

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240222008

K-B法和VITEK2法检测108株大肠埃希氏菌 18种抗生素耐药表型的一致性研究

梁其冰^{1#}, 冯春艳^{1#}, 谢作蓉², 冯晨韵¹, 袁维道¹, 陈彩霞¹, 王雪吟¹, 罗小菊^{2*}

[1. 海南省食品药品检验所海口分所, 海口 570311; 2. 海南省食品检验检测中心,
国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全), 海口 570314]

摘要: **目的** 运用K-B法和VITEK2法检测大肠埃希氏菌对氨苄西林等18种抗生素的药敏情况, 对比研究二者结果的一致性。**方法** 收集食源性大肠埃希氏菌108株(32株产 β -内酰胺酶的大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* producing β -lactamase, ESBLs+*E. coli*; 76株不产 β -内酰胺酶的大肠埃希氏菌 *Escherichia coli* non-producing β -lactamase, ESBLs-*E. coli*), 通过K-B法和VITEK2法检测大肠埃希氏菌对18种抗生素的敏感性。**结果** 除了复方新诺明, 两种方法检测其他17种抗生素的敏感率、中介率和耐药率均无统计学上的差异; 18种抗生素的一致率(categorical agreement, CA)在85.18%~100.00%之间, 非常重大误差(very major error, VME)在0%~26.41%之间, 重大误差(major error, ME)在0%~1.78%之间, 次要误差(minor error, MIE)在0%~12.04%之间。其中氨苄西林/舒巴坦的CA(87.96%)、复方新诺明的CA(85.18%)、氨基糖苷类的VME(7.14%)、复方新诺明的VME(26.41%)和氨苄西林/舒巴坦的MIE(12.04%)不符合标准要求。**结论** K-B法与VITEK2法在耐药表型测定方面不具有完全等同性, K-B法对异质性耐药菌识别能力优于VITEK2法, 但是在检测复方新诺明耐药表型时, 可采用其他方法进行验证, 综合判断后确定结果。

关键词: 大肠埃希氏菌; 耐药表型; K-B法; VITEK2法

Consistency of 18 kinds of antibiotic resistance phenotypes in 108 strains of *Escherichia coli* measured by K-B and VITEK2 methods

LIANG Qi-Bing^{1#}, FENG Chun-Yan^{1#}, XIE Zuo-Rong², FENG Chen-Yun¹,
YUAN Wei-Dao¹, CHEN Cai-Xia¹, WANG Xue-Yin¹, LUO Xiao-Ju^{2*}

(1. Haikou Branch of Hainan Food and Drug Inspection Institute, Haikou 570311, China; 2. Hainan Institute for Food Control, Key Laboratory of Tropical Fruits and Vegetables Quality and Safety for State Market Regulation, Haikou 570314, China)

ABSTRACT: Objective To detect the drug sensitivity of *Escherichia coli* to 18 kinds of antibiotics such as

基金项目: 国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全)基础应用研究课题项目(KF-2023014、ZZ-2023015)、海南省自然科学基金项目(321QN0971)

Fund: Supported by the Key Laboratory of Tropical Fruits and Vegetables Quality and Safety for State Market Regulation (KF-2023014, ZZ-2023015), and the Natural Science Foundation of Hainan Province (321QN0971)

#梁其冰、冯春艳为共同第一作者

#LIANG Qi-Bing and FENG Chun-Yan are Co-first Authors

*通信作者: 罗小菊, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检验检测。E-mail: 279106595@qq.com

*Corresponding author: LUO Xiao-Ju, Master, Senior Engineer, Hainan Institute for Food Control, No.285 Nanhai Road, Xiuying District, Haikou 570311, China. E-mail: 279106595@qq.com

ampicillin by K-B method and VITEK2 method, and the compare and study the consistency of the two results.

Methods The 108 strains of food-borne *Escherichia coli* (32 strains of *Escherichia coli* producing β -lactamase, ESBLs+*E. coli*; 76 strains of *Escherichia coli* non-producing β -lactamase, ESBLs-*E. coli*) were used to detect the sensitivity of *Escherichia coli* to 18 kinds of antibiotics by K-B method and VITEK2 method. **Results** Except for co-trimoxazole, there was no statistical difference in sensitivity, intermediary rate and drug resistance between the two methods for detecting other 17 kinds of antibiotics. The categorical agreement (CA) of 18 kinds of antibiotics was between 85.18% and 100.00%, the very major error (VME) was between 0% and 26.41%, the major error (ME) was between 0% and 1.78%, and the minor error (MIE) was between 0% and 12.04%. Among them, CA of ampicillin/sulbactam (87.96%), CA of co-trimoxazole (85.18%), VME of aztreonam (7.14%), VME of co-trimoxazole (26.41%) and MIE of ampicillin/sulbactam (12.04%) did not meet the standard requirements.

Conclusion K-B method and VITEK2 method are not completely equivalent in the determination of drug resistance phenotype, and K-B method is superior to VITEK2 method in identifying heterogeneous drug-resistant bacteria, but other methods can be used to verify the drug resistance phenotype of co-trimoxazole, and the results can be determined after comprehensive judgment.

