

VITEK 2 Compact 检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对阿米卡星药敏结果的准确性评价*

刘云, 万玉香, 马炜, 李亚周, 黄晓春, 秦琴

(海军军医大学第一附属医院实验诊断科, 上海 200433)

摘要:目的 评价 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统(简称 VITEK 2 Compact)及与之配套的 AST-GN13 卡检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对阿米卡星药物敏感性结果的准确性。方法 分别采用 VITEK 2 Compact, 纸片扩散法(K-B 法)和 E-test 法检测临床分离的 147 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对阿米卡星的敏感性。结果 147 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对阿米卡星的药敏检测中, K-B 法和 E-test 法的结果完全一致。其中, 5 株 VITEK 2 Compact, K-B 法和 E-test 法三种检测方法结果一致, 4 株均为敏感, 1 株均为耐药; 142 株 VITEK 2 Compact 和 E-test 法结果不一致, VITEK 2 Compact 结果敏感或中介, 而 E-test 法和 K-B 法结果耐药。结论 VITEK 2 Compact 在检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对阿米卡星的敏感性时会出现不准确的结果, 临床工作中需要用 K-B 法或者其他方法验证后方能报告耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对阿米卡星的药敏结果。

关键词: VITEK 2 Compact; 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 阿米卡星; 纸片扩散法; E-test 法

中图分类号: R378.996; R446.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2018)01-133-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.01.035

Evaluation on the Accuracy of VITEK 2 Compact for the Susceptibility of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* to Amikacin

LIU Yun, WAN Yu-xiang, MA Wei, LI Ya-zhou, HUANG Xiao-chun, QIN Qin

(Department of Laboratory Diagnosis,

the First Affiliated Hospital of Navy Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the accuracy of VITEK 2 Compact in the detection of the drug susceptibility of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) to Amikacin. **Methods** The susceptibility for 147 isolates of SRKP to Amikacin were detected by VITEK 2 Compact, disk diffusion method (K-B method) and E-test method, respectively. **Results** Among the 147 strains of *Klebsiella pneumoniae*, the drug susceptibility results were consistent between K-B and E-test method. Among the 5 strains, the results were totally consistent by VITEK 2 Compact, K-B method and E-test method, of which 4 strains were sensitive, 1 strains were resistant. There were 142 strains being not consistent between VITEK 2 Compact and E-test method. The results of VITEK 2 Compact were sensitive or intermediate, while E-test were drug resistance. **Conclusion** VITEK 2 Compact is not reliable for the detection of CRKP to Amikacin, which requires that K-B method or other methods should be used for the susceptibility of CRKP to Amikacin.

Keywords: VITEK 2 compact; carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae*(CRKP); amikacin; K-B method; E-test method

肺炎克雷伯菌是肠杆菌科中常见的细菌,是造成医院内感染的重要病原菌。该菌可引起原发性肺炎,还能引起各种肺外感染,包括肠炎、脑膜炎、泌尿系感染及菌血症等^[1]。近年来,随着碳青霉烯类抗生素的长期大量使用,导致耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae*, CRKP)逐年增多,给临床治疗带来极大困难,也为该菌在医院内感染的暴发流行带来隐患。

氨基糖苷类是临床上常用的一类抗菌药物,可与细菌 30s 核糖体亚单位的 16s rRNA 特异性位

点不可逆结合,干扰蛋白质合成,从而阻止细菌生长。该类抗生素抗菌谱广、疗效卓越,是一种治疗革兰阴性菌感染,尤其是医院内感染的重要抗生素^[2]。对于 CRKP 导致的感染,在治疗上可选择替加环素,和其他有体外抗菌活性的抗生素如头霉素类、 β -内酰胺类加酶抑制剂和氨基糖苷类等药物。临床医生用药方案的选择主要根据微生物室提供的体外药敏试验。因此,准确的体外药敏试验结果是临床治疗患者、控制医院感染的前提和关键。

