

• 论 著 •

四种方法检测替加环素对鲍曼不动杆菌药敏结果分析

杨佩红, 徐修礼[△], 刘家云, 孙怡群

(第四军医大学西京医院全军临床检验医学研究所, 西安 710032)

摘要:目的 比较四种药敏试验方法检测替加环素对鲍曼不动杆菌的敏感性。方法 将临床分离的 72 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(CRAB)分别用纸片扩散法、VITEK 2 Compact 仪器法、E-test 法、MIC 测试条(MTS)法检测其体外对替加环素的敏感性,参照美国食品药品监督管理局(FDA)的折点判断,分析四种药敏试验方法之间的差异性。结果 72 株 CRAB 纸片扩散法的敏感性、中介率、耐药率分别为 50.00%、48.61%、1.39%;VITEK 2 Compact 仪器法的敏感性、中介率、耐药率分别为 69.44%、29.17%、1.39%;E-test 法的敏感性、中介率、耐药率分别为 36.11%、26.39%、37.50%;MTS 法的敏感性、中介率、耐药率分别为 98.61%、1.39%、0.00%。与 MTS 法比较,E-test 法、纸片扩散法、VITEK 2 Compact 仪器法的分类一致率分别为 36.11%、51.39%、70.83%。结论 对 CRAB 菌株,不同药敏试验方法之间存在差异,E-test 法、纸片扩散法与 MTS 法之间的一致性较低。CRAB 菌株纸片扩散法、VITEK 2 Compact 仪器法、E-test 法检测中介或耐药菌株需用 MTS 法或肉汤稀释法确认。

关键词:替加环素; 鲍曼不动杆菌; 药敏试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)09-1198-03

Analysis on results of four kinds of method in susceptibility testing of tigecycline against *Acinetobacter baumannii*

YANG Peihong, XU Xiuli[△], LIU Jiayun, SUN Yiqun

(Institute of Clinical Laboratory Medicine, Xijing Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: **Objective** To compare the sensitivity of four kinds of drug susceptibility test method in detecting sensitivity of tigecycline against *Acinetobacter baumannii*. **Methods** The susceptibility of 72 clinically isolated strains of carbapenemase-resistant *Acinetobacter baumannii*(CRAB) to tigecycline in vitro was detected with disk diffusion method, VITEK 2 Compact system, E-test and MIC test strip(MTS) test strip respectively, according to FDA standards, and the differences of four kinds of drug susceptibility test methods were compared. **Results** The susceptibility rates of 72 strains of CRAB to tigecycline by disk diffusion method, VITEK 2 Compact system, E-test and MIC test strip were 50.00%, 69.44%, 36.11% and 98.61% respectively, the intermediate rates were 48.61%, 29.17%, 26.39% and 1.39% respectively, the resistant rates were 1.39%, 1.39%, 37.50% and 0.00% respectively. Compared with MTS, the classification consistency rates of E-test, disk diffusion method and VITEK 2 Compact system were 36.11%, 51.39% and 70.83% respectively. **Conclusion** There is difference among four kinds of method for conducting the drug susceptibility testing of tigecycline against CRAB, the consistency of disk diffusion method, VITEK 2 Compact system and E-test is lower. Detecting mediation or drug resistant strains of CRAB by disk diffusion method, VITEK 2 Compact system and E-test needs to be verified by MTS or Broth dilution method.

