

β -内酰胺酶血培养瓶对含抗菌素模拟 儿童菌血症标本的检测效能

陈楠¹, 沈永明¹, 张莹², 李国旭², 闫晓丹², 刘洋³

(1.天津医科大学儿童临床学院/天津市儿童医院检验科, 天津 300134;

2.天津医科大学研究生院, 天津 300070;

3.天津医科大学儿童临床学院/天津市儿童医院新生儿内科, 天津 300134)

摘要: 目的 研究添加 β -内酰胺酶血培养瓶对含抗菌素模拟儿童菌血症标本检测能力。方法 将培养瓶分为BD-S(BD BACTEC FX 血培养瓶)、BD-F (BD BACTEC Peds Plus 血培养瓶)、BD-SE (BD-S 添加 β -内酰胺酶)及BT-S(BacT/ALERT SA 血培养瓶)、BT-C(BACT/ALERT PF 血培养瓶)、BT-SE(BT-S 添加 β -内酰胺酶),选择儿科常见病原菌和常用抗菌素进行配对分组(金黄色葡萄球菌-青霉素钠组和大肠埃希菌-头孢唑啉钠组),将菌液、抗菌素(血药峰和中点浓度)、全血注入上述培养瓶进行培养,比较不同病原菌-抗生素分组的检出阳性率和阳性报菌时间(TTP)。结果 金黄色葡萄球菌-青霉素钠组和大肠埃希菌-头孢唑啉钠组的检出阳性率;二者血药峰浓度时,BD-F、BD-SE 均优于 BD-S,差异有统计学意义($P<0.05$);头孢唑啉钠峰浓度时,BT-C、BT-SE 优于 BT-S,差异有统计学意义($P<0.05$);二者峰和中点浓度时,BD-F 与 BD-SE、BT-C 与 BT-SE 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。TTP:二者峰和中点浓度时,BD-F、BD-SE 均优于 BD-S,差异有统计学意义($P<0.05$);BT-C、BT-SE 均优于 BT-S,差异有统计学意义($P<0.05$);青霉素钠中点浓度时,BD-SE 优于 BD-F,差异有统计学意义($P<0.05$);青霉素钠峰浓度时,BD-F 优于 BD-SE,差异有统计学意义($P<0.05$);青霉素钠峰和中点浓度时,BT-C 优于 BT-SE,差异有统计学意义($P<0.05$);头孢唑啉钠峰和中点浓度时,BT-C 与 BT-SE 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 添加了 β -内酰胺酶的培养瓶对于含抗菌素模拟儿童菌血症标本检验效能优于普通培养瓶,并且与含有树脂、活性炭的培养瓶检验效能接近。

关键词: 细菌;抗菌素; β -内酰胺酶;阳性报菌时间

中图分类号:R378.99

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2021.06.024

文章编号:1006-1959(2021)06-0093-04

The Detection Efficiency of β -lactamase Blood Culture Flasks on Bacteremia Specimens Containing Antibiotics in Children

CHEN Nan¹, SHEN Yong-ming¹, ZHANG Ying², LI Guo-xu², YAN Xiao-dan², LIU Yang³

(1.Children's Clinical College of Tianjin Medical University/Department of Laboratory Medicine,

Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China;

2.Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

3.Children's Clinical College of Tianjin Medical University/Department of Neonatology, Tianjin Children's Hospital,
Tianjin 300134, China)

