

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.15.015

3 种药敏检测方法对洋葱伯克霍尔德菌体外抗菌药物药敏结果分析

李莹¹, 陶运娟¹, 徐杰^{2△}, 任亚璐², 陈旭²1. 南京中医药大学附属盐城市中医院检验科, 江苏盐城 224000; 2. 苏州大学附属第一医院
检验科, 江苏苏州 215000

摘要:目的 评估微量肉汤稀释法、纸片扩散法和 E-test 法检测洋葱伯克霍尔德菌体外抗菌药物药敏试验的结果。方法 采用微量肉汤稀释法、纸片扩散法和 E-test 法检测 31 株洋葱伯克霍尔德菌对复方磺胺甲噁唑、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素、左氧氟沙星和美罗培南这 6 种抗菌药物的药敏性。以微量肉汤稀释法为参考方法, 计算 50% 最低抑菌浓度(MIC₅₀)、敏感率和误差率, 分析基本一致率和分类一致率。结果 复方磺胺甲噁唑的 MIC₅₀ 为 1.00 μg/mL, 敏感率为 100.0%, 体外活性最好。头孢哌酮/舒巴坦的 MIC₅₀ 为 16.00 μg/mL, 敏感率只有 61.3%, 体外活性最差。以微量肉汤稀释法为参考方法, E-test 法检测头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦和左氧氟沙星的基本一致率和分类一致率均 < 90.0%, 且存在一定的误差率, 其中左氧氟沙星的非常重大误差为 6.5%, 头孢哌酮/舒巴坦的重大误差为 12.9%; 纸片扩散法检测头孢他啶和头孢哌酮/舒巴坦的分类一致率 < 90.0%, 且存在一定的误差率, 其中米诺环素的非常重大误差为 6.5%, 头孢哌酮/舒巴坦的重大误差为 12.9%; E-test 法和纸片扩散法检测复方磺胺甲噁唑和美罗培南敏感率均 > 90.0%, 分类一致率均 > 90.0%。结论 微量肉汤稀释法、纸片扩散法和 E-test 法检测洋葱伯克霍尔德菌可能存在不同的误差, 应合理选择药敏检测方法, 以确保结果的准确性。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌; E-test 法; 纸片扩散法; 药敏试验

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)15-2160-04

Study on the antimicrobial susceptibility of *Burkholderia cepacia* in vitro by three methodsLI Ying¹, TAO Yunjuan¹, XU Jie^{2△}, REN Yalu², CHEN Xu²1. Department of Clinical Laboratory, Yancheng Hospital of Traditional Chinese Medicine
Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Yancheng, Jiangsu 224000, China;2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Suzhou
University, Suzhou, Jiangsu 215000, China

Abstract: Objective To evaluate the results of antimicrobial susceptibility test of *Burkholderia cepacia* in vitro by micro-broth dilution, paper diffusion and E-test. **Methods** The susceptibility of 31 *Burkholderia cepacia* strains to compound Sulfamethoxazole, Ceftazidime, Cefoperazone/Sulbactam, Minocycline, Levofloxacin and Meropenem were tested by micro-broth dilution, paper diffusion and E-test. The 50% minimal inhibitory concentration (MIC₅₀), sensitivity rate and error rate were calculated, and the basic consistency rate and classification consistency rate were analyzed. **Results** The MIC₅₀ of compound Sulfamethoxazole was 1.00 μg/mL, the sensitivity rate reached 100.0%, and the activity in vitro was the best. The MIC₅₀ of Cefoperazone/Sulbactam was 16.00 μg/mL, the sensitivity rate was only 61.3%, and the activity in vitro was the worst. With the method of micro-broth dilution as reference, the basic consistency rate and classification consistency rate of Ceftazidime, Cefoperazone/Sulbactam and Levofloxacin were less than 90.0% by E-test, and there was a certain error rate, the very significant error of Levofloxacin was 6.5%, and the significant error of Cefoperazone/Sulbac was 12.9%, respectively. The classification consistency rate of Cefotaxime and Cefoperazone/Sulbactam was less than 90.0% by paper diffusion method, and there was a certain error rate. The very significant error of Minocycline was 6.5%, and that the significant error of Cefoperazone/Sulbactam was 12.9%. The sensitive rate of E-test and paper diffusion method to compound Sulfamethoxazole and Meropenem was more than 90.0%, the classification consistent rate was more than 90.0%. **Conclusion** There may be different errors in the detection of *Burkholderia cepacia* by the methods of micro-broth dilution, paper diffusion and E-test. The drug sensitivity detection method should be selected reasonably to ensure the accuracy of the results.

