

纸片扩散试验检测 β -内酰胺酶的研究进展

严育忠, 陆燕春, 徐 英, 周秀梅 综述, 范惠清 审校
(上海浦东新区南汇中心医院检验科 201300)

关键词: 纸片扩散抗菌试验; β 内酰胺酶类; 研究

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)15-1720-02

在产酶细菌感染的治疗和预后中,美国临床实验室标准化协会(CLSI)M100-S20 文件弱化了细菌产酶机制的检测,而认为细菌最小抑菌浓度(MIC)与临床治疗结局的相关性更好,但是除了参考新修订的抗生素折点外, β -内酰胺酶的检测和报告规则不变^[1],该文件作为临床治疗重要的参考依据不容忽视,对于感染的控制及流行病学调查更是至关重要。在新形势下,如何快速、可靠地检测超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、AmpC 酶及碳青霉烯酶是国内外学者研究细菌耐药机制的热点课题。

1 ESBLs

纸片扩散法 ESBLs 确证试验以两步法检测:第 1 步筛选,第 2 步确证^[1]。该方法可以定量,能排除判读的主观性。双纸片协同确证试验也是一种常用的 ESBLs 确证试验,合理的纸片间距对于试验非常重要,它能避免假阴性及结果的不确定性。对于专业人士来说,该试验应用广泛,且非常有效。但是在这些试验中,一些产其他类型的 β -内酰胺酶的确证试验可能出现假阳性^[2]。

产 ESBLs 合并产其他 β -内酰胺酶菌株已非常普遍,使得 ESBLs 检测显得越来越困难。如合并产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株,CLSI ESBLs 确证试验可能会得到假阴性的结果。在此类菌株的检测中,有研究者用硼酸纸片抑制试验得到了满意的结果^[3]。而在合并产 KPC 酶和 ESBLs 的菌株中,CLSI ESBLs 确证试验结果可能不确定,加了硼酸后,结果明确易读^[4]。在以上试验中,硼酸抑制了 AmpC 酶和 KPC 酶的水解作用,排除了干扰,使 ESBLs 确证试验结果清晰明了。

在 ESBLs 筛选及确证试验中,选择 1 种以上药物作为依据,可以提高敏感度^[1],在药敏筛选时同时植入确证试验效果最好^[5]。硼酸抑制试验在确证 ESBLs 中具有较高的应用价值。

2 AmpC 酶

近年来,对于 AmpC 酶表型检测的研究已有不少进展,但至今没有 CLSI 认可或公认的 AmpC 酶检测标准^[6]。染色体诱导型 AmpC 酶存在于阴沟肠杆菌、产气肠杆菌和弗劳地柠檬酸杆菌等,这些细菌在使用 β -内酰胺类抗生素治疗时可诱导产生 AmpC 酶形成耐药机制;而在克雷伯菌属、沙门氏菌属和奇异变形杆菌中,AmpC 酶为质粒介导而非诱导型 AmpC 酶。有些实验室用 CLSI ESBLs 的筛选标准来筛选 AmpC 酶,或者用耐头孢西丁试验筛选除 ACC-1 和 ACC-4 型 AmpC 酶外的质粒型 AmpC 酶^[7],而头孢西丁诱导试验常用来检测染色体型 AmpC 酶。

AmpC 酶的检测通常是利用其对头霉素的水解作用或 AmpC 酶抑制剂的抑制作用。利用细菌生长繁殖过程中产的酶或破坏细菌结构释放的酶液与头霉素纸片相互作用产生特殊的抑菌圈检测 AmpC 酶的存在,常用的试验为 AmpC 酶纸片法。唐振华和朱义朗^[8]就是利用该方法对 63 株阴沟肠杆菌

进行了 AmpC 酶检测。破坏细菌结构直接释放酶液的敏感度更高^[9],因为细菌如果产酶的效率较低,可能导致假阴性。AmpC 酶的抑制剂最常用的有硼酸及氯唑西林,通过抑制 AmpC 酶来增强头霉素的活性。有学者利用 3-氨基苯酚硼酸联合头孢噻肟和头孢他啶检测出了所有 AmpC 酶的表型,同时也有效地和 ESBLs、B 类碳青霉烯酶(MBLs)区分^[10-11],硼酸抑制试验能显示 AmpC 酶阳性结果,但是不能鉴别染色体型和质粒型 AmpC 酶^[10]。但是硼酸对 KPC 酶、一些 ESBLs 和碳青霉烯酶 OXA-12 有抑制作用,有时还可能对某些细菌生长也有抑制作用,而造成结果不确定。如果同时加入硼酸自身对照,硼酸抑制试验也不失为一种好的方法^[12]。有报道应用氯唑西林联合头孢噻肟和头孢他啶双纸片协同试验检测 15 株产 AmpC 酶的菌株,结果都发生了协同效应^[13]。同时在头孢西丁和头孢噻肟/头孢他啶的双纸片扩散试验中,ACC-1 型 AmpC 酶发生了协同效应,DHA-1 型 AmpC 酶出现了诱导效应,而 1 株去阻遏的突变株既不发生协同效应也无诱导效应。同样需要注意的是双纸片的间距,不恰当的距离得不到有效的结果。还有一些特异性的 AmpC 酶抑制剂,如 LN-2-128、RO48-1220 和 Syn2190 等,其中 Syn2190 与头孢替坦联合后,检测 AmpC 酶得到了很高的敏感度(91%)和特异度(100%)^[14-15],但是目前类似的抑制剂还没有商品化。

3 碳青霉烯酶

随着碳青霉烯类药物的广泛使用,临床产碳青霉烯酶细菌的检出率在不断增加,碳青霉烯酶可分为 A、B、D 类。M100-S20 文件对碳青霉烯类的折点也做了及时更新,增加了抑菌圈的阈值,调低了 MIC 的折点。

