

两种方法在筛选产金属 β -内酰胺酶鲍曼不动杆菌中的应用价值*

潘娟¹, 杨耀斌², 刘凤¹, 吕纯莉¹, 陈安林¹, 陈泽慧^{1△} (1. 遵义医学院附属医院检验科, 贵州遵义 563003; 2. 贵州省遵义市桐梓县人民医院 563200)

【摘要】目的 以 E-test 法、双纸片增效法筛选产金属 β -内酰胺酶(MBL)鲍曼不动杆菌(Ab), 为临床筛选产 MBL 菌株、探究 Ab 耐药机制提供依据。**方法** 使用 MicroScan Walkway-40 全自动微生物分析仪及 MicroScan Negative Combo Panel Type31 复合板进行菌株鉴定和药敏试验, 筛选出泛耐药 Ab, 再分别用双纸片增效法、E-test 法检测产 MBL 菌株。**结果** 从 298 株 Ab 中筛选出 38 株泛耐药菌, 经双纸片增效法筛选出 MBL 阳性 19 株 (50.0%); E-test 法筛选出 MBL 阳性 18 株 (47.4%), 两种方法阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 双纸片增效法、E-test 法操作简单, 均可用于 MBL 表型的快速筛查; 但由于 E-test 法成本昂贵, 不适宜在临床实验室推广; 双纸片增效法成本低廉, 适合在广大临床实验室特别是基层医院实验室推广。

【关键词】 E-test 法; 双纸片增效法; 鲍曼不动杆菌; 金属 β -内酰胺酶; 泛耐药

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.14.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)14-1781-02

The application value of two methods in the screening of *Acinetobacter baumannii* producing metallo- β -lactamase*

PAN Juan¹, YANG Yao-bin², LIU Feng¹, LV Chun-li¹, CHEN An-lin¹, CHEN Ze-hui^{1△} (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Tongzi County People's Hospital of Zunyi in Guizhou Province, Zunyi, Guizhou 563200, China)

【Abstract】Objective Using E-test method and double-disk synergy method to screen of metallo- β -lactamase (MBL) produced by *Acinetobacter baumannii* for clinical, and to provide the basis for exploring mechanisms of *Acinetobacter baumannii* resistance. **Methods** Strains identification and drug-susceptibility test were conducted by Microscan Walkway-40 automatic microbiology analyzer and MicroScan Negative Combo Panel Type31 composite panels to select the pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, and then double-disk synergy method and E-test method were separately conducted to detect strains producing MBL. **Results** 38 extensively drug-resistant strains were detected from 298 *Acinetobacter baumannii*. 19 strains producing MBL were picked by double-disk synergy method (50.0%). 18 strains were picked by E-test method (47.4%). There was no significant difference between the positive rates of the two methods ($P>0.05$). **Conclusion** Both double-disk synergy method and E-test method are easy to operate and can be used for rapid screening of MBL phenotype. E-test method is not suitable for promotion in the clinical laboratory due to high cost, but double-disk synergy method suitable for promotion in the majority of clinical laboratories, particularly in the grassroots hospitals due to its low cost.

【Key words】 E-test method; double-disk synergy method; *Acinetobacter baumannii*; metallo- β -lactamase; pan-drug resistant

鲍曼不动杆菌(Ab)是一种非发酵革兰阴性杆菌, 它广泛分布于水与土壤、医院环境及人体皮肤、黏膜, 一般无致病性, 为条件致病菌。近几年来, 随着广谱抗菌药物的大量应用及侵入性治疗的广泛开展, 使不动杆菌属引起的感染呈明显上升趋势, 并呈多重耐药甚至泛耐药, 其中产金属 β -内酰胺酶(MBL)是导致 Ab 泛耐药的重要因素之一。MBL 属于 Ambler 分子结构分类中的 B 类酶, 它能水解除单环类以外的几乎所有 β -内酰胺类抗菌药物, 使细菌对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类药物耐药^[1]。MBL 是一类活性中心依赖金属离子的 β -内酰胺酶, 主要在 Zn^{2+} 存在下才有活性, 因此利用有机络合剂与 Zn^{2+} 络合从而使 MBL 失活导致抑菌圈增大的原理可以检测细菌是否产 MBL。目前 MBL 表型的检测方法主要有双纸片增效法、双纸片协同法、E-test 法等。本实验采用双纸片增效法、E-test 法筛选产 MBL 的 Ab, 为临床选择更广泛的筛选方

