

三种方法评估替加环素对多重耐药鲍曼不动杆菌体外药敏结果分析

代鑫露, 黄松音, 李红玉

(中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 比较3种药敏检测方法检测替加环素对多重耐药鲍曼不动杆菌敏感性的差异。方法 收集2018年临床分离耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌60株,采用MIC Test Strip(MTS)法、VITEK-2法、纸片扩散法分别检测替加环素对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的敏感性。结果 按照FDA标准,以MTS法为参考,VITEK-2法的一致率较高,纸片扩散法的一致率较低。Vitek-2法的MIC值比MTS法的MIC值低1~2个稀释度,利用MTS法检测替加环素对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药率达到23.3%,出现耐药株。结论 对于耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,Vitek-2法和纸片扩散法均不适合检测替加环素的敏感性,不能作为常规方法,需用MTS法确认。

关键词:替加环素;鲍曼不动杆菌;纸片扩散法;MIC Test Strip法(MTS法);VITEK-2法

中图分类号:R378;R446.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-7414(2020)03-103-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.03.027

Comparison of Three Susceptibility Testing Methods of Tigecycline Against Multidrug Resistant *Acinetobacter Baumannii*

DAI Xin-lu, HUANG Song-yin, LI Hong-yu

(Department of Clinical Laboratory, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Objective To study the difference of three testing methods on susceptibility results of tigecycline against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR-AB). **Methods** 60 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) strains were collected from Sun Yat-Sen Memorial Hospital. Minimum inhibitory concentration(MIC) and inhibitory zone diameters for tigecycline were determined by Vitek-2, MTS and disk diffusion methods. The results of Vitek-2 and disk diffusion methods were compared with MTS method. The differences with antimicrobial susceptibility among the three different methods were evaluated. **Results** According to FDA standard, the consistency rate of Vitek-2 method was higher than that of paper diffusion method and Vitek-2 result in MIC₉₀ in 1 dilution was lower compared with MTS. The drug resistance rate of tegacycline to carbapenems resistant *Acinetobacter baumannii* was detected by MTS method, which reached 23.3%, and drug-resistant strains appeared. **Conclusion** For routine susceptibility testing of MDR-AB on tigecycline, the disk diffusion and Vitek-2 may not be proper because of the poor correlation of results between the MTS.

Keywords: tigecycline; *Acinetobacter baumannii*; disk diffusion method; MIC test strip method; VITEK-2 method

随着抗生素的广泛使用,多重耐药鲍曼不动杆菌(multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDR-AB)日趋增多,给临床抗感染治疗带来严峻挑战^[1]。替加环素是目前为数不多的针对多重耐药鲍曼不动杆菌的抗生素之一,然而各地区敏感性差异大,不同药敏方法也存在差异,目前美国临床实验室标准化研究所(CLSI)仍无替加环素对鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)的药敏折点标准^[2]。本研究是以MIC test strip法(以下简称MTS法)为参考,分析比较替加环素不同药敏方法对MDR-AB药敏结果的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 60株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌菌株分离自2018年中山大学孙逸仙纪念医院住院病人临床标本,药物敏感试验质控菌株为大肠埃希菌(ATCC25922)。

1.2 主要试剂和仪器 替加环素药敏纸片(15 μg)购自英国OXOID公司,替加环素MIC test Strip试纸条(MTS, 0.016~256 μg/ml)购自意大利Liofichem公司, MH琼脂培养基、VITEK-2全自动微生物分析仪及配套鉴定和药敏卡均为法国梅里埃产品。

基金项目:广东省科技计划项目(项目编号2017A020215017)。

作者简介:代鑫露(1987-),女,大学本科,学士学位,主要研究方向为微生物及免疫, E-mail:443848397@qq.com。

1.3 实验方法

1.3.1 VITEK-2法: 使用VITEK-2全自动微生物分析仪及配套GN卡鉴定细菌和AST-GN16药敏卡进行药敏试验^[3]。

1.3.2 纸片扩散法: 根据CLSI推荐操作, 取0.5麦氏浊度单位的菌液均匀涂布于MH琼脂培养基上^[4], 室温放置15 min待表面干燥后将纸片替加环素药敏纸片贴于培养基表面, 35℃孵育箱培养16~18 h, 用游标卡尺量取完整抑菌圈直径。

