

• 临床研究 •

产 AmpC 酶大肠埃希菌的检测及耐药分析

王欣慧, 许可欣[△]

(南京医科大学第二附属医院检验科, 江苏南京 210011)

摘要:**目的** 检测临床分离细菌中大肠埃希菌的 AmpC β -内酰胺酶(简称 AmpC 酶)及其耐药情况。**方法** 收集临床上药敏试验头孢西丁抑菌圈直径 ≤ 18 mm 的大肠埃希菌 299 株, 三维试验筛选产 AmpC 酶大肠埃希菌, 多重 PCR 扩增产 AmpC 酶的基因。最低抑菌浓度法检测抗菌药物的敏感性。**结果** AmpC 酶初筛试验阳性的 299 株大肠埃希菌中, 56 株(18.73%)三维试验筛选阳性, 多重 PCR 试验阳性共 34 株, 其中 DHA 群的有 14 株, CIT 群的有 20 株。**结论** 大肠埃希菌临床菌株中 AmpC 酶仍有较高的分离率, 本研究中以 DHA 群和 CIT 群为主, 并且耐药情况越来越严重。

关键词: 大肠埃希菌; AmpC β -内酰胺酶; ampC
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)08-1112-03

大肠埃希菌的分离率始终最高, 从近年我国发布的耐药监控数据分析来看, 其耐药率也逐年增加^[1-3]。细菌因产生各种 β -内酰胺酶导致的耐药现象随着 β -内酰胺类抗菌药物的广泛应用日趋严重, 酶的水解作用已成为耐药增加的一个重要原因, 尤其以产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、AmpC 酶 β -内酰胺酶(AmpC 酶)最为常见。其中 AmpC 酶已是肠杆菌科细菌对 β -内酰胺类抗菌药物产生多重耐药的重要原因之一^[4]。AmpC 酶的产生使细菌对包括青霉素和除头孢匹罗和头孢吡肟以外几乎全部的头孢菌素类药物产生耐药, 另有报道, 由于伴有 ESBLs, 产 AmpC 酶的大肠埃希菌出现了广谱头孢菌素的耐药性^[5]。种间传播性是质粒介导的 AmpC 酶具有的特征, 不论其在细菌耐药机制还是在院内感染方面都有重要的意义。目前, 对于 AmpC 酶产生耐药的检测仍然没有方法学的临床和实验室标准协会(CLSI)指导标准^[6], 临床常规检测项目中也并没有对产 AmpC 酶的大肠埃希菌检测。因此, 笔者对临床菌株产 AmpC 酶的情况及其耐药情况用进行了调查和分析, 旨在为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株 从临床痰、尿等标本中分离得到且筛选出头孢西丁抑菌圈直径小于等于 18 mm 299 株, 无重复的菌株。用大

肠埃希菌 ATCC 25922 作为产 AmpC 酶的阴性对照株, 以产 AmpC 酶阴沟肠杆菌(O29M)作为产 AmpC 酶的阳性对照株。

1.2 仪器与试剂 试验药敏纸片购自 Oxoid 公司; 药敏试验板购自上海复星佰路生物技术有限公司, PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; 引物合成于上海生工生物公司。使用的仪器包括微生物鉴定药敏系统、Mastercycle 梯度 PCR 仪、Tanon Eps100 电泳仪、凝胶成像仪、高速离心机、加热仪器、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱。

1.3 方法

1.3.1 AmpC 酶的初筛试验 用微生物鉴定药敏系统对菌株进行鉴定, 筛选出头孢西丁抑菌圈直径 ≤ 18 mm 的大肠埃希菌。

1.3.2 三维试验筛选 反复冻融提取酶粗提物, 大肠埃希菌 ATCC 25922 菌液涂布 M-H 琼脂培养基, 将头孢西丁纸片贴在培养基中心, 沿纸片边缘向外划线加入酶粗提物, 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16~18 h^[7]。

1.3.3 多重 PCR 方法检测 AmpC 酶 加热裂解方法提取细菌 DNA, 配制 PCR 的反应体系共 50 μl , 分群特异性的引物 6 对^[8], 见表 1。多重 PCR 的反应条件是 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

