

VITEK 2 Compact 专家系统对肠杆菌科 碳青霉烯酶耐药表型分析的问题探讨*

王 颖, 陈芳芳, 黄 梅, 奚海燕, 范 明, 邵海枫, 王卫萍

(南京总医院中心实验科, 南京 210002)

摘要:目的 评估 Vitek 2 compact 专家系统(AES)对肠杆菌科细菌碳青霉烯酶耐药表型的提示和分析的准确性,探讨弥补其不足的检测方法。方法 收集用 Vitek 2 compact 检测亚胺培南非耐药,而专家系统提示其产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌 28 株。纸片扩散法检测亚胺培南药物的敏感度;改良 Hodge 试验(MHT)筛查产碳青霉烯酶菌株;EDTA 双纸片协同试验检测金属 β -内酰胺酶;PCR 检测细菌超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和碳青霉烯酶相关耐药基因。结果 28 株菌中,均扩增出 ESBLs 相关耐药基因,其中 16 株扩增出 KPC 基因。金属酶表型皆为阴性。以碳青霉烯酶基因检测为金标准,AES 的符合率为 57.1%;纸片扩散法检测亚胺培南的符合率为 100%;MHT 的符合率为 100%。PCR 与纸片扩散法及 MHT 对碳青霉烯酶检测的结果一致,与 AES 有差异($\chi^2=10.08, P<0.05$)。结论 AES 对肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶提示不一定全部准确,存在一定的假阳性,可以采用其他方法,如简便易行的纸片扩散法或改良 Hodge 试验予以复检,以提高药敏结果的可靠性。

关键词:专家系统;碳青霉烯酶;肠杆菌科

中图分类号:R378.2;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)04-101-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.028

Discussion on the Problems of Vitek 2 Compact Advanced Expert System to Identify Carbapenemase Phenotypes in Isolates of *Enterobacteriaceae*

WANG Ying, CHEN Fang-fang, HUANG Mei, XI Hai-yan, FAN Ming,

SHAO Hai-feng, WANG Wei-ping (Clinical Center for Laboratory Medicine,

Nanjing General Hospital, PLA, Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective To explore the accuracy of Vitek 2 compact advanced expert system (AES) in indicating and analyze the carbapenemases-resisting *Enterobacteriaceae* phenotypes, and further investigate the methods to make up the AES. **Methods**

28 *Enterobacteriaceae* strains with Imipenem-Nonsusceptible by Vitek 2 compact, but AES suggested all production of carbapenemases were isolated. And imipenem susceptibility was determined by the disk diffusion method. Modified Hodge test (MHT) and the metallo- β -lactamase was detected by the double disk synergy method. Resistance genes were detected by the PCR amplification. **Results** ESBLs gene was amplified from all 28 selected strains, 16 of which was detected KPC gene, and no strain of metallo- β -lactamases-producing bacteria. With carbapenemase gene detection as the gold standard, the accuracy of AES was 57.1%. Disc diffusion method detection accuracy rate of imipenem was 100%, and for 100% of MHT accuracy. PCR amplification, MHT and the disk diffusion displayed the same result in detecting carbapenemases, but different with AES ($\chi^2=10.08, P<0.05$). **Conclusion** The indications of the presence of carbapenemases using AES was not completely correct with a certain false-positive, and it is necessary to take other methods, such as disk diffusion or MHT methods, and improve the reliability of medicine-sensitivity tests.

Keywords: advanced expert system; carbapenemase; enterobacteriaceae

VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统操作简便、功能齐全,在微生物检测领域被广泛应用。高级专家系统(advanced expert system, AES)是在 MIC 基础上,建基於国际权威文献及集团内外科研广泛全面的庞大资料库编写而成的计算机软件,是折点的补充和延伸^[1]。其对检测结果的数据分析可以警示潜在错误药敏结果,给实验结果提供菌株的表型知识及耐药机制,有利于实验室修正药

敏试验报告以更确切地反映细菌耐药情况,避免体外低浓度耐药表达而引起的治疗失败,指导临床医师更好地使用抗菌药物。目前, AES 对肠杆菌科细菌碳青霉烯酶表型的研究报道尚不多见。本研究收集经 VITEK 2 Compact 系统筛选的亚胺培南 MIC 值检测为非耐药,而 AES 提示其产碳青霉烯酶并将亚胺培南的 MIC 表型由敏感或中介修改为耐药的肠杆菌科细菌 28 株,分析其产碳青霉烯酶

