

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20195182

· 论 著 ·

## CRE 对多粘菌素 B 的敏感性及其两种检测方法的差异

李焕芹, 牛敏, 刘淑敏, 宋贵波, 杜艳

(昆明医科大学第一附属医院检验科 云南省检验医学重点实验室 云南省实验诊断研究所, 云南 昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 采用两种不同方法分析耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)对多粘菌素 B 的敏感性, 为实验室选择药敏方法和临床合理用药提供依据。**方法** 收集昆明医科大学第一附属医院 2018 年 1—12 月分离的 230 株 CRE 菌株, 分别采用 E-test 法和微量肉汤稀释(BMD)法检测 CRE 对多粘菌素 B 的敏感性, 分析两种药敏方法之间的差异性。**结果** 菌株主要来源以痰为主, 占 70.87% (163 株), 其次是血(33 株, 14.35%)和分泌物(15 株, 6.52%), 病原菌分布以肺炎克雷伯菌为主(205 株)。CRE 菌株 E-test 方法的敏感率为 96.52%, 耐药率为 3.48%; BMD 法的敏感率为 95.65%, 耐药率为 4.35%。两种方法的基本一致率为 95.65%, 分类一致率为 99.13%, 极大误差为 0.87%。**结论** 多粘菌素 B 对 CRE 有较好的抗菌活性, E-test 法操作简便, 和 BMD 法一致性好, 可应用于临床常规药敏试验。

**[关键词]** 多粘菌素 B; 耐碳青霉烯类肠杆菌; E-test; 微量肉汤稀释法; 药敏试验; CRE

**[中图分类号]** R378.2 R446

## Susceptibility of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae to polymyxin B and difference between two detection methods

LI Huan-qin, NIU Min, LIU Shu-min, SONG Gui-bo, DU Yan (Yunnan Key Laboratory of Laboratory Medicine, Yunnan Institute of Laboratory Diagnosis, Department of Laboratory Medicine of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the susceptibility of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) to polymyxin B by two different methods, so as to provide basis for the selection of antimicrobial susceptibility methods in laboratory and rational clinical antimicrobial use. **Methods** 230 strains of CRE isolated from the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University between January and December 2018 were collected, the susceptibility of CRE to polymyxin B was detected by E-test and broth microdilution (BMD) method respectively, differences between two methods were analyzed. **Results** The main source of bacteria was sputum (163 strains, 70.87%), followed by blood (33 strains, 14.35%) and secretion (15 strains, 6.52%), *Klebsiella pneumoniae* was the main pathogen (205 strains). Susceptibility rate and resistant rate of CRE strains detected by E-test were 96.52% and 3.48% respectively; susceptibility rate and resistant rate of CRE strains detected by BMD method were 95.65% and 4.35% respectively; the basic consistent rate of two methods was 95.65%, classification consistent rate was 99.13%, and very major error was 0.87%. **Conclusion** Polymyxin B has good antimicrobial activity against CRE, E-test method is easy to be operated and is well consistent with BMD method, it can be used in clinical routine antimicrobial susceptibility testing.

**[Key words]** polymyxin B; carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; E-test; broth microdilution method; antimicrobial susceptibility testing; CRE

[收稿日期] 2019-03-11

[基金项目] 云南省卫生和计划生育委员会医学学科带头人培养计划(D-2017023)

[作者简介] 李焕芹(1992-), 女(汉族), 云南省保山市人, 硕士研究生, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 杜艳 E-mail: duyan\_m@139.com

耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)已成为医院获得性感染的重要病原体,感染者病死率高,疾病负担重,治疗方案有限,且菌株可通过质粒、整合子和插入序列等水平播散,给临床抗感染治疗带来极大的挑战<sup>[1-3]</sup>。多粘菌素 B 是一种环状多肽抗生素,于 1947 年发现,主要是多粘菌素 B 和 E,其带正电荷性质,与革兰阴性菌菌膜上带负电荷的磷酸基团结合,导致脂多糖(LPS)不稳定,改变菌膜的渗透性,同时还能抑制重要的还原酶(如菌膜中的 II 型 NADH 醌氧化还原酶),从而发挥抗菌作用<sup>[4-7]</sup>。多粘菌素被广泛用于治疗革兰阴性杆菌引起的严重感染,直到二十世纪八十年代,因其肾毒性和神经毒性被逐渐停用,但由于 CRE 菌株抗感染缺乏新的有效抗菌药物,导致多粘菌素被重新引入临床抗感染治疗中<sup>[8-10]</sup>,随着多粘菌素 B 的大量使用,世界范围内对多粘菌素 B 耐药的鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌相继出现并逐年增多<sup>[11-12]</sup>。鉴于临床上 CRE 菌株对多粘菌素 B 体外敏感性检测相关的临床研究较少,临床经验有限,迫切需要快速、准确的药敏结果指导临床合理用药。

最低抑菌浓度(MIC)是极有价值的药物敏感性试验数值,为临床制定合理用药方案、调整用药方案及实施个性化用药提供依据<sup>[13]</sup>。临床上测定 MIC 值的方法有琼脂稀释法、微量肉汤稀释(broth microdilution, BMD)法、E-test 法以及自动化分析仪法,其中 E-test 法是一种简便且可测定各种微生物(包括苛养菌)体外药物敏感性的替代方法,但因其其在多粘菌素 B 敏感性测定方法中的应用不同导致研究结果不同,研究<sup>[14-16]</sup>表明其与 BMD 法在 MIC 值上保持一致,也有研究<sup>[17]</sup>报道因药物在琼脂中扩散不均,其结果并不十分可靠。本研究收集昆明医科大学第一附属医院 2018 年 1—12 月分离于临床各科室患者的非重复 CRE 菌株 230 株,通过比较 E-test 法与 BMD 法检测 CRE 菌株对多粘菌素 B 的敏感性差异,评估 E-test 法的临床应用效果,为临床用药提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2018 年 1—12 月昆明医科大学第一附属医院临床各科室送检的非重复 CRE 菌株 230 株,药敏质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 购自卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 全自动微生物鉴定与药敏分析系统 VITEK 2 和配套的 GN 卡、AST-GN14 卡均购于法国生物梅里埃公司。插入式多粘菌素 B 药敏试纸条(E-test 法)、多粘菌素 B 药敏试剂板条(BMD 法)、药敏接种培养液均由温州市康泰生物科技有限公司提供;MH 琼脂平板购自郑州安图生物工程股份有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 药敏试验 采用插入式 E-test 试纸条法和微量肉汤稀释法进行 MIC 值检测,严格按照产品使用说明两种方法同时进行,两名专业人员同时读取数据。

1.3.2 药敏试验结果判断 参照 2018 年欧洲临床微生物和感染病学会药敏委员会(EUCAST)折点判断<sup>[18]</sup>,质控菌株 ATCC 25922 MIC 值范围在(0.25~2)  $\mu\text{g}/\text{mL}$  表明在质控范围内。试验菌株  $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  判定为敏感(S), $\text{MIC} > 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  判定为耐药(R)。

1.4 数据分析 MIC 值定义为在琼脂或肉汤稀释法药物敏感性检测试验中能抑制肉眼可见的微生物生长的最低抗菌药物浓度;以 BMD 法为标准,基本一致性(essential agreement, EA):待测 MIC 系统与参考方法 MIC 值相差不超过 1 个稀释倍数;分类一致性(categorical agreement, CA):被评估药敏方法与参考方法判断试验结果为敏感、中介、耐药的一致性;极重大误差(very major error, VME):将耐药误判为敏感,即假敏感;重大误差(major error, ME):将敏感误判为耐药,即假耐药;小误差(minor error; mE):将中介判为敏感或耐药、或者将耐药或敏感判为中介<sup>[5]</sup>。根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)要求,能接受的误差范围 CA 和 EA 均  $\geq 90\%$ , $\text{VME} \leq 1.5\%$ , $\text{ME} < 3\%$ , $\text{mE} \leq 10\%$ <sup>[19]</sup>。

