

质粒 I 型 β -内酰胺酶检测方法的研究

张 杨(泰山医学院附属新泰医院,山东新泰 271200)

【摘要】 目的 探讨质粒介导的 I 型 β -内酰胺酶(AmpCs)的检测方法。**方法** 用直接法、间接 I 法和间接 II 法对 1053 株细菌进行了质粒 AmpCs 检测,并对结果进行了比较。**结果** 共检出阳性菌 156 株,可疑菌 13 株,直接法检出率最低,间接 I 法和间接 II 法的检出率相近,在部分可疑结果的判断上,间接 I 法不如间接 II 法。**结论** 间接 II 法操作方便,可避免一些不良因素的影响,准确性和特异性高,可在临床上推广应用。

【关键词】 I 型 β -内酰胺酶; 直接法; 间接法; 质粒
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.05.015 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)05-0542-03

Study on detection method of plasmid-mediated AmpCs ZHANG Yang (Affiliated Xintai Hospital, Taishan Medical College, Xintai, Shandong 271200, China)

【Abstract】 Objective To probe the detection method of the plasmid-mediated AmpCs. **Methods** We used the cefoxitin 3-dimensional test (direct, indirect I and indirect II) to detect 1053 bacterial isolates and also compared the detection results. **Results** 156 positive isolates were detected out and 13 isolates were suspicious bacteria. In the detection rate, the direct test was lowest, and the indirect I test and the indirect II test were similar. The indirect II test was better than the indirect I test in judging some suspicious results. **Conclusion** The indirect II test is very easy to operate and can avoid the influence of some harmful factors with high accuracy and high specificity, and worth using in clinical practice.

【Key words】 AmpCs; direct test; indirect test; plasmid

质粒介导的 I 型 β -内酰胺酶(AmpCs),系基因转移到质粒使之成为 AmpC 酶,这种新的耐药表型因其较快的传播速度和较强的耐药性^[1-2],引起人们的高度关注。而在临床常规药敏中发现,质粒 AmpCs 对 β -内酰胺类药物的表型有时并不一定耐药^[3]。所以该酶的实验室检测,对防止误导临床用药,防止诱导产生更多的产酶菌株,是十分必要的。头孢西丁(FOX)三相试验是检测质粒 AmpCs 的良好方法^[4-5]。文献报道 FOX 三相试验检测质粒 AmpCs 分直接法和间接法^[6]。作者在实际工作中对间接法进行了改造,并与直接法和文献报道的间接法进行比较,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 从临床标本中检出革兰阴性杆菌 1 053 株,其中 FOX 抑菌环在 18 mm 以上(包含 18 mm)685 株,<18 mm 368 株。将 FOX 抑菌环直径小于 18 mm 的菌株分为 4 组:<3 mm 67 株,3~<18 mm 98 株,8~<13 mm 103 株,13~<18 mm 100 株。以大肠埃希菌 ATCC25922 为不产酶对照组。

1.1.2 试剂 FOX 纸片(每片 30 μ g)和 MH 琼脂,由杭州天和微生物试剂有限公司提供。

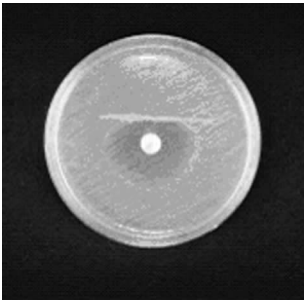
1.2 方法

1.2.1 直接法 将试验菌株制成浊度为 0.5 麦氏单位的菌悬液,用无菌棉棒均匀涂布于 MH 平板上。将 35 mm 长的双面刀片经火焰消毒后,在已生长试验菌株的血平板上轻压,使刀片均匀地沾上试验菌。然后将刀刃向下垂直插入已涂布试验菌株的 MH 平板上,轻轻拔出刀片,使切口口自然闭合。刀口沾菌量不宜过多,以免溢出琼脂表面。随后在距切割线 3 mm 处贴上 FOX 纸片,将 MH 平板 35 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

1.2.2 间接 I 法 将大肠埃希菌 ATCC25922 制成浊度为

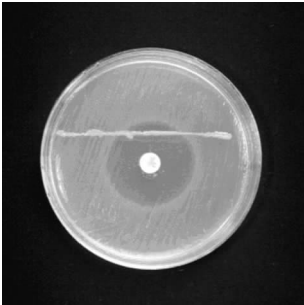
0.5 麦氏单位的菌悬液,均匀涂布于 MH 平板上,其他操作同直接法。

1.2.3 间接 II 法 操作程序同间接 I 法,只是用刀片作试验菌株切线时,切线的一端以 FOX 纸片为起点,呈放射状。切线的近端距离 FOX 纸片边缘 1~2 mm(平均 1.5 mm)为宜。



