

两种检测超广谱 β -内酰胺酶表型方法的比较

严育忠, 范惠清, 徐 英, 周秀梅, 陆燕春

(上海市浦东新区南汇中心医院 - 复旦大学附属华山医院南汇分院, 上海 201300)

[摘 要] **目的** 了解某医院临床产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)细菌的耐药性与基因型, 比较两种方法对 ESBLs 表型检测的效果。**方法** 随机收集 100 株 ESBLs 阳性菌株(初筛试验阳性)为实验组, 30 株 ESBLs 阴性菌株(初筛试验阴性)为对照组。经 Vitek2 Compact 自动化系统鉴定细菌, 纸片扩散法进行药敏试验; 采用改良 Hodge 试验检测耐碳青霉烯类药物菌株; 美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的 ESBLs 表型确证试验和利用 3-氨基苯酚硼酸改良的 ESBLs 表型确证试验进行表型检测; 同时用聚合酶链反应(PCR)检测全部菌株的 ESBLs 基因。**结果** ESBLs 初筛试验阳性菌株均耐头孢噻肟, 但对碳青霉烯类药物仍敏感; 2 株耐碳青霉烯类药物的菌株, 改良 Hodge 试验阳性。ESBLs 基因检出率为 84.00%, 基因型以 SHV 和 CTX-M 型为主。以 PCR 检测 ESBLs 基因结果为金标准, ESBLs 表型确证试验和改良 ESBLs 表型确证试验的灵敏度、特异性、阴性预期值、阳性预期值分别为 72.61%、100.00%、100.00%、66.67% 和 98.81%、100.00%、100.00%、97.87%, 两种方法比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.53, P = 0.006$)。**结论** ESBLs 初筛试验阳性菌株对碳青霉烯类药物具有较高的敏感性。利用 3-氨基苯酚硼酸改良的 ESBLs 表型确证试验检测 ESBLs 表型, 效果更好。

[关 键 词] 超广谱 β -内酰胺酶; 表型试验; 耐药基因; 抗药性; 微生物; 微生物敏感性试验; 实验室技术和方法

[中图分类号] R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)05-0336-05

Two methods for the detection of ESBL phenotypes

YAN Yu-zhong, FAN Hui-qing, XU Ying, ZHOU Xiu-mei, LU Yan-chun (Nanhui Central Hospital of Pudong-Nanhui Branch of Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201300, China)

[Abstract] **Objective** To investigate antimicrobial resistance and genotypes of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing strains isolated from clinic in a hospital, and to establish an effective method to analyze ESBL phenotypes. **Methods** One hundred ESBL positive isolates (initial screen test was positive) were randomly selected as experimental group, and 30 ESBL negative isolates (initial screen test was negative) was as control group. All strains were identified by Vitek-2 Compact automatic system, and antimicrobial susceptibility test was performed by Kirby-Bauer disc diffusion method; Carbapenem-resistant isolates were detected by modified Hodge test; β -lactamase phenotypes were detected by both ESBL phenotypic confirmatory test recommended by Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) and modified ESBL confirmatory test incorporating 3-aminophenylboronic acid; ESBL genes of all isolates were detected by PCR and DNA sequencing. **Results** ESBL screen positive isolates were all resistant to cefotaxime, but susceptible to carbapenems; the modified Hodge tests were positive in two carbapenem-resistant isolates. The detection rate of ESBL genes was 84.00%, the dominant genes were SHV and CTX-M type. PCR detection for ESBL genes was regarded as a golden standard, and the sensitivity, specificity, negative predictive value, as well as positive predictive value of ESBL phenotype confirmatory test and modified ESBL phenotype confirmatory test was 72.61%, 100.00%, 100.00%, 66.67% and 98.81%, 100.00%, 100.00%, 97.87% respectively, the difference was significant ($\chi^2 = 7.53, P = 0.006$). **Conclusion** ESBL screen test positive isolates still have a high susceptible rate to carbapenems. ESBL phenotypes can be effectively detected by modified ESBL confirmatory test incorporating 3-aminophenylboronic acid.

