

[4] 中国人群成人静脉血细胞分析参考范围调查协作组. 中国人群成人静脉血细胞分析参考范围调查[J]. 中华医学杂志 2003, 83(14): 1201-1205.  
 [5] 陈彬, 梅树江, 罗家逸, 等. 中国人群成人静脉血细胞分析参考范围调查的统计质疑. 西部医学 2004, 16(3): 280-

281.

[6] 沈建成, 葛国兴. 绍兴市成人静脉血细胞 22 项参数参考值调查[J]. 检验医学, 2006, 21(1): 68-70.

(收稿日期: 2010-05-30)

临床研究

## 乙二胺四乙酸纸片法检测革兰阴性杆菌产 AmpC 酶

张彩宁(广东省茂名农垦医院检验科 525200)

**【摘要】** 目的 寻找一种简便、快速、有效的检测革兰阴性杆菌产 AmpC 酶的方法。方法 用 Microscan 微生物自动鉴定系统进行细菌鉴定与药敏试验, 并应用乙二胺四乙酸(EDTA)纸片法进行 AmpC 酶检测。结果 在所检测的 231 株革兰阴性杆菌产 AmpC 酶初筛试验出 45 株, 总检出率为 19.4%(45/231), 而 EDTA 纸片法菌株共 22 株, 总检出率为 9.6%(22/231)。结论 EDTA 纸片法用于革兰阴性杆菌产 AmpC 酶的检测, 方法简便, 结果可靠, 无需特殊仪器支持, 可在临床实验室推广使用。

**【关键词】** AmpC 酶; 革兰阴性杆菌; EDTA 纸片法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.22.035

中图分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)22-2499-02

在细菌耐药酶研究机制中, 革兰阴性杆菌中的 AmpC 酶备受临床关注, 使人类对抗 AmpC 酶的斗争更加艰难<sup>[1]</sup>。近年来, 因 AmpC 酶导致对 β-内酰胺抗生素特别是头孢菌素的高水平耐药菌株已成为医院感染的重要病原菌。高产 AmpC 酶的致病菌因对多种抗生素耐药, 使临床抗感染治疗造成很大困难。AmpC 酶越来越受到人们的关注。因此, 迫切需要临床实验室快速而准确的检测出产 AmpC 酶细菌的试验方法<sup>[2]</sup>。目前, 国内外已报道了多种检测 AmpC 酶的方法, 如 Coudron 等提出的改良三维试验虽然准确但过程繁琐难于在临床中开展。至今仍未建立起一种筛选和发现 AmpC 酶的标准的表现检测方法<sup>[3]</sup>。为此, 本院采用 Tris 本院 EDTA 浸润纸片法。该法具有灵敏度高、特异性强、操作简便的优点, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 菌株** 选择 2007 年 10 月至 2008 年 10 月本院 542 株临床分离革兰阴性杆菌。从中随机选 231 例, 研究革兰阴性杆菌产 AmpC 酶情况。经 Microscan 微生物自动鉴定系统鉴定菌种, 其中鲍曼不动杆菌 68 株, 大肠埃希菌 63 株, 肺炎克雷伯菌 52 株, 阴沟肠杆菌 40 株, 弗劳地枸橼酸杆菌株 5 和产气肠杆菌 3 株。

标准菌株: 阴沟肠杆菌标准菌株 *E. cloacae* 029M(高产 AmpC 酶)为阳性对照, 肺炎克雷伯菌 ATCC700603(产 ESBLs 酶)和铜绿假单胞菌 ATCC27583 为阴性对照, 大肠埃希 ATCC25922 作为背景菌。

**1.2 抗生素和化学试剂** 头孢西丁(FOX, 30 μg/片)药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品, 按要求经室内质控合格后应用, M-H 培养琼脂于粉购自杭州天和微生物有限公司, Tris-EDTA。