表 1 PCR 引物序列及扩增片段长度

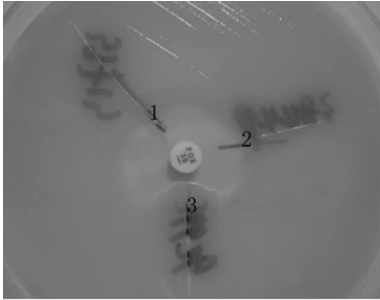
基因名称	引物名称及序列(5'~3')	片段(bp)	退火($^{\circ}\text{C}$)
MOX-1、MOX-2、CMY-1、CMY-8 至 CMY-11	MOXMR:CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520	64
	MOXMF:GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT		
LAT-1 至 LAT-4、CMY-2 至 CMY-7、BIL-1	CITMR:TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462	64
	CITMF:TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA		
DHA-1、DHA-2	DHAMR:CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	405	64
	DHAMF:AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T		
MIR-1、ACT-1	EBCMR:CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302	64
	EBCMF:TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG		
ACC	ACCMR:TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346	64
	ACCMF:AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA		
FOX-1 至 FOX-5b	FOXMR:CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190	64
	FOXMF:AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G		

[△] 通讯作者, E-mail:sunshinexu1988@163.com。

1.3.4 微量肉汤稀释法 按照 CLSI 推荐使用 MIC 法检测待检大肠埃希菌对抗菌药物的敏感性。稀释后菌液顺次加入含有不同浓度药物的 96 孔板中,设有阳性和阴性对照孔。37 °C 培养 20~22 h 进行结果观察。

2 结 果

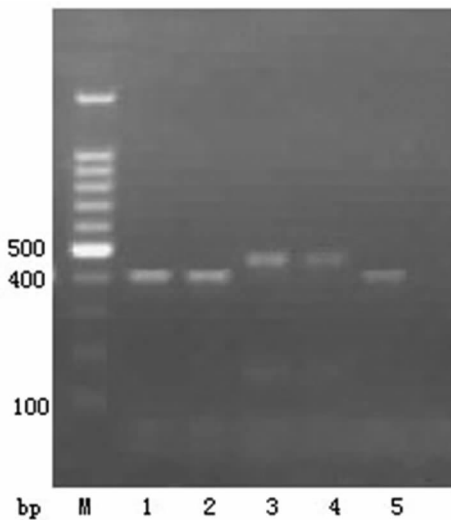
2.1 三维试验 对初筛试验阳性的菌株进行三维试验,得到三维试验阳性共 56 株,其阳性率为 18.73%(56/299),见图 1。



1、2:三维试验阴性;3:为三维试验阳性。

图 1 三维试验结果

2.2 多重 PCR 试验 对三维试验阳性的大肠埃希菌进行多重 PCR 试验,多重 PCR 试验阳性共 34 株,其中 DHA 群的有 14 株,CIT 群的有 20 株,见图 2。



1、2、5:DHA 群;3、4:CIT 群。

图 2 多重 PCR 试验结果图

2.3 MIC 法药物敏感试验 筛选出的 34 株大肠埃希菌的 MIC 法药物敏感试验结果,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),这些大肠埃希菌对 AMP、KZ、CXM、CTX 的耐药率均为 100%,对 FEP 的耐药率高达 58.8%,另外对 CIP、PRL 和 CAZ 的耐药率分别高达 91.2%、94.1%和 97.1%和,对 AK 的耐药率为 23.5%,而对碳青霉烯类抗菌药物如 MEM 和 IPM 耐药率相对较低分别为 8.8%和 11.8%。

3 讨 论

大肠埃希菌为临床分离革兰阴性杆菌引起感染中最常见,可见于泌尿道、伤口、呼吸道、胆道和脑膜等部位,随着抗菌药物在临床的广泛应用耐药现象不断增加^[9]。各种因 β -内酰胺酶引起的耐药中 AmpC 酶已成为肠杆菌科细菌对 β -内酰胺类抗菌药物产生多重耐药的重要原因之一。

