

• 论 著 •

VITEK2 筛选鲍曼不动杆菌产头孢菌素酶可靠性评价*

蓝 锴, 邓光远, 何 敏, 林海标, 张 文, 庞雪云, 唐小龙

(广东省中医院检验科, 广州 510120)

摘 要:目的 验证和评价 VITEK2 高级专家系统(AES)判定鲍曼不动杆菌产头孢菌素酶 AmpC 的可靠性。方法 首先收集 2009 年 1~8 月经 VITEK2 的 AES 判定为产 AmpC 酶鲍曼不动杆菌, 用 AmpC 纸片法进行确证试验, 最后用聚合酶链反应验证阳性株是否存在 AmpC 基因。结果 15 株 AES 判断为产 AmpC 酶的菌株, 经 AmpC 纸片法确证试验为阳性, 其中 12 株阳性产酶株可以检测到 AmpC 基因。132 株 AES 判断为不产 AmpC 酶的菌株中, 经 AmpC 纸片法验证均为阴性。结论 VITEK2 AES 可以很好地预测鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶情况, 有助于快速、准确地检测鲍曼不动杆菌这一相关耐药机制, 为临床治疗多重耐药鲍曼不动杆菌提供更有力的支持。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 头孢菌素酶; 耐药机制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 14. 002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)14-1533-02

Evaluation of VITEK2 advanced expert system for detection of *Acinetobacter baumannii* positive with cephalosporinases*

Lan Kai, Deng Guangyuan, He Min, Lin Haibiao, Zhang Wen, Pang Xueyun, Tang Xiaolong

(Department of Clinical Laboratory, Guangdong Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the reliability of *Acinetobacter baumannii* strains producing cephalosporinase judged by advanced experts system(AES) in VITEK2. **Methods** *Acinetobacter baumannii* strains, producing cephalosporinases and judged by AES, were collected from January 2009 to August 2009. Then AmpC disk test was performed to identify cephalosporinase positive strains. Finally, PCR was performed to amplify ampC gene in AmpC positive strains. **Results** All AmpC positive strains judged by AES were identified to produce cephalosporinases. PCR showed that 12 positive strains were positive with AmpC gene. 132 AmpC negative strains demonstrated could not produce cephalosporinases by AmpC disk test. **Conclusion** VITEK2 AES system could accurately identify cephalosporinase phenotype of *Acinetobacter baumannii* so as to provide more helpful data to clinician.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; cephalosporinase; drug-resistant mechanism

头孢菌素酶是一种重要的 β -内酰胺酶, 而产生 β -内酰胺酶是革兰阴性菌对 β -内酰胺类耐药的主要原因。头孢菌素酶代表酶为 AmpC β -内酰胺酶, 属 C 类酶, 在革兰阴性杆菌中头孢菌素酶又叫 AmpC 酶。美国临床实验室标准化研究所(CLSI)制定了超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的检测方法和标准, 但至今仍未建立一种筛选和确证 AmpC 酶规范方法。VITEK2 高级专家系统(AES)是一种计算机化药敏试验综合分析程序, 在检测抗菌剂敏感性结果的同时可以对一些耐药机制作出判断, 如获得性高水平青霉素酶、头孢菌素酶、ESBLs 等。国内外已有不少关于 AES 细菌耐药机制准确性的评价, 如对产 ESBLs 菌株或耐甲氧西林葡萄球菌判定准确性的评价等, 但关于其对鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶判断的准确性还鲜有报道。而近年来 AmpC 酶引起鲍曼不动杆菌耐药的报道逐年增多, 甚至有研究者认为产 AmpC 酶已成为鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因^[1]。本研究拟从不同方面验证和评价 VITEK2 AES 对鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶菌株的判定, 以期更好地指导临床对鲍曼不动杆菌感染的治疗。