Abstract: Objective To study the ability of adding β -lactamase blood culture flasks to detect bacteremia samples containing antibiotics in children. Methods The culture bottles were divided into BD-S (BD BACTEC FX blood culture bottles), BD-F (BD BACTEC Peds Plus blood culture bottles), BD-SE (BD-S with β -lactamase) and BT-S (BacT/ALERT SA blood culture bottle), BT-C (BACT/ALERT PF blood culture bottle), BT-SE (BT-S with β -lactamase), selecting common pediatric pathogens and commonly used antibiotics for pairing (Staphylococcus aureus-penicillin sodium group and Escherichia coli-cefuroxime sodium group), inject bacteria liquid, antibiotics (blood drug peak and midpoint concentration), and whole blood into the above-mentioned culture bottle for culture, compare the positive detection rate and the positive reporting time (TTP) of different pathogen-antibiotic groups. Results The positive rate of detection of Staphylococcus aureus-penicillin sodium group and Escherichia coli-cefuroxime sodium group: BD-F and BD-SE are better than BD-S at the peak blood concentration of both, the difference was statistically significant ($P<0.05$); At the peak concentration of cefuroxime sodium, BT-C and BT-SE were better than BT-S, the difference was statistically significant ($P<0.05$); At the peak and midpoint concentrations of the two, there was no statistically significant difference between BD-F and BD-SE, and BT-C and BT-SE ($P>0.05$). TTP: BD-F and BD-SE were better than BD-S at both peak and midpoint concentrations, the difference was statistically significant ($P<0.05$); BT-C and BT-SE were better than BT-S, the difference was statistically significant ($P<0.05$); At the midpoint concentration of penicillin sodium, BD-SE was better than BD-F, the difference was statistically significant ($P<0.05$); At the peak concentration of penicillin sodium, BD-F was better than BD-SE, the difference was statistically significant ($P<0.05$); At the peak and midpoint concentrations of penicillin sodium, BT-C was better than BT-SE, the difference was statistically significant ($P<0.05$); There was no statistically significant difference between BT-C and BT-SE at the peak and midpoint concentrations of cefuroxime sodium ($P>0.05$). Conclusion The test efficiency of culture flasks with β -lactamase added is better than that of ordinary culture flasks for bacteremia samples containing antibiotics, and is similar to that of culture flasks containing resin and activated carbon.

Key words: Bacteria; Antibiotics; β -lactamase; Positive reporting time

基金项目:天津市科技局科技基金项目(编号:2014KZ031)

作者简介:陈楠(1981.6-),女,天津人,本科,主管技师,主要从事临床微生物相关研究及耐药监测工作

通讯作者:刘洋(1978.10-),男,天津人,博士,副主任医师,主要从事新生儿感染及免疫相关疾病、出生缺陷的防治工作

脓毒症(sepsis)是导致全球范围内成人和儿童死亡的主要原因之一^[1],其发病率和病死率在新生儿和儿童中最高,并且在过去几十年没有显著下降^[2,3]。调查显示^[4],儿童脓毒症在儿科重症病房的发病率为8.2%,住院病死率达25%,细菌约占病原的55%。关于脓毒症处理的指南,几乎都强调了在使用抗菌素之前采集血液进行血液培养的重要性^[5],但超过40%的住院患者采血培养前应用了抗菌素^[6],约20%患者在入院时已经使用口服抗菌素^[7],儿科诊疗水平的差异及抗菌素的不合理应用,使得上述现象在儿科尤为突出。目前,常采用含有树脂或活性炭的培养瓶清除血标本中的抗菌素残留提高血培养的检出阳性率,缩短阳性报菌时间(TTP),但是也存在如干扰检验结果、增加基层医疗机构运行负担等不足。由于儿童抗菌素选择以 β -内酰胺类抗菌素为主,本研究通过对比三种不同血培养瓶对含抗菌素模拟菌血症标本的检测能力,验证添加 β -内酰胺酶的培养瓶用于儿童菌血症检测的可行性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 参考既往研究^[8-10],选用有代表性的临床常见病原菌种,获得标准菌株。革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 (天津市临床检验中心);革兰氏阴性菌:大肠埃希菌 ATCC 25922(天津市临床检验中心)。全血为健康人群的志愿献血,献血前2周末应用抗菌素。

1.2 仪器与试剂 美国 BD 公司 BACTECTM 9240 全自动血液培养系统及其配套需氧微生物培养瓶[BD BACTECTM Peds PlusTM/F Culture Vials (BD-F瓶)],标准需氧微生物培养瓶 [BD BACTECTMTM FX(BD-S瓶)];法国梅里埃公司 BACT/ALERT 3D 全自动细菌及分枝杆菌培养监测系统,及其配套需氧和兼性厌氧微生物培养瓶[BACT/ALERT®PF(BT-C瓶)],标准需氧微生物培养瓶 [BacT/ALERT SA (BT-S瓶)]。本研究使用的每种培养瓶均为同一批次、且在有效期内。参考既往报道选择临床常用抗菌素^[11,12]:注射用青霉素钠(哈药集团制药总厂,批号:18020608-1,80万U/支);注射用头孢呋辛钠(75万U/6ml/支,丽珠集团丽珠制药厂,批号:J180201)。 β -内酰胺酶:青霉素酶(600万U/2ml/支,中国食品药品检定研究院,批号130441-201907);头孢菌素酶(200万U/支,上海源叶生物科技有限公司,批号:J02M9F54980)。

1.3 方法 试验方法参考文献建立^[6,13-15],培养瓶分为BD-S瓶、BD-F瓶、BD-SE瓶和BT-S瓶、BT-C瓶、BT-SE瓶两类,按照所选菌株和抗菌素,两类培养瓶分别分成金黄色葡萄球菌-青霉素钠和大肠埃希菌-头孢呋辛钠,其中BD-SE瓶和BT-SE瓶为对照