## 2 结果

2.1 E-test 法和 BMD 法测定质控菌株大肠埃希菌的 MIC 值 E-test 法检测质控菌株 ATCC 25922 对多粘菌素 B 的 MIC 为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,BMD 法测定的 MIC 为 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,均在质控范围内(0.25~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

2.2 标本来源及病原菌分布特点 标本来源以痰为主(163 株),占 70.87%,其次是血(33 株,14.35%)和分泌物(15 株,6.52%);尿、引流液、脑脊液分别占 3.48%、3.04%、1.74%。病原菌分布

以肺炎克雷伯菌为主(205 株),其次为阴沟肠杆菌(14 株)和大肠埃希菌(7 株)。

### 2.3 两种方法测定菌株对多粘菌素 B 的药敏结果

2.3.1 两种药敏试验方法检测 CRE 对多粘菌素 B 敏感性的差异 通过比较 E-test 法和 BMD 法, E-test 法敏感率较高,为 96.52%,BMD 法耐药率较高,占 4.35%,见表 1。

表 1 两种药敏试验方法检测 230 株 CRE 对多粘菌素 B 药敏结果[株(%)]

Table 1 Susceptibility testing result of 230 strains of CRE to polymyxin B detected by two antimicrobial susceptibility testing methods (No. of isolates[%])

药敏试验方法	敏感	耐药
E-test 法	222(96.52)	8(3.48)
BMD 法	220(95.65)	10(4.35)

2.3.2 两种药敏试验方法比较 CRE 对多粘菌素 B 的 MIC 值变化 经 E-test 法测得多粘菌素 B 的 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>均为 0.5 μg/mL,BMD 法对多粘菌素 B 的 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>为 0.5、1 μg/mL,MIC<sub>90</sub>值 E-test 法的 MIC 较 BMD 法低 1 个稀释度,药敏试验方法的误差统计学分析以 BMD 法为参考方法,两种方法基本一致率 95.65%,分类一致率 99.13%,mE 0, ME 0,VME 0.87%。见表 2、图 1。

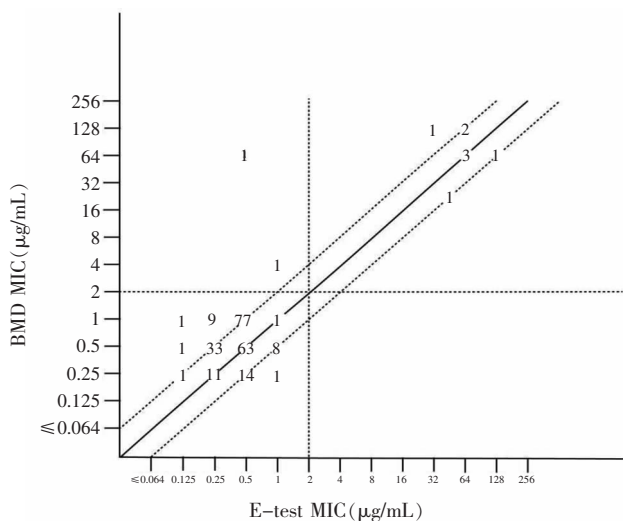
表 2 E-test 法和 BMD 法检测 CRE 对多粘菌素 B 的 MIC 比较(μg/mL)

Table 2 Comparison in minimum inhibitory concentrations of CRE to polymyxin B detected by E-test method and BMD method(μg/mL)

药敏方法	MIC 范围	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
E-test 法	0.125~128	0.5	0.5
BMD 法	0.25~128	0.5	1.0

## 3 讨论

CHINE 细菌耐药监测数据显示,近年来 CRE 菌株呈逐年增长趋势,尤其是肺炎克雷伯菌,多粘菌素耐药的 CRE 菌株引起的感染治疗选择极其有限且病死率高,本研究中 CRE 菌株对多粘菌素耐药仅 3.48%和 4.35%,与国内其他医院耐药率 4.4%相近<sup>[20]</sup>,耐药率尚低,两种方法 MIC<sub>50</sub>均为 0.5 μg/mL,MIC<sub>90</sub>分别为 0.5、1 μg/mL,E-test 法最低 MIC 值