1 材料与方法

1.1 材料 2009 年 1~8 月期间用 VITEK2 鉴定为鲍曼不动杆菌的菌株, 其中 AES 判断 AmpC 酶阳性 15 株, AmpC 酶阴性 132 株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2 仪器与试剂 VITEK2 全自动细菌鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃产品); BIO-RAD 电泳仪; BIO-RAD Hood 2 成像仪; 高速冰冻离心机; GeneAmp PCR System 9700 PCR 仪。VITEK2 细菌鉴定卡(GN)、药敏试验卡(AST GN-13)均为法国生物梅里埃产品; AST GN-13 检测抗菌剂包括: 氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢唑林、头孢呋辛钠、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、氨曲南、头孢替坦、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、厄他培南、亚胺培南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因、复方新诺明。引物由 Invitrogen 生物工程公司合成; Tap 酶、dNTP、MgCl₂、缓冲液购自 Takara 公司; 所有药敏纸片均购自 Oxoid 公司; 100× Tris-EDTA 购自 Sigma 公司; 哥伦比亚血平板、M-H 琼脂平板和营养肉汤均为广州迪景微生物有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定及药敏试验 所有临床分离菌株先用 VITEK-2 鉴定到种, 用 AST GN-13 药敏卡进行药敏检测, 同时用 K-B 纸片扩散法验证仪器检测结果准确性, 试验方法与判断标准参照 CLSI 2009 年版^[2]。

1.3.2 AmpC 酶表型确证试验 参照文献[3]利用头孢西丁和 EDTA 纸片试验进行 AmpC 酶确证(又叫 AmpC 纸片法)。

1.3.3 AmpC 酶结构基因的扩增 采用煮沸法提取细菌的 DNA^[4]。参照文献[5]合成 ampC 基因引物, 其序列为引物 A:

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30770935); 广东省卫生厅资助项目(A2009234)。

5'-TAA ACA CCA CAT ATG TTC CG-3';引物 B:5'-ACT TAC TTC AAC TCG CGA CG-3';预期产物大小为 663 bp。PCR 扩增条件为:94℃预变性 4 min;94℃变性 1 min,50℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,共 30 个循环;最后再 72℃延伸 10 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min,用凝胶成像仪观测结果并拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 进行统计学处理,耐药率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 药敏检测结果 鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶菌株比不产 AmpC 酶的菌株明显更为耐药,对第三代头孢耐药严重,头孢噻肟、氨曲南耐药率为 100.0%,头孢他啶耐药率为 93.3%,头孢吡肟的耐药率也高达 66.7%。除亚胺培南、美洛培南、阿米卡星外,AmpC 酶阳性菌株与不产 AmpC 酶菌株耐药率差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1(阿米卡星、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦采用校正 χ^2 检验,其余抗菌剂直接采用 χ^2 检验计算 χ^2 值)。

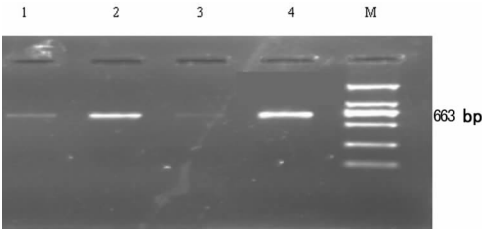
表 1 鲍曼不动杆菌对不同抗菌剂耐药率比较

抗菌剂	产酶组(15 株)		不产酶组(132 株)		χ^2 值	P 值
	菌株数	耐药率(%)	菌株数	耐药率(%)		
阿米卡星	1	6.7	2	1.5	7.89	>0.05
氨曲南	15	100.0	82	62.1	8.61	<0.05
头孢吡肟	10	66.7	49	37.1	4.89	<0.05
头孢噻肟	15	100.0	58	43.9	16.93	<0.05
头孢他啶	14	93.3	52	39.4	15.84	<0.05
环丙沙星	12	80.0	49	37.1	10.20	<0.05
庆大霉素	12	80.0	52	39.4	9.03	<0.05
亚胺培南	0	0.0	1	0.8	25.01	>0.05
左氧氟沙星	10	66.7	47	35.6	5.47	<0.05
美罗培南	0	0.0	1	0.8	25.01	>0.05
哌拉西林	13	86.7	50	37.8	13.09	<0.05
哌拉西林/他唑巴坦	2	14.3	2	1.5	5.57	<0.05
妥布霉素	11	73.3	47	35.6	8.03	<0.05
复方新诺明	15	100.0	59	44.7	16.48	<0.05