[收稿日期] 2012-01-20

[基金项目] 上海市浦东新区卫生局卫生科技发展专项基金资助(PW2011A-22)

[作者简介] 严育忠(1977-), 男(汉族), 上海市人, 主管技师, 主要从事临床微生物检验及细菌耐药性研究。

[通讯作者] 陆燕春 E-mail: huhua021@126.com

[Key words] extended-spectrum β -lactamase; phenotypic test; drug-resistant gene; drug resistance, microbial; anti-microbial susceptibility testing; laboratory technique and method

[Chin Infect Control, 2012, 11(5): 336–340]

上世纪 80 年代,德国首次发现超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamase, ESBL),目前 ESBLs 已呈全世界播散趋势^[1]。及时、准确地鉴定医院内产 ESBLs 菌株已成为防止耐药菌产生,有效控制医院感染的重要手段。目前常采用美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的纸片初筛试验和确证试验对 ESBLs 表型进行检测^[2],但由于细菌产酶机制复杂,常规的表型检测试验可能会遇到许多问题。本研究对 100 株 ESBLs 初筛试验阳性菌株,采用 CLSI 推荐的 ESBLs 表型确证试验和利用 3-氨基苯酚硼酸(3-aminophenylboronic acid, APBA)改良的 ESBLs 表型确证试验进行表型检测,并比较两种方法的效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验菌株:本院 2010 年 1 月—2011 年 6 月共分离到 1 237 株 ESBLs 初筛试验阳性菌株(对头孢他啶和/或头孢噻肟耐药),随机挑选其中 100 株作为实验菌株,其中大肠埃希菌 53 株,肺炎克雷伯菌 46 株,普通变形杆菌 1 株。对照菌株:本院临床分离的 30 株 ESBLs 初筛试验阴性菌株作为对照,其中大肠埃希菌 18 株,肺炎克雷伯菌 10 株,普通变形杆菌 2 株。

1.2 药敏试验 采用 Vitek2 Compact 自动化系统鉴定细菌,纸片扩散法^[2]进行菌株的 ESBLs 初筛试验。采用纸片扩散法测定试验菌株对抗菌药物的敏感性,抗菌药物纸片分别为:头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、氨曲南(ATM)、头孢吡肟(FEP)、头孢西丁(FOX)、头孢替坦(CTT)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)和厄他培南(ETP)及 ESBLs 表型鉴定纸片头孢噻肟/克拉维酸(CTX/CA)、头孢他啶/克拉维酸(CAZ/CA)。参照 CLSI 标准进行实验操作和结果判断。

1.3 改良 Hodge 试验(MHT) 参照 CLSI 标准进行实验操作和结果判断,检测耐碳青霉烯类药物菌株。

1.4 ESBLs 表型确证试验(下文称 CLSI 法) 采用纸片扩散法^[2],参照 CLSI 标准进行实验操作和结果判断。

1.5 改良 ESBLs 表型确证试验(下文称改良法) 将 APBA 120 mg 溶解于 1.5 mL 二甲亚砜中,加 1.5 mL 蒸馏水,配制成 40 mg/mL 溶液。滴加 10 μ L 上述 APBA 溶液分别于 CAZ、CTX 的单药和含 CAZ/CA、CTX/CA 的复合纸片,制成含抑制剂(APBA)的复合纸片 CAZ/APBA、CTX/APBA、CAZ/CA/APBA、CTX/CA/APBA,干燥 30 min 后,在 1 h 内使用。改良法的实验操作与结果判断:同 CLSI 法^[2]。

1.6 ESBLs 基因检测和序列测定 采用聚合酶链反应(PCR)法。煮沸法提取细菌 DNA 模板,检测 ESBLs 基因,所需的引物序列和 PCR 反应条件按参考文献^[3]进行。PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像,并送上海生工生物工程有限公司测序。

1.7 质控菌株 药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和 ATCC 35218;改良 Hodge 试验阳性对照菌株为经 PCR 确认的肺炎克雷伯菌 Kpn431;ESBLs 表型确证试验阳性对照菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.8 仪器与试剂 Vitek2 Compact 自动化系统(法国生物梅里埃公司)、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice(日本 TaKaRa 公司)、电泳槽和凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司);抗菌药物均为 Oxoid 公司产品;PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;APBA 购自 Sigma 公司。

1.9 统计分析 以 PCR 检测结果为金标准,计算两种 ESBLs 表型确证试验的灵敏度、特异性、阳性预期值和阴性预期值。计算公式:灵敏度 = 真阳性/(真阳性 + 假阴性);特异性 = 真阴性/(真阴性 + 假阳性);阳性预期值 = 真阳性/(真阳性 + 假阳性);阴性预期值 = 真阴性/(真阴性 + 假阴性)。应用 SPSS 11.0 软件进行 χ^2 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏试验 100 株 ESBLs 初筛试验阳性菌株对 CTX 均耐药,而对碳青霉烯类药物具有很高的