KEY WORDS: *Escherichia coli*; antibiotic resistance phenotype; K-B method; VITEK2 method

0 引言

随着抗菌药物在全球范围内广泛使用, 细菌耐药性问题已成为全球重大公共卫生安全问题之一^[1], 预计 2050 年后每年将约有 1000 万人死于细菌耐药^[2]。2021 年全国耐药监测网数据显示, 大肠埃希氏菌耐药检出率位于革兰阴性杆菌之首^[2]。有文献显示, 我国抗生素使用总量是英国的 150 倍, 人均使用量是美国的 6 倍以上^[3], 目前我国医院感染常见的耐药病原菌有产超广谱 β -内酰胺酶(β -lactamase, ESBLs)的细菌和耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)等^[4]。大肠埃希氏菌是产 ESBLs 的代表菌^[5], 广泛存在于人体肠道中, 大肠埃希氏菌耐药检出率的增加, 给临床用药及公众安全带来了极大的威胁, 因此, 大肠埃希氏菌尤其是产 ESBLs 大肠埃希氏菌的耐药及多重耐药情况值得关注。

检测细菌耐药表型常用的方法有纸片扩散法(K-B 法)、稀释法(包括培养基稀释法和琼脂法)、E 试验法和 VITEK2 法, 不同方法因其各自的特点被不同试验室所选用。耐药表型结果的准确性是保证临床选用抗菌药物、监测分析耐药流行趋势及指导相关部门调整临床用药策略的前提。随着现代化试验室条件的改善和临床对耐药表型结果时限要求的提高, VITEK2 法凭借其快速、高通量、自动化的优势成为大部分试验室药敏试验的首选。然而针对大肠埃希氏菌耐药表型检测, VITEK2 法并不是美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Inisitute, CLSI)的推荐方法。有文献报道, VITEK2 法检测部分抗生素耐药表型结果存在一定误差^[6-7]。本研究以耐药监测网提示耐药情况较严重

的大肠埃希氏菌为研究对象, 选取临床常用的 18 种抗生素, 针对目前临床上药敏检测常用的 VITEK2 法与 CLSI 规定的 K-B 法进行一致性比较研究, 旨在阐明 VITEK2 法和 K-B 法检测大肠埃希氏菌 18 种常见抗生素药敏结果的准确性和可靠性, 为大肠埃希氏菌耐药表型检测方法选用及临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株来源

菌株由海南省食品药品检验所海口分所和海南省食品检验检测中心于 2022 年~2023 年从海南省海口市、澄迈县、定安县、文昌市、五指山市、儋州市、琼海市、三亚市、万宁市 9 个不同地区采集的食用农产品中分离得到, 共 108 株大肠埃希氏菌, 其中 32 株为产超广谱 β -内酰胺酶的大肠埃希氏菌(ESBLs+*E. coli*), 76 株为不产超广谱 β -内酰胺酶的大肠埃希氏菌(ESBLs-*E. coli*)。全部菌株由海南省食品药品检验所海口分所鉴定及保存。质控标准菌株为大肠埃希氏菌(ATCC 25922)(美国细胞培养物收藏中心); 铜绿假单胞菌 FSCC 206003(等效于 ATCC 27853)、大肠埃希氏菌 GDMCC 1.1326(等效于 ATCC 35218)(广东环凯微生物科技有限公司)。

1.1.2 培养基及试剂

MH 琼脂培养基(北京路桥生物技术有限公司); K-B 药敏纸片(上海士锋生物科技有限公司); VITEK2 AST-GN13 药敏卡(法国生物梅里埃股份有限公司)。

K-B 药敏纸片和 VITEK2 AST-GN13 药敏卡均涵盖 18 种抗生素: 氨苄西林(ampicillin, AM)、氨苄西林/舒巴坦(ampicillin/sulbactam, SAM)、哌拉西林/他唑巴坦

(piperacillin/tazobactam, TZP)、头孢唑啉(cefazolin, CZ)、头孢替坦(ceftazidime, CTT)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、头孢曲松(ceftriaxone, CRO)、头孢吡肟(cefepime, FEP)、氨曲南(aztreonam, ATM)、厄他培南(ertapenem, ETP)、亚胺培南(imipenem, IPM)、阿米卡星(amikacin, AN)、庆大霉素(gentamicin, GM)、妥布霉素(tobramycin, TM)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、左旋氧氟沙星(levofloxacin, LEV)、呋喃妥因(furadantin, FT)、复方新诺明(co-trimoxazole, SXT)。

1.2 仪器与设备

VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定仪、DENSICHEK 比浊仪(法国生物梅里埃股份有限公司); LRH-150 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); 18NA 游标卡尺[马尔计量设备(中国)有限公司]; BSC-1000IIB2 生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司); HVA-85 立式蒸汽灭菌锅(日本 HIRAYAMA 平山制作所)。

1.3 试验方法

1.3.1 K-B 法药敏试验

参照 CLSI 标准文件, 挑取纯化平板上的菌落制备成经比浊仪测定为 0.5 McF 的菌悬液, 用无菌棉拭子沾取菌悬液均匀划线于 MH 琼脂培养基, 待培养基上的菌悬液干燥后在培养基表面贴上待测抗生素药敏纸片, 每个平板贴 4 种待测抗生素药敏纸片, 置于生化培养箱中 35°C 培养 18 h, 取出平板, 用游标卡尺精确量取抑菌圈直径, 按 CLSI 文件中要求的折点值进行结果判定。