1、2、4、6: AmpC 酶阳性株;3:大肠埃希菌 ATCC25922(阴性对照);5:AmpC 酶阴性株。

图 1 AmpC 纸片法检测产 AmpC 酶的鲍曼不动杆菌



1~4:ampC 基因扩增阳性;M:DNA 标记。

图 2 ampC 基因琼脂糖电泳图

2.2 AmpC 酶验证实验 15 株 AES 判定为产 AmpC 酶的菌株中,用 AmpC 纸片法检测均显示阳性,见图 1。132 株不产酶的菌株,经 AmpC 纸片法检测均为阴性。用三维试验对阴性菌株 AmpC 酶检测,亦无阳性株发现,AES 与 AmpC 纸片法、三维试验检测阴性符合率为 100%。用 PCR 扩增 ampC 基因,检测结果发现 15 株产酶菌株中有 12 株阳性,阳性率为 80%,电泳结果见图 2。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺类主要耐药原因与质粒或染色体编码的 β -内酰胺酶生成有关,也可能与膜通透性改变、青霉素结合蛋白的亲合力下降有关。按照 Bush 分类方法,头孢菌素酶代表酶为 AmpC β -内酰胺酶,属 C 类酶。该酶几乎不被 β -内酰胺酶抑制剂所抑制,大量产生时可以对所有的 β -内酰胺类抗菌剂耐药,所以头孢菌素酶又叫 AmpC 酶。它既可由染色体介导,又可由质粒介导,被认为是目前革兰阴性杆菌中最危险的耐药形式,其重要性已越来越引起人们的关注[6]。近年来,AmpC 酶在鲍曼不动杆菌耐药中起着越来越重要的作用,快速、准确检测 AmpC 酶对临床合理用药具有至关重要的作用。

法国生物梅里埃 VITEK2 AES 由 2 000 多个细菌耐药表型和多达 20 000 种的最小抑菌浓度(MIC)分布构成,基本涵盖了目前临床耐药菌株中已经发现的主要耐药表型及机制。其主要功能包括:(1)判断药敏试验结果表型与所鉴定菌种是否相符,并在不一致的时候提出修改意见;(2)根据 VITEK2 检测的药敏结果推测可能存在的耐药机制,并根据耐药机制对体外试验敏感而体内可能无效的抗菌剂进行结果修正;(3)根据 CLSI 规则和耐药机制推断 VITEK 系统未包括的相关抗菌剂药物敏感性[7]。但是 VITEK2 AES 是基于欧美国家医院的菌株监测数据建立,与国内医院中的耐药表型可能存在一定差异,需要用其他检测 AmpC 酶的方法对其进行评价和验证。

目前,比较常用的 AmpC 酶筛选方法主要有三维试验、改良 Hodge 试验、氯唑西林双纸片协同试验及 PCR[8]。本文所用 AmpC 纸片法无需事先提取待测菌的 β -内酰胺酶,操作更为简便。从验证结果来看,AES 判定为产 AmpC 的菌株用 AmpC 纸片法检测全部呈阳性,不产 AmpC 酶菌株结果均为阴性。同时说明本院分离到的产 AmpC 酶鲍曼不动杆菌以质粒型为主。质粒型 AmpC 酶又叫 pAmpC 酶,特点为对第三代头孢耐药,对第四代头孢如头孢匹罗、头孢吡肟和碳青霉烯类如亚胺培南、美洛培南的水解能力低。部分 pAmpC 酶对单环 β -内酰胺类有较高的水解能力。pAmpC 酶不被现有的酶抑制剂抑制[9]。从药敏结果检测情况来看,此次检测的鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶株对头孢噻肟、氨曲南耐药率为 100.0%,头孢他啶耐药率为 93.3%,而亚胺培南、美洛培南耐药率极低,也说明这 15 株产 AmpC 酶鲍曼不动杆菌可能为质粒型。

