

胞,是机体受病毒感染后,由正常淋巴细胞受刺激后,向浆细胞转化的一种病理细胞^[3],这种处于转化过程中的细胞,具有一些新的形态学特点,如:体积变大、核大、染色质疏松,甚至会出现模糊的核仁;胞浆变化更为显著,不仅量变多,而且常变成深蓝色,有时有泡沫感,形似浆细胞。正常血片中偶见异型淋巴细胞(属于 T 淋巴细胞在形态上的变异),健康人血片中一般不超过 2%,在病毒性感染时增多^[4]。在各种患儿发热疾病中,异型淋巴细胞增高是病毒感染的经典标志,近年来发现异型淋巴细胞增高可与多种病毒感染、淋巴细胞增殖性疾病有关^[5],近几年,国内在小儿呼吸道感染疾病的血清学检测与外周血异型淋巴细胞形态学分析等相关报道中,异型淋巴细胞检出率以 EBV 感染最高^[6]。

本组观察的 317 例发热患儿的血涂片中,出现异型淋巴细胞 177 例(55.8%),其中 I 型异型淋巴细胞 90 例(28.4%),II 型异型淋巴细胞 61 例(19.2%),III 型异型淋巴细胞 26 例(8.2%)。经抗病毒配合中药治疗,均痊愈出院。患儿外周血中异型淋巴细胞的检出率无性别差异,对照组未见异型淋巴细胞。同时,本组患儿外周血白细胞计数结果与异型淋巴细胞检出率无相关性。这说明白细胞计数不能反映出是否有病毒感染的存在,有必要做血涂片镜检,观察有无异型淋巴细胞的存在。临床上最常见的患儿发热是病毒或细菌感染引起的,因此,发热患儿进行血涂片镜检,观察外周血片中有无异型淋巴细胞,可帮助临床医生初步判断患儿为病毒感染或细菌感染,为临床诊断提供重要依据。

外周血细胞形态学检查对免疫力低下者的临床诊断也有特殊的应用价值。笔者遇到过出生 58 d 的患儿,皮下肿块,患儿烦躁不安,血常规检查数值正常,血细胞形态学检查可见中、晚幼粒细胞及粗大中毒颗粒,抗菌药物治疗后病情明显好转。

外周血涂片分类对于临床诊断各种发热、多种原因引起的外周血白细胞数和量的异常、不明原因浅表淋巴肿大等常见

• 经验交流 •

疾病起着重要作用,其分类的准确与否直接影响着临床医生对患者的诊断和治疗。在临床工作中,通过外周血涂片镜检,笔者发现过白血病、溶血性贫血、缺铁性贫血等血液系统疾病。为了避免误诊误治,临床上凡是患儿不明原因的发热、出血、贫血、黄疸及某一不易控制的症状均应进行血细胞形态学检验。血细胞形态学检验不仅能为临床提供快捷、准确的实验室诊断依据,而且经济方便,尤其是在基层医院值得重视和推广。

血细胞形态学检查是血常规检验的重要内容,也是检验医学技术人员必须掌握的基本功。近年来,自动化的血液分析仪在我国已相当普及。它在一定程度上也提高了检验的精密度和准确性。但是,他们毕竟不是在显微镜下直接观察细胞的内部结构,如核的形状、染色质的粗细、有无核仁、胞浆着色性、浆内颗粒性质有无内含物等区分和鉴定异常细胞的重要指标,仪器是无法提供的。因此,血液细胞形态学检验对儿科发热疾病的诊断、鉴别诊断非常重要,临床工作人员应加以的重视。

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,2006:121.
 [2] 汪华,刘兴态,蓉蓉. 外周血异常淋巴细胞检出情况分析[J]. 实用医技杂志,2006,13(16):2808-2809.
 [3] 刘志洁,黄方源. 实用临床血液细胞学图谱[M]. 北京:科学出版社,1996:52.
 [4] 陈家焯,朱丹华. 怎样看化验单[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2001:13.
 [5] 魏扬. 外周血异型淋巴细胞增高患儿病原学和细胞免疫变化的探讨[J]. 中国实用儿科杂志,2003,18(6):362-363.
 [6] 涂学亮,薛燕平,王巍巍. 387 例小儿支气管肺炎患者血液学检测结果分析[J]. 江西医学检验,2006,24(1):48-49.