Key words: *Burkholderia cepacia*; E-test method; paper diffusion method; drug sensitivity test

洋葱伯克霍尔德菌是一种常见的医院获得性感染条件致病菌,包括新洋葱伯克霍尔德菌、洋葱伯克霍尔德菌、多噬伯克霍尔德菌、越南伯克霍尔德菌、稳定伯克霍尔德菌、污染伯克霍尔德菌等^[1]。洋葱伯克霍尔德菌可引起免疫缺陷患者的严重感染,尤其是在囊性纤维化患者中;还可引起以坏死性肺炎、败血症和整体预后差为特征的“洋葱综合征”^[2]。由于临床上抗菌药物和免疫抑制剂的广泛使用,使得洋葱伯克霍尔德菌对抗菌药物多重耐药甚至全耐药^[2-3]。碳青霉烯类亚胺培南及 3 代头孢菌素的使用会增加洋葱伯克霍尔德菌检出和定植的发生。本研究以微量肉汤稀释法为参考方法,评估纸片扩散法和 E-test 法检测洋葱伯克霍尔德菌体外抗菌药物药敏试验的结果。

1 材料与方法

1.1 临床菌株 收集 2017 年 3 月至 2018 年 8 月从苏州大学附属第一医院临床分离的洋葱伯克霍尔德菌 30 株,从盐城市第三人民医院分离 1 株,共 31 株为研究对象。其中来自痰 15 株(48.39%),咽拭子 10 株(32.25%),全血 3 株(9.68%),引流液 1 株(3.23%),伤口 1 株(3.23%),分泌物 1 株(3.23%)。通过质谱仪鉴定 31 株伯克霍尔德菌属,其中多噬伯克霍尔德菌 15 株(48.39%),洋葱伯克霍尔德菌 13 株(41.93%),越南伯克霍尔德菌 1 株(3.23%),污染伯克霍尔德菌 1 株(3.23%),新洋葱伯克霍尔德菌 1 株(3.23%)。同一患者同一标本中多次分离的相同菌株不重复计数。

1.2 质控菌株 铜绿假单胞菌 ATCC27853,大肠埃希菌 ATCC25922。

1.3 仪器与试剂 法国梅里埃公司的 VITEK MS 全自动微生物质谱鉴定仪和法国梅里埃公司的 VITEK 2 compact 全自动微生物鉴定系统,微量肉汤稀释法和 E-test 法药敏试剂均购自温州市康泰生物科技有限公司,纸片扩散法药敏试剂购自赛默飞世尔

(上海)仪器有限公司。

1.4 药敏结果判定及标准 按照美国临床和实验室标准协会(CLSI)M100 28th 抗微生物药敏试验的执行标准进行操作及药敏结果判读,其中头孢哌酮/舒巴坦纸片扩散法、微量肉汤稀释法、E-test 法最低抑菌浓度(MIC)值参考肠杆菌头孢哌酮折点标准。以微量肉汤稀释法为参考方法,基本一致率(EA)为被评估方法的 MIC 值与微量肉汤稀释法 MIC 值相差不超过 1 个稀释度的菌株百分比;分类一致率(CA)为被评估方法的药敏结果(敏感、中介、耐药)与微量肉汤稀释法一致的菌株百分比;非常重大误差(VME)为被评估方法将耐药报告为敏感;重大误差(ME)为被评估方法将敏感报告为耐药;小误差(MI)为被评估方法将中介报告为耐药或敏感,或将耐药、敏感报告为中介。可接受范围:CA≥90.0%,EA≥90.0%,VME≤1.5%,ME≤3.0%,MI≤10.0%^[4]。

1.5 统计学处理 本研究采用 Excel 进行数据分析;计数资料以率(%)进行描述性统计分析。

2 结果

2.1 抗菌药物 MIC 值和敏感率 复方磺胺甲噁唑是体外抗洋葱伯克霍尔德菌群最有效的抗菌药物 50% MIC (MIC₅₀) 为 1.00 μg/mL,敏感率为 100.0%;然后是米诺环素,MIC₅₀ 为 1.00 μg/mL,敏感率高达 96.8%;美罗培南 MIC₅₀ 为 4.00 μg/mL,敏感率为 90.3%;头孢他啶和左氧氟沙星 MIC₅₀ 分别为 2.00、1.00 μg/mL;敏感率均为 83.8%;而头孢哌酮/舒巴坦 MIC₅₀ 为 16.00 μg/mL,仅仅只能抑制 61.3%的洋葱伯克霍尔德菌生长。复方磺胺甲噁唑、米诺环素和美罗培南 3 种检测方法的体外敏感率比较接近,且敏感率均>90.0%;而头孢他啶和头孢哌酮/舒巴坦的微量肉汤稀释法敏感率却低于 E-test 法和纸片扩散法;左氧氟沙星的微量肉汤稀释法敏感率高于 E-test 法。见表 1。