1.3.2 VITEK2 法药敏试验

取 1.3.1 中菌悬液, 按 VITEK2 AST-GN13 药敏卡使用说明进行菌悬液处理, 按 VITEK2 仪器操作规程开展药敏试验。

1.3.3 药敏试验质控

K-B 法和 VITEK2 法每次试验开始前先进行质控菌株测试, 质控菌株结果准确时才记录待测菌试验结果。质控菌株为: 大肠埃希氏菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌 FSCC 206003(等效于 ATCC 27853)、大肠埃希氏菌 GDMCC

1.1326(等效于 ATCC 35218)。

1.3.4 一致性分析方法

汇总分析 K-B 法与 VITEK2 法药敏结果, 通过计算 4 类评价指标进行一致性比较研究。具体评价指标^[8]如下: 一致率(categorical agreement, CA): 将 K-B 法与 VITEK2 法药敏结果为敏感(S)、中介(I)、耐药(R)一致的例数相加除以总例数; 非常重大误差(very major error, VME): 将 VITEK2 法药敏结果为 S 而 K-B 法为 R 的例数除以 K-B 法结果为 R 的例数; 重大误差(major error, ME): 将 K-B 法药敏结果为 S 而 VITEK2 法结果为 R 的例数除以 K-B 法结果为 S 的例数; 次要误差(minor error, MIE): 将 K-B 法药敏结果为 R 或 S 而 VITEK2 法结果为 I 的例数和 K-B 法药敏结果为 I 而 VITEK2 法结果为 R 或 S 的例数相加除以总例数。评价标准^[9]: CA ≥ 90.0%, VME ≤ 1.5%, ME ≤ 3.0%, MIE ≤ 10.0%。

1.4 数据处理

运用 SPSS 26 软件对数据进行列联分析, 统计量采用线性相关卡方(χ^2)。

2 结果与分析

2.1 两种方法检测 108 株大肠埃希氏菌多重耐药情况

运用 K-B 法和 VITEK2 法检测 108 株大肠埃希氏菌对 18 种抗生素进行药敏分析, 结果如表 1 所示, 其中 4 重及以上耐药率, ESBLs+*E. coli* 明显高于 ESBLs-*E. coli*。18 种抗生素药敏结果中, ESBLs+*E. coli* 对头孢曲松、头孢他啶等三代头孢菌素的耐药率均处于较高水平, 32 株 ESBLs+*E. coli* 中, 9 株对头孢曲松耐药, 2 株对头孢他啶耐药, 10 株对头孢曲松和头孢他啶均耐药, 同曾莉^[10]与 TIPPELSKIRCH 等^[11]研究结果基本一致。ESBLs+*E. coli* 这种情况的产生可能与第 3 代头孢菌素在临床上广泛使用有密切关系^[12]。K-B 法和 VITEK2 法在检测大肠埃希氏菌多重耐药结果统计学上无差异, 但由于 VITEK2 法可多通量同时检测、且耗时较短, 运用于多重耐药检测时更有优势。

表 1 两种方法检测 108 株大肠埃希氏菌多重耐药情况
Table 1 Detection of multi-antibiotic susceptibility in 108 strains of *E. coli* by two methods

菌种类型	ESBLs+ <i>E. coli</i> (n=32)		ESBLs- <i>E. coli</i> (n=76)	
	K-B 法	VITEK2 法	K-B 法	VITEK2 法
1 重耐药率/%	9.38 (3/32)	6.26 (2/32)	15.79 (12/76)	13.16 (10/76)
2 重耐药率/%	15.63 (5/32)	12.50 (4/32)	26.31 (20/76)	31.58 (24/76)
3 重耐药率/%	34.37 (11/32)	40.62 (13/32)	38.16 (29/76)	35.52 (27/76)
4 重及以上耐药率/%	40.62 (13/32)	40.62 (13/32)	19.74 (15/76)	19.74 (15/76)
χ^2 与 P	$\chi^2=0.163, P=0.686$		$\chi^2=0.000, P=1.000$	

注: n 代表菌株数量; % (n/n): 百分比(菌株数/菌株数), 下同。

2.2 两种方法检测 108 株大肠埃希氏菌药敏结果情况

选用 K-B 法与 VITEK2 法对 108 株大肠埃希氏菌进行 18 种抗生素耐药表型检测, 结果如表 2 所示, 有 9 株 ESBLs+*E. coli* 和 5 株 ESBLs-*E. coli* 运用 K-B 法检测时结果为耐药而 VITEK2 法检测结果为敏感, K-B 法和 VITEK2 法检测复方新诺明耐药表型的结果差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明两种方法检测复方新诺明耐药表型时符合性较低, 喻华等^[13]通过研究证实运用 K-B 法检测复方新诺明时存在“假耐药”现象, “假耐药”率达 11.6%。张小卫等^[14]