(收稿日期:2012-11-08)

肠杆菌科产碳青霉烯酶菌株的筛选方法研究

杨有琴,徐风芹

(海洋石油总医院检验科,天津 300452)

摘要:目的 了解该院肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗生素的耐药情况。方法 收集该院 2009~2011 年间分离肠杆菌科细菌,用梅里埃药敏卡 AST-GN09 检出对碳青霉烯类抗生素敏感性减低的分离株 24 株,并且采用纸片扩散法检测其对厄他培南、亚胺培南、美罗培南的耐药性;再通过改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶。结果 24 株对碳青霉烯类抗菌药物敏感性减低的菌株纸片扩散法检测,对厄他培南耐药 10 株,敏感 14 株;对美罗培南耐药 11 株,敏感 13 株;对亚胺培南耐药 10 株,敏感 14 株。通过改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶 24 株菌中有 4 株阳性。结论 改良 Hodge 试验可以有效地检测肠杆菌科细菌中的碳青霉烯酶,是基层医院开展碳青霉烯酶检测的有效方法。

关键词:改良 Hodge 试验; 肠杆菌; 碳青霉烯酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.062

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2013)11-1467-02

肠杆菌科细菌如肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌是医院感染的主要致病菌。碳青霉烯类抗菌药物是治疗肠杆菌科细菌严重感染的最有效的 β-内酰胺类抗菌药物^[1]。碳青霉烯酶是可以水解碳青霉烯类抗菌药物活性的 β-内酰胺酶,使碳青霉烯类抗生素的 MIC 值升高,却未达到临床实验室标准化协会(CLSI)规定的耐药判定标准。2009 年 CLSI 建议用改良 Hodge 试验(MHT)筛选低产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌^[2]。对碳青霉烯类抗

菌药物 MIC ≥ 2 μg/mL 的肠杆菌科细菌用 MHT 进行筛查,为临床提供肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物潜在的耐药情况。

1 材料与方 法

1.1 材料 选取本院 2009~2011 年住院患者分离的对碳青霉烯类抗生素敏感性降低的肠杆菌科细菌,用 AST-GN09 药敏卡进行药敏检测,筛选出对亚胺培南(IPM)、美罗培南

(MEM)MIC ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株,同一患者多次分离只取 1 株。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪、GN09 鉴定卡和 AST-GN09 药敏卡为法国生物梅里埃产品;MH 琼脂、厄他培南、亚胺培南和美罗培南纸片为天津金章公司产品。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC13883 和阴沟肠杆菌 ATCC13047。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感试验 采用 K-B 法测定菌株对厄他培南、亚胺培南和美罗培南的敏感性。取 0.5 麦氏单位的菌液,均匀涂布于 MH 琼脂平板上,待室温干燥 3~5 min 后贴亚胺培南、美罗培南和厄他培南纸片,各纸片中心大于 24 mm,纸片距离平板边缘应大于 15 mm,置 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16~18 h 后读取结果。判断标准参照 CLSI 2010 年标准。

1.3.2 改良 Hodge 试验(MHT) MHT 操作步骤参照美国 CLSI 推荐方法^[2]。使用无菌生理盐水将大肠埃希菌 ATCC25922 菌悬液浊度调至 0.5 麦氏单位并进行 1:10 稀释,将菌液涂布在 MH 琼脂平板上,干燥 3~10 min,在平板中心贴 10 μg 厄他培南纸片,用 10 μL 接种环挑取 3~5 个待测分离菌株从纸片的边缘画线到平板的边缘,35 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。若出现矢状生长为碳青霉烯酶表型阳性。以大肠埃希菌 ATCC25922 为指示菌株,肺炎克雷伯菌 ATCC13883 和阴沟肠杆菌 ATCC13047 作为阴性对照。

2 结果

24 株对碳青霉烯类抗生素敏感性减低的菌株,经纸片扩散法检测对 3 种碳青霉烯类抗生素纸片的敏感性,结果如下:对厄他培南耐药 10 株,敏感 14 株;对美罗培南耐药 11 株,敏感 13 株;对亚胺培南耐药 10 株,敏感 14 株。通过改良 Hodge 试验(MHT)检测碳青霉烯酶 24 株菌中有 4 株阳性,19 株阴性,阳性率为 1.67%。