* 作者简介:王 颖(1984—),女,本科,主管技师,主要从事微生物检验, E-mail: wynj0216@163.com。

通讯作者:王卫萍(1966—),女,硕士,主任技师,主要从事微生物学研究, E-mail: njglyzyjw@sina.com。

的情况,探讨 AES 检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的准确性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 均为我院 2016 年 6 月~12 月临床标本中分离的肠杆菌科细菌非重复菌株 28 株,其中肺炎克雷伯菌 16 株,大肠埃希菌 10 株,阴沟肠杆菌 2 株。入选标准为 VITEK 2 Compact 全自动分析系统 GNS-13 卡显示亚胺培南非耐药($MIC \leq 2 \mu g/ml$),而 AES 诊断其产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922,肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706,肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705。

1.2 试剂和仪器 BU-Tap 2×Master PCR Mix (Biouniquer 公司);药敏纸片,M-H 琼脂(Oxoid 公司);VITCK 2 Compact 全自动微生物分析系统(法国生物梅里埃公司);PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司);凝胶电泳图像分析系统(上海欧翔公司)。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感试验:用 K-B 法检测亚胺培南菌的抑菌圈直径。检测及判读参照美国 CLSI(2016)标准执行。

1.3.2 改良 Hodge 试验(MHT):将 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌 ATCC25922 菌悬液 1:10 稀释后涂布于 MH 琼脂平板,将美罗培南纸片贴于平板中心,用接种环挑取待测菌株,从药敏纸片边缘向平板边缘划待测菌,35℃ 培养 18~24 h。若碳青霉烯酶表型阳性则待测菌株与药物抑菌圈交界处出现矢状生长。以大肠埃希菌 ATCC25922 为指示菌株,分别以肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 和 ATCC BAA-1705 作为阴、阳性对照。

1.3.3 检测金属 β -内酰胺酶:将待测菌菌悬液调至 0.5 麦氏单位,涂布 MH 平板,分别将 2 张美罗培南纸片贴在平皿上,加入 5 μl 0.5 mol/L ED-

TA- Na_2 于任一纸片上,35℃ 培养 18~24 h,含 EDTA 纸片的抑菌圈直径较未添加者增加则判为金属酶阳性。

1.3.4 耐药基因扩增及序列分析:PCR 法扩增 ESBLs 基因(包括 blaSHV,blaTEM,blaCTX-M)和碳青霉烯酶基因(包括 blaKPC,blaIMP,blaVIM,blaSME,blaOXA-48,blaIMI/NMC,blaGES-1,blaNDM-1)。煮沸法制备细菌 DNA 模板,引物及扩增条件参见文献[2,3]。产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,所得序列与 GeneBank 数据库进行对比分析。

1.4 统计学分析 AES 与 PCR 对碳青霉烯酶检出率采用卡方检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

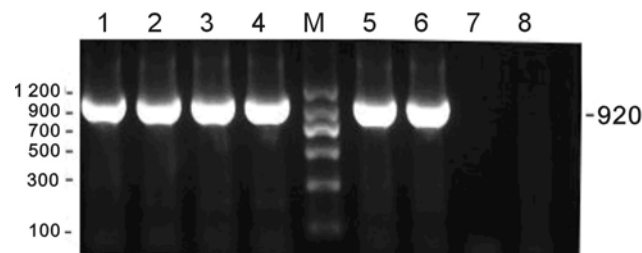
2 结果

2.1 药物敏感试验结果 28 株待测菌中,KB 法检测亚胺培南耐药肺炎克雷伯菌 13 株、大肠埃希菌 3 株。

2.2 MHT 试验 阳性 16 株,其中肺炎克雷伯菌 13 株,大肠埃希菌 3 株;金属酶表型皆为阴性。

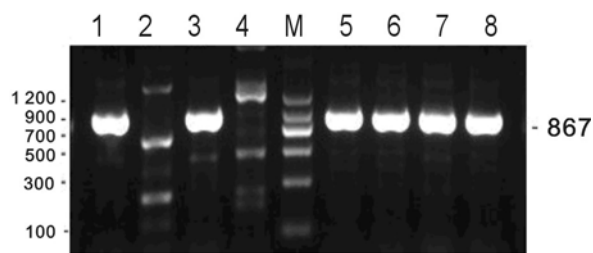
2.3 PCR 扩增耐药基因 28 株菌均未扩增出 blaIMP,blaVIM,blaOXA-48,blaIMI/NMC,blaGES-1,blaNDM 目的基因。16 株菌扩增出 KPC 基因,核苷酸序列与 GeneBank 比对分析显示均与 KPC 基因 100% 同源;所有菌株均携带 ESBLs 基因(包括 blaTEM 21 株,blaSHV 16 株,blaCTX-M 15 株)。见图 1A,1B,1C,1D。