虽然 VITEK2 和 AmpC 纸片法结果相符,但是在 15 株产 AmpC 酶的鲍曼不动杆菌中有 3 株并没有扩增出 ampC 基因。ampC 基因是 AmpC 酶的结构基因,但是合成 AmpC 酶还需要 ampG、ampD、ampR 的调控参与[10]。本次试验检测出这 15 株鲍曼不动杆菌均产生 pAmpC,有可能与这 3 株 ampC 基因阴性的菌株质粒 DNA 含量较低但是调控基因表达较强,高表达 AmpC 酶有关,所以虽然表型确证试验呈阳性但是却无法扩增出 ampC 基因。

本研究显示,VITEK2 AES 能够对鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶菌株进行同步、准确的判定,而且具有操作简便、快速、重复性好的优点,可以作为本实验室检测 AmpC(下转第 1537 页)

题,首先是要建立一个大家公认的检测 TCR CDR3 基因谱型的,特异性、敏感性好、高通量、重复性好、操作简便、检测成本低的技术,从而监测较大样本人群,排除个体差异,在 MHC 相同个体中找到同一疾病的共同的 TCRBV CDR3 亚家族,更好地反映出疾病状态下机体克隆特异性 T 细胞的存在与分布情况,从而用于疾病的诊断和治疗。

Yang 等^[1]利用实时定量 PCR 结合熔解曲线分析技术检测出恶性淋巴瘤多克隆背景中的特异性克隆 T 细胞,该方法对比了基因扫描方法,熔解曲线分析技术的敏感性和特异性达到了 100%和 97%。本研究利用这一技术建立了监测 HIV 感染者 T 细胞 α 、 β 链 CDR3 漂移的 FQ-PCR 结合熔解曲线分析技术方法,通过平行样检测与基因扫描对比,二者结果一致,并且本研究建立的方法具有以下优点:(1)试验过程简单,PCR 和 CDR3 谱型分析在封闭管中一步完成,能同时能对每个 TCRAV 家族的 CDR3 PCR 产物进行相对定量和克隆增生情况分析,发现特异性的 CDR3;(2)操作简单,核酸提取、逆转录(cDNA 合成)和 FQ-PCR 所需人员的技术要求低,操作过程简单,具有一般分子生物学理论和实验技能的人员就能进行。而变性聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描技术则需要专门的技术人员才能得以进行,这项检测大多都需要由少数特定的专业实验室或测序公司来进行;(3)实验周期短,本方法和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描技术前期实验所花费的时间基本一致,但在监测 HIV 感染者 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移,发现 HIV 感染者表位特异性的 CDR3 这一环节,方法只需要 1.5 h 左右,实验周期大大缩短。(4)研究成本低,本方法所采用的是 Realtime PCR Master Mix 试剂盒,单个样本的检测成本大约只有基因扫描的 1/4,节约研究经费,更有利于推广和应用。

综上所述,FQ-PCR 熔解曲线法监测 TCR α 、 β 链 CDR3 谱系漂移技术操作简便、实验周期短、研究成本低,特别适用于 HIV 感染者外周血样本 TCR CDR3 谱系漂移的监测。

参考文献

- [1] Yang XY, Xu D, Du J, et al. Rapid detection of clonal T-cell receptor-beta gene rearrangements in T-cell lymphomas using the Lish-tCycler-polymerase chain reaction with DNA melting curve analysis[J]. J Mol Diagn, 2005, 7(1): 81-88.
- [2] Manfras BJ, Rudert WA, Tmcco M, et al. Analysis of the alpha/

beta T-cell receptor repertoire by competitive and quantitative/ve family-specific PCR with exogenous standards and hish resolution fluorescence based CDR3 size imaging[J]. J Immunol Methods, 1997, 210(2): 235-249.

