

• 检验技术与方法 •

双纸片抑制增效试验在 AmpC 酶检测中应用分析^{*}郑港森, 张加勤[△], 黄朝阳, 马晓波

(厦门大学附属第一医院检验科, 福建厦门 361003)

摘要:目的 探讨分析双纸片抑制增效试验在肺炎克雷伯菌产 AmpC 酶的检测应用, 评价该方法在临床实验室的应用价值。**方法** 采用头孢西丁纸片法, 头孢西丁三维试验, 双纸片抑制增效试验, 以及耐药基因多重 PCR 技术对临床分离菌株进行检测。**结果** 137 株临床分离肺炎克雷伯菌中, 对头孢西丁不敏感的菌株共有 22 株, 头孢西丁三维试验阳性有 11 株; 双纸片抑制增效试验 FOX/FOX+PBA 双纸片组中阳性有 18 株, CTT/CTT+PBA 双纸片组中阳性有 11 株; 多重 PCR 技术检测阳性有 19 株。头孢西丁三维试验阳性结果与 PCR 结果符合率为 47.4% (9/19), 双纸片抑制增效试验中, CTT/CTT+PBA 双纸片组阳性结果与 PCR 结果符合率为 57.9% (11/19); FOX/FOX+PBA 双纸片组阳性结果与 PCR 结果符合率为 94.7% (18/19)。**结论** 双纸片抑制增效试验, 其方法简便, 结果准确性高, 其中 FOX/FOX+PBA 双纸片组可应用于临床分离肺炎克雷伯菌产 AmpC 酶的检测。

关键词: 双纸片抑制增效; 肺炎克雷伯菌; 头孢菌素酶; 头孢西丁**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.037**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2014)16-2208-03Application analysis of double-disk synergy test in AmpC β -lactamase detection^{*}Zheng Gangsen, Zhang Jiaqin[△], Huang Chaoyang, Ma Xiaobo

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China)

Abstract: Objective To investigate and analyze the double-disk inhibiting synergy test for detecting AmpC β -lactamase produced by *Klebsiella pneumoniae* and to evaluate its application value in clinical laboratory. **Methods** The cefoxitin disk agar diffusion method, cefoxitin three-dimensional method, double-disk inhibiting synergy test and drug resistance gene multiplex PCR assay were adopted to detect the clinically isolated bacterial strains. **Results** Among 137 clinically isolated strains of *Klebsiella pneumoniae*, 22 strains were insensitive to cefoxitin and 11 strains were positive by the three-dimensional method; in the double-disk inhibiting synergy test, 18 strains were positive for the FOX/FOX+PBA group and 11 strains were positive for the CTT/CTT+PBA group respectively; in the multiplex PCR assay, 19 strains were positive. The coincidence rate of the cefoxitin three-dimensional method and multiplex PCR methods was 47.4% (9/19), in the double-disk inhibiting synergy test, the coincidence rate of the positive results in the CTT/CTT+PBA group and the multiplex PCR methods was 57.9% (11/19); the coincidence rate of the FOX/FOX+PBA group and multiplex PCR methods was 94.7% (18/19). **Conclusion** The double-disk inhibiting synergy test is simple with highly accurate results, in which the FOX/FOX+PBA double-disk synergy test could be applied to detect AmpC β -lactamase produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.

Key words: double-disk synergy test; *Klebsiella pneumoniae*; AmpC; Cefoxitin

自 20 世纪 90 年代, 首次在肺炎克雷伯菌发现质粒编码 AmpC 酶以来, 产 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌不断在世界各地被发现, 并呈现流行趋势。目前, 美国临床检验标准委员会 (CLSI) 已经建立了对 ESBLs 进行检测的确证试验, 但尚没有对 AmpC 酶进行检测的推荐方法。尽管近年来有许多检测 AmpC 酶的方法报道, 但尚缺乏针对质粒介导 AmpC 酶检测方法的研究。本研究通过对临床分离肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶的进行检测, 探讨分析双纸片抑制增效试验在临床实验室的应用价值, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 收集 2012 年 9 月至 2013 年 8 月本院的临床各种标本, 经法国 BioMerieux VITEK2 Compact 自动细菌鉴定仪进行鉴定肺炎克雷伯菌共 137 株(同一患者同类标本分离菌株不重复计数)。137 株实验菌株经头孢西丁纸片琼脂扩散法筛选, 结果对头孢西丁不敏感(抑菌圈小于或等于 17 mm)的