目前国际上检测 AmpC 酶的方法有很多,三维试验是公认可以使用的方法,本研究三维试验阳性率为 18.73%(56/

299)。质粒介导的 AmpC 酶至少被归为 CIT、DHA、MOX、EBC、FOX 和 ACC 六个主要群,本研究中以 DHA 群和 CIT 群为主,可见 DHA 群和 CIT 群是临床中产 AmpC 酶大肠埃希菌的常见基因型。

通过对筛选出的 34 株产 AmpC 酶大肠埃希菌进行药物敏感试验,得出一、二、三代头孢中这些产 AmpC 酶大肠埃希菌均有高的耐药率,这也与 AmpC 酶可水解第一、二、三代头孢菌素的报道一致^[10]。另外,对 AMP、PRL 和 CIP 的耐药率也分别高达 100%、94.1%和 91.2%。本实验结果显示一直对产 AmpC 酶的大肠埃希菌有高敏感率的四代头孢如 FEP 的耐药率竟然高达 58.8%。当前因产生 AmpC 酶而出现对一代、二代和三代头孢耐药的感染性疾病治疗最为有效的抗菌药物是碳青霉烯类抗菌药物如 IPM 和 MEM,耐药率相对较低分别为 11.8%和 8.8%。可见,治疗因产 AmpC 酶的细菌引起的感染性疾病中可用抗菌药物的选择范围变得非常小,要控制抗生素使用和加强产酶菌监测,否则一旦继续滥用抗菌药物就会出现无药可用。

伴着细菌出现高耐药率,一方面揭示了细菌的耐药性正在增强,这样发展下去,对感染性疾病的治疗极可能无药可用;另一方面,虽然 AmpC 酶被认为是革兰阴性细菌尤其是肠杆菌科细菌产生耐药的重要机制,但随着更深入的研究发现膜通透性降低、泵外排作用和青霉素结合蛋白的改变等机制在细菌产生耐药过程中也起着至关重要的作用,同时,也正是存在各种机制的协同作用导致了耐药现象更为严重。

参考文献

- [1] 梅亚宁,童明庆. 2011 年度卫生部全国细菌耐药监测网报告:成年患者分离菌的耐药监测[J]. 中国临床药理学杂志,2014,2(30): 94-99.
- [2] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,5(13):321-330.
- [3] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,5(14):365-374.
- [4] Nedbalcova K, Nechvatilova K, Pokludova L, et al. Resistance to selected beta-lactam antibiotics[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 171 (3/4):328-336.
- [5] Mammeri H, Nazic H, Naas T, et al. AmpC beta-lactamase in an Escherichia coli clinical isolate confers resistance to expanded-spectrum cephalosporins [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004,48(10):4050-4053.
- [6] Roche C, Boo TW, Walsh F, et al. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland[J]. Clin Microbiol Infect, 2008,14(6):616-618.
- [7] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veterans medical center [J]. J Clin Microbiol, 2000,38(5):1791-1796.
- [8] Hussain M, Hasan F, Shah AA, et al. Prevalence of class A and AmpC beta-lactamases in clinical Escherichia coli isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan[J]. Jpn J Infect Dis, 2011,64(3):249-252.
- [9] Yamasaki K, Komatsu M, Abe N, et al. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9): 3267-3273.

[10] Upadhyay S, Sen MR, Bhattacharjee A. Diagnostic utility of boric acid inhibition with different cephalosporins against *Escherichia coli* producing AmpC β -lactamases[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 5):691-693.

(收稿日期:2016-01-10)



• 临床研究 •

白血病初诊患者外周血检出幼稚细胞结果分析

陆作洁, 韦仕喻[△], 农少云

(广西医科大学附属民族医院/广西民族医院检验科, 广西南宁 530001)

摘要:目的 探讨白血病初诊患者外周血形态学检查中幼稚细胞检出对白血病诊断的重要性。方法 64 例白血病初诊患者作血常规检测同时进行外周血涂片染色后在光学显微镜下作形态学检查检出幼稚细胞。结果 64 例白血病初诊患者幼稚细胞检出率为 75.00%, 未检出率为 25.00%。在未检出幼稚细胞的病例中 56.25% 为低白细胞患者, 其中漏检 1 例占未检出幼稚细胞病例的 1.56%, 误诊 1 例, 占 1.56%。结论 外周血涂片形态学检查对白血病的诊断极为重要, 应重视外周血涂片未检出幼稚细胞的原因, 加强幼稚细胞形态学学习, 防止漏诊及误诊。