### 1.3 方法

**1.3.1 菌株的种属鉴定和药敏筛选** 以 Microscan walkway 40 全自动细菌鉴定及药敏测试结果为依据。

**1.3.2 Ampc 初筛试验** 利用 AmpC 酶对抗生素耐药的性质, 如利用头孢西丁(cefexitin, FOX)作为酶解底物, 筛选耐药

菌。方法是根据临床实验室标准化机构(Clinical laboratory Standards Insitute, CLSI)推荐的 K-B 法进行药敏试验, 抑菌圈小于或等于 18 mm 或 MIC > 16g/mL 的细菌提示有 AmpC 酶。在 231 株血标本来源的细菌中, 将初筛阳性的 45 株作为本实验所选用的菌株。

**1.3.3 EDTA 纸片法<sup>[4]</sup>** 是检测 AmpC 酶 该试验 Tris-EDTA 可渗透至菌细胞内, 促使 β-内酰胺酶释放外部环境, 通过对头孢菌素的水解作用, 判断细菌是否具有 AmpC 酶。AmpC 纸片的制备: 将 pH 值 8.0 的 100×三羟甲基氨基甲烷 Tris-EDTA 于生理盐水 1:1 混合后, 取 20 μL 加至无菌纸片上, 干燥, 贮于 2~8℃备用。其方法是按照 CLSI 标准 K-B 法将菌株接种法, 将大肠埃希氏 ATCC25922 制成 0.5 麦氏单位菌悬液, 用棉棒涂布于 M-H 作为背景菌。

分别取 FOX(30)纸片, 和蘸取少许待测菌落的 EDTA 纸片贴在 MH 琼脂平皿上, 35℃培养 16~24 h 观察结果。若出现抑制区凹陷或扁平, 为 AmpC 酶阳性。若抑制区不变形, 表示不产 AmpC 酶。

**1.3.4 统计学处理** 应用 WHONET5.3 软件进行统计分析, 率的比较用  $\chi^2$  验, 其他用 *t* 检验。

### 2 结果

**2.1 AmpC 酶初筛试验结果** 血培养标本分离出的 231 株病原菌中, 初筛试验阳性 45 株, 阳性率为 19.4%。其中鲍曼不动杆菌 15 株, 阳性率 22%(15/68), 大肠埃希菌 13 株, 阳性率为 20.6%(13/63), 肺炎克雷伯菌 8 株, 阳性率为 15.4%(8/52), 阴沟肠杆菌 7 株, 阳性率为 17.5%(7/40), 弗劳地枸橼酸杆菌 1 株和产气肠杆菌 1 株, 阳性率为 20%(1/5)和 33.3%(1/3)。

**2.2 EDTA 纸片法实验结果** 231 株革兰阴性杆菌中, 经初筛试验筛选出符合 AmpC 酶表型筛选条件的菌株共 45 株, 经 EDTA 确认产 AmpC 酶菌株 22 株, AmpC 酶检出率为 9.6%, 其中鲍曼不动杆菌(9 株)最多, 其次为大肠埃希菌(6 株); 初筛

与确诊总符合率为 48.9%，其中阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌确诊符合率均大于或等于 40% 见表 1。

表 1 革兰阴性杆菌 AmpC 酶初筛与 EDTA 确诊试验符合率

细菌种类	初筛菌株数	EDTA 试验 阳性菌株数	确认符合率 (%)
阴沟肠杆菌	7	3	42.8
鲍曼不动杆菌	15	9	60
大肠埃希菌	13	6	46.1
肺炎克雷伯菌	8	3	37.5
产气肠杆菌	1	1	100
弗劳地枸橼酸杆菌	1	0	0

### 2.3 革兰阴性杆菌 AmpC 酶初筛与 EDTA 纸片法比较结果

231 株细菌中,186 株初筛实验与 EDTA 纸片法实验均阴性,22 株两种方法均阳性,23 株菌初筛实验阳性,但 EDTA 纸片法试验阴性。两种检测方法阳性符合率为 48.9%,阴性符合率为 100%,总符合率为 76.4%,见表 2。

表 2 革兰阴性杆菌 AmpC 酶初筛与 EDTA 纸片法比较 (n)