肺炎克雷伯菌共有 22 株。

1.2 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC 25922, 肺炎克雷伯菌 ATCC 700603, 阴沟肠杆菌 O29M(去阻遏持续表达 AmpC 酶), 产 DHA-1 型肺炎克雷伯菌及产 CMY-2 型大肠埃希菌(福州总医院冯福英惠赠)。

1.3 仪器与试剂 头孢西丁(FOX, 每片 30 μ g)和头孢替坦(CTT, 每片 30 μ g)为英国 Oxioid 公司产品。苯基代硼酸(Phenylboronic acid, PBA)为 Fluka 公司产品。Mini Plasmid Kit 质粒提取试剂盒为天根生物有限公司产品。TaKaRa Ex TaqTM Hot Start 试剂盒及 150 bp DNA Ladder Marker 为大连宝生物技术有限公司产品。

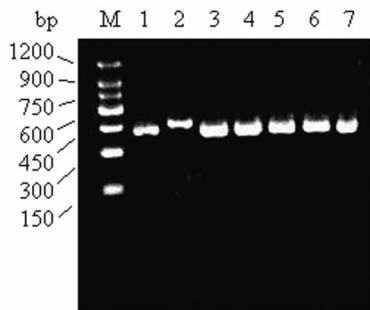
1.4 头孢西丁三维试验 酶粗提液采用反复冻融法制备, 头孢西丁三维试验参考文献[1-2]进行操作, 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

1.5 双纸片抑制增效试验 将 120 g PBA 溶于 3 mL 二甲亚

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81000762); 福建省卫生厅青年基金项目(2010-2-90)。 作者简介: 郑港森, 男, 主管技师, 主要从事细菌耐药机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: jqzhangxm@sina.com。

碘溶液,再加入 3 mL 蒸馏水,漩涡混匀。向 FOX 及 CTT 纸片分别加入 10 μ L 上述溶液,烘干待用。按照 CLSI 的操作标准^[3],进行琼脂纸片法试验。将含有和不含有 PBA 的 FOX 及 CTT 纸片贴于涂有实验菌株的 M-H 琼脂平板上,35 °C 过夜培养。含有和不含有 PBA 纸片的抑菌圈直径之比在 5 mm 或以上,判断为 AmpC 酶阳性^[4],见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

1.6 多重 PCR 扩增与产物分析 根据质粒提取试剂盒说明书提取实验菌株质粒 DNA 作为模板。根据文献[5]设计 6 对 AmpC 酶基因 PCR 引物序列以及设置多重 PCR 反应参数和反应条件。PCR 扩增产物在含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳完毕后在 BIO-RAD 凝胶成像系统观察结果(图 2)。AmpC 酶基因扩增阳性的产物经电泳回收纯化后直接测序。多重 PCR 引物序列合成及扩增产物测序(正反测序)由上海英骏生物技术有限公司完成。测序结果与 GenBank 数据库进行对比后确定其基因型。



M: 150 bp DNA 标记物; 1: DNA-1 型肺炎克雷伯菌株; 2: CMY-2 型大肠埃希菌株; 3~7: 待测菌株。

图 2 肺炎克雷伯菌 PCR 产物电泳图

2 结 果

2.1 表型检测结果 137 株临床分离肺炎克雷伯菌中,对头孢西丁不敏感的菌株共有 22 株。在 22 株对头孢西丁不敏感的肺炎克雷伯菌中,头孢西丁三维试验阳性有 11 株;双纸片抑制增效试验 FOX/FOX+PBA 纸片组中阳性 18 株, CTT/CTT+PBA 纸片组中阳性 11 株;多重 PCR 技术扩增阳性有 19 株。

2.2 多重 PCR 结果 19 株 AmpC 酶基因扩增阳性的产物,其测序结果与 GenBank 数据库进行对比,均与 DHA 型基因序列有 99% 的一致性。

2.3 对比分析 头孢西丁三维试验阳性结果与 PCR 结果符合率为 47.4% (9/19),双纸片抑制增效试验中,FOX 为头孢西丁纸片, CTT 为头孢替坦纸片, PBA 为苯基代硼酸, CTT/CTT+PBA 纸片组阳性结果与 PCR 结果符合率为 57.9% (11/19); FOX/FOX+PBA 纸片组阳性结果与 PCR 结果符合率为 94.7% (18/19)。见表 1。

表 1 肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶的检测结果

菌株	FOX	三维	FOX/FOX	CTT/CTT	多重 PCR 基因型
	试验	试验	+PBA 组	+PBA 组	
K16	+	+	+	+	DHA 型
K23	+	+	+	+	DHA 型
K24	+	-	-	-	-
K29	+	-	-	-	-

