

纸片扩散法在淋球菌药物敏感性检测中准确性的评价

周潜¹ 朱小宇² 朱邦勇³ 尹跃平¹ 徐文绮¹

¹ 中国医学科学院皮肤病医院(中国医学科学院皮肤病研究所), 南京 210042; ² 中国疾病预防控制中心性病控制中心, 南京 210042; ³ 广西壮族自治区皮肤病防治研究所/皮肤病医院, 南宁 530007

周潜和朱小宇对本文有同等贡献

通信作者: 徐文绮, Email: xuwq@ncstdlc.org

【摘要】 目的 评估纸片扩散法在淋球菌药物敏感性检测中的准确性。方法 选取 2021 年在广西 14 个地市的 37 家医疗机构收集的 584 株淋球菌临床分离株, 分别使用琼脂稀释法与纸片扩散法进行大观霉素、头孢曲松和头孢克肟的药物敏感性测定, 计算纸片扩散法与琼脂稀释法的一致性。结果 大观霉素、头孢曲松和头孢克肟纸片扩散法的分类一致率分别为 87.64%、83.45% 和 80.31%, 配对 χ^2 检验结果表明两种方法检测的药物敏感性结果存在显著性统计学差异 ($\chi^2=65.000, 52.128$ 和 $95.870, P$ 均 <0.001)。结论 某些厂家的纸片扩散法可能不是临床实践中筛选淋球菌耐药菌株的合适选择, 未来需要更多高准确性的纸片以实现纸片扩散法在淋球菌耐药筛查中的应用, 或使用前对不同厂家生产的纸片扩散法进行评估, 选择与琼脂稀释法一致性较好的进行测试。

【关键词】 淋病奈瑟球菌; 纸片扩散法; 琼脂稀释法; 准确性评价

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10101001-004-003)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20221201-00258

Evaluation of the accuracy of disk-diffusion testing in *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial-susceptibility testing

Zhou Qian¹, Zhu Xiaoyu², Zhu Bangyong³, Yin Yueping¹, Xu Wenqi¹

¹Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China; ²National Center for Sexually Transmitted Diseases Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210042, China; ³Guangxi Provincial Institute of Dermatology/Dermatology Hospital, Nanning 530007, China

Zhou Qian and Zhu Xiaoyu contributed equally to this article

Corresponding author: Xu Wenqi, Email: xuwq@ncstdlc.org

【Abstract】 Objective To evaluate the accuracy of disk-diffusion testing in *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial-susceptibility testing. **Methods** In 2021, 584 strains of *Neisseria gonorrhoeae* were collected from 37 medical institutions in 14 cities in Guangxi area, and the drug susceptibility of spectinomycin, ceftriaxone and cefixime was determined using agar dilution method and disk-diffusion testing. The consistency between disk-diffusion testing and agar dilution method was calculated. **Results** The concordance rates of classification by disk-diffusion testing were 87.64%, 83.45% and 80.31% for spectinomycin, ceftriaxone and cefixime, respectively. The results of paired chi-square test showed that the drug susceptibility results detected by two methods were significantly different ($\chi^2=65.000, 52.128$ and $95.870, P<0.001$). **Conclusions** Some manufacturers' disk may not be an appropriate choice for screening resistant gonorrhea strains by the disk-diffusion testing in clinical practice. More test disks with improved accuracy are needed in the future to enable the application of the disk diffusion testing in *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial-susceptibility testing. In addition, it needs to evaluate the accuracy of different disks before clinical application and select those with better agreement with agar dilution methods.