1.3.3 MTS法: 操作同纸片扩散法, 将纸片换做MTS试纸条贴于培养基中央, 有刻度的一面朝上, 读取结果判断: 读取椭圆型抑菌圈与试纸条的交界处刻度, 即最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)^[5]。

1.4 数据分析 由于CLSI标准中还没有替加环素体外药敏试验检测的操作指南和结果判定标准, 因此参照美国食品药品监督管理局(FDA)推荐折点进行判读。MIC ≤ 2 mg/L为敏感(S), 4 mg/L为中介(I), ≥ 8 mg/L为耐药(R)。将MTS法作为参考方法比较Vitek-2法、纸片扩散法与MTS方法的一致性。分类一致性(caregorical agreement, CA)定义

表1 MTS法与Vitek-2法的MIC结果比较[株(%)]

药敏方法	与MTS法检测MIC结果相差的稀释度					
	>-2	-2	-1	0	1	2
Vitek-2法	4 (6.7)	13 (21.7)	24 (40.0)	19 (31.7)	0 (0.0)	0 (0.0)

注: 正值表示Vitek-2法的MIC值高于MTS法, 负值表示Vitek-2法的MIC值低于MTS法。

2.3 两种方法与MTS法测定结果比较 见表2。以MTS法为参考, 将其他两种方法与之比较, 按FDA标准, Vitek-2法和纸片扩散法的CA均<90%, mE均>10%, 纸片扩散法ME为1.7%, Vitek-2法的VME为1.7%, 提示Vitek-2法和纸片扩散法不适合检测替加环素的敏感性。

表2 MTS法与其他2种方法检测结果比较[株(%)]

药敏方法	CA	mE	ME	VME
Vitek-2法	36 (60.0)	23 (38.3)	0 (0.0)	1 (1.7)
纸片扩散法	22 (36.7)	37 (61.7)	1 (1.7)	0 (0.0)

3 讨论

替加环素是一种新上市的广谱抗生素, 它能有效治疗碳青霉烯耐药菌株及多种复杂耐药菌株^[7-8]。然而近些年却出现了对替加环素不敏感菌株, 甚至在一些没有使用替加环素的地区也出现了耐药, 其耐药性的发生、发展可能与这些抗生素的选择性压力有关^[9-10]。目前, 针对替加环素体外药敏试验, 不同方法、不同判定折点间存在较大的差异。因此, 本研究对临床MDR-AB用不同检测方法检测替加

为被评估方法与MTS法药敏结果判断一致的菌株百分比。非常重大误差(very major error, VME)定义为被评估方法将耐药误判为敏感, 重大误差(major error, ME)定义为被评估方法将敏感误判为耐药, 小误差(minor error, mE)定义为被评估方法将中介报告为耐药或敏感^[6]。可接受的误差范围为: CA ≥ 90%, VME ≤ 1.5%, ME ≤ 3%, mE ≤ 10%。

2 结果

2.1 三种方法测定替加环素对MDR-AB的药敏结果及MIC值分布 参照FDA判断标准MTS法对多重耐药鲍曼不动杆菌的敏感率为1.7% (1/60), 中介率为75.0% (45/60), 耐药率为23.3% (14/60), MIC50为6mg/L, MIC90为8mg/L。Vitek-2法敏感率为26.7% (16/60), 中介率为65.0% (39/60), 耐药率为8.3% (5/60), MIC50为4mg/L, MIC90为4mg/L。纸片扩散法敏感率为1.7% (1/60), 中介率为13.3% (8/60), 耐药率为85.0% (51/60)。