标本分别加入10 μ l上述浓度的青霉素酶或头孢菌素酶,以达到试剂说明要求。每组重复10份。实验前,将菌株用血琼脂平板37℃隔夜传代2次,用肉汤稀释法测定其最小抑菌浓度(MIC)。将传代后的实验菌株(金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌)配制成 1.5×10^4 CFU/ml浓度备用,并用同一菌株的同一稀释菌液完成全部实验。按照药剂说明书,分别制备抗菌素制剂,青霉素钠1000 mg/L、头孢呋辛钠2500 mg/L备用; β -内酰胺酶制剂,青霉素酶7500 mg/L、头孢菌素酶5000 mg/L备用。在培养瓶中加入1 ml无菌新鲜血液,再加入10 μ l上述浓度菌悬液,使血中菌浓度达到 1.5×10^2 CFU/ml;在含抗菌素组的培养瓶中分别加入10 μ l和20 μ l上述浓度抗菌素,使抗菌素浓度分别达到药品说明书中的血药中点($C_{1/2}$)和血药峰浓度(C_{max})。将模拟标本培养瓶制备完成后,同时放入各自血液培养系统内,检测时间为120 h。培养瓶记录阳性报警时间,并涂片进行革兰氏染色。

1.4 统计学分析 本次研究所有统计分析均采用SPSS 23.0软件完成。计数资料采用(%)表示,行 χ^2 检验;计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较行配对t检验,采用析因设计的方差分析评价因素的主效应及交互作用,进一步的多重比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金黄色葡萄球菌-青霉素钠组与大肠埃希菌-头孢呋辛钠组阳性检出率比较 不同抗菌素血药浓度的阳性检出率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);随着抗菌素血药浓度的增加,不同培养瓶中阳性检出率逐渐降低;按照抗菌素血药浓度进行分层,不同培养瓶的阳性检出率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。所有培养瓶对于不含抗菌素标本的检出阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);两种抗菌素在血药峰浓度时,BD-F瓶、BD-SE瓶的检出阳性率均高于BD-S瓶,差异有统计学意义($P < 0.05$);而BD-F瓶与BD-SE瓶比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);在血药中点浓度时,BD-F瓶、BD-SE瓶与BD-S瓶检出阳性率比较,BD-F瓶与BD-SE瓶检出阳性率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。头孢呋辛钠在血药峰浓度时,BT-C瓶、BT-SE瓶的检出阳性率优于BT-S瓶,差异有统计学意义($P < 0.05$);而BT-C瓶与BT-SE瓶比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);青霉素钠在血药峰浓度时,BT-C瓶、BT-SE瓶的检出阳性率与BT-S瓶比较,BT-C瓶与BT-SE瓶比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);两种抗菌素为血药中点浓度时,BD-F瓶、BD-SE瓶的检出阳性率与BD-S瓶比较,BD-F瓶与BD-SE瓶比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1、表2。

2.2 金黄色葡萄球菌-青霉素钠组与大肠埃希菌-头孢呋辛钠组阳性检出时间比较 析因设计的方差分析显示,两组不同培养瓶、不同抗菌素血药浓度的 TTP 比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。对不含有抗菌素的标本,不同培养瓶的 TTP 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两种抗菌素在血药峰浓度和中点浓度时,BD-F 瓶、BD-SE 瓶的 TTP 均优于 BD-S 瓶,差异有统计学意义($P<0.05$);当青霉素钠在血药峰浓度时,BD-SE 瓶的 TTP 优于 BD-F 瓶,差异有统计学意义($P<0.05$);当青霉素钠在血药中点浓度时,BD-SE 瓶与 BD-F 瓶的 TT 比较,差异无统计学

意义($P>0.05$);当头孢呋辛钠在血药峰浓度和中点浓度时,BD-F 瓶与 BD-SE 瓶的 TTP 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两种抗菌素在血药峰浓度和中点浓度时,BT-C 瓶、BT-SE 瓶的 TTP 均优于 BT-S 瓶,差异有统计学意义($P<0.05$);当青霉素钠在血药峰浓度和中点浓度时,BT-C 瓶的 TTP 均优于 BT-SE 瓶,差异有统计学意义($P<0.05$);当头孢呋辛钠在血药峰浓度和中点浓度时,BT-C 瓶与 BT-SE 瓶的 TTP 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3 和表 4。