注:阳性显示切线处抑菌环明显缩小变形。

图 1 直接法和间接 I 法 AmpCs 阳性结果

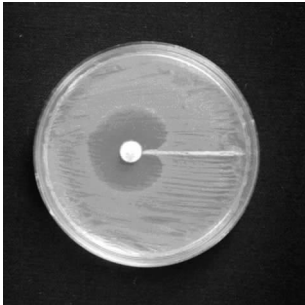


注:阴性显示切线处抑菌环无任何变化。

图 2 直接法和间接 I 法 AmpCs 阴性结果

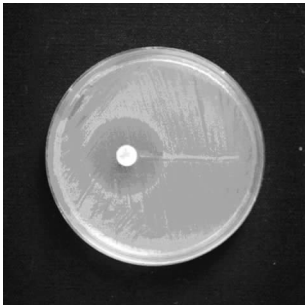
1.2.4 结果判断 直接法和间接 I 法 AmpCs 阳性及阴性结果如图 1、2 所示。间接 II 法 AmpCs 阳性及阴性结果如图 3、4

所示。在切线与抑菌环相交处,有明显的抑菌环缩小或凹陷变形,均提示为头孢西丁失活,为头孢西丁三相试验阳性。与切线相交处抑菌环无改变为阴性。



注:阳性显示抑菌环与切线相交处发生凹陷。

图 3 间接Ⅱ法 AmpCs 阳性结果



注:阴性显示抑菌环与切线相交处无任何变化。

图 4 间接Ⅱ法 AmpCs 阴性结果

2 结 果

2.1 1 053 株试验菌中,头孢西丁三相试验阳性 156 株,总阳性率为 14.8%(156/1053);13 株可疑。AmpCs 阳性及可疑株主要分布于 FOX 抑菌环直径小于 18 mm 的菌株中。结果见表 1。

表 1 1 053 株细菌质粒 AmpCs 的筛选结果

FOX 抑菌环直径(mm)	被检菌株数	AmpCs 阳性菌株数(%)	结果可疑菌株数(%)
<18	368	156(42.4)	10(2.7)
≥18	685	0(0.0)	3(0.4)

2.2 头孢西丁三相试验阳性菌株与 FOX 抑菌环直径的关系见表 2。从表 2 看出,随 FOX 抑菌环直径减小 AmpCs 检出率呈增加趋势,抑菌环越小检出率越高。各组之间的 AmpCs 阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=19.19, P<0.05$)。

2.3 3 种方法共检出阳性菌株 156 株,可疑菌株 13 株。其中以间接Ⅱ法检出的阳性菌最多,可疑菌株和结果不能判定菌株最少;直接法检出的阳性菌最少,可疑菌株和结果不能判定菌株最多。间接Ⅰ法检出阳性、可疑和结果不能判定菌株与间接Ⅱ法相近。结果见表 3。

2.4 在 156 株 AmpCs 阳性菌株中,抑菌环直径小于 7 mm 有 88 株,占 56.4%(88/156),用直接法检测时结果不易确定,必要时需用间接法进行复检。

表 2 质粒 AmpCs 阳性株与 FOX 抑菌环直径的关系

抑菌环直径(mm)	总株数	AmpCs 阳性株数(%)	AmpCs 可疑株数(%)	χ^2 值(阳性株)	P 值(阳性株)
<3	67	39(58.2)	0(0.0)	—	—
3~<8	98	49(50.0)	1(1.02)	0.83 ^a	>0.5
8~<13	103	41(39.8)	3(2.9)	3.89 ^a , 1.39 ^b	<0.05 ^a , >0.5 ^b
13~<18	100	27(27.0)	6(6.0)	10.39 ^a , 6.64 ^b , 2.04 ^c	<0.05 ^{a,b} , >0.5 ^c

注:^a与直径<3 mm 组比较;^b与直径 3~<8 mm 组比较;^c与直径 8~<13 mm 组比较。—表示无数据。

表 3 3 种方法对 156 株阳性及 13 株可疑菌(共 169 株)的检测结果及总检出率[n(%)]