2.2 MTS法与Vitek-2法的MIC结果比较 见表1。按照FDA标准, Vitek-2法的MIC值较MTS法低1~3个稀释度, 易造成假敏感或假中介。

环素的药敏结果进行比较, 为本地区替加环素的体外药敏试验提供参考依据。

目前肉汤稀释法被认为是检测替加环素敏感性的金标准^[1], 但该方法操作繁琐, 不适宜临床大规模检测。Vitek-2由于自动化、高通量, 广泛应用于临床对细菌的鉴定和药敏实验。但是多项研究显示Vitek-2的鉴定效果存在一定的误差^[11-12]。熊安英等^[13]评估了Vitek-2系统对肺炎链球菌的药敏诊断价值, 与MTS法相比, 二者对青霉素MIC在0.06~1.00 mg/L的CA为100%, 但当MIC>2.00 mg/L时, CA仅为46.0%, 出现了较多的假敏感和中介现象。同样的, 黄晓春等^[14]以微量肉汤法为标准, 发现Vitek-2检测鲍曼不动杆菌对阿米卡星的敏感度出现了50%的重大误差, 提示Vitek-2在检测鲍曼不动杆菌对阿米卡星的敏感性时有局限性。本研究结果显示, Vitek-2法检测的敏感率为26.7%, 但MTS法仅为1.7%, 同时Vitek-2测得的替加环素对MDR-AB的MIC值较MTS低1~2个稀释度, 出现了较多的假敏感, 提示其对于检测替加环素的MIC值有限。分析其原因, 可能与Vitek-2的检测

原理有关, Vitek-2 是通过检测 3~4 个抗生素浓度进而预测出细菌 6 个不同的生长模式, 最终提供 6 个 MIC 值, 但这 3~4 个抗生素浓度可能并不是菌株的生长折点, 因此可能会出现假敏感现象, 另外由于 Vitek-2 采用光电比浊法进行药敏检测, 结果会存在拖尾现象, 易将中介或耐药误报为敏感或中介。这些都有可能使 Vitek-2 法的检测结果出现一定误差。

纸片扩散法操作简便且成本较低, 但易受多种因素的影响, 如接种量、抗生素含量、琼脂厚度等^[15]。潘楚芝等^[16]比较了纸片扩散法和微量肉汤稀释法检测 MDR-AB 对替加环素的敏感性, 发现二者存在较大差异, 该研究认为差异原因可能与纸片扩散法检测肠杆菌科细菌不同的折点标准有关, 并推荐当抑菌环直径 >12 mm 时判定为敏感。而目前常用的 3 种标准(美国 FDA 推荐标准、Jones 法、Kulah 法)判定敏感的标准均 >16 mm。本研究结果表明, 纸片扩散法对 MDR-AB 的耐药率、中介率上升, 敏感率下降。mE 为 61.6%, 超出了可接受范围, CA 仅为 36.7%, 一致率较低, 但多数菌株为 MTS 法敏感而纸片扩散法中介或 MTS 法中介而纸片扩散法耐药, 未出现 MTS 法耐药而纸片扩散法敏感的结果。有国内外研究^[17-18]报道纸片扩散法可能高估了替加环素的中介率和耐药率, 本文出现的 mE 为 61.6% 可能与此有关。

综上所述, 对于多重耐药鲍曼不动杆菌, Vitek-2 法和纸片扩散法均不适合检测替加环素的敏感度, Vitek-2 法和纸片扩散法测定的中介和耐药菌株仍需要用 MTS 法确认。本研究的菌株来源同一家医院且样本量少, 仍需多中心大样本的研究证实。

参考文献:

- [1] 赵和平, 王冀邯, 蒋文艳, 等. 骨科医院多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性与基因同源性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31 (5): 88-90.
ZHAO Heping, WANG Jihan, JIANG Wenyan, et al. Drug resistance and homology analysis of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in orthopaedic hospital[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31 (5): 88-90.
- [2] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识 [J]. 中国医药科学, 2012, 2(8): 3-8.
CHENG Baiyi, HE Lixian, HU Bijie, et al. Consensus of Chinese experts on diagnosis treatment and prevention of *Acinetobacter Baumannii* infection[J]. China Medicine and Pharmacy, 2012, 2(8): 3-8.
- [3] 武爱荣, 安良, 黄波, 等. VITEK-2 Compact AST-GN16 检测鲍曼不动杆菌对阿米卡星和哌拉西林-他唑巴坦药敏结果的准确性评价 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33 (6): 136-139.
WU Airong, AN Liang, HUANG Bo, et al. Evaluation of the accuracy of *Acinetobacter Baumannii*'s susceptibility to amikacin and peracillin-tarazobatam in the detection of Vitek-2 compact AST-GN16[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33 (6): 136-139.
- [4] 李春辉. MDR, XDR, PDR 多重耐药菌暂行标准定义 - 国际专家建议 [J]. 中国感染控制杂志, 2014, 13 (1): 62-64.
LI Chunhui. Interim standard definition of MDR, XDR and PDR multidrug resistant bacteria recommendations of international experts[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2014, 13 (1): 62-64.
- [5] 张华, 詹颖, 苍金荣, 等. TGC, MH 和 PB 对泛耐药鲍曼不动杆菌的体外抗菌活性观察 [J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30 (4): 93-95.
ZHANG Hua, ZHAN Jie, CANG Jinrong, et al. Antibacterial activity observation of TGC, MH and PB on the Pan-resistant *Acinetobacter Baumannii* in vitro[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30 (4): 93-95.
- [6] 何渊慧, 张凌云, 李耘, 等. 不同 Mueller-Hinton 培养基对鲍曼不动杆菌替加环素体外药敏结果的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34 (9): 1060-1063.
HE Yuanhui, ZHANG Lingyun, LI Yun, et al. Influence of different Mueller-Hinton agar on the susceptibility test methods in vitro to tigecycline of *Acinetobacter baumannii*[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2018, 34 (9): 1060-1063.
- [7] 徐春晖, 宿扬, 吕燕霞, 等. 肛周皮肤拭子细菌培养对血液病患者耐碳青霉烯类肠杆菌血流感染的预警价值 [J]. 中华血液学杂志, 2018, 39 (12): 1021-1025.
XU Chunhui, SU Yang, LÜ Yanxia, et al. Perianal swabs surveillance cultures of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) can be hints for CRE bloodstream infection in patients with hematological diseases[J]. Chinese Journal of Hematology, 2018, 39 (12): 1021-1025.
- [8] HUANG Junyun, LIU Zhiping. The first case of *Acrophialophora levis*-induced severe pneumonia: a case report and literature review[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19 (1): 843.
- [9] SADER H S, FLAMM R K, JONES R N. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011) [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76 (2): 217.
- [10] ZARKOTOU O, POURNARAS S, ALTOUVAS G, et al. Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for expanded-spectrum cephalosporin and carbapenem resistant gram negative, pathogens[J]. Clin Microbiol, 2012, 50 (11): 3747.
- [11] MUSYOKI V M, MASIKA M M, MUTAI W, et al. Antimicrobial susceptibility pattern of *Acinetobacter* isolates from patients in Kenyatta National Hospital, Nairobi, Kenya[J]. Pan Africal Medical Journal, 2019, 33: 146.
- [12] EL-BADAWY M F, ABDELWAHAB S F, AL-GHAMDI S A, et al. Characterization of phenotypic and genotypic traits of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered from a ter-

- tiary care hospital in Taif, Saudi Arabia[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 3113-3124.
- [13] 熊安英, 黄鹂, 马莉, 等. 对 VITEK2-Compact 肺炎链球菌 GP68 药敏卡的性能评估 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17 (5) : 558-561.
XIONG Anying, HUANG Li, MA Li, et al. Performance evaluation of the GP68 antibiotic susceptibility testing card in testing the susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* on VITEK 2-Compact system[J]. Chin J Infect Chemother, 2017, 17 (5) : 558-561.
- [14] 黄晓春, 陈岩, 李园, 等. VITEK 2C 检测鲍曼不动杆菌对阿米卡星体外敏感性的性能评价 [J]. 检验医学, 2013, 28 (8) : 666-670.
HUANG Xiaochun, CHEN Yan, LI Yuan, et al. Evaluation on the performance of VITEK 2C for the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* to amikacin[J]. Laboratory Medicine, 2013, 28 (8) : 666-670.
- [15] 张成, 龚雅利, 罗小强, 等. 1 310 例热力烧伤患者创面病原菌分布及耐药性分析 [J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34 (11) : 802-808.
ZHANG Cheng, GONG Yali, LUO Xiaoqiang, et al. Analysis of distribution and drug resistance of pathogens from the wounds of 1 310 thermal burn patients[J]. Chinese Journal of Burns, 2018, 34 (11) : 802-808.
- [16] 潘楚芝, 李裕军, 赵子文, 等. 纸片扩散法与微量肉汤稀释法检测鲍曼不动杆菌对替加环素体外敏感性的比较 [J]. 广东医学, 2013, 34 (14) : 2132-2135.
PAN Chuzhi, LI Yujun, ZHAO ziwen, et al. Comparison of the external sensitivity of *Acinetobacter Baumannii* to tegacyclotin detected by strip diffusion method and micro broth dilution method[J]. Guangdong Medical Journal, 2013, 34(14): 2132-2135.
- [17] LIU Jienwei, KO Wenchien, HUANG Chenghua, et al. Agreement assessment of tigecycline susceptibilities determined by the disk diffusion and broth microdilution methods among commonly encountered resistant bacterial isolates: results from the Tigecycline In Vitro Surveillance in Taiwan (TIST) study, 2008 to 2010[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56 (3) : 1414-1417.
- [18] 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, 31 (1) : 8-11.
WANG Qi, HU Yanyan, ZHANG Rong, et al. Resistance of Clinical isolated gram negative bacilli to tigecycline[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31 (1) : 8-11.