法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 来自本院 2010 年 3 月至 2011 年 1 月门诊及住院临床各科室送检的痰液、尿液、创面分泌物等标本。

1.1.2 仪器与试剂 MicroScan Walkway-40 全自动微生物分析仪、Microscan Negative Combo Panel Type31 及配套试剂 (美国 Dade Behring 公司), 葡萄糖肉汤、M-H 营养琼脂、麦康凯琼脂 (杭州天和微生物试剂厂); 亚胺培南 (IPM, 10 μ g) 纸片 (英国 Oxoid 公司); 乙二胺四乙酸 (EDTA) (石家庄杰克化工有限公司); E-test 试纸条 (瑞典 AB Biodisk 公司)。

1.2 方法

1.2.1 泛耐药 Ab 的筛选 使用 MicroScan Walkway-40 全自动微生物分析仪及其 MicroScan Negative Combo Panel

Type31 复合板进行细菌学鉴定和药敏试验,按照美国临床实验室标准化委员会 2005 年标准^[2]判断结果。从临床各科室送检的痰液、尿液、创面分泌物等标本中分离出 Ab,再从 Ab 中筛选出耐喹诺酮类、头孢类、碳青霉烯类抗菌药物的泛耐药 Ab。

1.2.2 EDTA 水溶液配制 根据参考文献^[3]称取 EDTA 1.46 g 溶于 10 mL 蒸馏水中,将 EDTA 配制成 0.5 mmol/L 水溶液,高压灭菌后,常温保存备用。

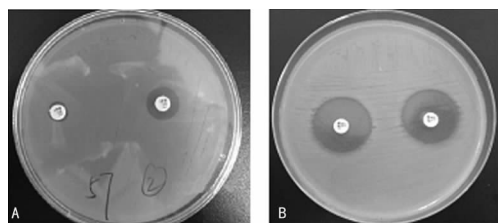
1.2.3 产 MBL 菌株的检测 用以下两种方法从泛耐药菌株中筛选出产 MBL 的 Ab。(1)双纸片增效法:将待测菌株制成 0.5 麦氏单位菌液均匀涂布于 90 mm M-H 琼脂平板上,在平板上放置 2 片 IPM 纸片,2 个纸片相距 30~40 mm 然后在其中 1 片 IPM 上加入 10 μ L EDTA 溶液,35 $^{\circ}$ C 孵育 18~24 h 观察结果。(2)E-test 法:用灭菌棉棒蘸取 0.5 麦氏单位的待检菌液接种于 M-H 琼脂平板 10 min 后于平板中央贴一条 E-test 试纸条,置 35 $^{\circ}$ C 培养 16~18 h 观察结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行配对资料 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

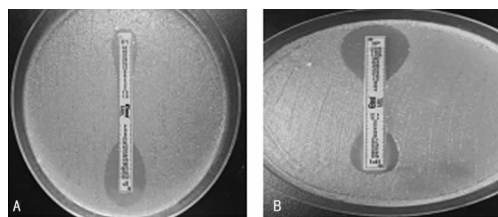
2.1 泛耐药 Ab 的筛选结果 细菌学鉴定检测出 298 株 Ab,经药敏试验筛选出 38 株 (12.8%) 泛耐药 Ab。38 株泛耐药 Ab 除对米诺环素敏感外,对其余药物全部耐药。

2.2 MBL 的检测结果 双纸片法:(1)用游标卡尺分别测量 2 个纸片的抑菌环直径,若 IPM 加 EDTA (IPI) 直径与 IPM 不加 EDTA (IP) 直径之差大于或等于 5 mm^[4] 则判为 MBL 阳性 (图 1),该法筛选出产 MBL 的 Ab 19 株 (50.0%)。(2)E-test 法:若 IPI 的最小抑菌浓度 (MIC) 的比 IP 的 MIC 值降低 3 个或 3 个以上对倍稀释度或者 IP/IPI ≥ 8 ,则报告试验阳性;另外在两种药物梯度之间的空白区出现协同抑菌圈或是未加螯合剂的一端的椭圆形抑菌圈尾部变形,亦判定为 MBL 阳性^[5-6] (图 2),该法筛选出产 MBL 的 Ab 18 株 (47.4%)。两种方法同时阳性 16 株,双纸片增效法阳性 E-test 法阴性 3 株,E-test 法阳性双纸片增效法阴性 2 株,两种方法检验结果比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