方法	检出阳性和可疑菌株数	AmpCs 阳性菌株数	AmpCs 可疑菌株数	结果不能判定菌株数	χ^2 值(阳性株)	P 值(阳性株)
直接法	124(11.8)	115(10.9)	9(0.9)	45(4.3)	—	—
间接Ⅰ法	161(15.3)	155(14.7)	6(0.6)	8(0.8)	4.65 ^a	<0.05 ^a
间接Ⅱ法	166(15.8)	162(15.4)	4(0.4)	3(0.3)	6.21 ^a , 0.39 ^b	<0.05 ^a , >0.5 ^b

注:^a与直接法比较,^b与间接Ⅰ法比较。—表示无数据。

3 讨 论

3.1 用 3 种方法对 1 053 株细菌进行了质粒 AmpCs 检测,共有 156 株菌阳性,13 株菌可疑。总阳性率为 14.8%(156/1 053),FOX 抑菌环直径小于 18 mm 菌株的阳性率为 42.4%(156/368)。在 FOX 抑菌环直径大于或等于 18 mm 的菌株中,未检出质粒 AmpCs 阳性株,有 3 株可疑菌株,是酶低产量株还是方法学缺陷引起的,有待于用分子生物学的方法做深入分析。检测结果显示,对 FOX 抑菌环直径小于 18 mm 的菌株进行质粒 AmpCs 检测是十分必要的。

3.2 在检出的 156 株 AmpCs 阳性菌株中,随 FOX 抑菌环直径减小 AmpCs 阳性株检出率增加(表 2),将 FOX 抑菌环直径

小于 18 mm 的菌株分成 4 组,4 组的总体检出率差异有统计学意义($\chi^2=19.19, P<0.05$)。并且以抑菌环直径 13~<18 mm 组与 3 mm 以下组和 3~8 mm 组的统计学差异最大(χ^2 值分别为 10.39、6.64, $P<0.05$),提示 FOX 抑菌环直径越小,菌株产 AmpCs 的概率越大,所以对这些菌株进行 AmpCs 筛选是十分必要的。

3.3 3 种检测方法中,直接法检出率最低,并有较多菌株的试验结果不能判定,直接法和间接Ⅰ、Ⅱ法检出率差异有统计学意义($\chi^2=4.65$ 和 6.21, $P<0.05$)。间接Ⅰ法和间接Ⅱ法对阳性菌株的检出率相近,两者检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.39, P>0.5$),但在少数可疑结果的判断上,间接Ⅰ法不如间

接Ⅱ法。

3.4 在 156 株阳性菌中,抑菌环小于 7 mm 的有 88 株,占 56.4%(88/156),这部分菌株用直接法往往因抑菌环直径太小而影响结果观察,须借助间接法才能获得最终结果。这也是直接法阳性检出率偏低和部分结果不能判定的主要原因之一。在试验过程中发现间接Ⅰ法受 MH 琼脂存放时间的影响较大,存放时间越长水分丢失越多,会使切割线不易自然合拢而影响药物扩散,易出现假阳性。间接Ⅱ法则有效避免了这种因素的影响,提高了试验的准确性。在试验过程中就发现有 3 株间接Ⅰ法阳性而间接Ⅱ法阴性的标本,用新制备的 MH 琼脂进行复检,证实为假阳性。

3.5 在操作过程中,间接Ⅰ法要注意切线离 FOX 纸片不能太远,一般以 2.5~3.5 mm(平均 3 mm)为宜^[7],否则会引起抑菌环变形不明显,将阳性菌株判为可疑,可疑菌株则会漏检。这也是间接Ⅰ法阳性检出率较间接Ⅱ法略低,可疑菌株及结果不能判定菌株较间接Ⅱ法高的主要原因。间接Ⅱ法切线距 FOX 纸片 1~2 mm(平均 1.5 mm)为宜,保证有较长一段试验菌切线在抑菌环内,使阳性结果更易观察。由于间接Ⅱ法操作更方便、影响因素较少、结果易判断、检出率较高,所以是一种比较理想的筛选方法。

另外,国内外文献报道,即使抑菌环发生细微的变形,也要考虑质粒 AmpCs 的可能,这部分菌株可能是质粒 AmpCs 的低产量株^[8-9],应引起关注。

参考文献

- [1] 田磊,李莉,张蓓,等. 阴沟肠杆菌产 AmpC 酶与 ESBLs 的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(15):1941-1943.
- [2] 史利宁,张慧,邵海枫,等. 泛耐型鲍曼不动杆菌耐药机制

的探讨[J]. 临床检验杂志,2008,26(5):327-330.