【Key words】 *Neisseria gonorrhoeae*; Disk diffusion; Agar dilution method; Accuracy evaluation

Fund program: National Science and Technology Major Project (2018ZX10101001-004-003)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20221201-00258

淋病奈瑟菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 又称淋球菌,是淋病的病原体,可通过性接触传播引起泌尿生殖道、咽部或直肠黏膜感染^[1]。根据 2016 年 WHO 发布的一项研究估计,全球 15~49 岁的成年人中有 8 690 万淋病病例^[2]。我国 2020 年报告显示,淋病年发病数居法定传染病第 4 位,达 105 160 例^[3]。抗生素是目前治疗淋球菌感染的主要手段,我国使用头孢曲松和大观霉素作为淋球菌感染的一线治疗药物,美国、欧洲和 WHO 的治疗指南推荐使用阿奇霉素和头孢曲松双重治疗^[4-6]。然而,由于淋球菌对抗生素的敏感性不断下降,多个国家已经出现了多药耐药(multiple drug resistance, MDR)淋球菌的相关报道^[7-8]。如果对淋球菌抗生素药物敏感性不能确定,可能导致患者的治疗失败或过度治疗^[9]。因此,早期快速的药物敏感性检测对淋病的治疗与适当的患者管理至关重要^[10]。

目前,琼脂稀释法是淋球菌抗生素耐药检测的“金标准”方法,可提供被测细菌直观的药物敏感性检测结果,并可同时对大量分离株进行检测,但存在操作复杂,耗时较长的局限性。纸片扩散法是一种定性的抗菌药物敏感性测定实验,可分类鉴定出耐药菌和敏感菌,于 1940 年由 Heatley 等^[11]开发用于检测金黄色葡萄球菌的青霉素耐药性。1966 年 Bauer 等^[12]将纸片扩散法应用于淋球菌耐药检测中,因此也称为 Kirby-Bauer 试验,该方法先在琼脂板表面接种从淋病患者感染部位分离的淋球菌,再将含有抗生素的纸片应用于琼脂板上进行孵育。如果抗生素抑制细菌生长或杀死细菌,在纸片周围会形成一个抑菌的圆形区域。将抑菌区域的直径与已知的抗生素敏感、中介和耐药信息数据库进行比较,可以定性区分淋球菌分离株对每种抗生素的敏感性。纸片扩散法具有耗材成本低和药物检测灵活等优点,并可以进行直接药敏试验,较琼脂稀释法更为方便快捷,但其结果容易受到商业化培养基及抗生素纸片的影响,在我国的临床应用仍需要大样本的

实验验证其准确性。

为探索纸片扩散法作为药敏检测试验在我国淋球菌药物敏感性监测中的可行性,本研究在 2020—2021 年对我国广西地区收集的淋球菌分别使用琼脂稀释法与纸片扩散法进行了 3 种抗生素的药物敏感性测定,以琼脂稀释法结果为对照,评估纸片扩散法与琼脂稀释法检测淋球菌药物敏感性的一致性。

材料与方法

一、样本来源

选取 2021 年在广西地区 14 个地市的 37 家医疗机构收集的 584 株淋球菌临床分离株,药物敏感性检测试验于广西壮族自治区皮肤病防治研究所单中心研究。所有菌株都通过选择性分离培养鉴定确定为淋球菌。本研究经中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所和中国疾病预防控制中心性病控制中心伦理委员会批准(编号:2014-LS-026)。所有菌株在药物敏感性检测之前都保存在-80℃的脱脂牛奶中。每次试验均采用 WHO 参考菌株 P、V、L、G、K 和 X 用作质量控制。

二、实验方法

1. 琼脂稀释法

采用琼脂稀释法测定淋球菌对头孢曲松、头孢克肟和大观霉素的药物敏感性。将抗生素配置成多个浓度梯度的工作液,与琼脂羊血混合培养液混合均匀后,配成含有不同药物浓度的培养基平皿。将复苏后的临床分离株研磨混匀在生理盐水中制成 1.5×10^7 CFU/mL 的菌悬液,用多点接种仪接种于药敏平板上,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 观察结果。以能抑制淋球菌生长的最小药物浓度为该药的 MIC 值^[13]。

2. 纸片扩散法

菌悬液配置过程同琼脂稀释法,用棉拭子蘸取菌液涂抹接种于琼脂羊血培养基上,待菌液干燥

后,取头孢曲松纸片(杭州滨和,30 μg),头孢克肟纸片(杭州滨和,5 μg)和大观霉素纸片(杭州滨和,100 μg)贴于培养基表面,37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后测量抑菌环直径^[13]。