注:散点图结果是将 E-test 法确定的多粘菌素 MIC 值(横坐标)与 BMD 确定的 MIC 值(纵坐标)进行比较。对角黑线表示完全一致,数字代表在每个点观察到的事件,虚线表示测试结果之间相差一个稀释度的 MIC 值。水平和垂直虚线表示耐药折点(>2 μg/mL)

图 1 E-test 法与 BMD 确定的 MIC 散点图

Figure 1 Scatter diagram of minimum inhibitory concentrations determined by E-test method and BMD method

为 0.125 μg/mL,BMD 法最低 MIC 值为 0.25 μg/mL,E-test 法的敏感率为 96.52%,BMD 法的敏感率为 95.65%,表明多粘菌素 B 对 CRE 菌株有很好的抗菌活性,故在临床 CRE 抗感染治疗中,可经验性选择使用。

多粘菌素 B 的体外药敏试验存在诸多挑战,缺乏可靠的药敏试验参考方法,多粘菌素存在多组分构成问题,在琼脂中扩散不良,还有其阳离子的吸附性质、异抗性的出现及培养基贮藏的影响等<sup>[11]</sup>,故目前对多粘菌素敏感性试验方法还未在国际上达成共识。EUCAST 推荐使用 BMD 法测定多粘菌素的 MIC 值,并制定了粘菌素药敏结果的折点判读标准。目前多粘菌素 B 体外敏感性试验可采用琼脂扩散法、BMD 法、E-test 法和自动化分析法检测,研究<sup>[21]</sup>表明琼脂扩散法与 BMD 法一致性良好,但两种方法均操作复杂,不适合临床实验室常规实施;另一个问题是多粘菌素 B 容易吸附到聚苯乙烯中,本次试验菌株有 127 株 BMD 测定的 MIC 值较 E-test 高 1 个稀释度,考虑该试验结果出现原因为多粘菌素 B 对塑料的吸附导致在微孔中分配的药物实际浓度低于标准浓度。E-test 法是近年来研究的新型方法,以其操作简便、结果可靠的优势已被越

来越多应用于苛养菌、真菌以及多重耐药菌 MIC 值的测定,本试验使用的药敏纸条又称为梳齿状药敏试纸条,为插入式 E-test 试纸条,是我国自主设计、专利生产的梯度浓度药敏试条,通过将含有黏附作用的缓释剂将抗菌药物附着在梳状药敏试条的梳齿下部,结合了稀释法和扩散法的原理和特点,定量检测细菌对药物的敏感性,插入式 E-test 试纸条不会产生平放式 E-test 试纸条会产生的气泡等干扰因素,插入琼脂后近乎一条直线,在读取抑菌圈椭圆的边与试纸条相交点时更直观,在操作上更简便<sup>[22]</sup>。本试验结果显示 E-test 法和 BMD 的基本一致率为 95.65%,分类一致率高达 99.13%,与各项研究结果显示 E-test 法和参考方法 BMD 之间存在良好的相关性一致<sup>[14]</sup>,故临床实验室可考虑采用 E-test 法进行多粘菌素 B 的常规敏感性检测。

本研究有 3 株 CRE 敏感菌株,BMD 法出现了跳孔现象,3 株前后孔表现一致,查阅相关文献,导致此现象的原因可能是污染,以及多粘菌素 B 异质性耐药的出现<sup>[23]</sup>。异质性耐药是指在体外药敏试验中,发现细菌的大部分亚群属于敏感,但有一小部分亚群出现耐药,作为一种独特的耐药现象,已经成为抗菌治疗的新挑战。针对多粘菌素 B 的异质性耐药问题,可以通过加大剂量和联合用药来解决异质性耐药的问题,达到临床治疗效果。本研究中 VME 为 0.87%,CLSI 能接受的误差范围为 VME  $\leq 1.5\%$ ,仍在可控范围内。分析出现“假敏感”现象的原因可能是人员操作差异,避免此类误差的方法是规范操作。本次试验 BMD 法检测出 10 株耐药菌株,其中 2 株与 E-test 结果不符,其原因尚不明。