Key words: tigecycline; *Acinetobacter baumannii*; bacterial susceptibility testing

近年来,多重耐药菌在院内感染中呈日趋增长的趋势,其耐药性及顽固的定植性,给临床治疗及感染控制带来巨大的挑战。有研究证明,替加环素对临床棘手的多重耐药菌,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)、鲍曼不动杆菌、产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌均有较好的体外抗菌活性^[1-2]。替加环素因其具有广谱抗菌活性被临床用于重症感染的治疗中,但替加环素理化性质不稳定,导致该药的体外敏感性检测存在较多的难点和操作误区^[3]。为了探讨不同药敏试验方法之间的差异性,本文选择了 72 株对碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌,分别采用纸片扩散法、VITEK 2 Compact 仪器法、E-test 法和 MIC 测试条(MTS)法进行替加环素体外药敏试验,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2013 年 8 月至 2014 年 5 月院内感染非重复的耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(CRAB)72 株。标准质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922 用于替加环素药敏纸片、E-test

法、MTS 法、VITEK2 AST-GN16 卡常规质控。

1.2 仪器与试剂 全自动细菌鉴定与药敏分析仪 VITEK2 Compact 购于法国生物梅里埃公司。MH 培养基购于温州康泰生物公司(进口分装美国 BD 公司 MH 琼脂干粉),批号 2296146,有效期至 2017 年 7 月。药敏试验纸片、纸条或板卡:替加环素药敏纸片购于意大利 Liofilchem 公司,批号 042814069;E-test 条购于法国梅里埃公司,批号 1001744730;MTS 条购于意大利 Liofilchem 公司,批号 031113033;VITEK2 AST-GN16 卡购于法国梅里埃公司,批号 113272640。

1.3 折点标准 MIC 结果参照 FDA 标准, MIC $\leq$ 2 mg/L 为敏感(S), 4 mg/L 为中介(I), $\geq$ 8 mg/L 为耐药(R)。纸片法参照 Jones 标准,抑菌圈直径 $\geq$ 16 mm 为 S, 13~15 mm 为 I, $\leq$ 12 mm 为 R^[3-4]。

1.4 数据分析 基本一致率(EA):两种方法检测的 MIC 值相同或相差 $\pm$ 1 个稀释度;分类一致率(CA):按相同折点标准,

S、I、R 一致的菌株比例;小误差(mE):菌株在同一折点判定标准下,被评估方法将中介判定为敏感或耐药;大误差(ME):使用同一折点判定标准,被评估方法将敏感判定为耐药,即“假耐药”;重大误差(VME):使用同一指点判定标注,被评估方法将耐药判定为敏感,即“假敏感”。CLSI 规定可接受的误差范围:CA 和 EA≥90%,VME≤1.5%,ME≤3%,mE≤10%。

2 结 果

2.1 四种药敏试验方法检测 CRAB 对替加环素敏感性的分布 72 株 CRAB 菌株,MTS 法的敏感率最高,占 98.6%(71/72);纸片扩散法的中介率最高,占 48.6%(35/72);E-test 法的耐药率最高,占 37.5%(27/72)。四种药敏试验方法检测 CRAB 对替加环素敏感性的分布见表 1。

表 1 四种药敏试验方法检测 CRAB 对替加环素敏感性分布[n(%)]

药敏方法	敏感	中介	耐药
纸片法	36(50.00)	35(48.61)	1(1.39)
仪器法	50(69.44)	21(29.17)	1(1.39)
E-test 法	26(36.11)	19(26.39)	27(37.50)
MTS 法	71(98.61)	1(1.39)	0(0.00)

2.2 三种药敏试验方法检测 CRAB 对替加环素的 MIC 比较 仪器法检测 CRAB 对替加环素的 MIC₅₀、MIC₉₀ 分别为 2.0、4.0 mg/L;E-test 法检测 CRAB 对替加环素的 MIC₅₀、MIC₉₀ 分别为 6.0、16.0 mg/L;MTS 法检测 CRAB 对替加环素的 MIC₅₀、MIC₉₀ 分别为 1.5、2.0 mg/L。三种药敏试验方法检测 CRAB 对替加环素的 MIC 比较见表 2。

表 2 三种药敏试验方法检测 CRAB 对替加环素的 MIC 比较(mg/L)