分析产生“假耐药”现象可能与分离培养基中的胸腺嘧啶核苷的成分有关。本研究结果提示, 试验者选用 K-B 法测定大肠埃希氏菌复方新诺明耐药表型时, 如试验结果为耐药, 应采用其他方法进行验证, 综合判断后上报结果。

2.3 两种方法检测 108 株大肠埃希氏菌药敏结果一致性情况

如表 3 所示, 比较 18 种抗生素的 CA 值, 标准要求 $CA \geq 90.0\%$, 其中氨苄西林等 16 种抗生素 CA 值均符合标准要求, 说明 K-B 法与 VITEK2 法检测大肠埃希氏菌耐药

表 2 两种方法测定 108 株大肠埃希氏菌 18 种抗生素药敏结果情况

Tab 2 Determination of 18 kinds of antibiotic resistance phenotypes in 108 strains of *E. coli* by two methods

抗生素类型	方法	敏感率 S/%	中介率 I/%	耐药率 R/%	χ^2	P
AM	K-B 法	22.22 (24/108)	8.33 (9/108)	69.44 (75/108)	0.007	0.935
	VITEK2 法	23.15 (25/108)	7.41 (8/108)	69.44 (75/108)		
SAM	K-B 法	53.70 (58/108)	15.74 (17/108)	30.56 (33/108)	0.998	0.318
	VITEK2 法	62.04 (67/108)	11.11 (12/108)	26.85 (29/108)		
TZP	K-B 法	97.22 (105/108)	2.78 (3/108)	0.00 (0/108)	0.204	0.652
	VITEK2 法	98.15 (106/108)	1.85 (2/108)	0.00 (0/108)		
CZ	K-B 法	62.04 (67/108)	9.26 (10/108)	28.70 (31/108)	0.052	0.820
	VITEK2 法	64.81 (70/108)	6.48 (7/108)	28.70 (31/108)		
CTT	K-B 法	94.44 (102/108)	0.92 (1/108)	4.63 (5/108)	0.000	1.000
	VITEK2 法	94.44 (102/108)	0.92 (1/108)	4.63 (5/108)		
CAZ	K-B 法	64.81 (70/108)	8.33 (9/108)	26.85 (29/108)	0.024	0.877
	VITEK2 法	65.74 (71/108)	8.33 (9/108)	25.92 (28/108)		
CRO	K-B 法	51.85 (56/108)	4.63 (5/108)	43.52 (47/108)	0.005	0.944
	VITEK2 法	51.85 (56/108)	5.56 (6/108)	42.59 (46/108)		
FEP	K-B 法	87.04 (94/108)	5.56 (6/108)	7.41 (8/108)	0.000	1.000
	VITEK2 法	87.96 (95/108)	3.70 (4/108)	8.33 (9/108)		
ATM	K-B 法	67.59 (73/108)	6.48 (7/108)	25.92 (28/108)	0.310	0.578
	VITEK2 法	70.37 (76/108)	7.41 (8/108)	22.22 (24/108)		
ETP	K-B 法	99.07 (107/108)	0.92 (1/108)	0.00 (0/108)	0.336	0.562
	VITEK2 法	98.15 (106/108)	1.85 (2/108)	0.00 (0/108)		
IPM	K-B 法	100.00 (108/108)	0.00 (0/108)	0.00 (0/108)	0.000	1.000
	VITEK2 法	100.00 (108/108)	0.00 (0/108)	0.00 (0/108)		
AN	K-B 法	91.67 (99/108)	3.70 (4/108)	4.63 (5/108)	0.024	0.877
	VITEK2 法	91.67 (99/108)	4.63 (5/108)	3.70 (4/108)		
GM	K-B 法	75.92 (82/108)	4.63 (5/108)	19.44 (21/108)	0.007	0.932
	VITEK2 法	75.92 (82/108)	5.56 (6/108)	18.52 (20/108)		
TM	K-B 法	89.81 (97/108)	0.93 (1/108)	9.26 (10/108)	0.014	0.907
	VITEK2 法	90.74 (98/108)	0.00 (0/108)	9.26 (10/108)		
CIP	K-B 法	61.11 (66/108)	7.41 (8/108)	31.48 (34/108)	0.022	0.881
	VITEK2 法	61.11 (66/108)	9.26 (10/108)	29.63 (32/108)		
LEV	K-B 法	63.89 (69/108)	7.41 (8/108)	28.70 (31/108)	0.095	0.758
	VITEK2 法	64.81 (70/108)	9.26 (10/108)	25.92 (28/108)		
FT	K-B 法	93.52 (101/108)	0.93 (1/108)	5.56 (6/108)	0.000	1.000
	VITEK2 法	93.52 (101/108)	0.93 (1/108)	5.56 (6/108)		
SXT	K-B 法	44.44 (48/108)	6.48 (7/108)	49.07 (53/108)	4.432	0.035
	VITEK2 法	59.26 (64/108)	4.63 (5/108)	36.11 (39/108)		

表 3 两种方法检测 108 株大肠埃希氏菌药敏结果一致性情况
 Table 3 Consistency of antibiotic resistance phenotypes results of 108 strains of *E. coli* detected by two methods