敏感率,仅出现 2 株耐药菌株。其中 1 株肺炎克雷伯菌 Kpn35 仅对 ETP 耐药,1 株肺炎克雷伯菌 Kpn62 对 3 种碳青霉烯类药物均耐药,见表 1。30 株阴性对照菌株对 9 种抗菌药物均敏感。

2.2 改良 Hodge 试验 对 2 株耐碳青霉烯类药物菌株(Kpn35、Kpn62)进行改良 Hodge 试验,均为阳性,如图 1。

表 1 100 株 ESBLs 初筛试验阳性菌株的药敏试验结果(%)
Table 1 Antimicrobial susceptibility testing result of 100 ESBL screen test positive isolates (%)

Antimicrobial agent	Sensitive rate	Resistant rate
CTX	0.00	100.00
CAZ	16.00	79.00
FEP	32.00	62.00
ATM	19.00	78.00
FOX	34.00	60.00
CTT	35.00	57.00
ETP	98.00	2.00
MEM	99.00	1.00
IPM	99.00	1.00

Intermediate were not included

表 2 100 株 ESBLs 初筛试验阳性菌株 PCR、CLSI 法和改良法的检测结果(株)

Table 2 Results of PCR, CLSI test and modified test of 100 ESBL screen positive isolates(No. of isolates)

PCR(Golden standard)	CLSI test		Modified test	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive isolates(<i>n</i> = 84)	61	23	83	1
Negative isolates(<i>n</i> = 16)	0	16	0	16

2.3 ESBLs 表型确证试验和改良 ESBLs 表型确证试验 采用两种方法对实验菌株进行表型确证试验,结果 100 株 ESBLs 初筛试验阳性菌株 CLSI 法检出 61 株,改良法检出 83 株,其中 61 株细菌两种试验均呈阳性,22 株细菌 CLSI 法阴性而改良法阳性,17 株细菌两种试验均呈阴性。30 株阴性对照菌株在两种试验中均呈阴性。见表 2 与图 2~4。

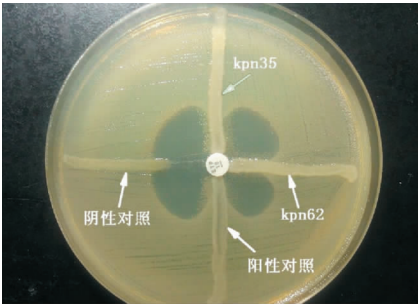
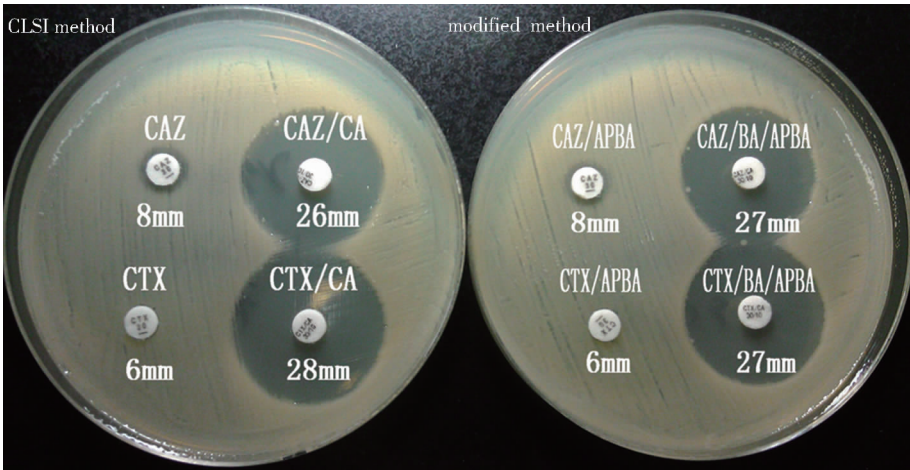


