

· 临床论著 ·

插入式E-test检测非发酵糖菌药物敏感试验的研究

高灵宝 沙鸭云 陈亚宝

【摘要】 目的 观察一种新型的梯度浓度药敏试条检测临床分离的非发酵糖革兰阴性杆菌对常用药物的敏感性。**方法** 应用8种抗生素的插入式E-test检测78株临床分离的革兰阴性非发酵菌的最小抑菌浓度(MIC)同时应用E-test纸条进行对比。**结果** 标准符合率分别是庆大霉素96.97%、阿米卡星96.97%、头孢他啶96.15%、亚胺培南98.48%、氨曲南98.48%、左氧氟沙星96.15%、复方新诺明94.87%、诺环素98.72%。**结论** 插入式E-test检测非发酵糖革兰阴性杆菌药物敏感试验与对比方法符合性良好,可以满足临床对非发酵菌的MIC检测需要。

【关键词】 非发酵糖菌; 药物敏感试验; 最小抑菌浓度

Insert E-test detection research about nonfermenting bacteria drug susceptibility testing

GAO Ling-bao, SHA Ya-yun, CHEN Ya-bao. Taizhou People's Hospital, Jiangsu 225300, China

Corresponding author: CHEN Ya-bao, Email: gxq1818@163.com

【Abstract】 Objective To observe the sensitivity of a new type concentration gradient drug sensitive test detecting drug sensitivity of isolated nonfermenting Gram-negative bacilli. **Methods** Total of 8 antibiotics inserted E-test was used for the detection of the minimum inhibitory concentration (MIC) of 78 clinical isolated Gram-negative bacilli strains of non-fermentative bacteria, and E-test strips were used for control. **Results** Standards consistent (CA) rates were as follows: gentamycin 96.97%, amikacin 96.97%, ceftazidime 96.15%, imipenem 98.48%, aztreonam 98.48%, left-ofloxacin 96.15%, compound sulfamethoxazole 94.87%, minocycline 98.72%. **Conclusion** Inserted E-test to detect the nonfermenting gram-negative bacilli drug sensitivity test and comparison of methods that are good, you can meet clinical needs for MIC testing of non-fermentative bacteria.

【Key words】 Nonfermenting bacteria; Drug susceptibility testing; MIC

非发酵糖菌是指一大群非发酵葡萄糖或仅以氧化形式利用葡萄糖的需氧或兼性厌氧无芽孢的革兰阴性杆菌,广泛存在于自然界的土壤、水、物体表面和空气中,大多为条件致病菌,常引起机会感染,随着介入性诊疗技术的开展和新型抗菌药物的使用,非发酵糖菌引起医院感染的发生率和耐药性都有增加趋势,中国主要地区14所教学医院2010年CHINET细菌耐药性监测数据显示,非发酵糖菌在革兰阴性菌中的检出率已上升到41.4%^[1];另外当CLSI标准改变时,由于产品开发和FDA审批的滞后性,采用传统的2点或3点稀释的药敏检测产品,

很难适应折点不断变化的需求。本研究应用插入式E-test检测了78株临床分离的非发酵糖革兰阴性杆菌对8种药物的敏感性。

材料与方法

一、实验材料

1. 菌株:临床78株非发酵菌均分离自本院住院和门诊患者标本,其中不动杆菌34株,铜绿假单胞菌32株,嗜麦芽窄食单胞菌11株,洋葱伯克霍尔德菌1株,质控菌株为铜绿假单胞菌ATCC27853。

2. 试剂:插入式E-test试条由安徽淮北宏远药敏试条厂生产并提供;E-test试条为AB BIOMERIEUX公司制造,上海祥和有限公司提供;MH琼脂为Oxoid公司生产,广东乐通泰公司提供。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.013

基金项目:江苏大学医学临床科技发展基金项目(No: JLY20120131)