三、统计学分析

根据 CLSI 标准提供的抑菌圈直径折点判定纸片扩散法检测的药物敏感性类别,使用美国临床实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 标准提供的 MIC 折点解释琼脂稀释法检测的抗生素敏感性^[14]。使用描述性统计方法计算两种 AST 测得的各抗生素敏感、低敏和耐药菌株数并计算比例。采用配对 χ^2 检验 (McNemar 检验) 比较两种体外抗菌药物敏感性试验 (antimicrobial susceptibility testing, AST) 的分类结果是否有统计学差异,使用 Kappa 一致性检验评估两种方法检测结果的一致性。以琼脂稀释法测得的各分离株对头孢曲松、头孢克肟和大观霉素的 MIC 结果为对照,计算纸片扩散法所得结果的分类一致数、重大错误数、非常重大错误数和微小错误数及比例。分类一致率指纸片扩散法与琼脂稀释法 MIC 结果之间敏感、中介和耐药结果分类一致的百分比;非常重大错误指耐药菌株被错误分类为敏感菌株;重大错误指敏感菌株被错误分类为耐药菌株;当一种方法将分离株分类为低敏而另一种方法将其定义为敏感或耐药时为微小错误^[15]。评价方法

可接受的百分比定义为分类一致率>90%,小误差率<7%。

结 果

一、纸片扩散法与琼脂稀释法的药敏结果比较

部分医疗机构未完整进行 3 种抗生素的药物敏感性对比检测,最终获得大观霉素 526 株,头孢曲松 568 株,头孢克肟 584 株。各抗生素敏感、低敏和耐药的临床分离株数见表 1。对于大观霉素,纸片扩散法直径范围在 18~36 mm,所有菌株通过纸片扩散法检测均为敏感菌,使用琼脂稀释法检测 MIC 范围为 8~64 mg/L,敏感菌为 461 株,占比 87.64%,低敏菌为 65 株,占比 12.36%。对于头孢曲松,纸片扩散法直径范围在 22~54 mm,测得敏感菌株 551 株,低敏菌株 17 株,而使用琼脂稀释法检测到敏感菌株 481 株,低敏菌株 87 株。对于头孢克肟,纸片扩散法直径范围在 18~50 mm,测得敏感菌株 473 株,低敏菌株 111 株,而使用琼脂稀释法检测到敏感菌株 578 株,低敏菌株 6 株。使用配对 χ^2 检验检测两种方法区分耐药表型之间的差异,大观霉素、头孢曲松和头孢克肟的结果均存在显著性统计学差异 ($\chi^2=65.000, 52.128$ 和 $95.870, P$ 均 <0.001)。使用 Kappa 一致性检验检测两种方法分类结果的一致性,大观霉素、头孢曲松和头孢克肟的分类结果无一致性 (Kappa 值=0.022、0.049 和 -0.002, $P=0.108、$

表 1 纸片扩散法与琼脂稀释法的淋球菌药物敏感性检测结果分类比较(株)

琼脂稀释法结果	纸片扩散法结果			合计	配对 χ^2 检验		Kappa 一致性检验	
	敏感	低敏	耐药		χ^2 值	P 值	Kappa	P 值
大观霉素					65.000	<0.001	0.022	0.108
敏感	461	0	0	461				
低敏	65	0	0	65				
耐药	0	0	0	0				
合计	526	0	0	526				
头孢曲松					52.128	<0.001	0.049	0.101
敏感	469	82		551				
低敏	12	5		17				
合计	481	87		568				
头孢克肟					95.870	<0.001	-0.002	0.883
敏感	468	110		578				
低敏	5	1		6				
合计	473	111		584				