表 1 31 株洋葱伯克霍尔德菌对 6 种抗菌药物的 MIC 和敏感情况

抗菌药物	药敏试验方法	MIC(μg/mL)			敏感率 (%)	耐药率 (%)
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC 抑菌圈范围		
头孢哌酮/舒巴坦	微量肉汤稀释法	16.00	256.00	2.00~256.00	61.3	29.0
	E-test 法	8.00	>256.00	2.00~256.00	64.5	12.9
	纸片扩散法	28.00	32.00	6.00~35.00	83.8	9.7
美罗培南	微量肉汤稀释法	4.00	4.00	0.25~16.00	90.3	3.2
	E-test 法	2.00	4.00	0.25~16.00	90.3	3.2
	纸片扩散法	26.00	28.00	6.00~32.00	96.8	3.2
米诺环素	微量肉汤稀释法	1.00	2.00	0.50~4.00	96.8	3.2
	E-test 法	0.50	1.00	0.50~4.00	96.8	3.2
	纸片扩散法	28.00	30.00	6.00~34.00	90.3	9.7
复方磺胺甲噁唑	微量肉汤稀释法	1.00	2.00	0.25~2.00	100.0	0.0
	E-test 法	0.50	1.00	0.25~2.00	100.0	0.0
	纸片扩散法	24.00	30.00	12.00~32.00	93.5	0.0
左氧氟沙星	微量肉汤稀释法	1.00	4.00	0.25~4.00	83.8	9.7

续表 1 31 株洋葱伯克霍尔德菌对 6 种抗菌药物的 MIC 和敏感情况

抗菌药物	药敏试验方法	MIC($\mu\text{g/mL}$)			敏感率 (%)	耐药率 (%)
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC 抑菌圈范围		
头孢他啶	E-test 法	2.00	>32.00	0.25~4.00	71.0	29.0
	纸片扩散法	—	—	—	—	—
	微量肉汤稀释法	2.00	16.00	0.50~16.00	83.8	3.2
	E-test 法	2.00	4.00	0.50~16.00	96.8	0.0
	纸片扩散法	28.00	30.00	20.00~34.00	100.0	0.0

注:复方磺胺甲噁唑和头孢哌酮/舒巴坦是复合性抗菌药物, MIC 中的折点分子和分母分别代表复合制剂的 2 种药物折点, 一般以分子的数值作为该抗菌药物的折点。—表示此项无数据。

2.2 6 种抗菌药物的误差率 以微量肉汤稀释法为参考方法, 纸片扩散法检测 6 种抗菌药物中美罗培南和复方磺胺甲噁唑的误差最小, VME 和 ME 均为 0.0%, MI 为 9.7%; 米诺环素的 VME 最高, 达 6.5%; 头孢哌酮/舒巴坦的 ME 为 12.9%, MI 为 16.1%; 头孢他啶 MI 为 12.9%, 略高于标准。见表 2。

表 2 纸片扩散法检测的误差率和 CA

抗菌药物	VME[n(%)]	ME[n(%)]	MI[n(%)]	CA(%)
头孢他啶	0(0.0)	1(3.2)	4(12.9)	83.8
米诺环素	2(6.5)	0(0.0)	0(0.0)	96.8
左氧氟沙星	—	—	—	100.0
美罗培南	0(0.0)	0(0.0)	2(6.5)	93.5
复方磺胺甲噁唑	0(0.0)	0(0.0)	2(6.5)	93.5
头孢哌酮/舒巴坦	0(0.0)	4(12.9)	5(16.1)	71.0

注:—表示此项无数据。

以微量肉汤稀释法为参考方法, E-test 法检测 6 种抗菌药物中美罗培南、米诺环素和复方磺胺甲噁唑无误差, 头孢他啶的误差比较小, ME 为 3.2%, MI 为 6.5%; 头孢哌酮/舒巴坦的误差最大, ME 为 12.9%, MI 为 12.9%; 左氧氟沙星的误差率略高, MI 为 6.5%, VME 为 6.5%。见表 3。