表 1 不同细菌在 BD-S、BD-F 与 BD-SE 的阳性检出结果

标准菌株	最小抑菌浓度($\mu\text{g/ml}$)	抗菌素	抗菌素浓度($\mu\text{g/ml}$)	阳性检出结果		
				BD-S	BD-F	BD-SE
金黄色葡萄球菌	0.5	青霉素钠	0	10	10	10
			10	6	9	9
			20	3	9	9
大肠埃希菌	4.0	头孢呋辛钠	0	10	10	10
			25	7	9	9
			50	3	9	9

表 2 不同细菌在 BT-S、BT-C 与 BT-SE 的阳性检出结果

标准菌株	最小抑菌浓度($\mu\text{g/ml}$)	抗菌素	抗菌素浓度($\mu\text{g/ml}$)	阳性检出结果		
				BT-S	BT-C	BT-SE
金黄色葡萄球菌	0.5	青霉素钠	0	10	10	10
			10	7	9	8
			20	3	8	8
大肠埃希菌	4.0	头孢呋辛钠	0	10	10	10
			25	8	9	10
			50	3	10	9

表 3 不同细菌在 BD-S、BD-F 与 BD-SE 的阳性检出时间

标准菌株	抗菌素	抗菌素浓度($\mu\text{g/ml}$)	阳性检出时间(h)		
			BD-S	BD-F	BD-SE
金黄色葡萄球菌	青霉素钠	0	9.90±0.55	9.96±0.90	9.93±0.69
		10	23.08±0.86	13.28±0.74	12.39±0.75
		20	66.61±3.32	17.02±1.51	19.61±0.69
大肠埃希菌	头孢呋辛钠	0	5.03±0.43	5.24±0.47	5.42±0.44
		25	12.99±0.75	6.18±0.78	6.38±0.32
		50	63.02±5.36	7.55±0.79	7.82±0.26

表 4 不同细菌在 BT-S、BT-C 与 BT-SE 的阳性检出时间

标准菌株	抗菌素	抗菌素浓度($\mu\text{g/ml}$)	阳性检出时间(h)		
			BT-S	BT-C	BT-SE
金黄色葡萄球菌	青霉素钠	0	8.15±0.71	8.65±0.65	8.71±0.75
		10	20.36±0.70	13.60±0.64	15.24±0.85
		20	70.63±0.73	16.28±0.52	18.24±0.79
大肠埃希菌	头孢呋辛钠	0	5.62±0.45	5.67±0.41	5.08±0.52
		25	11.03±0.50	6.93±0.65	6.41±0.61
		50	61.25±4.02	8.02±0.66	7.85±0.62

3 讨论

2017年,世卫组织已将脓毒症列为未来十年卫生保健的重点之一^[1]。我国5岁以下儿童的主要死因中,脓毒症的死亡率不降反升,有效降低脓毒症的病死率也成为我国政府高度重视的工作。血液培养对感染性疾病的诊断、治疗和预后具有重要的临床意义。但是,我国儿科诊疗水平差异较大,儿童脓毒症病原检出率约为23.5%~82.8%^[9],且存在不同程度的不合理应用抗菌素,在获得血培养标本之前应用抗菌素,会降低标本中细菌的载量,抑制细菌的生长,最终影响血培养阳性检出率和TTP。

既往研究^[13]已经证实了在培养瓶中添加树脂、活性炭或聚美珠等抗菌素结合剂或吸附剂,可以有效中和血培养标本的抗菌素残留,提高培养阳性率,缩短TTP。然而,该方法也存在一些局限性,如活性炭的存在可能是应用革兰氏染色、直接质谱分析、分子方法和直接抗菌素敏感测试的主要限制因素。中低收入国家广泛应用该技术尚存在一定困难^[6]。研究显示^[14],美罗培南及少数头孢菌素的峰值血药浓度可能会超过树脂培养瓶的中和能力。而由于特殊的生理特点和多数抗菌素的毒副作用,儿童的抗菌治疗以头孢菌素类和青霉素类为首选^[11]。基于此,本研究通过添加可以分解头孢菌素类和青霉素类抗菌素的 β -内酰胺酶制剂的方式,实现提高血培养阳性检出率,缩短TTP的目的,为儿童脓毒症患者的诊治提供帮助。