药敏方法	MIC 范围	MIC ₅₀	MIC ₉₀
仪器法	0.5~8.0	2.0	4.0
E-test 法	0.25~256	6.0	16.0
MTS 法	0.19~4.0	1.5	2.0

2.3 药敏试验方法的误差统计学分析 以 MTS 法为参考方法,按照 FDA 判断标准,仪器法、E-test 法的基本一致率(EA)分别为 86.11%、37.50%;纸片法、仪器法、E-test 法的分类一致率(CA)分别为 51.39%、70.83%、36.11%;三种药敏方法均无重大误差(VME);纸片法、仪器法、E-test 法的大误差(ME)分别为 1.39%、1.39%、48.61%;纸片法、仪器法、E-test 法的小误差(mE)分别为 1.39%、0.00%、1.39%。纸片法、仪器法、E-test 法与 MTS 法检测 CRAB 对替加环素敏感性的方法学误差比较见表 3。

表 3 纸片法、仪器法、E-test 法与 MTS 法检测 CRAB 对替加环素敏感性的方法学误差比较(%)

药敏方法	EA	FDA 折点判断			
		VME	ME	mE	CA
纸片法	—	0.00	1.39	1.39	51.39
仪器法	86.11	0.00	1.39	0.00	70.83
E-test 法	37.50	0.00	48.61	1.39	36.11

注:—表示无数据。

3 讨 论

3.1 替加环素药敏试验影响因素 纸片扩散法,文献报道主要受培养基的品牌、配制时间、药敏纸片的避光保存等因素的影响^[3,5]。本实验室 MH 培养基为进口分装美国 BD 公司 MH 琼脂干粉,且每周配制 1 次,药敏纸片储存用-40℃冷冻,取出 1 周用量的纸片用锡纸包裹放 4℃冷藏,在试验过程中尽量减少这些影响因素的干扰。仪器法、E-test 法、MTS 法要在药敏板素质控合格的基础上进行 CRAB 菌株的检测,还应注意 E-test 法、MTS 法检测结果的正确判读。肉汤稀释法目前被认为是检测替加环素体外药物敏感性的金标准,但因其母液配制过程的严格避光要求及操作繁琐不易在常规工作中开展^[3];也有学者研究证实,替加环素液体制剂形式在实验室和临床操作过程中无须严格避光,日光光源可直接作为照明光源^[6]。这些有争议的影响因素,仍需进一步的试验验证。

3.2 鲍曼不动杆菌替加环素药敏试验不同方法之间的结果分析 72 株 CRAB 菌株,不同的药敏试验方法中,敏感率最高的是 MTS 法(98.61%),其次是仪器法(69.44%)、纸片法(50.00%)、E-test 法(36.11%);中介率最高的是纸片法(48.61%),其次是仪器法(29.17%)、E-test 法(26.39%)、MTS 法(1.39%);耐药率最高的是 E-test 法(37.50%)、其次是纸片法(1.39%)、仪器法(1.39%)。三种药敏试验方法(仪器法、E-test 法、MTS 法)检测 CRAB 对替加环素的 MIC,MTS 法的 MIC₅₀、MIC₉₀ 分别为 1.5、2.0 mg/L,明显低于仪器法(2.0、4.0 mg/L)、E-test 法(6.0、16.0 mg/L)。由此可见,CRAB 菌株替加环素药敏试验,不同方法学之间存在一定的差异性。