作者单位:江苏省泰州市人民医院

通讯作者:陈亚宝, Email: gxq1818@163.com

二、方法

1. 菌液浓度配制：将纯菌悬液用0.9%氯化钠溶液调至0.5号麦氏管浊度，肺炎克雷伯菌和绿脓假单胞菌等透明黏液型菌落纯菌悬液调至1号麦氏管浊度。

2. MH平板要求：琼脂平板上皿和下皿盖好后，空间高度不低于1 cm，即下皿需高1 cm，琼脂高度为 (4.0 ± 0.5) mm，pH值为 (7.3 ± 0.1) ，平板直径90 mm。

3. 接种：将无菌无毒的拭子浸泡在接种悬浮液中，在试管内壁挤压多余的液体。在整个琼脂面上仔细划线3次，每次要将平板旋转60度，以便使接种液均匀分布在整個MH平板上。静置15~20 min，待菌液被琼脂充分吸干。

4. 药敏试条的放置：在插入药敏条时观察琼脂表面完全干燥后，用平头镊子夹住试条上部无药部分，将梳状药敏试条的梳齿垂直插入涂有待检细菌的琼脂培养基内，最大药量附着端梳齿紧贴培养皿的边缘，另一端指向培养皿中心（在90 mm 平皿上可以插入5种抗生素条，对于预期结果高度敏感的细菌，每个9 cm平板最多贴4条），作对比试验时在均匀涂布待检菌的9 cm平板上同时放置E-test试条和插入式药敏试条各1条，相距3 cm以上成平行放置。E-test塑料条按说明书贴放于平板上（若试条下看到气泡则需用镊子轻轻按压试条去除气泡），对比检测药敏试条放置如图1。

5. 孵育：普通培养箱35℃孵育16~24 h。

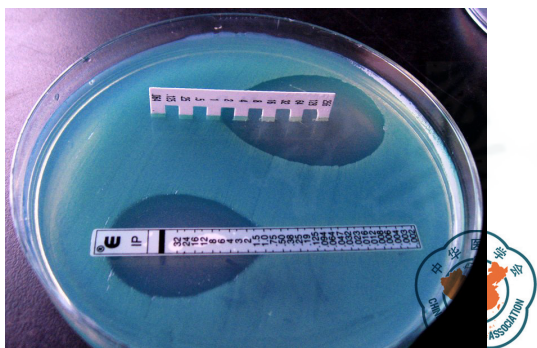


图1 插入式E-test和E-test对比检测铜绿假单胞菌对亚胺培南的MIC

6. 结果判读：在达到要求的培养时间且菌苔已有均匀显著生长时，读取抑菌圈椭圆的边与试条相交位置处的MIC值（ $\mu\text{g/ml}$ ）。如果有混合菌生长则需要将细菌分纯后重新测试，菌苔生长过多或过少也需要重新测试。

7. 药敏结果的统计标准：以E-test药敏结果为准，对插入式E-test药敏结果进行评估，两法间以严重差异（R→S）、大差异（S→R）和一般差异（R→I、S→I）、无差异作比较，计算标准符合率（CA）。E-test塑料条按照CLSI^[2]倍比稀释的浓度值判读。

结 果

一、非发酵糖菌药敏试验对比结果

本次试验共对8种常用抗生素插入式E-test应用E-test进行了对比试验，在试验中发现对所测试的78株革兰阴性非发酵糖菌药敏结果标准符合率均高于90%，总符合率达97.05%，米诺环素符合率最高达98.72%，最低的复方新诺明亦达94.87%，见表1。

二、插入式E-test药敏试条与E-test 的对比检测

插入式E-test药敏试条与E-test 的对比检测未出现大差异（标准为敏感而检测为耐药）和严重差异（标准耐药而检测为敏感）；仅出现一般差异（标准为耐药或敏感而检测为中度敏感），差异率最高的是复方新诺明（5.13%），见表2。