表 3 E-test 法检测的误差率和 CA

抗菌药物	VME[n(%)]	ME[n(%)]	MI[n(%)]	CA(%)
头孢他啶	0(0.0)	1(3.2)	3(9.7)	87.1
米诺环素	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	100.0
左氧氟沙星	2(6.5)	0(0.0)	2(6.5)	83.8
美罗培南	0(0.0)	0(0.0)	4(12.9)	90.3
复方磺胺甲噁唑	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	100.0
头孢哌酮/舒巴坦	0(0.0)	4(12.9)	4(12.9)	74.2

2.3 6 种抗菌药物的 EA% 和 CA% 在 log2 (−1~1) 范围内, 以微量肉汤稀释法为参考方法, E-test 法检测美罗培南和复方磺胺甲噁唑的 EA 为 >90.0%, 头孢哌酮/舒巴坦的 EA 为 80.5%, 米诺环素和头孢他啶的 EA 为 74.1%、77.4%, 左氧氟沙星仅为 67.7%。美罗培南、复方磺胺甲噁唑和米诺环素 3 种方法的 CA 均 >90.0%, 左氧氟沙星的 CA 范围为 83.8%~100.0%, 头孢他啶的 CA 范围为 83.8%~

87.1%。见表 2~4。

表 4 在 log2(−1~+1) 范围内 E-test 法基本一致率

抗菌药物	log2 范围							EA (%)
	≤−3	−2	−1	0	1	2	≥3	
头孢他啶	0.0	12.9	29.0	35.5	12.9	3.2	6.5	77.4
左氧氟沙星	16.1	16.1	48.4	19.3	0.0	0.0	0.0	67.7
美罗培南	0.0	3.2	16.1	38.7	41.9	0.0	0.0	96.7
米诺环素	0.0	0.0	0.0	19.3	54.8	19.3	6.5	74.1
复方磺胺甲噁唑	0.0	0.0	0.0	41.9	51.6	6.5	0.0	93.5
头孢哌酮/舒巴坦	3.2	3.2	16.1	48.4	16.1	0.0	12.9	80.5

注:以微量肉汤稀释法为参考标准。

3 讨 论

洋葱伯克霍尔德菌是引起医院感染的重要致病菌^[5], 包括菌血症、心内膜炎、肺炎、伤口感染、脓肿等, 同时也是引起肺囊性纤维化和慢性肉芽肿的重要致病菌^[6]。目前, 临床上分离到的洋葱伯克霍尔德菌越来越多, 在非发酵革兰阴性杆菌中位于第 4 位, 仅次于不动杆菌、铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌^[7]。洋葱伯克霍尔德菌对许多抗菌药物天然耐药, 且耐药机制比较复杂。一些国内外学者认为洋葱伯克霍尔德菌的耐药机制主要为^[2,8-9]: (1) 细胞膜渗透性降低; (2) 细胞的主动外排; (3) 通过底物裂解或化学修饰使酶失活; (4) 点突变引起的靶点改变、减少或缺失; (5) 以耐药靶替代易感目标, 进行代谢旁路; (6) 通过增加转录或基因增殖使产生的靶点过量; (7) 特异性结合蛋白的药物隔离作用。为及时准确地报告药敏结果, 指导临床合理用药, 本研究采用法国梅里埃公司的 VITEK MS 全自动微生物质谱鉴定仪鉴定并确认洋葱伯克霍尔德菌。通过微量肉汤稀释法、E-test 和纸片扩散法来检测洋葱伯克霍尔德菌的药敏结果。

微量肉汤稀释法被认为是“金标准”^[10]。纸片扩散法具有操作简单、价格便宜等优点, 在日常的药敏试验工作中应用非常广泛。本研究显示, 纸片扩散法和 E-test 法检测洋葱伯克霍尔德菌对复方磺胺甲噁唑无论是 MIC₅₀、敏感率、误差率、EA, 还是 CA 结果都很好, 但从操作和经济方面考虑, 纸片扩散法最适宜。复方磺胺甲噁唑和米诺环素敏感性最好, 与文献报道一致^[11-12]。但是米诺环素纸片扩散法的 VME 较高(6.5%), 与茅国峰等^[13]研究报道纸片扩散法结果不一致, 主要原因为: (1) 四环素类药物纸片扩散法存