A: 阳性; B: 阴性。

图 1 双纸片法检测结果



A: 阳性; B: 阴性。

图 2 E-test 法检测结果

3 讨论

Ab 是医院感染的重要病原菌,随着近年来广谱抗菌药物、免疫抑制剂、肿瘤化疗等药物的广泛使用,Ab 引起的呼吸

道、泌尿道感染日益突出,给临床治疗带来极大困难^[7-8]。特别是泛耐药菌株引起的暴发感染和医院获得性感染的发生,已引起临床医生和微生物学工作者对泛耐药 Ab 的广泛关注。

Ab 的耐药机制非常复杂,包括产生多种 β -内酰胺酶、氨基糖苷类药物修饰酶、外膜蛋白的丢失或膜孔蛋白的缺损、青霉素结合蛋白的改变和泵出机制等,其中以产 β -内酰胺酶为主要机制^[9-10]。按照 Ambler 分类方法, β -内酰胺酶分为 A、B、C、D 4 类。A 类酶包括多种质粒编码的青霉素酶,活性部位为丝氨酸残基,主要是超广谱酶;B 类酶由染色体或质粒编码,酶活性位点为 2 价金属阳离子,故又被称为 MBL;C 类酶主要指染色体编码的头孢菌素酶,活性部位为丝氨酸残基,其产生与诱导剂有关;D 类酶又称为 OXA 型 (水解苯唑西林) β -内酰胺酶。B 类酶即 MBL,是一类活性中心依赖金属离子的 β -内酰胺酶,主要在 Zn^{2+} 存在下才有活性,能被 EDTA 等有机络合剂抑制。因此,利用有机络合剂与 Zn^{2+} 络合从而使 MBL 失活导致抑菌圈增大的原理可以检测细菌是否产 MBL。国内外已有较多关于 MBL 检测方法的报道,但目前仍没有推荐方法。

本试验收集的 298 株 Ab 中,经药敏试验筛选得到 38 株泛耐药 Ab,经双纸片增效法检测有 19 株 (50.0%) Ab 产 MBL;经 E-test 法检测有 18 株 (47.4%) Ab 产 MBL,两种方法同时阳性 16 株 (42.1%)。检测结果表明,两种方法阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。由于本实验两种方法使用的底物和抑制剂均相同,筛选出的菌株本应一一对应,但实验结果中有 3 株双纸片增效法检测阳性而 E-test 法检测阴性,2 株 E-test 法检测阳性而双纸片增效法检测阴性。分析其可能的原因是,实验过程中存在操作误差或结果判读时受主观因素影响致结果出现偏差。另外,两种方法筛选 MBL 为阴性的泛耐药菌株其泛耐药的原因可能是存在其他耐药机制。

本实验表明,两种方法均可用于 Ab 产 MBL 表型的快速筛查。E-test 试纸条结合了纸片扩散法和琼脂稀释法的优点,基本不受接种量和预培养的影响,其适合于需氧菌、厌氧菌的染色体或质粒编码的各种 MBL,但由于 E-test 法成本昂贵,限制了其在临床实验室的广泛应用。双纸片增效法作为临床筛选 MBL 表型的常规方法,具备快速、操作简便等优点,同时成本低廉,适合在广大临床实验室特别是在广大基层医院实验室推广。如果要进一步确定 MBL 的基因型,可采用聚合酶链反应等其他分子生物学方法证实,但对于一般实验室来讲操作复杂且费时,不宜常规开展。检测 Ab 产 MBL 及其耐药机制的研究,有助于临床选药以及为 Ab 感染的流行病学调查提供依据。

参考文献

- [1] 胡金伟,伍勇. 鲍曼不动杆菌产金属 β -内酰胺酶的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(4): 419-422.
- [2] Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005: M51-M100.
- [3] Lee K, Chang Y, Shin HB, et al. Modified hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of pseudomonas and acinetobacter species[J]. Clin Microbiol Infect, 2001, 7(2): 88-91.
- [4] 陈泽慧,田应彪,李丹丹,等. 五味子、石榴皮等中药对鲍曼不动杆菌体外的抑菌作用[J]. 中国(下转第 1785 页)

续表 2 血液科患者 G⁺ 球菌主要抗菌药物的耐药结果 (%)

抗菌药物	金黄色葡萄球菌		溶血葡萄球菌		表皮葡萄球菌		粪肠球菌		屎肠球菌	
	耐药	中介	耐药	中介	耐药	中介	耐药	中介	耐药	中介
利福平	19.6	0.0	7.2	0.0	43.5	0.0	78.9	14.7	93.0	0.8
复方磺胺甲恶唑	23.3	0.0	65.2	0.0	89.4	0.0	33.7	0.0	55.1	0.0
四环素	43.2	4.5	33.8	1.5	50.0	10.9	78.9	2.1	60.9	5.5
利奈唑胺	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
替考拉宁	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
万古霉素	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	1.5	0.0