抗生素 类型	VITEK2 法	K-B 法			CA/%	VME /%	ME /%	MIE /%
		S	I	R				
AM	S	24	1	0	99.07 (107/108)	0.00 (0/75)	0.00 (0/24)	0.93 (1/108)
	I	0	8	0				
	R	0	0	75				
SAM	S	58	9	0	87.96 (95/108)	0.00 (0/33)	0.00 (0/58)	12.04 (13/108)
	I	0	8	4				
	R	0	0	29				
TZP	S	105	1	0	99.07 (107/108)	0.00 (0/0)	0.00 (0/105)	0.92 (1/108)
	I	0	2	0				
	R	0	0	0				
CZ	S	67	3	0	97.22 (105/108)	0.00 (0/31)	0.00 (0/67)	2.78 (3/108)
	I	0	7	0				
	R	0	0	31				
CTT	S	102	0	0	100.00 (108/108)	0.00 (0/5)	0.00 (0/102)	0.00 (0/108)
	I	0	1	0				
	R	0	0	5				
CAZ	S	69	2	0	96.30 (104/108)	0.00 (0/29)	0.00 (0/70)	3.70 (4/108)
	I	1	7	1				
	R	0	0	28				
CRO	S	55	1	0	96.30 (104/108)	0.00 (0/47)	1.78 (1/56)	2.78 (3/108)
	I	0	4	2				
	R	1	0	45				
FEP	S	94	1	0	96.30 (104/108)	0.00 (0/8)	0.00 (0/94)	3.70 (4/108)
	I	0	3	1				
	R	0	2	7				
ATM	S	73	1	2	95.37 (103/108)	7.14 (2/28)	0.00 (0/73)	2.78 (3/108)
	I	0	6	2				
	R	0	0	24				
ETP	S	106	0	0	99.07 (107/108)	0.00 (0/0)	0.00 (0/107)	0.92 (1/108)
	I	1	1	0				
	R	0	0	0				
IPM	S	108	0	0	100.00 (108/108)	0.00 (0/0)	0.00 (0/108)	0.00 (0/108)
	I	0	0	0				
	R	0	0	0				
AN	S	98	1	0	97.22 (105/108)	0.00 (0/5)	0.00 (0/99)	2.78 (3/108)
	I	1	3	1				
	R	0	0	4				
GM	S	80	2	0	94.44 (102/108)	0.00 (0/21)	1.22 (1/82)	4.63 (5/108)
	I	1	3	2				
	R	1	0	19				
TM	S	97	1	0	99.07 (107/108)	0.00 (0/10)	0.00 (0/97)	0.92 (1/108)
	I	0	0	0				
	R	0	0	10				
CIP	S	65	1	0	96.30 (104/108)	0.00 (0/34)	0.00 (0/66)	3.70 (4/108)
	I	1	7	2				
	R	0	0	32				
LEV	S	68	2	0	94.44 (102/108)	0.00 (0/31)	0.00 (0/69)	5.56 (6/108)
	I	1	6	3				
	R	0	0	28				
FT	S	101	0	0	100.00 (108/108)	0.00 (0/6)	0.00 (0/101)	0.00 (0/108)
	I	0	1	0				
	R	0	0	6				
SXT	S	48	2	14	85.18 (92/108)	26.41 (14/53)	0.00 (0/48)	1.85 (2/108)
	I	0	5	0				
	R	0	0	39				

表型时一致率高, 关联性好, 结果与王瑶等^[15]研究结论基本一致。氨苄西林/舒巴坦 CA (87.96%)和复方新诺明 CA (85.18%)未达到 CA \geq 90.0%标准要求。氨苄西林/舒巴坦 CA (87.96%)不符合标准要求可能与其 MIE (12.04%)有关, 复方新诺明 CA (85.18%)不符合标准要求可能与其 VME (26.41%)有关。

标准要求 VME \leq 1.5%, ME \leq 3.0%, MIE \leq 10.0%, 其中 18 种抗生素的 ME 值均符合标准要求。复方新诺明的 VME (26.41%)远超过 VME \leq 1.5%的标准要求, 是因为本研究中有 9 株 ESBLs+*E. coli* 和 5 株 ESBLs-*E. coli* 运用 K-B 法检测时结果为耐药而 VITEK2 法为敏感, 这也进一步说明 K-B 法和 VITEK2 法检测复方新诺明耐药表型的结果差异有统计学意义。

氨苄西林/舒巴坦的 MIE (12.04%)超出 MIE \leq 10.0% 的标准要求, 是因为本研究中有 3 株 ESBLs+*E. coli* 及 6 株 ESBLs-*E. coli* 用 K-B 法检测结果为中介而 VITEK2 法检测结果为敏感和有 2 株 ESBLs+*E. coli* 及 2 株 ESBLs-*E. coli* 用 K-B 法检测结果为耐药而 VITEK2 法检测结果为中介。此外, 氨苄西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑林、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、氨基糖苷、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左旋氧氟沙星、复方新诺明等虽然 MIE 值没有超出标准要求, 但是均出现类似情况。VITEK2 法检测耐药表型的原理是光电比浊法^[9], 通过选择检测待测抗生素的 3~4 个浓度点, 预测待测菌的生长模型, 经系统回归分析推测最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 因此当检测的抗生素浓度点不在菌株折点附近时, 可能会产生“假敏感”现象。这种“假敏感”现象在吴祥兵等^[16]、刘亚丽等^[17]、王莹等^[18]的研究中均有相关阐述, 本研究中部分抗生素的 MIE 偏高的原因可能也与 VITEK2 法存在“假敏感”现象有关。目前关于 VITEK2 法“假敏感”现象菌株来源均为临床收集, 本研究菌种来源为食源性大肠埃希氏菌, 可为 VITEK2 法“假敏感”现象出现规律和特点的进一步研究提供参考。

