

直接靶板微滴法快速检测肺炎克雷伯菌替加环素和多黏菌素的敏感性

夏兆新,杨文苏,朱毅,胡心益,林春晖,蒋童,沈继录

摘要 目的 探究直接靶板微滴法(DOT-MGA)快速检测替加环素和多黏菌素敏感性。方法 共收集了67株肺炎克雷伯菌进行DOT-MGA测试,将有或没有替加环素、多黏菌素(药物终浓度为2 μg/ml)的6 μl微滴一式三份加在靶板上,设置了3、4、6、8 h四个孵育时间点。Bruker Biotyper软件将测试结果判定为敏感(评分<1.7分)或非敏感(评分≥1.7分)。结果 孵育4 h后,替加环素和多黏菌素的生长有效率、特异度、阳性预测值均为100.00%,分类一致率分别为98.15%、96.15%,灵敏度分别为96.30%、92.31%,阴性预测值分别为96.45%、92.86%。结论 DOT-MGA可以快速准确鉴别对替加环素和多黏菌素的耐药表型,与微量肉汤稀释法比较具有良好的—致性。

关键词 直接靶板微滴法;快速药敏试验;替加环素;多黏菌素

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0859-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.026

肺炎克雷伯菌是重要的院内感染病原体,其耐药性在全球范围内不断增加,且治疗药物愈发受限,是重大的公共卫生问题之一^[1]。替加环素和多黏菌素是治疗这些致病菌感染的重要药物^[2-3]。然而随着其在临床抗感染治疗中的逐渐使用,近年来也不断有对其耐药的菌株被分离出来^[4-5]。CHINET数据^[6]显示,2021年肺炎克雷伯菌的替加环素耐药率为4.2%,中介率为7.0%,而多黏菌素在克雷伯菌属中的耐药率也达到3.9%。目前临床上常用纸片扩散法,或基于微量肉汤稀释法来检测替加环素和多黏菌素的敏感性,然而其操作繁琐,耗时长,可能会延误治疗。为了优化替加环素和多黏菌素的使用,该研究基于基质辅助激光解吸/电离飞行时间质

谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术^[7-8]进行直接靶板微滴生长法(direct-on-target microdroplet growth assay, DOT-MGA),预测替加环素和多黏菌素的敏感性,评估数小时内快速检测肺炎克雷伯菌耐药表型的可行性和准确性。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 共收集安徽医科大学第一附属医院临床分离的肺炎克雷伯菌67株,其中27株对替加环素耐药菌,13株对多黏菌素耐药,27株对两种抗生素敏感。所有菌株均经过MALDI-TOF MS(德国Bruker公司)鉴定,确定菌种。

1.2 材料与试剂 MALDI-TOF MS质谱仪,质谱样品处理基质液及MALDI-TOF MS靶板均购自德国Bruker公司;替加环素、多黏菌素和CAMHB肉汤粉末(阳离子调节肉汤)购自北京索莱宝科技有限公司;哥伦比亚血琼脂平板购自上海科玛嘉微生物技术有限公司;ATCC27853和ATCC25922作为微量肉汤稀释法和MALDI-TOF MS鉴定所用的标准菌株,为安徽医科大学第一附属医院微生物实验室所保存。

1.3 微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC) 通过微量肉汤稀释法测定替加环素的MIC。根据美国食品药品监督管理局临床折点,解释替加环素敏感性(MIC ≥ 8 mg/L为耐药, MIC = 4 mg/L为中介, MIC ≤ 2 mg/L为敏感),ATCC25922作为参考菌株;根据欧洲抗菌药敏感性试验委员会临床折点,解释多黏菌素敏感性(MIC ≥ 4 mg/L为耐药, MIC ≤ 2 mg/L为敏感),ATCC27853和ATCC25922作为参考菌株。

1.4 DOT-MGA 在96孔微量滴定板孔中先加入100 μl菌液,后加入100 μl的MH肉汤(含或不含抗生素,其终浓度为2 μg/ml),不含抗生素的孔用作该样品的生长对照孔。然后取6 μl混合液微滴转移到MALDI-TOF MS靶板孔上,一式三份进行,3个孔含有抗生素,另外3个孔不含抗生素。将接种