关键词:白血病; 外周血; 幼稚细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.042 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2016)08-1114-02

在当今各种全自动血细胞分析仪的广泛应用, 大大减轻了检验工作者的劳动强度, 缩短了检验时间, 提高工作效率^[1]。但是全自动血细胞分析仪并不能完全准确地分析异常细胞, 当细胞的结构出现异常时或出现细胞数量、大小等方面变化不大的病理细胞时, 常会造成各类疾病的漏诊、误诊, 并延误病情^[2]。下面通过回顾分析本院 2 年来对已经确诊白血病患者初诊的血常规和外周血形态学检查幼稚细胞结果进行分析, 具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析本院 2013 年 1 月至 2014 年 12 月血液科收治的白血病初诊患者 64 例, 其中男 37 例、女 27 例; 平均 49 岁。64 例患者全部按白血病诊断标准^[3]确诊, 其中急性白血病 52 例, 慢性白血病 12 例。

1.2 仪器与试剂 Sysmex 公司生产的全自动五分类血细胞分析仪 XT-2100i, 试剂采用其配套试剂(日本东亚株式会社); 外周血涂片采用 BASO 公司生产的瑞吉染色液, 形态学检查使用 OLYMPUS-CX30 光学显微镜观察。

1.3 方法 抽取 64 例白血病初诊患者 2 mL EDTA-K2 抗凝血在全自动血细胞分析仪进行检测, 结合仪器异常信息, 白细胞散点图, 进行外周血形态学检查。制作 2 张血涂片进行瑞吉染色后, 在光学显微镜下分类 100 个白细胞, 记录全片幼稚细胞的检出率。幼稚细胞包括原始细胞、早幼粒细胞、中幼粒细胞、晚幼粒细胞、幼稚单核细胞、幼稚淋巴细胞。

2 结果

2.1 幼稚细胞的检出情况 64 例白血病初诊患者外周血涂片检出幼稚细胞 48 例, 占 75.00%(48/64)。急性白血病患者中检出 38 例, 占 73.08%(38/52); 慢性白血病检出 10 例, 占 83.33%(10/12)。未检出幼稚细胞 16 例, 占 25.00%(16/64); 其中急性白血病未检出 15 例, 占 28.85%(15/64), 慢性白血病未检出 1 例占 8.33%(1/12)。见表 1。

2.2 白细胞计数与幼稚细胞检出情况的关系 对 64 例白血病初诊患者白细胞计数与幼稚细胞检出情况的关系进行分析,

见表 2。

表 1 64 例白血病初诊患者外周血幼稚细胞检出情况[n(%)]

组别	n	检出	未检出
急性白血病	52	38(73.08)	15(28.85)
慢性白血病	12	10(83.33)	1(8.33)
合计	64	48(75.00)	16(25.00)

表 2 白细胞计数水平不同的患者幼稚细胞的检出情况[n(%)]

白细胞计数	n	检出	未检出
<4.0×10 ⁹	14	5(10.42)	9(56.25)
(4.0~10.0)×10 ⁹	13	8(16.67)	5(31.25)
>10.0×10 ⁹	37	35(72.92)	2(12.50)

2.3 不同血常规参数异常患者的幼稚细胞检出情况 分析 64 例白血病初诊患者血常规中仅 HGB 异常的 6 例, 检出幼稚细胞 5 例, 占 83.33%; 仅 PLT 异常的 3 例, 均检出幼稚细胞, 占 100.00%; 仅白细胞异常的 2 例, 均检出幼稚细胞占 100.00%; 仅 HGB、PLT 异常的 6 例, 检出幼稚细胞 4 例, 占 66.67%。见表 3。

表 3 不同血常规参数异常患者的幼稚细胞检出情况[n(%)]

异常参数	n	检出	未检出
HGB 异常	6	5(83.33)	1(16.67)
PLT 异常	3	3(100.00)	0(0.00)
白细胞异常	2	2(100.00)	0(0.00)
HGB、PLT 异常	6	4(66.67)	1(16.67)

[△] 通讯作者, E-mail: luzuojie321@163.com。