收稿日期: 2019-03-17 修回日期: 2020-02-17

(上接 96 页)

- [4] 郑光辉, 周志男, 钱玲烨, 等. 血常规参数在 SARS-CoV-2 感染确诊患者、疑似患者、甲型及乙型流感患者中诊断与鉴别诊断的意义 [EB/OL]. 国际检验医学杂志, 2020,41(8):897-901.
ZHENG Guanghui, ZHOU Zhinan, QIAN Lingye, et al. Significance of blood routine biomarkers in the diagnosis and differential diagnosis of patients with SARS-CoV-2 infection, suspected patients, and patients with influenza A and B [EB/OL]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020,41(8):897-901.
- [5] LIU Rui, HAN Huan, LIU Fang, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020 [J/OL]. Clinica Chimica Acta, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898120301121>. DOI:10.1016/j.cca.2020.03.009.
- [6] XU Xi, YU Chengcheng, QU Jing, et al. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2[J]. Eur J Nucl Med Mol I, 2020 (prepublish):1-6. doi: 10.1007/s00259-020-04735-9.
- [7] 姜楠, 唐媚, 宋燕, 等. 血细胞形态检测在血液疾病诊断中的作用 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37 (14) :1959-1960.
JIANG Nan, TANG Mei, SONG Yan, et al. Role of blood cell morphology detection in diagnosis of blood diseases [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2016,37 (14) :1959-1960.
- [8] 李永霞, 吴蔚, 杨涛, 等. 新型冠状病毒肺炎患者早期外周血白细胞分类特点 [J/OL]. 中华内科杂志, 2020,59 (5): 372-374.
LI Yongxia, WU Wei, YANG Tao, et al. Characteristics of peripheral blood leukocyte differential counts in patients with COVID-19 [J/OL]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2020,59(5):372-374.
- [9] 任红梅, 单锡峥. 中性粒细胞与淋巴细胞比值预测重症肺炎患者预后的价值 [J]. 临床肺科杂志, 2019,24(2):275-279.
REN Hongmei, SHAN Xizheng. Value of neutrophil to lymphocyte ratio in predicting the prognosis of patients with severe pneumonia [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2019,24(2):275-279.
- [10] QIN Chuan, ZHOU Luqi, HU Ziwei, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China [J]. Clinical Infectious Diseases, 2020, DOI:10.1093/cid/ciaa248.
- [11] XU Zhe, SHI Lei, WANG Yijin, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome[J]. Lancet Respir Med, 2020,8(4):420-422. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
- [12] ZHANG Jinjin, DONG Xiang, CAO Yiyuan, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. [J]. Allergy, 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14238>.
- [13] ZHANG Guqin, HU Chang, LUO Linjie, et al. Clinical features and outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China [J]. Journal of Clinical Virology, 2020.127:104364. DOI:10.1016/j.jcv.2020.104364.
- [14] LI Qilin, DING Xiuli, XIA Geqing, et al. A simple laboratory parameter facilitates early identification of COVID-19 patients[J]. medRxiv, <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.13.20022830v1>.
收稿日期: 2020-03-18 修回日期: 2020-04-19