0.101 和 0.883)。

二、纸片扩散法与琼脂稀释法的一致性评估

将各抗生素利用纸片扩散法测得的药敏结果与琼脂稀释法测得的结果进行比对,计算纸片扩散法所得结果的分类一致数、重大错误数、非常重大错误数和微小错误数及比例。对于大观霉素,分类一致率为 87.64%(461/526),在 65 株菌的药敏检测中出现微小错误,微小错误率为 12.36%(65/526)。对于头孢曲松,在 474 株菌中纸片扩散法与琼脂稀释法的分类一致,分类一致率为 83.45%(474/568),出现 94 株微小错误,占比 16.55%(94/568)。对于头孢克肟,分类一致率为 80.31%(469/584),在 115 株菌的药敏检测中出现微小错误,微小错误率为 19.69%(115/584)。

讨 论

对淋球菌药物敏感性进行及时准确的检测,对选取治疗药物以及合适的患者管理尤为重要。同时,监测临床淋球菌对不同抗生素的药物敏感性趋势,也是公共卫生机构的一项重要任务。与传统的琼脂稀释法相比,纸片扩散法所需人力与时间较低,且更容易进行。对琼脂稀释法与纸片扩散法药物敏感性差异进行评估,有助于确定纸片扩散法检测结果的可靠性和准确性,若纸片扩散法具有较高的一致性,可作为特定研究或临床实验室中的推荐药物敏感性检测方法,对及早获得准确可靠的治疗决策具有一定的意义。目前,有少量研究对纸片扩散法在头孢曲松和头孢克肟药物敏感性检测中的准确性作了评估^[16-20],但对于大观霉素,还没有大规模的比较研究。在本研究中,我们使用从中国广西地区收集的 584 株淋球菌临床分离株,评估纸片扩散法检测这 3 种抗生素药物敏感性的准确性。

在本研究中,纸片扩散法和琼脂稀释法结果存在一定差异。大观霉素、头孢曲松和头孢克肟的分类一致率分别为 87.64%,83.45%和 80.31%,微小错误率分别为 12.36%,16.55%和 19.69%,低于可接受的性能率(分类一致率>90%,微小错误率<7%)^[16]。经检索,在国内外的研究中,头孢曲松分类一致性

范围在 91.3%~100%^[17-20],Liu 等^[18]报告头孢克肟分类一致性为 89.6%。配对 χ^2 检验结果也说明纸片扩散法和琼脂稀释法结果存在一定差异。本研究中分类一致性较低的原因可能与抗生素纸片的不同厂商有关,Xu 等^[19]的研究证明不同厂商的试纸条在纸片扩散法中的应用情况不同,Oxoid、滨河和凯泰纸片检测头孢曲松的分类一致性为 71.7%,73.2%和 81.8%;检测大观霉素的分类一致性均为 100%,导致大观霉素与本研究结果差异的原因可能是使用耐药折点标准不同,Xu 等^[19]使用 EUCAST 标准将 MIC 为 64 mg/L 的分离株定义为敏感菌株,而在本研究中,大观霉素 MIC 为 64 mg/L 的分离株被定义为低敏感菌株。

在本研究中,通过纸片扩散法检测到 87 株对头孢曲松低敏的菌株,而这 87 株菌株在使用琼脂稀释法检测药物敏感性中仅有 5 株为低敏,82 株为敏感菌株。头孢克肟中也出现类似结果,111 株纸片扩散法鉴定为头孢克肟低敏的菌株使用琼脂稀释法检测中仅有 1 株表现为低敏。而在大观霉素的结果中,纸片扩散法未检测出大观霉素低敏的菌株。结果说明纸片扩散法对大观霉素中介菌株和头孢菌素敏感菌株的鉴定性能较差,其结果可能会给临床医生错误的抗生素应用建议,造成治疗失败,增加治疗成本,也可能增加抗生素的耐药性。Han 等^[21]的结果也表明纸片扩散法在淋球菌耐药性日益严重的趋势下可能不是临床实践中筛选耐头孢菌素淋病菌株的合适选择。因此,未来需要更多高准确性的纸片以实现纸片扩散法在淋球菌耐药筛查中的应用,或在使用前对不同厂家生产的纸片扩散法进行评估,以选择与琼脂稀释法一致性较好的纸片进行试验。