CLSI 推荐的 MHT(modified Hodger test)为碳青霉烯酶的确证试验^[1],MHT 不能区分碳青霉烯酶的种类,对检测碳青霉烯酶也并非特异,只要具备类似碳青霉烯酶活性就有可能产生阳性结果。A 类碳青霉烯酶包括 KPC 型、IMI 型和 SME 型等,一些对碳青霉烯类水解作用较弱的酶,如有些 KPC 型酶会被误认为同样有水解碳青霉烯类药物作用的 ESBLs。对于目前最常见的 KPC 型碳青霉烯酶,有研究者推荐厄他培南筛选试验,因为产 KPC 酶菌株通常对其不敏感,而产其他类型碳青霉烯酶菌株可能敏感^[16]。硼酸抑制试验利用亚胺培南和美罗培南检测 KPC 酶具有很高的特异性,Tsakris 等^[17]利用硼酸抑制的纸片增强试验检出了第 1 株产 KPC-2 酶的肺炎克雷伯菌。在加了硼酸抑制剂后,头孢替坦、亚胺培南、头孢吡肟和头孢噻肟的抑菌圈均增加了 5 mm 以上。

金属 β -内酰胺酶(MBLs)主要为 VIM 型、IMP 型及 SPM 型,它们能有效水解碳青霉烯类药物,不水解单酰胺类药物,能被 EDTA 抑制,不被 β -内酰胺酶抑制剂抑制。如果排除 ESBLs 和高产 AmpC 酶,氨曲南敏感同时碳青霉烯类药物敏感性降低可作为 MBLs 的筛选标准。双纸片确证试验可用 EDTA、

巯基丙酸、巯基乙酸等作为抑制剂,增强碳青霉烯类或头孢他啶药物的活性^[18-21]。Tsakris 等^[22]利用 EDTA 和硼酸纸片增强试验检测 MBLs 和 KPC 酶,该方法简单、实用且非常有效。此类试验最好做螯合物的自身对照,来判断螯合物自身是否对检测菌有抑制作用^[23]。

D 类碳青霉烯酶主要为 OXA 型,其主要产自不动杆菌,对碳青霉烯类药物有弱水解作用,能被克拉维酸微弱抑制。亚胺培南可能是在 MHT 中特异度最差的一种药物,但它是检测 OXA 型碳青霉烯酶最敏感的药物^[11]。

产碳青霉烯酶细菌由于酶及菌种的不同,对碳青霉烯类药物的敏感度也可能不同^[24-26]。在选择纸片筛选碳青霉烯酶时,需从菌种及筛选药物等多方面考虑。

4 结 语

总之,纸片扩散法由于其操作上的优势,可将确证试验和筛选试验同时进行。如果考虑地域特点和主要流行模式,确证试验可以针对性地选择药物纸片组合,某些确证试验还能同时提供细菌产多种 β -内酰胺酶的信息。纸片扩散法因其操作简单、成本低廉,适合于各种医疗机构,特别是在感染控制能力和治疗水平相对较差的基层医疗机构。恰当的试验方法及专业的判读能提供达到金标准的试验效果。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2010.
- [2] Potz NA, Colman M, Warner M, et al. False-positive extended spectrum beta-lactamase tests for *Klebsiella oxytoca* strains hyperproducing K1 beta-lactamase[J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(3): 545-547.
- [3] Coudron PE. 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.
- [4] Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, et al. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(11): 3420-3426.
- [5] Moland ES, Kim SY, Hong SG, et al. Newer β -Lactamases: clinical and laboratory implications, part I [J]. Clin Microbiol Newsl, 2008, 30(11): 71-77.
- [6] Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases[J]. Int J Infect Dis, 2007, 11(3): 191-197.
- [7] 赵虎, 涂婉, 方毅, 等. 阴沟肠杆菌染色质 AmpD 基因的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 769-772.
- [8] 唐振华, 朱义朗. 产 AmpC 酶和 ESBLs 阴沟肠杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1): 16-19.
- [9] Moland ES, Kim SY, Hong SG, et al. Newer beta-lactamases: clinical and laboratory implications, part II [J]. Clin Microbiol Newsl, 2008, 30(11): 79-84.
- [10] Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(6): 2551-2558.
- [11] Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6): 1971-1976.

- [12] Jeong SH, Song W, Kim JS, et al. Broth microdilution method to detect extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(11): 3409-3412.
- [13] Ruppé E, Bidet P, Verdet C, et al. First detection of the Ambler class C 1 AmpC β -lactamase in *Citrobacter freundii* by a new, simple double-disk synergy test[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(11): 4204-4207.
- [14] Black JA, Thomson KS, Buynak JD, et al. Evaluation of β -lactamase inhibitors in disk tests for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in well-characterized clinical strains of *Klebsiella* spp[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 4168-4171.
- [15] Black JA, Thomson KS, Pitout JD. Use of β -lactamase inhibitors in disk tests to detect plasmid-mediated AmpC β -lactamases[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2203-2206.
- [16] Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2723-2725.
- [17] Tsakris A, Kristo I, Poulou A, et al. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(6): 1257-1260.
- [18] Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 40-43.
- [19] Kim SY, Hong SG, Moland ES, et al. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo- β -lactamases in the clinical laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(9): 2798-2801.
- [20] Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, et al. Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 4388-4390.
- [21] Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom 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.
- [22] Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(8): 1664-1671.
- [23] Ratkai C, Quinteira S, Grosso F, et al. Controlling for false positives; interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta-lactamases[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(3): 657-658.
- [24] Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, et al. Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(1): 59-63.
- [25] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.
- [26] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 306-325.