonia in the Asia-Pacific region [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(6): 839-854.
- [2] 赵春江, 张菲菲, 王占伟, 等. 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): 18-22.
- [3] LESTARI E S, SEVERIN J A, VERBRUGH H A. Antimicrobial resistance among pathogenic bacteria in South-east Asia [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2012, 43(2): 385-422.
- [4] FARRELL D J, FLAMM R K, SADER H S, et al. Ceftobiprole activity against over 60,000 clinical bacterial pathogens isolated in Europe, Turkey, and Israel from 2005 to 2010 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(7): 3882-3888.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] TIAN G, ZHANG L, LI M, et al. Genotypic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric pneumonia patients in Chengdu city, Sichuan, China [J]. *J Microbiol*, 2009, 47(4): 494-497.
- [9] TIAN G Z, ZHANG L J, WANG X L, et al. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in nasopharyngeal swabs by multiplex PCR [J]. *Biomed Environ Sci*, 2012, 25(3): 367-371.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S26 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2016.
- [10] 孙宏莉, 胡继红, 罗燕萍, 等. 2015 年全国 VITEK-2 细菌药敏检测系统药敏试验结果准确性调查研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(10): 2161-2165.
- [12] 陈文伟, 黄良珍, 彭钢文. 3 种方法检测白假丝酵母菌对氟康唑、伏立康唑的敏感性对比 [J]. *实用检验医师杂志*, 2016, 8(4): 202-205.
- [13] 肖亚雄, 何林波, 蒋国丹, 等. 假单胞菌和非发酵菌药敏试剂盒 ATBPSE 在临床药敏实验中的缺陷分析 [J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(18): 2640-2642.