- [3] 姚新生,马骊,温茜,等. 监测 TCR CDR3 漂移的免疫扫描谱型分析技术的建立与鉴定[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2006, 26(6): 571-573.
- [4] Han M, Harrison L, Kehn P, et al. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) and CD8⁺ T cells[J]. J Immunol, 1999, 163(1): 301-311.
- [5] Ikeda H, Sato N, Matsuura A, et al. Analysis of T-cell receptor V region gene usage of cytotoxic T-lymphocytes and Tumor infiltrating lymphocytes derived from human autologous gastric signet ringcell carcinomas[J]. Cancer Res, 1993, 53(13): 3078-3084.
- [6] 姚新生. TCR β 链 CDR3 谱序与疾病研究概况及进展[J]. 国际免疫学杂志, 2007, 30(4): 240-243.
- [7] Arstila TP, Casrouge A, Baron V, et al. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity[J]. Science, 1999, 286(5441): 958-961.
- [8] Lim A, Baron V, Ferradini L, et al. Combination of MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the Immunoscope permits sensitive ex vivo quantitation and follow-up of human CD8⁺ T cell immune responses[J]. J Immunol Methods, 2002, 261(1/2): 177-194.
- [9] 莫红梅,李蕾. 慢性乙型肝炎病毒感染与免疫球蛋白、T 淋巴细胞关系的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2001, 32(2): 194-195.
- [10] Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition[J]. Nature, 1988, 334(6181): 395-402.
- [11] Bentley GA, Boulout G, Karjalainen K, et al. Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor[J]. Science, 1995, 267(5206): 1984-1987.
- [12] Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, et al. Major expansion of CD8⁺ T cell with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV[J]. Nature, 1994, 370(6489): 463-467.
- [13] 阮光萍,姚翔,潘兴华,等. HIV 特异细胞免疫研究进展及其对疫苗发展的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2001, 32(1): 80-82.

(收稿日期:2011-03-20)

(上接第 1534 页)

酶的选择方法。但由于本研究中菌株数量偏少,国内外均没有关于对此类评估的相关报道,因此有必要进行更大样本量的评估,以便能更好地评价 AES 是否能成为临床实验室检测该酶的常规方法。

参考文献

- [1] Pimental JD, Low L, Styles K, et al. Control of an outbreak of multi-drug-resistant acinetobacter baumannii in an intensive care unit and a surgical ward[J]. J Hosp Infect, 2005, 59(3): 249-253.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S19 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- [3] Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases[J]. J Clin Microbial, 2005, 43(7): 3110-3113.
- [4] 萨姆克鲁克·拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译.

北京: 科学出版社, 2005.

- [5] 叶惠芬,陈惠玲,刘朝晖,等. 广州地区鲍曼不动杆菌 AmpC 酶检测及耐药性分析[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(1): 134-135.
- [6] 刘丁,黄鑫,陈萍. 鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶的检测[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(2): 83-85.
- [7] 张军民,罗燕萍,崔岩,等. 临床评价 VITEK2 高级专家系统对常见细菌 β 内酰胺耐药表型的检测和分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 26(4): 233-235.
- [8] 侯伟伟,蒋燕群. 三种 AmpC 酶表型检测方法比较[J]. 检验医学, 2010, 25(2): 122-125.
- [9] Philippon A, Alert G, Hanson ND. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(1): 1-11.
- [10] Schmidtke AJ, Handson ND. Model system to evaluate the effect of ampD gene mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(6): 2030-2037.

(收稿日期:2011-03-03)