* 基金项目:上海青年临床医技人才(临床检验专业)培养资助计划(沪卫医基【2016】04 号);上海市科委项目(17JC1400900);国家自然科学基金青年项目(31500721)。

作者简介:刘云(1984—),女,硕士,主管技师,研究方向:临床微生物检验, E-mail: liuyun1258@163.com。

万玉香(1990—),共同第一作者,女,本科,技师, E-mail: 13564570079@163.com。

通讯作者:秦琴, Email: qinq78@163.com;

黄晓春,共同通讯作者, E-mail: chunxiao_84@hotmail.com。

目前,临床实验室常采用 VITEK 2 Compact 用于微生物鉴定及其抗菌药物的药敏试验,可以在较短的时间内完成,极大地缩短了检测周期,指导临床医生合理用药,使病人得到尽快有效的治疗。但是,较短的孵育时间也可能使一些药敏结果检测不准确性的风险增加。我们在临床工作中发现:采用 AST-GN13 卡在 VITEK 2 Compact 上检测,部分 CRKP 对几乎所有抗生素耐药,但是阿米卡星敏感,采用纸片扩散法(K-B 法)检测时往往发现高度耐药(抑菌圈直径 6 mm)。所以,为了对 VITEK 2 Compact 药敏检测结果的准确性进行验证,本研究对 VITEK 2 Compact 检测 CRKP 对阿米卡星药敏结果的准确性做了系统研究。

1 材料和方法

1.1 菌株 147 株 CRKP 分离自上海长海医院 2015 年 11 月~2017 年 2 月的各种临床标本,包括尿液、分泌物、痰、灌洗液、胸腔积液、血液、坏死组织、咽拭子、囊肿液、导管等。标本分布于临床各个科室。所有菌株为非重复菌株,均经过布鲁克 MALDI-TOF 质谱仪鉴定,质控菌株为大肠埃希菌标准菌株(ATCC 25922)。

1.2 试剂与仪器 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统及其配套的 AST-GN13 药敏卡均为法国梅里埃公司产品。K-B 法试验的药敏纸片购自英国 OXOID 公司,每片药敏纸片含阿米卡星 30 μg 。E-test 药敏条购自法国梅里埃公司。药敏 M-H 平板本实验室自配。

1.3 方法 分别采用 VITEK 2 Compact, K-B 法

和 E-test 法检测 147 株 CRKP 对阿米卡星的敏感度,实验操作和结果的判读按美国临床实验室标准化协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)文件(M100-S26)^[3]进行。① VITEK 2 Compact: AST-GN13 卡对阿米卡星 MIC 的报告范围为 $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ 或 $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ 。② K-B 法: 抑菌圈直径 $\geq 17 \text{ mm}$ 为敏感, $15 \sim 16 \text{ mm}$ 为中介, $\leq 14 \text{ mm}$ 为耐药。③ E-test 法: 判断标准同 VITEK 2 Compact, MIC $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ 为耐药, MIC = $32 \mu\text{g/ml}$ 为中介, MIC $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ 为敏感。以上方法均采用标准菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)进行质量控制。

2 结果

2.1 菌株来源 147 株 CRKP 中,分离自痰或灌洗液的有 47 株、分泌物的有 40 株、尿液标本的有 26 株、引流液 9 株、血液 7 株、导管 5 株,其它标本类型 13 株(包括胸腔积液、脓液、坏死组织、穿刺液等)。呼吸道、分泌物及尿液标本来源的 CRKP 总计 113 株,占总样本数的 6.9%。147 株 CRKP 来自全院各科室。其中,烧伤科监护室及烧伤科 118 株,重症医学科 6 株、普通外科 4 株、消化科 4 株,其他科室 15 株(包括神经内科、脑血管科、器官移植科、泌尿外科等)。以上结果显示 80% 的菌株来源于烧伤科监护室及烧伤科病区,具有相对集中的趋势。