2022-12-10 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究重大项目(编号:KJ2021ZD0032)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科,安徽省公共卫生临床中心,合肥 230022

作者简介:夏兆新,女,硕士研究生;

沈继录,男,主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail: shenjilu@ahmu.edu.cn

好的靶板放入塑料运输盒中,在盒底部加入 4 ml 去离子水,用作湿盒。置于温箱中于 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 分别孵育 3、4、6、8 h 后,使用无尘纸将肉汤从靶板上移除。待靶板上剩余菌液完全干燥后,加入 1 μl 基质液覆盖靶点,手动收集 MALDI-TOF 质谱光谱,并由 MALDI Biotyper 3 软件(Bruker Daltonik)评估。

预实验中随机选取 13 株敏感和 13 株耐药的细菌,分别设置了 3、4、6 和 8 h 的孵育时间后,对所有菌株进行 DOT-MGA 进行检测。

在生长对照鉴定得分 ≥ 1.7 分的情况下,该组测试判定为有效。含有替加环素或多黏菌素的样本,成功鉴定(得分 ≥ 1.7 分)被解释为非敏感(中介或耐药)结果 NS (no susceptible),而鉴定失败(得分 < 1.7 分)定义为敏感 S (susceptible)。

1.5 数据处理 DOT-MGA 的最终结果分别与微量肉汤稀释法的结果进行比较,按照如下公式计算有效率、敏感度、特异度、阴性预测值、阳性预测值及分类一致率(categorical agreement, CA)。CA 即被评估方法的结果与微量肉汤稀释法药敏结果一致的菌株所占百分比。见表 1。

表 1 DOT-MGA 数据处理

| DOT-MGA | 微量肉汤稀释法 | | 合计 |
|---------|---------|-------|---------|
| | 非敏感(NS) | 敏感(S) | |
| 非敏感(NS) | a | b | a+b |
| 敏感(S) | c | d | c+d |
| 合计 | a+c | b+d | a+b+c+d |

灵敏度 = $a/(a+c)$; 特异度 = $d/(b+d)$; 阳性预测值 = $a/(a+b)$; 阴性预测值 = $d/(c+d)$

2 结果

研究^[7,9]报道中显示, DOT-MGA 试验以 6 μl 液滴培养可以获得最佳检测性能。在本研究前期实验中以 4、6、8 μl 作为比较,发现液滴体积小,小于 4 μl 细菌生长状态不佳,超过 6 μl 则容易溢出靶板孔,造成交叉污染,6 μl 可以很好的固定在孔内,获

得最佳的生长状态,于是后续实验均采用 6 μl 的体积来摸索最佳孵育时间。

2.1 替加环素的 DOT-MGA 结果 替加环素 DOT-MGA 预实验结果显示,培养 3 h 后,细菌生长的有效率为 88.46%, CA 为 73.91%, 细菌生长状态不好,不能被正确检测。而 4 h 后,细菌生长的有效率为 100.00%, CA 为 96.15%, 其灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 92.31%、100.00%、100.00%、92.86%, 已达到最佳状态,随着时间延长到 6 h 和 8 h,检测性能未能得到明显的提高。扩大菌株量,对所收集到的 54 株菌株,以 6 μl 液滴,孵育 4 h 后,经过 MALDI-TOF 质谱仪检测,与微量肉汤稀释法对比后,只有 1 株菌存在中介判断为敏感,存在微小误差,其他结果均一致。DOT-MGA 的有效率、CA、灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 100.00%、98.15%、96.30%、100.00%、100.00%、96.45%,与微量肉汤稀释法的结果具有良好的一致性。见表 2。