注：—表示无数据。

3 讨 论

本院近 5 年血液科患者分离病原菌的分布特征与本院往年资料及其他医院报道的资料基本一致^[2-4]。分离病原菌种类较多,常见的病原菌为肠杆菌科(大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌)、非发酵 G⁻ 杆菌(铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌)、肠球菌属(粪肠球菌和屎肠球菌)、葡萄球菌属(金黄色葡萄球菌、溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌)。血液科患者由于病情多数较重,故败血症、肺部感染、泌尿系统感染患者较多,血液、痰液、尿液等不同标本分离病原菌的种类及构成比差别较大,临床经验用药时应根据不同感染部位合理选择抗菌药物^[5-7]。

G⁻ 杆菌耐药率较低的为亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦和头孢他啶^[2-4]。肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药率仍然非常低,但大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌中均发现耐药菌株,对这些超级细菌应高度重视,对患者应做好隔离,以防扩散。非发酵 G⁻ 杆菌耐药率普遍较高,提示临床应重视病原菌培养鉴定和药敏试验结果,合理选用抗菌药物。

G⁺ 球菌中一直以葡萄球菌属和肠球菌属为主,葡萄球菌属对万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺的敏感率均为 100.0%,对其他药物的耐药率均较高;肠球菌属对替考拉宁和利奈唑胺的敏感率均为 100.0%。念珠菌属对临床常用抗真菌药物两性霉素 B、5-氟胞嘧啶、氟康唑和伊曲康唑耐药率均低于 7.0%。

本院近 5 年血液科患者分离大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产 ESBLs 比例、非发酵 G⁻ 杆菌泛耐药菌比例和葡萄球菌甲氧西林耐药率均居高不下,已经发现耐碳青霉烯类肠杆菌和耐万古霉素的肠球菌。临床医生应重视病原菌培养鉴定和药敏试验结果,合理选用抗菌药物,对感染多重耐药菌或泛耐药菌的

患者应做好隔离,以防扩散^[8-9]。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2007:472-531.

[2] 芮勇宇,耿穗娜,王前,等. 5 504 株临床分离细菌和念珠菌的分布及耐药性分析[J]. 中国实验诊断学,2007,11(12):1651-1654.

[3] 宁素荣. 老年医院感染患者 585 例危险因素分析[J]. 中国老年学杂志,2012,32(2):397-398.

[4] 褚卓卓,田素飞,年华,等. 2010 年度卫生部全国细菌耐药监测网报告:老年患者细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(1):52-56.

[5] 夏涵,刘智勇,任章银,等. 24 141 份血培养病原菌的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(20):4607-4610.

[6] 李光辉,朱德妹,汪复,等. 2010 年中国 CHINET 血流感染的病原菌分布及耐药性[J]. 中华感染与化疗杂志,2012,12(4):251-258.

[7] 吴朝阳,谭穗如. 下呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2012,9(4):395-396.

[8] 马冬梅,齐宏伟. 泌尿系统感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2012,9(14):1691-1693.

[9] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 尿液标本中细菌的分布和耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(4):241-250.

(收稿日期:2012-10-08 修回日期:2013-02-12)

(上接第 1782 页)

医院药学杂志,2011,31(15):1248-1251.

[5] Walsh TR,Bolmstr m A,Qwrnstr A,et al. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing[J]. J Clin Microbiol,2002,40(8):2755-2759.

[6] Lee K,Yong D,Yum JH,et al. Evaluation of e-test MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of pseudomonas spp. and acinetobacter spp[J]. J Clin Microbiol,2005,43(2):942-944.

[7] Liu CY,Liao CH,Chen YC,et al. Changing epidemiology of nosocomial bloodstream infections in 11 teaching hospitals in Taiwan between 1993 and 2006[J]. J Microbiol Im-

munol Infect,2010,43(5):416-429.

[8] 肖永红,王进,朱燕,等. Mohnarin 2008 年度全国细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(16):2377-2383.

[9] 楼正青,齐艳,徐黎. 全耐药鲍氏不动杆菌耐药基因的检测及研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(5):619-621.

[10] 侯盼飞,庄春妹,汪雅萍. 耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌产 β -内酰胺酶研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(4):285-289.

(收稿日期:2012-11-21 修回日期:2013-02-10)