2.4 三种检测方法的比较 见表 1。以碳青霉烯酶基因检测为金标准,28 株待测菌中,AES 检测碳青霉烯酶的符合率为 57.1%,K-B 法的符合率为 100%,MHT 的符合率为 100%。经统计学分析,AES 肠杆菌科碳青霉烯酶耐药表型分析与 PCR 检测两种方法的检出率差异有统计学意义($\chi^2 = 10.08, P < 0.05$)。



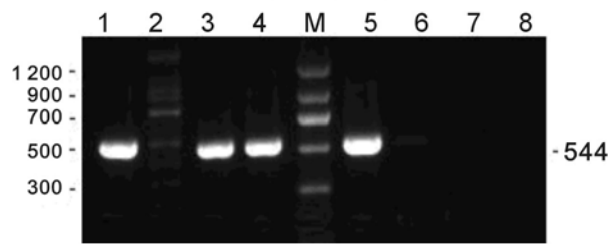
M:DNA marker;1~5:部分扩增出 blaKPC 条带实验菌株;6:K. pneumonia ATCC BAA-1705;7:K. pneumonia ATCC BAA-1706;8:E. coli ATCC 25922。

图 1A 部分扩增出 blaKPC 条带菌株电泳图



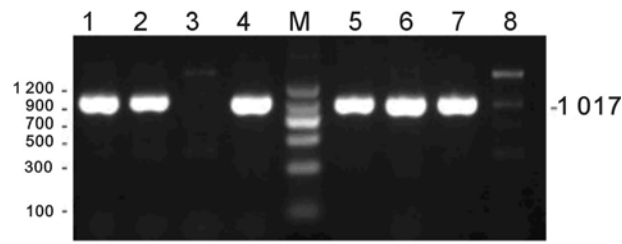
M:DNA marker;1:阳性对照菌株;2:E. coli ATCC 25922;3,5,6,7,8:部分扩增出 blaTEM 条带实验菌株;4:未扩增出 bla 条带实验菌株。

图 1B 部分菌株扩增出 blaTEM 条带电泳图



M: DNA marker; 1: 阳性对照菌株; 2: *E. coli* ATCC 25922; 3~5: 部分扩增出 blaCTX 条带实验菌株; 6~8: 未扩增出 blaCTX 条带实验菌株。

图 1C 部分菌株扩增出 blaCTX 条带电泳图



M: DNA marker; 1, 2, 4, 5, 6, 7: 部分扩增出 blaSHV 条带实验菌株; 3: 未扩增出 blaSHV 条带实验菌株; 8: *E. coli* ATCC 25922。

图 1D 部分菌株扩增出 blaSHV 条带电泳图

表 1 28 株菌基因检测结果及几种方法的检测结果的比较 (株)

KPC 基因	AES		MHT		亚胺培南 K-B 法表型		CTX-M 基因		SHV 基因		TEM 基因	
	+	-	+	-	耐药	敏感	+	-	+	-	+	-
+	16	16	0	16	0	16	4	12	12	4	12	4
-	12	12	0	0	12	0	11	1	4	8	9	3

3 讨论 碳青霉烯类药物已经作为多重耐药革兰氏阴性杆菌引起感染的首选药物使用,其对质粒介导的超广谱 β -内酰胺酶、染色体及质粒介导的头孢菌素酶均具有高度稳定性。青霉素结合蛋白是细菌细胞膜上特殊的蛋白分子,也是 β -内酰胺抗生素作用靶位,碳青霉烯类与青霉素结合蛋白紧密结合而显示出很强的杀菌活性。然而,随着碳青霉烯类抗生素在临床频繁广泛地应用,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)已经出现。传播 CRE 被认为是严重的临床威胁,因为可用于治疗由 CRE 引起的感染的抗生素非常有限。虽然肠杆菌科可以通过多种机制获得碳青霉烯类耐药性,但最重要的是产生质粒介导的碳青霉烯酶。在临床实验室中快速准确地检测 CRE 对感染的治疗和控制至关重要。然而,CRE 菌株的鉴定可能是困难的,因为一些 CRE 临床分离株表现出对碳青霉烯类的低水平耐药性或易感性^[2,3]。由于美国 CLSI 标准中亚胺培南折点的变迁,AES 对其修改率也逐渐攀升,以避免对某些可能存在碳青霉烯酶低表达菌株的漏检。针对此情况我们进行这项研究以评估 AES 修正的可靠性。