此外, 氨基糖苷的 VME 为 7.14%, 这可能是由于在用 K-B 法进行氨基糖苷药敏试验时发现了一株食源性异质性耐药大肠埃希氏菌导致。这株 ESBLs+*E. coli* 虽然在 MH 平板上抑菌圈直径为 25.70 mm, 超过敏感折点值(22 mm), 但抑菌圈内有 1 个单菌落存在, 该菌落到药敏纸片的距离为 3.86 mm, 小于抑菌折点值(12 mm), 因此判读 K-B 法检测该抗生素药敏结果为抑菌。猜测该菌可能为异质性耐药大肠埃希氏菌, 异质性耐药大肠埃希氏菌在岑柯等^[19]的研究中也有发现。异质性耐药^[20]是指某些菌株的耐药性表现出异质特性, 是同一菌株中不同亚群表现出对同一抗生素敏感度不同的现象, 表现为 K-B 法检测药敏时抑菌圈内有数量不等的菌落生长^[21]。关于异质性耐药形成的机制尚未清晰, 但其危害却不容小觑, 我国属于抗生素使用大国, 在长期复杂

的抗生素压力环境选择下, 更高水平的耐药亚群不断增加, 很可能是患者反复感染和药物治疗失败的主要原因之一^[22]。越来越多的异质性耐药菌被研究者们报道^[20,23]。近年来, 研究者们发现大肠埃希氏菌对碳青霉烯类临床常见抗生素也出现了异质性耐药现象^[24]。关于 K-B 法检测大肠埃希氏菌异质性耐药菌相比 VITEK2 法更优值得研究者们加以关注。

3 讨论与结论

研究数据显示, 致病性大肠埃希氏菌是人类食源性疾病爆发的常见病原微生物之一^[25-26], 加上肠杆菌科细菌在临床上的检出率及耐药率连年攀升, 其中以大肠埃希氏菌的耐药率最为严重^[27], 耐药基因可以在人体肠道的正常菌群和致病菌之间互相转移^[28], 对公众健康安全构成潜在威胁。本研究发现, ESBLs+*E. coli* 的 4 重及以上耐药率明显高于 ESBLs-*E. coli*, 分析其原因, ESBLs 存在于质粒上, 可以在同一菌种甚至不同菌种之间广泛传播及扩散, 导致产 ESBLs 细菌呈多重耐药^[29]。赵凤菊等^[12]对 ESBLs+*E. coli* 的多重耐药研究时发现, 9~11 重耐药率高达 65%, ESBLs+*E. coli* 的多重耐药率处于高水平的现状对食源性疾病风险及临床抗生素治疗提出了更大的挑战, ESBLs+*E. coli* 的耐药性通过食物链转移风险更高。因此建议相关部门加强食源性 ESBLs+*E. coli* 耐药谱的监测。

药敏结果的准确可靠是监测耐药谱的前提, K-B 法和 VITEK2 均广泛应用于细菌的药敏试验。K-B 法具有操作方法简单, 检测成本低, 便于基层实验室选用的优点, 但步骤多, 分析时间较长, 对人员的操作熟练度要求较高^[30]; VITEK2 法虽仪器价格较昂贵、抗生素类型选择不如 K-B 法种类多, 但具有自动化程度高、分析时间短、人为干扰因素少等优点, 是现代实验室开展药敏试验时的首选。目前针对大肠埃希氏菌药敏试验方法一致性研究集中于临床分离的菌株^[13,31], 本研究菌种来源为食源性大肠埃希氏菌, 可为大肠埃希氏菌药敏试验方法研究积累数据。研究结果提示, K-B 法与 VITEK2 法测定食源性大肠埃希氏菌不同抗生素耐药表型结果存在不同误差, VITEK2 法与 K-B 法不具有完全等同性, 在大部分抗生素耐药表型检测中两种方法可相互选择, 但试验者需要注意的是, K-B 法对异质性耐药菌识别能力优于 VITEK2 法, 但是在检测复方新诺明耐药表型时, 应采用其他方法进行验证, 综合判断后上报结果。

参考文献

- [1] 罗三凤, 黎四平. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希氏菌耐药现状及传播模式[J]. 当代医药论丛, 2023, 21(11): 90-93.
- LUO SF, LI SP. Current situation and spread of drug resistance of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamase [J]. Cotem