3.3 替加环素不同药敏试验方法间的差异性分析 专家共识中推荐以肉汤稀释法为参考方法,同时也确定 MTS 法与肉汤稀释法有很好的重复性^[3]。故本研究的实验数据分析以 MTS 法为参考,参照 FDA 折点判断,比较纸片法、E-test、仪器法三种药敏试验方法的一致率与误差率。基本一致率的比较,仪器法(86.11%)明显高于 E-test 法(37.50%);分类一致率的比较,仪器法(70.83%)也明显高于纸片法(51.39%)、E-test 法(36.11%)法;大误差的发生率,E-test 法(48.61%)明显高于纸片法(1.39%)、仪器法(1.39%);小误差的发生率,三种药敏试验方法均<1.5%;三种药敏方法均无重大误差的发生。在临床 CRAB 菌株替加环素药敏试验方法的选择上,MTS 法操作简便且准确性好,但受到检测成本的制约,很难作为常规方法推广。纸片法虽然具有操作简便的优点,但因其受到诸多因素的影响,故不被推荐纸片法检测替加环素的药物敏感性^[7]。本文纸片法与 MTS 法的分类一致率也仅有 51.39%,CRAB 药敏处于中介的数据必须用其他方法确认。E-test 与 MTS 法的基本一致率和分类一致率均<40%,且大误差(假耐药)的发生率也接近 50%。有文献显示,E-test 法检测鲍曼不动杆菌的 MIC 值高于肉汤稀释法检测结果,容易出现假耐药^[8-9];王琪等^[10]的研究显示,替加环素 E-test 方法的耐药率比 AST-GN16 药敏卡方法稍低。E-test 法在不同文献报道中存在争议,需进一步验证。因此,不建议临床选择该法做 CRAB 菌株的替加环素药敏试验。有文献报道,AST-GN16 卡检测替加环素的敏感性,其 MIC 值高于肉汤稀释法^[9]。但陈兢兢等^[11]的研究却表明,AST-GN16 卡检测鲍曼不动杆菌的敏感率却高于肉汤稀释法,与国外研究有所不同^[12]。但本院替加环素药敏试验数据显示,仪器法与 MTS 法的基本一致率和分类一致率均>70%,且误差的发生率均<1.5%。因此,在药敏板卡质控

合格的前提下,AST-GN16 卡可用于替加环素的常规药敏检测,但中介或耐药数据仍需其他方法确认。

总之,72 株 CRAB 菌株替加环素药敏以 MTS 法评估,充分体现了替加环素良好的体外抗菌活性,但各种药敏试验方法学的影响因素及差异性必定会影响替加环素药敏检测结果的准确性。因此,替加环素药敏试验的操作一定要严格按照专家共识操作规范执行,对于纸片法、仪器法、E-test 法出现中介或耐药的菌株,应以 MTS 法或肉汤稀释法确认。

参考文献

[1] 余巧珍,朱恒光. 替加环素对临床多重耐药菌的体外药敏结果的分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(21):2991-2992.

[2] 贺毅,吴伟元,陆坚,等. 替加环素、米诺环素、多黏菌素 B 对碳青霉烯类敏感性降低和不敏感鲍曼不动杆菌体外抗菌活性[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(1):42-46.

[3] 王辉,俞云松,王明贵,等. 替加环素体外药敏试验操作规程专家共识[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(7):584-587.

[4] Jones RN,Ferraro MJ,Reller LB,et al. Multicenter studies of tigecycline disk diffusion susceptibility results for *Acinetobacter* spp[J]. J Clin Microbiol,2007,45(1):227-230.

[5] 崔俊昌,宋秀杰. 不同 MH 琼脂对于替加环素对鲍曼不动杆菌药敏结果的影响[J]. 中国药物应用与监测,2012,9(2):84-86.

[6] 陈乐华,李梅梅,李斌,等. 日光灯光照对替加环素活性及体外药敏试验结果的影响[J]. 中国抗生素杂志,2016,41(4):301-304.

[7] Tas T,Kocoglu E,Mengelglu Z,et al. Investigation of in-vitrosusceptibility of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens to tigecycline[J]. Bosn J Basic Med Sci,2013,13(4):266-270.

[8] 杜小幸,王海萍,傅鹰,等. 不同药敏方法检测替加环素对鲍曼不动杆菌敏感性的比较[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(7):598-603.