续表 1 肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶的检测结果

菌株	FOX 试验	三维 试验	FOX/FOX +PBA 组	CTT/CTT +PBA 组	多重 PCR 基因型
K30	+	-	+	-	DHA 型
K32	+	+	+	+	DHA 型
K33	+	+	+	+	DHA 型
K34	+	-	+	-	DHA 型
K35	+	-	-	-	DHA 型
K49	+	-	+	-	DHA 型
K66	+	+	+	+	DHA 型
K74	+	-	+	+	DHA 型
K81	+	-	+	+	DHA 型
K98	+	+	+	+	DHA 型
K102	+	+	+	+	DHA 型
K117	+	+	+	+	DHA 型
K122	+	-	+	-	DHA 型
K126	+	-	+	-	DHA 型
K129	+	-	+	-	DHA 型
K133	+	-	+	-	DHA 型
K136	+	+	+	+	DHA 型
K137	+	-	-	-	-

3 讨 论

肺炎克雷伯菌是临床分离常见的革兰阴性杆菌,是导致医院各种感染的主要致病菌。目前,肺炎克雷伯菌对抗菌药物尤其是对 β -内酰胺类耐药的主要机制仍是 ESBLs 的产生。然而,随着 C 类 β -内酰胺酶,即 AmpC 酶在肺炎克雷伯菌的不断出现,将成为肺炎克雷伯菌对 β -内酰胺类耐药的另一个重要机制。AmpC 酶属于 Ambler 分子结构分类法中的 C 类, Bush 功能分类法中第 1 组。AmpC 酶与超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的区别在于除了能水解广谱头孢菌素外,还水解头孢霉素类抗菌药物,且不被克拉维酸、舒巴坦所抑制。一直以来, AmpC 酶主要见于一些临幊上分离率较低的革兰阴性杆菌,由染色体编码产生。20 世纪 90 年代以后,质粒型 AmpC 酶逐渐在肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌等革兰阴性杆菌被发现,至今报道质粒型 AmpC 酶已有 30 余种,分布于世界各地。DHA 型 AmpC 酶基因序列上还含有 ampR 调控基因,属于诱导型 AmpC 酶。目前,CLSI 已经建立了对 ESBLs 进行检测的确证试验,尚没有对 AmpC 酶进行检测的推荐方法。尽管近年来有许多检测 AmpC 酶的方法报道,但各具有优缺点,还未能作为临幊微生物室常规使用的检测方法,且尚缺乏针对质粒介导 AmpC 酶检测方法的研究。

本研究结果显示,如果以 PCR 扩增结果为 AmpC 酶检测的“金标准”,头孢西丁三维试验的符合率最低,其次是双纸片抑制试验中 CTT/CTT+PBA 纸片组合,FOX/FOX+PBA 纸片组合符合率最高。头孢西丁三维试验被认为是检测表型 AmpC 酶比较准确的方法,然而对肺炎克雷伯菌 AmpC 酶的检测率却不是很高,可能与肺炎克雷伯菌产诱导性 DHA 型 AmpC 酶有关,产酶量不足导致假阴性。同时发现 Kpn98 及 Kpn137 菌株三维试验阳性,AmpC 酶基因扩(下转第 2211 页)

灵敏度为 17.2%，特异性为 100.0%。苯唑西林纸片法与青霉素 Etest 方法比较，差异有统计学意义 ($\chi^2 = 77, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 苯唑西林纸片法与青霉素 Etest 方法比较 (n)

Etest 方法	苯唑西林纸片法		合计
	PSSP	PNSP	
PSSP	16	77	93
PNSP	0	3	3

3 讨 论

SP 是儿童感染性疾病，尤其是小儿肺炎的常见病原菌，治疗 SP 感染，历史沿袭的首选药物是青霉素 G。2008 年，CLSI 对 SP 非脑膜炎株的青霉素折点值进行了重大调整，这种调整使 SP 非脑膜炎株对青霉素的敏感率大幅度提高^[4-7]。折点改变后，PSSP 菌株明显增多，PISP 和 PRSP 明显减少^[4-7]。美国 CDC 对 6 423 株 SP 非脑膜炎株进行研究，发现折点修改后 PSSP 从 74.7% 上升为 93.2%，PISP 从 15.0% 下降为 5.6%，PRSP 从 10.3% 下降为 1.2%^[4]。本研究中，96 株 SP 非脑膜炎株中，PSSP 高达 93 株 (96.9%)，与其他报道的 93.2%^[4]、92.2%^[5] 接近，比浙江报道的 85.9% 和 85.5% 高^[6]。青霉素仍能作为治疗 SP 非脑膜炎株感染的首选药物。对 SP 引起的呼吸道感染等额外感染性疾病，青霉素 G 仍是一价廉而有效的一线药物。