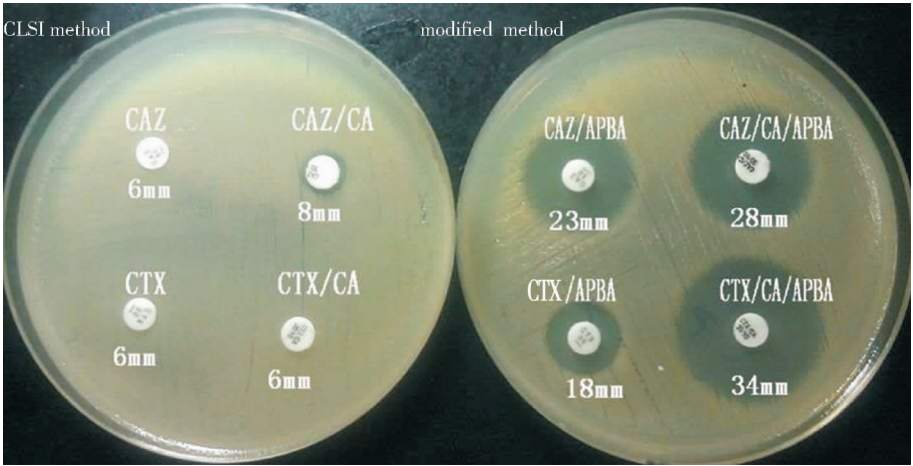
图 1 2 株耐碳青霉烯类药物菌株的改良 Hodge 试验
Figure 1 Modified Hodge tests of two carbapenem-resistant isolates



(The number indicated diameter of inhibitory zone)

图 2 同一株细菌两种表型确证试验均阳性(对比图)

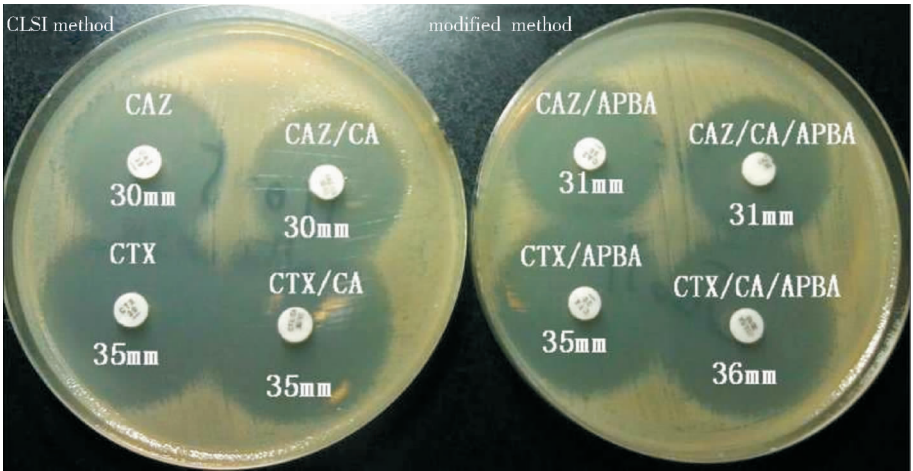
Figure 2 Two kinds of ESBL confirmatory tests of the same isolate were both positive



(The number indicated diameter of inhibitory zone)

图 3 同一株细菌 CLSI 法阴性而改良法阳性(对比图)

Figure 3 CLSI ESBL confirmatory test was negative, while modified ESBL confirmatory test was positive for the same isolate



(The number indicated diameter of inhibitory zone)

图 4 同一株细菌两种表型确证试验均阴性(对比图)

Figure 4 Two kinds of ESBL confirmatory tests of the same isolate were both negative

2.4 基因检测 对 100 株 ESBLs 初筛试验阳性菌株进行基因检测, 84 株携带 ESBLs 基因, 检出率为 84.00%, 见表 2。测序结果显示, 41 株检出 SHV 型 β -内酰胺基因(29 株 SHV-11 和 12 株 SHV-12), 47 株检出 CTX-M-1 组基因(30 株 CTX-M-15 和 17 株 CTX-M-14), 3 株检出 OXA-10 型 β -内酰胺基因; 其中 7 株同时检出 SHV 型和 CTX-M 型 β -内酰胺基因。Kpn35 含有 CTX-M-14 型 ESBLs 基因, 而 Kpn62 未检测出 ESBLs 基因。30 株阴性对照菌株 PCR 扩增均为阴性。

2.5 CLSI 法和改良法的比较 CLSI 法的灵敏度、特异性、阳性预期值和阴性预期值分别为 72.61%、100.00%、100.00%和 66.67%, 改良法的上述项分

别为 98.81%、100.00%、100.00%和 97.87%, 两种方法比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.53, P = 0.006$), 改良法优于 CLSI 法。