[9] Casal M,Rodriguez F,Johnson B,et al. Influence of testing methodology on the tigecycline activity profile against presumably tigecycline-non-susceptible *Acinetobacter* spp [J]. J Antimicrob Chemother,2009,64(1):69-72.

[10] 王琪,胡燕燕,张嵘,等. 临床常见革兰阴性杆菌对替加环素的药敏情况分析[J]. 现代检验医学杂志,2016,(1):8-11.

[11] 陈兢兢,张莉滢,陈正贤. 不同药敏方法检测替加环素对耐亚胺培南鲍曼不动杆菌敏感性的比较[J]. 实用医学杂志,2014,30(12):1990-1992.

[12] Huang T D,Berhin C,Bogaerts P,et al. In vitro susceptibility of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates to tigecycline[J]. J Antimicrob Chemother,2012,67(11):2696-2699.

(收稿日期:2016-11-20 修回日期:2017-01-16)

(上接第 1197 页)

参考文献

[1] 李凤秋,杨孜,张爱青,等. 不同临床发病特征子痫前期孕妇胎盘组织中 LCHAD 表达与氧化应激、炎症反应及血清游离脂肪酸和甘油三酯水平的相关性[J]. 中华妇产科杂志,2015(2):92-100.

[2] 邹艳芬,孙丽洲. 子痫前期发病中长链非编码 RNA 与氧化应激的关系[J]. 江苏医药,2015,41(11):1306-1308.

[3] 彭聪. 孕妇血清、脐血及胎盘组织中髓过氧化物酶水平和子痫前期发病的关系[J]. 临床和实验医学杂志,2016(3):270-272.

[4] 李爱金,章伟丽,陈再玲,等. 子痫前期胎盘组织氧化应激和炎症反应状态及与新生儿预后的关系[J]. 实用医学杂志,2013,29(20):3365-3367.

[5] 盛佳佳,刘雨生,吴莉,等. 子痫前期患者外周血中 Th17、Treg 细胞变化及意义[J]. 临床输血与检验,2013,15(1):7-10.

[6] 李巍,王晓艳,石玉芬. Th17/Treg 平衡在子痫前期发病中的变化及 IL-21、TGF-β 对其调节作用的研究[J]. 中国计划生育学杂志,2016,24(2):114-117.

[7] 杨孜,张为远. 剖析子痫前期发病的多因素拓宽临床实践研究的多视角[J]. 中华妇产科杂志,2015,50(10):734-739.

[8] 李再. 子痫前期的相关临床风险因素与孕期肥胖[J]. 医

学美学美容,2015(5):191-192.

[9] 张连英,傅珂,何英杰,等. 妊娠期高血压患者血管内皮细胞功能和氧化应激水平的变化[J]. 疑难病杂志,2014(8):852-854.

[10] 徐霞,张延珍,王慧兰,等. 子痫前期并发脏器受累的孕妇血清及胎盘氧化应激损伤水平研究[J]. 国际妇产科学杂志,2016,43(1):39-42.

[11] 翁文骏,潘莉,方建培,等. 致敏小鼠调节性 T 细胞对其致敏水平及免疫功能的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版),2014,35(5):710-716.

[12] 杨越明,孙小军,许文芳. 辅助性 T 细胞 17 及调节性 T 细胞调节初治肺结核患者免疫功能的作用[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2014,41(6):378-381.

[13] 曹霞,王莲莲,梁杰. 子痫前期孕妇外周血调节性 T 细胞差异表达的临床意义[J]. 东南大学学报(医学版),2010,29(6):621-622.

[14] 马银瑶,严思萍,梁旭霞. 孕妇外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞对子痫前期的预测[J]. 现代临床医学,2013,39(2):100-103.

[15] 郭艳艳,马玉燕,张艳慧,等. Th17/Treg 平衡与正常妊娠及子痫前期关系的研究[J]. 现代妇产科进展,2011,20(12):936-939.

(收稿日期:2016-10-12 修回日期:2017-01-08)