初筛实验	EDTA 纸片法	
	阳性	阴性
阳性	22	23
阴性	0	186

## 3 讨 论

细菌耐药性已成为全球性的问题,其中由革兰阴性杆菌引起的耐药性在临床中占有越来越重要的地位,一旦这类细菌由于某种机制而产生了大量由染色体或质粒介导的 β-内酰胺酶(青霉素酶,头孢菌素酶,碳青霉烯酶等),则可使抗生素失活<sup>[5]</sup>。AmpC 酶是由革兰阴性杆菌染色体或质粒介导产生的一类 β-内酰胺酶,属 Ambler 分类中 C 类酶, Bush 分类中工类酶,能水解第 3 代头孢菌素,不被 β-内酰胺酶抑制剂所抑制。AmpC β-内酰胺酶是由 AmpC 基因编码的具有丝氨酸活性中心的头孢菌素酶,主要是由肠杆菌属、不动杆菌属、枸橼酸杆菌属、摩根摩根菌属等革兰阴性杆菌产生<sup>[6]</sup>。总之,随着产 AmpC 酶的细菌的日益增多,其多药耐药机制严重影响各类抗菌药物的治疗,给临床抗感染带来很大困难,因此,在临床上检测细菌 AmpC 酶非常必要。

本试验中,经初筛试验筛选出符合 AmpC 酶表型筛选条件菌株共 45 株,经 EDTA 纸片法实验产 AmpC 酶菌株有 22 株,检出率为 9.6%,这一结果与罗兰等<sup>[7]</sup>报道基本符合。在 231 株革兰阴性杆菌中,EDTA 纸片法试验中阳性菌株共 22 株,总检出率为 9.8%(22/231),以鲍曼不动杆菌检出率最高,

其次是大肠埃希菌。两种检测方法阳性符合率为 48.9%,阴性符合率为 100%,总符合率为 76.4%。

检测 AmpC 酶的方法很多,每种方法各有利弊,各实验室应根据各自的情况选择检测的方法,尽可能为临床抗生素的使用提供参考。头孢西丁筛选试验操作简便,但特异性差,只能作为初筛试验。表型筛选试验操作简单、快速,可作为临床实验室常规 AmpC 酶的筛选方法。但表型筛选试验的缺点为药敏结果易受其他因素影响。同时细菌耐药机制也日益复杂和多样化。细菌细胞膜通透性的改变以及其他 β-内酰胺酶的存在都会对药敏结果产生影响<sup>[8]</sup>。以 EDTA 纸片法来检测 AmpC 酶的方法,操作简便、快速经济,结果基本可靠,可在各级临床微生物实验室推广使用。而对 AmpC 酶特性,产酶基因的结构和功能进行更深入的研究,掌握其分子生物学检测方法,将为发现新的耐药菌,监测细菌耐药性变迁,控制耐药菌的传播,以及指导临床抗生素的应用提供更有思路的手段。

## 参考文献

- [1] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Plasmid-borne AmpC beta-lactamases[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(6): 479-493.
- [2] 卢月梅, 张阮章, 李红林, 等. DTA 纸片法检测大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌高产 AmpC 酶的探讨[J]. 广东医学 2008, 8(29): 1327-1328.
- [3] Tan TY, Ng LS, He J, et al. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in Escherichia coli, Klebsilla pneumoniae, and Proteus mirabilis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 146-149.
- [4] Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC β-actamases [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3110-3113.
- [5] 吴伟元, 陈民钧. 阴沟肠杆菌 ampD 基因突变与阻遏持续高产 AmpC 酶[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2001, 1(2): 65-69.
- [6] 汪雅萍, 应春妹, 张灏曼. 革兰阴性杆菌 AmpC 酶的检测及分析[J]. 检验医学, 2004, 19(5): 390-392.
- [7] 罗兰, 廖康, 喧建美, 等. 肠杆菌科菌持续高产 AmpC 酶的检出及耐药分析[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(1): 41-42.
- [8] 段金菊, 刘卓拉, 张润梅, 等. 三维实验对产 AmpC 酶革兰阴性菌的检测及分析[J]. 中国药物与临床, 2007, 4(7): 257-260.

(收稿日期: 2010-06-12)