利益冲突 所有作者均声明无利益冲突

作者贡献声明 周潜:酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、起草文章;朱小宇:分析/解释数据、统计分析、起草文章;朱邦勇:实施研究、采集数据;尹跃平:批评性审阅、技术指导、行政支持;徐文绮:批评性审阅、技术指导、行政支持

参 考 文 献

[1] Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and

- pathogenesis[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(4): 226–240. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.169.
- [2] Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016[J]. *Bull World Health Organ*, 2019, 97(8): 548–562P. DOI: 10.2471/BLT.18.228486.
- [3] 国家卫生计生委疾病预防控制局. 2020 年全国法定传染病疫情概况[EB/OL]. [2021-03-12]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3578/202103/f1a448b7df7d4760976fea6d55834966.shtml>.
- [4] Unemo M, Ross J, Serwin AB, et al. 2020 European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults[J]. *Int J STD AIDS*, 2020: 956462420949126. DOI: 10.1177/0956462420949126.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010: Oral cephalosporins no longer a recommended treatment for gonococcal infections[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2012, 61(31): 590–594.
- [6] World Health Organization. WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*[R]. Geneva: World Health Organization, 2016.
- [7] Chen SC, Han Y, Yuan LF, et al. Identification of internationally disseminated ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain FC428, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(7):1427–1429. DOI: 10.3201/eid2507.190172.
- [8] Williamson DA, Fairley CK, Howden BP, et al. Trends and risk factors for antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Melbourne, Australia, 2007 to 2018[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(10): e01221–19. DOI: 10.1128/AAC.01221-19.
- [9] Han Y, Yin Y, Dai X, et al. Widespread use of high-dose ceftriaxone therapy for uncomplicated gonorrhea without reported ceftriaxone treatment failure: Results from 5 years of multicenter surveillance data in China[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 70(1):99–105. DOI: 10.1093/cid/ciz170.
- [10] Seña AC, Bachmann L, Johnston C, et al. Optimising treatments for sexually transmitted infections: Surveillance, pharmacokinetics and pharmacodynamics, therapeutic strategies, and molecular resistance prediction[J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(8): e181–e191. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30171-7.
- [11] Heatley NG. A method for the assay of penicillin[J]. *The Biochemical journal*, 1944, 38(1): 61–65. DOI: 10.1042/bj0380061.
- [12] Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method[J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 1966, 45(4): 493–496. DOI: 10.1128/am.13.2.279-280.1966
- [13] World Health Organization. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus [EB/OL]. [2022-12-01]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840_eng.pdf;sequence=1.
- [14] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. 31st ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.
- [15] Chen SC, Liu JW, Wu XZ, et al. Comparison of microdilution method with agar dilution method for antibiotic susceptibility test of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13:1775–1780. DOI: 10.2147/IDR.S253811.
- [16] Xu WQ, Liu JW, Zhu XY, et al. Evaluation of the accuracy of various disks and strips for rapid culture-based gonococcal antimicrobial susceptibility screening tests in China[J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 5131–5136. DOI: 10.2147/IDR.S340074.
- [17] Liao CH, Lai CC, Hsu MS, et al. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: Comparison of results using GC agar and chocolate agar[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(5): 457–460. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.01.007.
- [18] Liu H, Taylor TH Jr, Pettus K, et al. Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2016, 5: 46. DOI: 10.1186/s13756-016-0148-x.
- [19] Mal PB, Jabeen K, Farooqi J, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Pakistan by Etest compared to Calibrated Dichotomous Sensitivity and Clinical Laboratory Standards Institute disc diffusion techniques[J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 236. DOI: 10.1186/s12866-016-0707-6.
- [20] Singh V, Bala M, Kakran M, et al. Comparative assessment of CDS, CLSI disc diffusion and Etest techniques for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*: A 6-year study[J]. *BMJ Open*, 2012, 2(4): e000969. DOI: 10.1136/bmjopen-2012-000969.
- [21] Han Y, Yin YP, Xu WQ, et al. Disk-diffusion testing is an inappropriate screening tool for cephalosporin-resistant gonorrhoea strains in clinical practice in China[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 2417–2423. DOI: 10.2147/IDR.S248030.

(收稿日期:2022-12-01)