在中介和耐药假性增高的问题,这是由四环素类药物的化学性决定的;(2)此次研究的菌株数量比较少,可能存在随机误差。因此,为了结果的准确性,应该扩大研究菌株的数量。同时,有资料表明,米诺环素对人体的伤害性较大,临床用此药应当慎重^[14]。左氧氟沙星由于 2017 年 CLSI 取消了纸片扩散法的折点,所以只能测定其 MIC 值。头孢他啶尽管纸片扩散法 MI 略高,为 12.9%,但是 MIC₅₀、敏感性、CA 和误差比较小,可能是标本量比较少的原因,存在随机误差。头孢哌酮/舒巴坦的 CA<90.0%,与茅国峰等^[13]研究结果一致,头孢哌酮/舒巴坦的 ME>3.0%,MI>10.0%,可能与没有具体的 CLSI 折点有关。

综上所述,临床上有洋葱伯克霍尔德菌感染者,E-test 法、纸片扩散法检测洋葱伯克霍尔德菌体外药敏试验结果显示,不同的方法检测可能存在不同的误差,应合理选择药敏检测方法,以确保结果的准确性。

参考文献

- [1] DEVANGA-RAGUPATHI N K, VEERARAGHAVAN B. Accurate identification and epidemiological characterization of Burkholderia cepacia complex: an update[J]. Ann Clin Microbiol Antim, 2019, 18(1):7.
- [2] RHODES K A, SCHWEIZER H P. Antibiotic resistance in Burkholderia species[J]. Drug Resist Update, 2016, 28(9):82-90.
- [3] DREVINEK P, MAHENTHIRALINGAM E. Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(7):821-830.
- [4] Clinica and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement: M100-S27 [S]. Wayne, PA: USA, CLSI, 2017:46.
- [5] BAYLAN O. An opportunistic pathogen frequently isolated from immunocompromised patients: burkholderia cepacia complex[J]. Mikrobiyol Bul, 2012, 46(2):304-318.

(上接第 2159 页)

可能影响结果的准确性及全面性,未来仍需大样本临床治疗研究加以验证。

参考文献

- [1] 林武振. 环丝氨酸联合胸腺肽对耐多药肺结核患者痰菌阴转及细胞免疫功能的影响[J]. 现代诊断与治疗, 2017, 28(22):4234-4236.
- [2] BROUQUI P, QUENARD F, DRANCOURT M. Old antibiotics for emerging multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis (MDR/XDR-TB) [J]. Int J Antimicrob Agents, 2017, 49(5):554-557.
- [3] SARAF G, AKSHATA J S, KURUTHUKULANGARA S, et al. Cycloserine induced delirium during treatment of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) [J]. Egypt J Chest Dis Tuberc, 2015, 64(2):449-451.
- [4] 杨俭, 邱文超, 郭苏珊, 等. 环丝氨酸联合胸腺肽方案治疗耐多药肺结核的效果[J]. 心电图杂志, 2018, 7(1):59-61.

- [5] 肖和平. 耐药结核病化学治疗指南(2010 年) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011:1-58.
- [6] ZUMLA A, GEORGE A, SHARMA V, et al. The WHO 2014 global tuberculosis report-further to go[J]. Lancet Glob Health, 2015, 3(1):10-12.
- [7] NUNN A J, RUSEN I, VAN DEUN A, et al. Evaluation of a standardized treatment regimen of anti-tuberculosis drugs for patients with multi-drug-resistant tuberculosis (STREAM): study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2014, 15(1):353.
- [8] 吴小霞, 辛朝雄, 杨俭, 等. 环丝氨酸联合胸腺肽干预耐多药肺结核研究[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(7):936-939.
- [9] 李丹, 杜德兵, 肖春桥, 等. 结核丸辅助治疗耐多药肺结核的临床疗效观察及免疫功能影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(32):70-74.

(收稿日期:2019-12-15 修回日期:2020-04-10)

- [5] 肖和平. 耐药结核病化学治疗指南(2010 年) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011:1-58.
- [6] ZUMLA A, GEORGE A, SHARMA V, et al. The WHO 2014 global tuberculosis report-further to go[J]. Lancet Glob Health, 2015, 3(1):10-12.
- [7] NUNN A J, RUSEN I, VAN DEUN A, et al. Evaluation of a standardized treatment regimen of anti-tuberculosis drugs for patients with multi-drug-resistant tuberculosis (STREAM): study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2014, 15(1):353.
- [8] 吴小霞, 辛朝雄, 杨俭, 等. 环丝氨酸联合胸腺肽干预耐多药肺结核研究[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(7):936-939.
- [9] 李丹, 杜德兵, 肖春桥, 等. 结核丸辅助治疗耐多药肺结核的临床疗效观察及免疫功能影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(32):70-74.

(收稿日期:2019-12-08 修回日期:2020-04-18)