2.2 不同抗菌药物的敏感率 见表 1。147 株 CRKP 经 Vitek 2 Compact 检测不同抗菌药物的药敏试验,对阿米卡星的敏感率为 96.6%。

表 1

147 株肺炎克雷伯菌对不同抗菌药物的药敏率

抗菌药物	耐 药		中 介		敏 感	
	株数	耐药率(%)	株数	中介率(%)	株数	敏感率(%)
氨苄西林/舒巴坦	146	99.3	1	0.7	0	0
哌拉西林/他唑巴坦	144	98.0	1	0.7	2	1.3
头孢唑肟	147	100	0	0	0	0
头孢他啶	147	100	0	0	0	0
头孢吡肟	145	98.6	1	SDD	1	0.7
头孢替坦	10	6.8	17	11.6	120	81.6
氨曲南	146	99.3	0	0	1	0.7
厄他培南	147	100	0	0	0	0
亚胺培南	51	34.7	73	49.7	23	15.6
庆大霉素	137	93.2	4	2.7	6	4.1
妥布霉素	142	96.6	1	0.7	4	2.7
阿米卡星	5	3.4	0	0	142	96.6
环丙沙星	147	100	0	0	0	0
左氧氟沙星	144	98.0	3	2.0	0	0
磺唑/甲氧苄啶	145	98.6	0	0	2	1.4

2.3 阿米卡星体外药敏试验结果 147 株 CRKP

对阿米卡星体外药敏试验结果显示:采用 VITEK

2 Compact 检测,敏感菌株有 142 株,中介有 4 株,耐药有 1 株;采用 K-B 法检测敏感菌株有 4 株,耐药 143 株;K-B 法和 E-test 法药敏结果完全一致。其中,4 株经 VITEK 2 Compact 法和 K-B 法检测阿米卡星药敏结果均为敏感;1 株经 VITEK 2 Compact 法和 K-B 法检测阿米卡星药敏结果均为耐药;4 株经 VITEK 2 Compact 检测阿米卡星药敏结果为中介,K-B 法检测结果为耐药;138 株经 VITEK 2 Compact 检测阿米卡星药敏结果为敏感,而 K-B 法检测结果为耐药,见表 2。

表 2 147 株肺炎克雷伯菌对阿米卡星体外药物敏感试验结果

K-B 法	VITEK 2 Compact			合计
	敏感	中介	耐药	
敏感	4	0	0	4
耐药	138	4	1	143
合计	142	4	1	147

采用 VITEK 2 Compact 检测,阿米卡星 MIC $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ 有 33 株,其中 4 株 K-B 法敏感,29 株 K-B 法耐药;阿米卡星 MIC 为 $4 \sim 16 \mu\text{g/ml}$ 有 109 株,K-B 法均为耐药。阿米卡星 MIC 为 $32 \mu\text{g/ml}$ 有 4 株,K-B 法均耐药;阿米卡星 MIC 为 $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ 有 1 株,K-B 法亦耐药,见表 3。

表 3 147 株肺炎克雷伯菌不同 MIC 浓度下 K-B 法的检测结果

VITEK 2 Compact 法 MIC($\mu\text{g/ml}$)	K-B 法		总菌株数
	耐药	敏感	
≤ 2 (S)	29	4	33
4 (S)	60	0	60
8 (S)	26	0	26
16 (S)	23	0	23
32 (I)	4	0	4
≥ 64 (R)	1	0	1

3 讨论 肺炎克雷伯菌是临床常见的重要条件致病菌。感染肺炎克雷伯菌的患者,大部分进行过有创操作,包括气管插管、深静脉置管、胃肠减压、或者患有肠穿孔、肠梗阻等致肠道菌群可能出现明显异位的疾病^[4]。近年来,随着抗菌药物的大量使用,多重耐药的肺炎克雷伯菌不断增加,因产生碳青霉烯酶或高产 AmpC 酶等耐药机制,导致对常用的碳青霉烯类抗菌药物耐药,临床治疗难度加大,病情迁延不愈^[5~7]。这一现状越来越被临床医生、检验人员及感染控制专家所关注和重视^[8]。