3 讨论

随着抗菌药物的大量使用,临床对各类抗生素耐药的菌株迅速增多。碳青霉烯类抗菌药物有较强的抗菌作用,抗菌谱广泛及对 β -内酰胺酶稳定性高,对肺炎克雷伯菌、产 ESBLs 大肠埃希菌有高度抗菌作用^[3-6],已成为临床治疗肠杆菌科细菌引起的严重感染的首选药物。但近年来相继发现了对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌,肠杆菌科细菌产生碳青霉烯酶是其对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制^[7-8]。

单纯产碳青霉烯酶的菌株,可能对碳青霉烯类抗生素表现为敏感性减低,并不显示耐药。因此,仅依靠自动仪的药敏结果或者纸片法的结果来判断是否产碳青霉烯酶,是不可靠的,容易造成漏检。因此,CLSI 推荐用改良 Hodge 试验(MHT)来检测肠杆菌科细菌中的碳青霉烯酶。该方法操作简便,敏感性高,能同时检测 KPC 型碳青霉烯酶菌株对各种抗生素的敏感性,并能根据 CLSI 新标准判读结果,适合一般实验室用于肠杆菌科细菌中碳青霉烯酶的常规筛查。2010 年 CLSI 对肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物折点进行了修订,修改后,耐药范围能更好地覆盖 MIC 值较低的产酶菌株。

菌株对厄他培南的敏感性下降是产 KPC 酶的敏感标志^[9]。Hodge 试验主要用于筛查 KPC 型碳青霉烯酶,耐碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌中,一部分是由于外膜孔道蛋白缺失引起的,这类菌株如果获得质粒介导的碳青霉烯酶,就会对碳青霉烯类抗生素产生高水平耐药,而 MHT 出现阴性;如果菌株

高产 AmpC 酶或产 CTX-M,可能会出现 MHT 假阳性的结果。不同的检测方法对碳青霉烯酶检出率存在很大差异,这是由于不同的药敏试验方法接种的细菌量不同,提高接种量可以造成假阳性率升高,即产碳青霉烯酶菌株存在明显的接种效应^[11]。

本次实验中的 4 例 MHT 阳性的细菌,3 例来源于重症 ICU,1 例来源于呼吸科病房,均为老年病患,平均年龄 67.5 岁。2 例为肿瘤晚期患者,1 例老年慢性肺气肿合并感染患者,1 例血液病患者,经由外院治疗后转入本院。显示这类患者通常有基础病,自身免疫力下降,住院时间长,使用抗生素频率高,种类多,有些患者多次在不同医院住院治疗,易于造成耐药菌株的携带和传播。这类患者是医院感染的高危人群,应采取严格消毒隔离措施,控制多重耐药菌株的传播。

厄他培南是检测产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的最好药物,由于本实验室使用的梅里埃 AST-GN09 药敏卡不包含厄他培南,因此,笔者对多药耐药的肠杆菌科菌株进行了厄他培南的 K-B 法药敏检测,以防造成产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的漏检。对于亚胺培南、美罗培南敏感和厄他培南耐药的菌株,再通过改良 Hodge 试验检测其是否产生碳青霉烯酶,为临床医生选择抗生素提供参考,为院内感染提供警示。本医院为基层医院,不具备 PCR 检测碳青霉烯酶基因的条件。经 MHT 筛选出的阳性菌株,以及潜在产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌,可以送二级实验室进一步用基因检测法确认。

参考文献

- [1] Rahal JJ. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram-negative infections[J]. Crit Care, 2008, 12(Suppl 4): S5.
- [2] CLSI. M100-S19 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement [S]. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- [3] 蒯守刚,邵海帆,王卫萍,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药机制研究[J].中华医院感染学杂志,2010,20(22):3441-3444.
- [4] 关静,霍艳艳,祝春艳.口服碳青霉烯类抗生素的研究进展[J].科技成果纵横,2001(3):56-57.
- [5] 郑初.碳青霉烯类抗生素临床应用[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(4):248-249.
- [6] 周鹏,洪云月,孙渊.碳青霉烯类药物安全性与细菌耐药性研究进展[J].医药导报,2010,29(6):750-754.
- [7] 陆坚.碳青霉烯酶研究进展[J].国外医学:流行病学传染病学分册,2003,30(1):14-17.
- [8] 陆坚,唐英春.细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的热点问题[J].国外医学:内科学分册,2003,30(9):369-372.
- [9] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(4): 228-236.
- [10] Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, et al. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of Enterobacteriaceae by incorporating boronic acid[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1323-1332.
- [11] 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.