目前,体外模拟实验评估不同培养瓶清除标本中抗菌素能力的方法已经被广泛开展^[6,13,14]。本研究分别选用具有代表性的金黄色葡萄球菌-青霉素钠、大肠埃希菌-头孢呋辛钠的组合,完成体外模拟实验。结果显示,抗菌素的残留的确降低了血培养的阳性率,延长了TTP,并且随着抗菌素浓度的增加,影响更加明显。对于青霉素钠、头孢呋辛钠两种 β -内酰胺类抗菌素,添加了树脂、活性炭及 β -内酰胺酶的三种培养瓶,均可通过清除血标本中的残留抗菌素,达到提高阳性检出率和缩短TTP的效果。在阳性检出率和TTP方面,添加了 β -内酰胺酶的培养瓶几乎达到了与添加了树脂或活性炭的培养瓶相接近的效能。因此,通过添加 β -内酰胺酶清除血培养标本内残留的 β -内酰胺类抗菌素具有一定可行性,同时也可以尝试作为树脂培养基的有益补充,为儿童脓症患者以及中低收入国家的医务人员解决血培养标本中抗菌素残留问题提供了新的选择。另外,操作中需严格遵循无菌操作,以避免在培养瓶中添加 β -内酰胺酶而导致的标本污染。

综上所述,添加了 β -内酰胺酶的培养瓶对于含抗菌素模拟儿童菌血症标本检验效能优于普通培养

瓶,并且与含有树脂、活性炭的培养瓶检验效能接近。

参考文献:

- [1]Fleischmann -Struzek C,Goldfarb DM,Schlattmann P,et al. The global burden of paediatric and neonatal sepsis:a systematic review[J].The Lancet Respiratory Medicine,2018,6(3):223-230.
- [2]Rhee C,Dantes R,Epstein L,et al.Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data,2009-2014[J].JAMA,2017,318(13):1241-1249.
- [3]Alvaromeca A,Jimenezsosa MA,Micheloud D,et al.Epidemiological trends of sepsis in the twenty-first century(2000-2013): an analysis of incidence,mortality,and associated costs in Spain[J].Population Health Metrics,2018,16(1):1-11.
- [4]Weiss SL,Fitzgerald JC,Pappachan J,et al.Global Epidemiology of Pediatric Severe Sepsis:The Sepsis Prevalence,Outcomes,and Therapies Study[J].American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine,2015,191(10):1147-1157.
- [5]Ombelet S,Barbe B,Affolabi D,et al.Best Practices of Blood Cultures in Low- and Middle- Income Countries [J].Frontiers in Medicine,2019(6):131.
- [6]Chung Y,Kim IH,Han M,et al.A comparative evaluation of BACT/ALERT FA PLUS and FN PLUS blood culture bottles and BD BACTEC Plus Aerobic and Anaerobic blood culture bottles for antimicrobial neutralization [J].European Journal of Clinical Microbiology&Infectious Diseases,2019,38(12):2229-2233.
- [7]Panday RS,Wang S,De Ven PM,et al.Evaluation of blood culture epidemiology and efficiency in a large European teaching hospital[J].PLoS One,2019,14(3):e0214052.
- [8]Fuchs A,Bielicki J,Mathur S,et al.Reviewing the WHO guidelines for antibiotic use for sepsis in neonates and children[J].Paediatrics and International Child Health,2018,38(sup1):S3.
- [9]Chen XT,Qian ST.Progress in epidemiology and etiology of pediatric sepsis[J].Chin J Pediatr,2019,57(5):380-383.
- [10]Li TH,He YX.Etiological characteristics of sepsis in children [J].Int J Pediatr,2019,46(6):440-444.
- [11]Xie XX,Yang QT,Kuang MH,et al.Analysis of the Status of Antibiotics Use of Children in China From 2004 to 2015 [J].Medical Science Journal of Central South China,2016,44 (2): 130-134.
- [12]Fan WX,Mu JJ,Song XX,et al.Investigation on Antibiotic Cognition and Use of Parents of Preschool Children in Tianjin [J].Chinese Primary Health Care,2019,33(4):65-66.
- [13]Menchinelli G,Liotti FM,Giordano L,et al.Efficient Inactivation of Clinically Relevant Antimicrobial Drug Concentrations by BACT/ALERT® or BACTEC™ Resin-Containing Media in Simulated Adult Blood Cultures [J].Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2019,63(7).
- [14]Grupper M,Nicolau DP,Aslanzadeh J,et al.Effects of Clinically Meaningful Concentrations of Anti-Pseudomonal β -Lactams on Time to Detection and Organism Growth in Blood Culture Bottles[J].Journal of Clinical Microbiology,2017,55(12): 3502-3512.

收稿日期:2020-10-20;修回日期:2020-10-30

编辑/王朵梅