- [3] 张淑芳,吴多荣,张应爱,等. 老年患者大肠埃希菌产质粒 AmpC 酶基因型特点及耐药性分析[J]. 中国老年学杂志,2010,30(16):2254-2257.
- [4] 李从荣,黄俊,吕霞,等. 产质粒介导 AmpC 酶肺炎克雷伯菌流行基因型及传播机制的研究[J]. 现代检验医学杂志,2007,22(3):45-48.
- [5] 刘强,张蕾蕾,张红梅,等. 鲍氏不动杆菌产 AmpC 酶的检测与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(23):3776-3778.
- [6] Bou G, Oliver A, Ojeda M, et al. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase from an Escherichia coli strain isolated in Spain[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(9):2549-2553.
- [7] 王赛芳,潘钦石,周铁丽,等. 肺炎克雷伯菌超广谱 β -内酰胺酶和 AmpC 酶基因检测及耐药性分析[J]. 中国微生态杂志,2006,18(6):474-476.
- [8] 林珠峰,黄德稳. 阴沟肠杆菌 AmpC 酶的检测及耐药性分析[J]. 海峡药学,2009,21(11):78-80.
- [9] Pfaller MA, Jones RN, MYSTIC Study Group(Europe). Antimicrobial susceptibility of inducible AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Programme, Europe 1997-2000[J]. Int J Antimicrob Agents, 2002, 19(5):383-388.

(收稿日期:2012-08-15 修回日期:2012-11-30)

(上接第 541 页)

严重的甚至是终末期的疾病改变了正常的红细胞表面的抗原;或分泌了某种物质吸附于红细胞表面;或多次反复输同种异体血,导致血浆中的蛋白质(包括 Ig、补体)等非特异性地吸附到红细胞表面,使患者的红细胞被致敏,而微柱凝胶试验法的柱中试剂内含有抗 IgG、C3 的溶液,它可以与人红细胞上的 IgG 及补体结合,在体外发生凝集。也有学者认为其主要原因是红细胞表面发生了一些变化,在红细胞表面存在药物抗体吸附,血浆蛋白比值倒置引起的蛋白吸附,或是在长期疾病治疗状态下改变了正常的红细胞表面表达,使得在试验室配血过程中与试剂中含有抗 IgG、C3 溶液发生反应^[11]。

总之,次侧凝集这类患者并发症多,病情严重,病死率高。次侧凝集可以作为一个危险的指标,提示患者病情预后不良。所以,当遇到配血次侧有凝集时,要结合临床综合分析,引起重视,对并发症及早干涉,以降低病死率。

参考文献

- [1] Labgston MM, Proctel JL, Cipolone KM, et al. Evaluation of the gel system for ABO grouping and D typing[J]. Transfusion, 1999, 39(3):300-305.
- [2] 兰炯采,负中桥,陈静娴,等. 输血免疫血液学实验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:123.
- [3] 熊燕. 微柱凝胶配血假阳性结果的分析与处理[J]. 现代检验医学杂志,2006,21(6):100-101.

- [4] 丛玉隆,尹一兵,陈瑜,等. 检验医学高级教程[M]. 北京:人民军医出版社,2011:710.
- [5] Hama N, Itoh H, Shirakami G, et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1995, 92(6):1558-1564.
- [6] 汤蓓. C 反应蛋白在急性冠脉综合征预后评判中的价值[J]. 心脑血管病防治,2004,4(4):23-25.
- [7] 赵慧颖,安友仲,刘方. B 型利钠肽对严重感染及感染性休克患者预后的预测作用[J]. 中国危重病急救医学,2009,21(5):293-295.
- [8] 严瑾,陈朝轩,戴伟良. BNP 在慢性肾衰竭并发心血管疾病患者中的临床应用价值[J]. 国际医药卫生导报,2009,15(22):82-84.
- [9] 刘婧,孙倩美. 脑钠肽与慢性肾脏病患者心血管疾病关系的研究进展[J]. 中国血液净化,2008,7(1):38-41.
- [10] Hillege HL, Nitsch D, Pfeffer MA, et al. Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure[J]. Circulation, 2006, 113(5):671-678.
- [11] 唐长玖,王华,李瑞云,等. 微柱凝胶配血次侧不合 17 例临床分析[J]. 中国输血杂志,2005,18(1):61.

(收稿日期:2012-08-15 修回日期:2012-11-21)