CLSI^[1-2] 认为可用苯唑西林纸片法筛选 SP 青霉素的敏感性。苯唑西林抑菌环直径大于或等于 20 mm，提示 SP 对青霉素敏感；苯唑西林抑菌环直径小于或等于 19 mm，提示 SP 对青霉素可能耐药、敏感或中介，需用 MIC 方法判断 SP 对青霉素的敏感性。2008 年青霉素折点值的重大调整导致 SP 的耐药性结果判读发生根本改变^[4-7]，也使得苯唑西林对 SP 非脑膜炎株青霉素注射剂筛选的灵敏度大大降低。本研究中，苯唑西林对 SP 非脑膜炎株 PSSP 筛选的灵敏度只有 17.2% (16/

(上接第 2209 页)

增为阴性，推测是其他 β -内酰胺酶产生的结果^[6]。近年来有学者利用新的 AmpC 酶抑制剂，如 Ro48-1220、LN-2-128 和 Syn2190 等，检测质粒型 AmpC 酶，其准确性都比较高，但这些酶抑制剂在临床比较难获得。本试验通过苯基代硼酸对 AmpC 酶的抑制作用对肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶进行检测，FOX/FOX + PBA 纸片组合的特异性和敏感性都比较高，而 CTT/CTT + PBA 纸片组合检测率比较低，而且双纸片抑制增效试验操作简便，速度快很适用于临床肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶的检测。

可见，对于临床微生物工作者来说，要想正确指导临床有效用药，单单从体外药敏结果判断诱导型 AmpC 酶的耐药性是比较困难的，应该综合考虑到酶的水解特性、诱导剂以及接种物效应等的影响。目前，临床微生物工作者面临着许多困难。一方面，肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶的不断增加，势必影响到临床抗感染的疗效。另一方面，临床实验室在 AmpC 酶检测方法的建立以及对产酶菌株复杂的耐药性认识相对不够，导致不能给临床提供及时、有效的指导。以新 AmpC 酶抑制剂为基础建立的检测方法可能成为检测 AmpC 酶的新方向，临床微生物学工作者应加强这方面研究探讨，进一步应用到其他肠杆菌科 AmpC 酶的检测。

93)，82.8% (77/93) 的 SP 非脑膜炎株 PSSP 不能通过苯唑西林纸片法筛选出来，只能通过 MIC 方法进行检测。因此，实验室使用苯唑西林筛选 PSSP 时，对于苯唑西林抑菌环直径小于或等于 19 mm 的 SP，检测青霉素的 MIC 至关重要。Etest 方法操作简单、结果稳定、便于阅读，是检测 SP 青霉素 MIC 的较好方法。

参考文献

- Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S18 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; eighteenth informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S22 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.
- 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, 2006.
- Centers for disease control and prevention (CDC). Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for Streptococcus pneumoniae—United States, 2006–2007 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2008, 57(50): 1353-1355.
- Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, et al. Impact of new Clinical Laboratory Standards Institute Streptococcus pneumoniae penicillin susceptibility testing breakpoints on reported resistance changes over time [J]. Microb Drug Resist, 2011, 17(1): 47-52.
- 李建平, 叶青, 沈月芳, 等. 2009~2010 年浙江大学儿童医院肺炎链球菌耐药性和血清分型 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(10): 792-795.
- 华春珍, 李建平, 俞惠民, 等. 应用 CLSI 新的折点值标准判读儿童分离的肺炎链球菌非脑膜炎株的耐药性 [J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(2): 137-140.

(收稿日期: 2014-03-11)

参考文献

- 陈东科, 张志敏, 张秀珍. 三维法检测 β -内酰胺酶的影响因素探讨及方法的改进 [J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(10): 600-604.
- 冯福英, 兰小鹏, 杨湘越, 等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒 AmpC 基因型及流行病学分析 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(3): 314-318.
- CLSI. M100-S22 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.
- Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Klebsiella spp., Escherichia coli, and Proteus mirabilis [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 4163-4167.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6): 2153-2162.
- Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-Mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 763-765.

(收稿日期: 2014-02-18)