三、78株非发酵糖菌的分类比较

34株不动杆菌的标准符合率最高为阿米卡星（100%）、氨曲南（100%），其他药物均为97.06%；32株铜绿假单胞菌标准符合率最高为亚胺培南100%，最低是复方新诺明90.63%；11株嗜麦芽窄食单胞菌4种药物标准符合率均为100%；1株洋葱伯克霍尔德菌4种药物标准符合率为100%，见表3~5。

表1 78株非发酵糖菌药敏试验对比结果

	例数	插入式E-test敏感（例）	E-test敏感（例）	标准符合率（%）
阿米卡星	66	34	34	96.97
庆大霉素	66	22	22	96.97
头孢他啶	78	31	31	96.15
亚胺培南	66	43	43	98.48
氨曲南	66	29	29	98.48
左氧氟沙星	78	39	39	96.15
复方新诺明	78	31	31	94.87
米诺环素	78	62	62	98.72
合计	576	291	291	97.05

表2 插入式E-test药敏试条与E-test 的检测差异

	例数	无差异 (例)	一般差异 (例)	大差异 (例)	严重差异 (例)	差异率 (%)
阿米卡星	66	64	2	0	0	3.03
庆大霉素	66	64	2	0	0	3.03
头孢他啶	78	75	3	0	0	3.85
亚胺培南	66	65	1	0	0	1.52
氨基糖苷	66	65	1	0	0	1.52
左氧氟沙星	78	75	3	0	0	3.85
复方新诺明	78	74	4	0	0	5.13
米诺环素	78	77	1	0	0	1.28
合计	576	559	17	0	0	2.95

表3 34株不动杆菌应用插入式E-test与对照方法的符合率

	例数	敏感 (例)	耐药 (例)	标准符合率 (%)
庆大霉素	34	6	28	97.06
阿米卡星	34	7	25	100.00
头孢他啶	34	10	23	97.06
亚胺培南	34	17	16	97.06
氨基糖苷	34	5	28	100.00
左氧氟沙星	34	12	22	97.06
复方新诺明	34	7	25	97.06
米诺环素	34	30	4	97.06

表4 32株铜绿假单胞菌与对照方法的符合率

	例数	敏感 (例)	耐药 (例)	标准符合率 (%)
庆大霉素	32	16	15	96.88
阿米卡星	32	27	4	96.88
头孢他啶	32	18	12	93.75
亚胺培南	32	26	6	100.00
氨基糖苷	32	24	7	96.88
左氧氟沙星	32	18	12	93.75
复方新诺明	32	13	16	90.63
米诺环素	32	27	3	93.75

表5 11株嗜麦芽窄食单胞菌与对照方法的符合率

	例数	敏感 (例)	耐药 (例)	标准符合率 (%)
复方新诺明	11	11	0	100
左氧氟沙星	11	9	2	100
头孢他啶	11	3	8	100
米诺环素	11	11	0	100

讨 论

自2008年以来我国非发酵糖菌的感染主要为鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和嗜麦芽窄食单胞菌^[3], 针对嗜麦芽窄食单胞菌的感染尚缺乏特异的抗菌药物指导用药, 亦未有标准化的药物敏感试验标准, MIC的测定则成为指导临床用药的有效方案^[4]。对不动杆菌的研究者亦指出长期应用抗菌素可使细菌对药物敏感性下降^[5], 而KB法则无法检测细菌敏感性的下降, 故要求实验室提供各种药物的MIC值, 以便临床医生根据MIC结果选择可能有效的几种药物进行治疗。对广泛耐药革兰阴性杆菌感染的研究指出, 使用E-test法可以动态地观察并进一步证实糖肽-多黏菌素组合可能是治疗广泛耐药革兰阴性杆菌感染有用的治疗选择^[6]。