综上所述,CRE 对多粘菌素 B 有较好的抗菌活性,是抗感染治疗的重要药物,BMD 法目前是检测多粘菌素 B 体外药物敏感性的推荐方法,但是其操作较为繁琐且对药物及培养基要求较高,研究表明 E-test 法和 BMD 法在 0.25~1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时一致性良好,试验中使用的垂直插入式 E-test 试纸条较传统的 E-test 平放试纸条有一定优势,一定程度上解决了药物在琼脂中难扩散及多粘菌素 B 对塑料的吸附问题的缺点,E-test 法操作简便,和 BMD 法一致性好,可以应用于临床常规药敏试验,同时 BMD 法需规范试剂厂家生产规格。

#### [参 考 文 献]

[1] van Loon K, Voor In't Holt AF, Vos MC, et al. A systematic

review and meta-analyses of the clinical epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 61(1): 1-18.

- [2] Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat[J]. *JAMA*, 2008, 300(24): 2911-2913.
- [3] Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2016, 15: 20.
- [4] Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria[J]. *Ann Pharmacother*, 1999, 33(9): 960-967.
- [5] 杨佩红,徐修礼,刘家云,等.四种方法检测替加环素对鲍曼不动杆菌药敏结果分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(9): 1198-1200.
- [6] Landman D, Georgescu C, Martin DA, et al. Polymyxins revisited[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(3): 449-465.
- [7] Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, et al. A secondary mode of action of polymyxins against gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity[J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2014, 67(2): 147-151.
- [8] Kwa A, Kasiakou SK, Tam VH, et al. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E)[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2007, 5(5): 811-821.
- [9] Velkov T, Roberts KD, Nation RL, et al. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics[J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(6): 711-724.
- [10] Li J, Nation RL, Turnidge JD, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections[J]. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6(9): 589-601.
- [11] Poirel L, Jayol A, Nordmann P, et al. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30(2): 557-596.
- [12] Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, et al. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(2): 194-199.
- [13] 邵海枫,秦卫松,李珍大,等. E-test 法用于 100 株革兰阴性菌的药敏结果评价[J]. *临床检验杂志*, 1997, 15(5): 276-278.
- [14] Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, et al. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(10): 3726-3730.
- [15] Arroyo LA, Garcia-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, et al. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2): 903-905.

- [16] Lee SY, Shin JH, Lee K, et al. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of *Acinetobacter* species from a Korean university hospital[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1924 - 1926.
- [17] Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(8): 4625 - 4630.
- [18] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters[M]. EUCAST, Version 8. 1.
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing [S]. CLSI, 2018, M100, 28th ed, Wayne, PA.
- [20] 孙丽, 郭燕, 杨洋, 等. 肠杆菌科细菌对多黏菌素的敏感性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3): 373 - 376.
- [21] Falagas M, Makris G, Dimopoulos G, et al. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(2): 101 - 104.
- [22] 高灵宝, 沙鸭云, 陈亚宝. 插入式 E-test 检测非发酵糖菌药物敏感试验的研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2013, 7(5): 681 - 684.
- [23] Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1678 - 1684.

(本文编辑: 豆清娅、陈玉华)

**本文引用格式:**李焕芹, 牛敏, 刘淑敏, 等. CRE 对多粘菌素 B 的敏感性及其两种检测方法的差异 [J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(11): 1059 - 1063. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195182.

**Cite this article as:** LI Huan-qin, NIU Min, LIU Shu-min, et al. Susceptibility of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae to polymyxin B and difference between two detection methods[J]. Chin J Infect Control, 2019, 18(11): 1059 - 1063. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195182.