- Med Sym, 2023, 21(11): 90–93.
- [2] 全国细菌耐药监测网. 2021 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中华检验医学杂志, 2023, 46(6): 566–581.
- China antimicrobial resistance surveillance system. 2021 National antimicrobial resistance surveillance report [J]. Chin J Lab Med, 2023, 46(6): 566–581.
- [3] ZHANG QQ, YING GG, PAN CG, *et al.* Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. [J]. Env Sci Technol, 2015, 49(11): 6772–6782.
- [4] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2018–2021 年中医医院多重耐药菌监测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(10): 1148–1158.
- China antimicrobial resistance surveillance system. Multidrug-resistant organisms in traditional Chinese medicine hospitals: Surveillance report from China antimicrobial resistance surveillance system, 2018–2021 [J]. Chin J Infect Control, 2023, 22(10): 1148–1158.
- [5] 罗石任, 王锦爱, 张云芳. 产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希氏菌的耐药调查及用药分析[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(24): 128–130.
- LUO SR, WANG JAI, ZHANG YF. Drug resistance and medication analysis of ESBLs-producing *Escherichia coli* in the hospital [J]. Asia-Pacific Trad Med, 2014, 10(24): 128–130.
- [6] MUSYOKI VM, MUIA MM, WINNIE M, *et al.* Antimicrobial susceptibility pattern of acinetobacter isolates from patients in Kenyatta National hospital, Nairobi, Kenya [J]. J Pan Afri Med, 2019, 33: 146.
- [7] EL-BADAWY MF, ABDELWAHAB SF, ALGHAMDI SA, *et al.* Characterization of phenotypic and genotypic traits of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates recovered from a tertiary care hospital in Taif, Saudi Arabia [J]. Inf Drug Resis, 2019, 3(12): 3113–3124.
- [8] 王战豪, 王晓蕾, 刘华伟, 等. 用 3 种药敏方法评价流感嗜血杆菌对 3 种 β -内酰胺类药物的药敏实验一致性的研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(11): 1905–1908, 1933.
- WANG ZH, WANG XL, LIU HW, *et al.* A study on the consistency of three methods for detecting the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to three β -lactams drugs [J]. Lab Imm Clin Med, 2021, 28(11): 1905–1908, 1933.
- [9] 代鑫露, 黄松音, 李红玉. 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[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(3): 103–106.
- DAI XL, HUANG SY, LI HY. Comparison of three susceptibility testing methods of tigecycline against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. J Mod Lab Med, 2020, 35(3): 103–106.
- [10] 曾莉. 不同来源大肠杆菌 ESBLs 基因分子流行病学研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- ZENG L. Molecular characteristics of plasmid-mediated ESBLs genes in *Escherichia coli* isolated from animals, retail meat and humans [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [11] TIPPELSKIRCH P, GÖLZ G, PROJAHN M, *et al.* Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in broiler chicken during slaughter in Germany [J]. Int J Food Microbiol, 2018, 281: 82–89.
- [12] 赵凤菊, 曹东, 李井春, 等. 猪源大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶的检测及其耐药性分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(2): 111–115.
- ZHAO FJ, CAO D, LI JC, *et al.* Detection and analysis of drug resistance of ESBLs in *Escherichia coli* strains isolated from swine [J]. J Henan Agric Sci, 2017, 46(2): 111–115.
- [13] 喻华, 刘华, 周忠华, 等. VITEK 药敏系统与 Kirby-Bauer 纸片法药敏结果的评价[J]. 西部医学, 2004, 16(3): 218–219.
- YU H, LIU H, ZHOU ZH, *et al.* Evaluation result of antibiotic susceptibility test between VITEK method and Kirby-Bauer method [J]. Med J West China, 2004, 16(3): 218–219.
- [14] 张小卫, 邵海枫, 李珍大, 等. MH 肉汤增菌在复方新诺明药物敏感试验中的重要性[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(6): 353.
- ZHANG XW, SHAO HF, LI ZD, *et al.* The significance of MH broth enrichment in antibiotic susceptibility test of cotrimoxazole [J]. J Chin Clin Lab Sci, 2001, 19(6): 353.
- [15] 王瑶, 徐英春, 谢秀丽. 全自动微生物鉴定药敏分析仪对临床相关细菌药敏测定能力的评估[J]. 中华检验医学, 2007, 30(9): 1052.
- WANG Y, XU YC, XIE XL. Evaluation of Vitek 2 compact for antimicrobial susceptibility testing of clinically relevant bacteria [J]. Chin J Lab Med, 2007, 30(9): 1052.
- [16] 吴祥兵, 叶颖颖, 支绍桅, 等. VITEK 2 Compact 与 Phoenix-100 对革兰阴性杆菌药物敏感试验结果对比分析[J]. 中国乡村医药, 2021, 28(12): 47–49.
- WU XB, YE YY, ZHI SW, *et al.* Detection and analysis of antibiotic susceptibility test between VITEK 2 method and Phoenix-100 method on gram-negative rod [J]. CN J Rur Med Pha, 2021, 28(12): 47–49.
- [17] 刘亚丽, 徐和平, 肖晟. 评估纸片扩散法与 Vitek Compact GN13 测定肠杆菌科细菌体外药敏及 ESBLs 可靠性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 35(2): 139.
- LIU YL, XU HP, XIAO M. Evaluation of the capabilities of disc diffusion and Vitek2-Compact GN13 methods for testing antimicrobial susceptibility and screening of ESBLs Enterobacteriaceae clinical isolates [J]. Chin J Mic Imm, 2015, 35(2): 139.
- [18] 王莹, 汪鹏程, 曾章锐, 等. Vitek 2 Compact 全自动微生物仪检测鲍曼不动杆菌对阿米卡星敏感性误差的原因[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(1): 28–31.
- WANG Y, WANG PC, ZENG ZR, *et al.* Investigation on the source of errors for the susceptibility of *Acinetobacter baumannii* to amikacin detected by Vitek 2 compact [J]. J Chin Clin Lab Sci, 2013, 31(1): 28–31.
- [19] 岑柯, 裘春宁, 徐丽慧, 等. 基于 K-B 法筛选异质性耐药菌株及其对抗菌药物敏感试验结果的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(4): 44–47.
- CEN K, QIU CN, XU LH, *et al.* Screening of heterogeneous strains and its effect on antimicrobial susceptibility tests based on K-B method [J]. Chin J Microecol, 2019, 31(4): 44–47.
- [20] THET KT, LUNHA K, SRISRATTAKARN A, *et al.* Colistin heteroresistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a Thai university hospital [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2020, 36(7): 102.
- [21] 何建春, 董剑, 杨雷, 等. 亚胺培南异质性耐药大肠埃希菌血流感染流行病学及危险因素调查[J]. 新乡医学院学报, 2021, 38(2): 141–145, 151.
- HE JC, DONG J, YANG L, *et al.* Investigation on epidemiology and risk factors for infection of imipenem-heteroresistant *Escherichia coli* in bloodstream [J]. J Xinxiang Med Univ, 2021, 38(2): 141–145, 151.