MIC值是非常有价值的药敏试验数值, 其为临床调整用药拟定合理抗菌方案和实施个体化用药

的依据^[7]。临床实验室测定MIC的方法有琼脂稀释法、肉汤稀释法和E-test法, 前两者操作繁琐, 不适应临床的常规开展, E-test法以其操作简便、结果可靠的优势已越来越多的被应用在苛养菌^[8]、真菌^[9]、多重耐药菌^[10]以及分枝杆菌^[11]MIC测定。插入式E-test试条是我国自主设计、专利生产并具有鲜明特色的一种梯度浓度药敏试条, 有7个梳齿, 在梳齿的上部印上用于判读最低抑菌浓度(MIC)的13列呈2倍递减的数字, 抗菌药物通过具有粘附作用的缓释剂附着在梳状药敏试条梳齿下部的两面上, 每个梳齿附着的抗菌药物量依梳齿上方的数字大小按4倍比率逐次递减, 其很好地结合了E-test^[12]的连续药物浓度分布于试条的优点, 由于插入式E-test插入琼脂中, 因此不会产生E-test平放于琼脂表面时而经常出现的空气泡; 插入式E-test试条在插入琼脂后近于一条线, 在读取抑菌圈椭圆的边与试条相交位置结果时, 相交处近似一个点, 因而更

加直观、易读。

8种抗菌药物插入式E-test试条检测非发酵糖菌MIC, 未出现大差异和严重差异, 总符合率达97.05%, 与前期的研究结果符合率相当^[13-14]。复方新诺明的符合率在8种药物的检测中偏低, 可能系细菌尤其是铜绿假单胞菌在复方新诺明药敏纸条周围二次生长, 导致肉眼判读的误差。嗜麦芽窄食单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌在研究中标符合率均为100%, 是否由于分离菌株较少的原因, 尚有待进一步收集菌株进行测试。

因为具有自主知识产权, 价格低廉, 操作简单、判读容易, 与E-test具有极高的一致性, 插入式E-test试条不但能够满足临床分离的非发酵菌检测MIC的需要, 还使得MIC常规检测在我国将成为可能, 从而更好地推动我国细菌耐药性的研究。

参 考 文 献

- 1 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2009年中国CHINET细菌耐药性监测. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5): 325-334.
- 2 Franklin R, Matthew A, Jeff A, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI, 2012, 32(3): M100-S20.
- 3 张丽, 杨文航, 肖盟, 等. 2010年度全国细菌耐药监测网报告: ICU来源细菌耐药性监测. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(1): 34-38.
- 4 Nicodemo AC, Paez JI. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(4): 229-237.
- 5 Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2007, 59: 1210-1215.
- 6 Hornsey M, Longshaw C, Phee L, et al. In vitro activity of telavancin in combination with colistin versus Gram-negative bacterial pathogens. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(6): 3080-3085.
- 7 邵海枫, 秦卫松, 李珍大, 等. E-test 法用于100株革兰阴性菌的药敏结果评价. 临床检验杂志, 1997, 15(5): 276-278.
- 8 苏丹虹, 肖庆忠, 陈树生, 等. 广州地区52株流感嗜血杆菌对6种抗生素体外抗菌活性分析-Etest法. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(1): 83-85.
- 9 Galani L, Kontopidou F, Souli M, et al. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(5): 434-439.
- 10 Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, et al. Comparative evaluation of E-test and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 698-706.
- 11 Chihara S, Smith G, Petti CA. Carbapenem susceptibility patterns for clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* determined by the E-test method. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 579-580.
- 12 Klinger BV, Stobberingh EE, MacLaren DM, et al. A multicenter survey of resistance in The Netherlands using the E-test. Diagn Microbiol Infect Dis, 1994, 19(3): 151-156.
- 13 高灵宝, 陈亚宝. 一种插入式Etest药敏试条的临床应用. 现代检验医学杂志, 2010, 25(6): 108-112.
- 14 高灵宝, 陈亚宝, 沙鸭云. 插入式E试验监测烧伤创面甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌对万古霉素敏感性的变化. 中华烧伤杂志, 2012, 28(2): 119-120.

(收稿日期: 2013-03-19)
(本文编辑: 李卓)

高灵宝, 沙鸭云, 陈亚宝. 插入式E-test检测非发酵糖菌药物敏感试验的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(5): 681-684.