3 讨论

头孢类药物是肠杆菌科细菌感染治疗的一线用药, 然而细菌在抗菌药物的选择性压力下, 对头孢类药物的耐药率逐年上升。水解头孢类药物是 ESBLs 的特性之一。对于目前普遍存在的产 ESBLs 细菌感染, 临床首选碳青霉烯类药物, 但现已出现产碳青霉烯酶细菌, 抗感染形势更加严峻^[4], 重视 ESBLs 的检测, 有助于控制医院感染。本研究 2 株产

ESBLs 细菌对碳青霉烯类药物耐药,改良 Hodge 试验为阳性。对碳青霉烯类耐药的肠杆菌在近 10 年引起了全世界的关注,其耐药机制包括产各类型的碳青霉烯酶;另外也有报道^[5],细菌产 CTX-M 型 ESBLs 如合并膜蛋白的缺失,可能导致对碳青霉烯类药物耐药。因此,应密切关注产 ESBLs 菌株对碳青霉烯类药物的敏感性,防止此类耐药菌株的产生与扩散。

PCR 扩增阳性菌株主要为 CTX-M 和 SHV 基因型,首次在肺炎克雷伯菌中发现 OXA 型 ESBLs 基因。不同地区流行的 ESBLs 型别不完全相同,了解本地的基因型,有利于监测其他型别的输入性传播。通过进一步调查,本研究中的 3 株产 OXA 型 ESBLs 菌株来源于同一时期、同一病区的患者标本,疑为一次输入性的 OXA 型 ESBLs 克隆菌株流行。16 株经 PCR 检测阴性菌株的耐药机制有待进一步研究。

CLSI 推荐的 ESBLs 表型试验普遍应用于临床,但该方法可能受到其他酶的干扰而影响试验结果,特别是 AmpC 酶和 KPC 酶^[6-7]。产质粒型 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌在临床已非常普遍,产 KPC 酶的肠杆菌科细菌也有全世界范围内播散的趋势,两者合并产 ESBLs,使耐药情况更加严重^[4,8]。有文献报道^[9-10],硼酸作为一种 β -内酰胺酶抑制剂,在 AmpC 酶和 KPC 酶表型检测中取得了很好效果。利用硼酸对 AmpC 酶和 KPC 酶的特异性抑制作用,对 CLSI 推荐的 ESBLs 表型确证试验进行改良,较好地避免了假阴性结果的出现,检测效率显著提高。本研究中 3 株产 OXA 型 ESBLs 菌株,采用 CLSI 推荐的方法,均为阴性结果,而采用加入抑制剂的改良试验,检出 2 株阳性。已有研究表明^[11],由于 OXA 型 ESBLs 被克拉维酸轻度抑制,CLSI 推荐的表型检测不能准确鉴定。我们推测可能为硼酸增加了 CLSI 法的抗菌药物纸片抑菌圈直径,使两种纸片的差值扩大。综上所述,改良法更适用于对 ESBLs 表型的检测。

Projan^[12]认为,具有较大染色质容量的微生物较易获得耐药基因,而 ESBLs 阳性菌携带的耐药质粒往往为大型质粒,具有较一般质粒更大的染色质长度,所以可能更易获得耐药基因。随着合并产多种酶菌株的日益增多,常规的表型检测方法面临诸

多挑战,我们应通过多种手段加强对细菌产酶表型的检测。本研究也仅针对 ESBLs 表型进行了分析,其他酶表型有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Bradford P A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4):933-951.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 19th informational supplement, M100-S19 CLSI, Wayne, PA, 2009.
- [3] 胡付品,朱德妹,叶信予,等. 对头孢吡肟敏感的疑似产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和克雷伯菌属的分子生物学特征[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(10): 1128-1133.
- [4] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(4): 228-236.
- [5] Carvalhaes C G, Picao R C, Nicoletti A G, et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(2): 249-251.
- [6] Coudron P E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8):4163-4167.
- [7] Pillai D R, Melano R, Rawte P, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Canada[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(5): 827-829.
- [8] Cai J C, Zhou H W, Zhang R, et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(6): 2014-2018.
- [9] Doi Y, Paterson D L. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases[J]. Int J Infect Dis, 2007, 11(3): 191-197.
- [10] Tsakris A, Kristo I, Poulou A, et al. Evaluation of boronic acid disc tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(2): 362-367.
- [11] 刘晓一,刘文恩. OXA 型超广谱 β -内酰胺酶的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9(6): 462-467.
- [12] Projan S J. (Genome) size matters[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1133-1134.