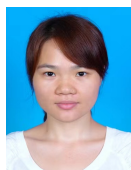
- [22] CHARRETIER Y, DIENE SM, BAUD D, *et al.* Colistin heteroresistance and involvement of the PmrAB regulatory system in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(9): e00788–18.
- [23] PEREIRA C, LARSSON J, HJORTT K, *et al.* The highly dynamic nature of bacterial heteroresistance impairs its clinical detection [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 521.
- [24] 赵艳坤, 刘慧敏, 孟璐, 等. 大肠埃希菌异质性耐药的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(9): 59–71.
ZHAO YK, LIU HM, MENG L, *et al.* Research progress in heteroresistance of *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bull*, 2022, 38(9): 59–71.
- [25] 李治平, 吴照, 刘旭红, 等. 甘肃省 2018 年病媒生物监测报告[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2019, 30(6): 639–642.
LI ZP, WU Z, LIU XH, *et al.* A vector surveillance report of Gansu province, China, 2018 [J]. *Chin J Vector Biol Control*, 2019, 30(6): 639–642.
- [26] 张慧敏. 傅立叶变换红外光谱技术对 6 种致病性大肠埃希氏菌快速分型的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(1): 216–222.
ZHANG HM. Rapid classification for 6 species of pathogenic *Escherichia coli* by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(1): 216–222.
- [27] 王永亮. 吉林省部分地区动物源大肠杆菌耐药性及多重耐药株全基因组序列分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022.
WANG YL. Genome sequence analysis of drug-resistant and multidrug-resistant *Escherichia coli* strains from animals in some areas of Jilin Province [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022.
- [28] 俞漪, 张云鹏, 曲勤凤. 市售生禽类产品分离大肠埃希氏菌药物敏感分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(16): 5419–5424.
YU Y, ZHANG YP, QU QF. Drug sensitivity analysis of *Escherichia coli* isolated from commercial poultry products [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(16): 5419–5424.
- [29] SCHWABER MJ, NAVON-VENEZIA S, SCHWARTZ D, *et al.* High levels of antimicrobial co-resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(5): 2137–2139.
- [30] 陈福红, 张思琴, 齐艳. K-B 法和 E-test 法测定 150 株 CRE 对头孢他啶/阿维巴坦药敏的一致性分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(22): 2724–2725.
CHEN FH, ZHANG SQ, QI Y. To analyze the consistency of drug susceptibility of 150 strains of carbapenem-resistant enterobacteriaceae to ceftazidime/avibactam by K-B method and E-test method [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2022, 32(22): 2724–2725.
- [31] 罗蔬薇, 夏云, 何秀丽, 等. VITEK2 全自动微生物分析系统药敏检测结果准确性探讨[J]. *重庆医学*, 2009, 38(19): 2413–2415.
LUO SW, XIA Y, HE XL, *et al.* Accuracy evaluation of automatic microorganism analysis system Vitek-2 for antimicrobial susceptibility test [J]. *Chongqing Med J*, 2009, 38(19): 2413–2415.

(责任编辑: 张晓寒 蔡世佳)

作者简介



梁其冰, 副研究员, 主要研究方向为药品质量安全和检验检测。
E-mail: 496180822@qq.com



冯春艳, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检验检测。
E-mail: 956228454@qq.com



罗小菊, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为微生物检验检测。
E-mail: 279106595@qq.com