2.2 多黏菌素的 DOT-MGA 结果 本研究共收集到 13 株多黏菌素不敏感的菌株,又随机选取了 13 株多黏菌素敏感的菌株进行 DOT-MGA 实验,在 3 h 孵育时间下生长有效率为 92.15%,而 4、6、8 h 孵育时间下,生长对照孔均能有效鉴定出,生长有效率为 100.00%,而在孵育 4 h 后, DOT-MGA 的鉴定性能达到最佳,其 CA、灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 96.15%、92.31%、100.00%、100.00%、92.86%,孵育时间延长到 6 h 和 8 h,检测性能与 4 h 的结果一致。见表 3。

3 讨论

目前,微量肉汤稀释法是抗菌药物敏感性实验的金标准^[10]。临床常用的 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统是基于该方法进行药物 MIC 值的检测,但其结果通常不能在同一天内获得,从而可能延误有效的治疗,微生物的快速药敏检测仍然是

表 2 DOT-MG 对替加环素非敏感菌株的鉴定性能

| 孵育时间 | 有效率(%) | CA(%) | 灵敏度(%) | 特异度(%) | 阳性预测值(%) | 阴性预测值(%) | 菌株数 |
|---------------|--------|-------|--------|--------|----------|----------|----------|
| 3 h(13NS,13S) | 88.46 | 73.91 | 45.45 | 100.00 | 100.00 | 66.67 | 6(VME) |
| 4 h(13NS,13S) | 100.00 | 96.15 | 92.31 | 100.00 | 100.00 | 92.86 | 1(VME) |
| 6 h(13NS,13S) | 100.00 | 96.00 | 100.00 | 92.31 | 92.86 | 92.31 | 1(ME/mE) |
| 8 h(13NS,13S) | 96.15 | 96.00 | 100.00 | 92.31 | 92.31 | 100.00 | 1(ME/mE) |
| 4 h(27NS,27S) | 100.00 | 98.15 | 96.30 | 100.00 | 100.00 | 96.45 | 1(mE) |

NS: 替加环素耐药或中介的菌株; S: 替加环素敏感的菌株; VME: 非常重大误差,将耐药误判为敏感,即不能检出耐药; ME: 重大误差,将敏感误判为耐药,即假耐药; mE: 微小误差,将中介报告为敏感或耐药,将敏感或耐药判断为中介

表3 靶板微滴生长法对多黏菌素非敏感菌株的鉴定性能

| 孵育时间 | 有效率(%) | CA(%) | 灵敏度(%) | 特异度(%) | 阳性预测值(%) | 阴性预测值(%) | 菌株数 |
|---------------|--------|-------|--------|--------|----------|----------|--------|
| 3 h(13NS,13S) | 96.15 | 88.00 | 69.23 | 100.00 | 100.00 | 81.25 | 3(VME) |
| 4 h(13NS,13S) | 100.00 | 96.15 | 92.31 | 100.00 | 100.00 | 92.86 | 1(VME) |
| 6 h(13NS,13S) | 100.00 | 96.15 | 92.31 | 100.00 | 100.00 | 92.86 | 1(VME) |
| 8 h(13NS,13S) | 100.00 | 96.15 | 92.31 | 100.00 | 100.00 | 92.86 | 1(VME) |

NS:替加环素耐药或中介的菌株;S:替加环素敏感的菌株;VME:非常重大误差,将耐药误判为敏感,即不能检出耐药;ME:重大误差,将敏感误判为耐药,即假耐药;mE:微小误差,将中介报告为敏感或耐药,将敏感或耐药判断为中介