本研究结果显示,呼吸道、分泌物和尿液标本中分离的 CRKP 菌株比率较高。其中,分泌物全部来自烧伤监护室和烧伤病区患者的烧伤创面,这

提示临床应进一步加强烧伤患者创面感染的控制,以减少 CRKP 感染播散引起的血流感染与脓毒症。烧伤患者 CRKP 的分离率高,与其免疫屏障受损、机体免疫力低下、气管插管、使用呼吸机等设施、长期使用抗生素和激素类药物有关。因此,烧伤病房控制感染的措施,除阶段性选择性减少碳青霉烯类抗生素的使用外,还要注意加强医疗器械的消毒,重视医护人员的无菌操作观念,以防医源性感染的出现及进一步流行。

本研究分别采用 VITEK 2 Compact, K-B 法和 E-test 法检测 147 株 CRKP 对阿米卡星的敏感性。结果显示, K-B 法和 E-test 法结果完全一致,但与 VITEK 2 Compact 法有显著差异。分析原因可能是因为肺炎克雷伯菌对阿米卡星存在诱导性耐药。采用 K-B 法检测时发现阿米卡星纸片周围出现了双圈耐药现象,即抑菌圈与纸片之间出现一个生长圈,这与鲍曼不动杆菌研究中观察到的现象很相似^[2,9]。有文献研究显示^[10~12],主要由于肺炎克雷伯菌存在氨基糖苷乙酰转移酶(AAC)耐药基因,并且该耐药基因可以被阿米卡星诱导而表达增加。因 AAC 等耐药基因的存在,氨基糖苷修饰酶的大量表达,抗生素被修饰后与细菌核糖体氨酰-tRNA 的亲合力大大减弱,失去了干扰细菌蛋白质合成的能力,使细菌对氨基糖苷类药物产生抗性。另外,由于 VITEK 2 Compact 检测周期短,CRKP 药物敏感性试验检测时间为 $6 \sim 8 \text{ h}$,并且可诱导耐药基因表达依赖特定浓度范围的阿米卡星,从而造成了 VITEK 2 Compact 检测值偏低。

阿米卡星是氨基糖苷类抗生素中抗菌活性较强的药物,其抗菌机制不同于碳青霉烯类抗生素。临床治疗 CRKP 感染时,常选择替加环素联合阿米卡星或其它体外具有抗菌活性的药物。但是,本研究中 147 株 CRKP 经 VITEK 2 Compact 检测,只有 3.4% 的菌株阿米卡星的药敏结果是准确的。VITEK 2 Compact 检测 CRKP 对阿米卡星的假敏感率非常高,尤其是在 MIC 为 $4 \sim 16 \mu\text{g/ml}$ 时,假敏感率竟达 100%。这说明 VITEK 2 Compact 检测 CRKP 对阿米卡星的敏感菌株中,大部分菌株并不是真的对阿米卡星敏感。目前我们无法根据阿米卡星的折点,判断菌株是否携带 AAC 基因,这就需要在临床工作中关注 CRKP 菌株,特别是阿米卡星特定浓度范围内药敏结果的准确度。

综上所述,本研究证实 VITEK 2 Compact 全自动细菌分析仪检测 CRKP 对阿米卡星的敏感性时结果不可靠。微生物实验室在使用该仪器检测 CRKP 对阿米卡星的药物敏感性时,需要用其他方法如 K-B 法或 Etest 法等进行验证后,方可给临床

发出最终报告。

参考文献:

- [1] 倪语星, 尚红. 临床微生物学检验[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 121-123.
Ni YX, Shang H. Clinical microbiology test[M]. 5th Ed. Beijing: People's Publishing House, 2012: 121-123.
- [2] 杨银梅, 陈斌, 彭颖仪, 等. VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统检测亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌对阿米卡星的准确性评估[J]. 检验医学, 2016, 31(10): 907-910.
Yang YM, Chen B, Peng YY, et al. Accuracy of VITEK-2 compact for the determination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* to Amikacin[J]. Laboratory Medicine, 2016, 31(10): 907-910.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Wayne, PA, CLSI M100-S26: 2016.
- [4] Vardakas KZ, Matthaiou DK, Falagas ME, et al. Characteristics, risk factors and outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in the intensive care unit[J]. J Infect, 2015, 70(6): 592-599.
- [5] 张河林, 赵飞俊, 何凤屏, 等. 2 527 株临床分离病原菌的耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 87-90.
Zhang HL, Zhao FJ, He FP, et al. Drug resistance spectrum analysis of 2 527 clinical isolates of bacteria[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(2): 87-90.
- [6] Khatri A, Naeger Murphy N, Wiest P, et al. Community-acquired pyelonephritis in pregnancy caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(8): 4375-4378.
- [7] 程莉, 谭婷婷, 魏红霞, 等. 临床分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药机制研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3): 112-114.
Cheng L, Tan TT, Wei HX, et al. Resistance mechanisms of clinical isolated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(3): 112-114.
- [8] 杨朵, 胡智颖, 辛续丽. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌中 KPC 基因分布[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(4): 465-467.
Yang D, Hu ZY, Xin XL. Prevalence of KPC gene in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Chin J Infect Chemother, 2016, 16(4): 465-467.
- [9] 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 XC, Chen Y, Li Y, 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.
- [10] Bremmer DN, Clancy CJ, Press EG, et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains that harbor AAC(6)-Ib exhibit intermediate resistance to amikacin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(12): 7597-7600.
- [11] Chiem K, Fuentes BA, Lin DL, et al. Inhibition of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-mediated amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by zinc and copper pyrithione[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9): 5851-5853.
- [12] Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, et al. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* In Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6)-Ib[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2014, 78(1): 66-69.

收稿日期: 2017-11-02

修回日期: 2017-11-24

(上接 132 页)

- [5] Dimitriades VR, Brown AG, Gedalia A. Kawasaki disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. Curr Rheumatol Rep, 2014, 16(6): 423.
- [6] 刘丽莎, 朱纯亮, 韩勃, 等. 川崎病患儿血清活化 HUVECs NF- κ B 并促进 MMP-9 分泌[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(1): 99-100.
Liu LS, Zhu CL, Han Q, et al. Serum activation of HUVECs NF- κ B and MMP-9 secretion in children with kawasaki-disease[J]. Basic & Clinical Medicine, 2015, 35(1): 99-100.
- [7] 朱纯亮, 韩勃, 韩晶晶, 等. 川崎病合并冠状动脉损伤患儿血清对脐静脉内皮细胞 NF- κ B 和 MMP-9 表达的影响[J]. 江苏医药, 2015, 41(20): 2407-2409.
Zhu CL, Han Q, Han JJ, et al. Effect of serum from kawasaki disease children with coronary artery lesions on expressions of NF- κ B and matrix metalloproteinase-9 in human umbilical with endothelial cells[J]. Jiangsu Med J, 2015, 41(20): 2407-2409.
- [8] Lee Y, Wakita D, Dagvadorj J, et al. IL-1 signaling is critically required in stromal cells in kawasaki disease vasculitis mouse model; role of both IL-1 α and IL-1 β [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(12): 2605-2616.
- [9] 靳剑芸, 李启亮, 宋文琪. 血浆血栓弹力图与抗凝血酶 III 检测对儿童川崎病诊断的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2): 130-132.
Jin JY, Li QL, Song WQ. Correlation discussion of blood plasma thromboelastography values and antithrombin III level in children's kawasaki disease[J]. J Mod Lab Med, 2017, 32(2): 130-132.
- [10] 马乐, 杜忠东. 川崎病血管内皮细胞损伤机制的研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(2): 158-160.
Ma L, Du ZD. Advances in the mechanism of vascular endothelial cell injury in kawasaki disease[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2016, 54(2): 158-160.

收稿日期: 2017-11-26

修回日期: 2017-12-24