AES 通常可以通过耐药表型来推断基因型,警示潜在错误药敏结果,提供菌株的表型知识、耐药机制以及 CLSI 的指引。根据耐药表型,AES 对 MIC 结果解释进行修正,从而更好地预测“体内”治疗效果。虽然 AES 能够根据药敏实验结果对绝大多数临床致病菌的耐药表型进行准确判定,但并不是对所有结果都能给出正确的判定,特异性不够^[4,5]。我们应充分了解 AES 的功能及分析能力,不能对 AES 判定结果盲目接受,特别是对 AES 提

示修正的结果要做出自己的判断。在某些耐药表型的判定上根据实验结果验证积累一定的经验后就可对 AES 修正的结果进行再次修正。

本研究所收集的 28 株菌中有 16 株产碳青霉烯酶,均为 KPC 型,产 KPC 型碳青霉烯酶的菌株对碳青霉烯类抗生素常表现为中介或敏感性下降而并不一定耐药。其它 12 株非产碳青霉烯酶菌株均产超广谱 β -内酰胺酶。当细菌对头孢菌素类抗生素耐药不是因产碳青霉烯酶引起而是由产超广谱 β -内酰胺酶等其他方面因素所致时,AES 对这类菌株的碳青霉烯酶的检测存在一定的偏差,与李喜红等^[6]的报道相符。以 PCR 检测为金标准,准确率仅为 57.1%,差异有统计学意义。碳青霉烯酶的产生不是赋予某些抗生素降低易感性的唯一机制。亚胺培南纸片扩散法或改良 Hodge 试验对碳青霉烯酶菌株的筛查结果与 PCR 检测结果相符率较高,均为 100%。用这两种方法予以复检可以减少 AES 碳青霉烯酶检测的假阳性,增加特异性,使药敏结果更加真实可靠。尤其是多重耐药菌株,错误的药敏结果可能导致过度使用其他具有更广泛抗菌谱的抗菌药物。

本研究针对 VITEK 2 Compact 检测肠杆菌科细菌亚胺培南敏感性与 AES 不相符的现象,检测了肠杆菌科细菌中碳青霉烯酶耐药基因的存在情况,提示肠杆菌科细菌对亚胺培南药物敏感性试验结果为非耐药而 AES 提示其产碳青霉烯酶时不一定全部准确,存在一定的假阳性,可以采用其他方法,如简便易行的纸片扩散法或改良 Hodge 试验予以复检,以提高药敏结果的可靠性,为临床提供更加准确的结果。

(下转 106 页)

参考文献:

- [1] 刘杰,赵满仓,周海峰. VITEK II 全自动微生物分析系统应用问题分析[J]. 中国医疗设备, 2013, 28(9): 119-121.
Liu J, Zhao MC, Zhou HF. Analysis of application problems of VITEK II automatic microbe identification system[J]. Chinese Medical Devices, 2013, 28(9): 119-121.
- [2] Bae IK, Kang HK, Jang IH, et al. Detection of carbapenemases in clinical enterobacteriaceae isolates using the VITEK AST-N202 card[J]. Infect Chemother, 2015, 47(3): 167-174.
- [3] Pailhoriès H, Cassisa V, Lamoureux C, et al. Discordance in the minimal inhibitory concentrations of ertapenem for *Enterobacter cloacae*: Vitek 2 system versus setest and agar dilution methods[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2014(18): 94-96.
- [4] 李瑜珍,曾学辉,莫莉,等. VITEK2 Compact 全自动微生物分析仪对黏液型和非黏液型铜绿假单胞菌药敏检测评价[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(4): 121-124.
Li YZ, Zeng XH, Mo L, et al. Evaluation of drug sus-

ceptibility test to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with VITEK2 compact automatic microbiology analyzer[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(4): 121-124.

- [5] 何清雯,李彬,曹颖平,等. VITEK-2 Compact 细菌自动化鉴定与药敏仪器检测碳青耐药霉烯类肠杆菌科细菌的性能评价[J]. 福建医科大学学报, 2016, 50(2): 133-135.
He QW, Li B, Cao YP, et al. Performance evaluation of VITEK-2 compact automated systems detecting carbapenemase-resistant *enterobacteriaceae*[J]. J Fujian Med Univ, 2016, 50(2): 133-135.
- [6] 李喜红,刘盼盼,王莲慧,等. 评估纸片扩散法与 Vitek2-compact GN13 测定的肺炎克雷伯菌体外亚胺培南药敏及 AES 系统修正可靠性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(8): 615.
Li XH, Liu PP, Wang LH, et al. Evaluation of the capabilities of disc diffusion and Vitek2-compact GN13 methods for imipenem susceptibility testing and study of the reliability of advanced expert system[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2016, 36(8): 615.

收稿日期: 2017-04-05

修回日期: 2017-05-09