急需解决的问题。DOT-MGA 是基于微量肉汤稀释法原理,利用 MALDI-TOF MS 仪器具有更高的检测性能,缩短常规肉汤稀释法的孵育时间,从而达到快速检测的效果,且与肉眼观察结果比较,既可以排除主观因素的干扰,也可以提高其准确性和灵敏度,这一方法受到了人们的广泛关注^[11-14]。有学者将美罗培南与肺炎克雷伯菌和肠杆菌共同孵育,利用 DOT-MGA 在 4 h 内实现快速检出该菌对碳青霉烯酶的非敏感性和碳青霉烯酶的分型^[15-16]。本研究收集了临床分离的 27 株替加环素不敏感的菌株和 13 株多黏菌素不敏感的菌株,探究 DOT-MGA 对替加环素和多黏菌素耐药的肺炎克雷伯菌的表型检测性能。结果显示,在与替加环素、多黏菌素共同孵育 4 h 后,大部分肺炎克雷伯菌可以被 MALDI-TOF MS 仪检测出,其抗生素敏感性的结果与肉汤稀释法相比具有较高的一致性,替加环素和多黏菌素的生长有效率均为 100.00%,CA 分别为 98.15% 和 96.15%。在替加环素 DOT-MGA 实验中,54 株菌中有 1 株菌(MIC = 4 μg/ml,I)由中介误判为敏感,存在微小误差,多黏菌素 DOT-MGA 实验中,26 株菌有 1 株菌(MIC = 4 μg/ml,R)由耐药误判为敏感,存在非常重大误差,这可能是由于该菌 MIC 值与选取的折点药物浓度相近(2 μg/ml),而配置过程中存在认为误差引起。

DOT-MGA 也同样可以推广到许多不同的微生物和抗生素检测中,Idelevich et al^[17]评估了 DOT-MGA 检测头孢呋辛、厄他培南、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素等多种抗生素的性能。但 DOT-MGA 检测需要优化抗生素-生物体组合条件,摸索最适孵育时间以获得最佳检测性能。在本研究中,孵育时间为 3 h 时,部分细菌生长控制无法检测出,这可能是孵育时间过短,细菌含量低,细菌黏液性高,从而光谱较差,仪器无法检测出。而无抗生素孵育组,尽管生长控制孔已达到了仪器的检测限,但加药后偶尔也有几个替加环素或多黏菌素耐药的菌株生长仍未达到检测要求,这主要与微生物自身的生长状

况有关,生长缓慢的细菌需要更长的时间来与抗生素竞争,而过长的孵育时间也会导致细菌过度生长,并可能产生其他杂菌,从而无法做出准确的判断。适当的孵育时间应允许可以成功检测的细菌生长控制,同时可以准确表征细菌对抗生素的易感性。本研究中替加环素 DOT-MGA 组,有一株菌在两次 4 h 孵育鉴定中,一次未检出,一次可以正确预测,这个误差可能受操作过程中吸水纸吸取液滴不当或靶板清洁程度等多种因素的影响。因此,在摸索多种抗生素-细菌组合的最佳检测条件后,开发出一种含有固定含量抗生素的一次性靶板,改进弃去液滴的方式,规范操作流程,从而减小实验中的误差,更好用于临床药物敏感性的检测。

本研究仅对替加环素和多黏菌素这两种药物进行评估,研究表明 DOT-MGA 法可以在 4 h 孵育后检测对替加环素、多黏菌素敏感和不敏感的菌株,未对其他抗生素进行评估,但其他抗生素尤其是碳青霉烯类药物的检测先前已有报道,Idelevich et al 验证了多种抗生素在孵育 4 h 后便可获得最佳检测性能^[17]。替加环素、多黏菌素耐药的菌株难以收集,实验中的菌株量有限,仍需扩大样本量和细菌种类进一步验证。其中 Horseman et al^[11]的研究也表明 DOT-MGA 法在金黄色葡萄球菌、肠球菌、大肠杆菌和肺炎克雷伯菌四种常见病原菌的药敏鉴定中同样具有很高的准确性。DOT-MGA 方法在其他不同菌种的药物敏感性检测中可能也具有很大的潜能。

综上所述,DOT-MGA 方法可以快速鉴别替加环素和多黏菌素的敏感性,并可能用于不同菌种、不同抗生素敏感性的鉴别,这为临床微生物抗生素快速检测提供新的思路,对临床多重耐药菌的抗感染治疗具有重大意义。

参考文献

- [1] Logan L K, Weinstein R A. The epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae; the impact and evolution of a global menace [J]. J Infect Dis, 2017, 215 (Suppl 1): S28-36.
- [2] Yaghoubi S, Zekiy A O, Krutova M, et al. Tigecycline antibacterial

- activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance; narrative review [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2022, 41(7):1003–22.
- [3] Elias R, Duarte A, Perdigao J. A Molecular perspective on colistin and *Klebsiella pneumoniae*; mode of action, resistance genetics, and phenotypic susceptibility [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(7):1165.
- [4] Park Y, Choi Q, Kwon G C, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(12):e23506.
- [5] El-Sayed Ahmed M A E, Zhong L L, Shen C, et al. Colistin and its role in the era of antibiotic resistance; an extended review (2000–2019) [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1):868–85.
- [6] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2021年CHINET中国细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022, 22(5):521–30.
- [7] Li R, Tang H, Xu H, et al. Direct-on-target microdroplet growth assay applications for clinical antimicrobial susceptibility testing [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14:1423–5.
- [8] Neonakis I K, Spandidos D A. Detection of carbapenemase producers by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(10):1795–801.
- [9] Tang H, Li R, Xu H, et al. Direct-on-target microdroplet growth assay for detection of bacterial resistance in positive blood cultures [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14:4611–7.
- [10] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会, 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组. 多黏菌素类与替加环素及头孢他啶/阿维巴坦药敏方法和报告专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(10):964–72.
- [11] Horseman T S, Lustik M B, Fong K S K. Rapid qualitative antibiotic resistance characterization using VITEK MS [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2020, 97(4):115093.
- [12] Nix I D, Idelevich E A, Storck L M, et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from agar cultures and directly from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry-based direct-on-target microdroplet growth assay [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:232.
- [13] Idelevich E A, Storck L M, Sparbier K, et al. Rapid direct susceptibility testing from positive blood cultures by the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based direct-on-target microdroplet growth assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(10):e00913–8.
- [14] Neonakis I K, Spandidos D A. MALDI-TOF MS-based direct-on-target microdroplet growth assay; latest developments [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3):2555–6.
- [15] Correa-Martinez C L, Idelevich E A, Sparbier K, et al. Development of a MALDI-TOF MS-based screening panel for accelerated differential detection of carbapenemases in Enterobacterales using the direct-on-target microdroplet growth assay [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):4988.
- [16] 沈佳瑾, 黄声雷, 周春妹, 等. MALDI-TOF MS直接靶板微滴生长法对耐碳青霉烯类肠杆菌的快速鉴别诊断价值 [J]. *中国临床医学*, 2020, 27(4):549–53.
- [17] Idelevich E A, Nix I D, Busch J A, et al. Rapid simultaneous testing of multiple antibiotics by the MALDI-TOF MS direct-on-target microdroplet growth assay [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(10):1803.

A rapid tigecycline and polymyxin B susceptibility test for *Klebsiella pneumoniae* using direct-on-target micro-droplet growth assay

Xia Zhaoxin, Yang Wensu, Zhu Yi, Hu Xinyi, Lin Chunhui, Jiang Tong, Shen Jilu

(The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,

The Anhui Public Health Clinical Center, Laboratory Dept, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the direct-on-target micro-droplet growth assay (DOT-MGA) for rapid detection of the susceptibility of tigecycline and polymyxin. **Methods** A total of 67 strains of *Klebsiella pneumoniae* were collected for DOT-MGA. 6 μ l droplets with or without tigecycline or polymyxin (The final drug concentration is 2 μ g/ml) were added in triplicate into the wells of the MALDI plate with four incubation time points (3 h, 4 h, 6 h, and 8 h). The results were classified as susceptible (score < 1.7) and non-susceptible (score \geq 1.7) according to the Bruker Biotype software. **Results** After incubation for 4 h, the growth efficiency, specificity and positive predictive value of tigecycline and polymyxin were both 100.00%. The classification consistency rate was 98.15% and 96.15%, the sensitivity was 96.30% and 92.31%, and the negative predictive value was 96.45% and 92.86%, respectively. **Conclusion** DOT-MGA can provide rapid and reliable drug susceptibility diagnosis of tigecycline and polymyxin, which is of great significance for the clinical anti-infective treatment.

Key words DOT-MGA; antibiotic susceptibility test rapid assay; tigecycline; polymyxin