维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0424-03

用头孢西丁三相试验检测大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌的质粒AmpC酶

夏 云，赵世巧
（重庆医科大学临床学院检验科，重庆 400016）

【摘 要】目的：检测质粒介导的持续高产AmpC酶在大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌中的携带率，为临床治疗提供指导。方法：采用头孢西丁纸片药敏试验（K-B法）作AmpC酶的初筛试验，头孢西丁三相试验间接法作AmpC酶的确证试验。结果：在检测的86株菌中，有9株菌K-B法初筛结果为阳性。在这9株菌中经头孢西丁三相试验确证有5株产AmpC酶，阳性率为5.8%。其中大肠埃希菌3株，肺炎克雷伯菌2株。结论：头孢西丁K-B法筛选试验结合头孢西丁三相试验可准确检出质粒介导的AmpC酶，可用于临床常规检测。

【关键词】三相试验；质粒AmpC酶；大肠埃希菌；肺炎克雷伯菌
【中国图书分类法分类号】R915 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-09-04

Detection of plasmid-mediated AmpC expressed in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae by cefoxitin three-dimensional test

XIA Yun, et al
(Clinical Laboratory, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To detect the prevalence rate of the plasmid-mediated AmpC expressed constitutively at high level in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae for providing guideline for clinical therapy. *Methods*: Cefoxitin susceptibility disk test (K-B method) was used for screening and indirect cefoxitin three-dimensional test was used for the confirming of plasmid-mediated AmpC. *Results*: Of 86 strains,9 isolates were positive by K-B screening method. Of the 9 positive isolates, 5 (three Escherichia coli, two Klebsiella pneumoniae) were positive by indirect cefoxitin three-dimensional confirming test, with a positive rate of 6.9%. *Conclusion* :Cefoxitin screening test combinated with indirect three-dimensional test can detect plasmid-mediated AmpC accurately and can be used in clinical routine detection.

【Key words】Three-dimensional test; Plasmid-mediated AmpC; Escherichia coli; Klebsiella Pneumoniae

革兰阴性杆菌产生的由染色体介导的I型β-内酰胺酶（AmpC酶）能水解包括三代头孢菌素在内的大多数β-内酰胺类抗生素，与超广谱β-内酰胺酶(Extend Spectrum β Lactamases,ESBLS)不同的是由于此类酶对克拉维酸等酶抑制剂及头霉烯类抗生素不敏感，故给临床治疗带来较大的困难[1]。特别是近年来发现的质粒介导的AmpC酶在大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌中高水平表达表明AmpC酶具有较强的横向传播能力[2]。为了解质粒介导的AmpC酶在大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌中的分布，本文采用K-B法及三相试验检测AmpC酶，现报告如下。

1 材料和方法

作者介绍：夏 云（1966- ），男，硕士。
主要研究方向：细菌耐药性检测。

1.1 菌株分离与鉴定

从2001年1月至2001年6月收集的临床标本按《全国临床检验操作规程》（第2版）进行接种分离，采用ATB Express细菌鉴定仪（法国生物梅里埃）将细菌鉴定至种（ID>90%）。以大肠埃希菌ATCC25922作不产酶质控株，以已知产AmpC酶的阴沟肠杆菌作产酶质控株。

1.2 药敏培养基及药敏纸片

1.2.1 药敏培养基：MH琼脂购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2.2 药敏纸片：头孢西丁（FOX，30μg/片），头孢他啶（CAZ，30μg/片），头孢噻肟（CTX，30μg/片），泰能（IMP，10μg/片）均为OXOID产品，氨苄西林（AMP，10μg/片），头孢唑啉（CFZ，30μg/片），庆大霉素（GEN，10μg/片），阿米卡星（AKN 30μg/片），环丙沙星（CIP，5μg/片），阿莫西林/棒酸(AMC，10μg/片)，哌拉西林/他唑巴坦（PTZ 100/10 μg/片），头孢呋新（FRX，30μg/片），头孢吡肟（FEP，30μg/片），头孢曲松

维普资讯 http://www.cqvip.com

（CRO，30μg/片），哌拉西林（PIP，100μg/片），复方新诺明（SXT，25μg/片），氨曲南（ATM，30μg/片）均为北京天坛药物生物技术开发公司产品。

1.3 方法

1.3.1 AmpC酶初筛试验：采用头孢西丁纸片药敏试验（K-B法），按NCCLS标准1999版操作，将FOX≤14mm，CAZ≤18mm或/和CTX≤22mm者初筛为AmpC酶[3]。

1.3.2 AmpC酶的确证试验：采用头孢西丁三相试验间接法，将大肠埃希菌ATCC25922制成浊度为0.5麦氏单位的菌悬液，用棉棒均匀涂布于MH平板上，在平皿中央贴一FOX纸片，将35mm长的双面刀片经火焰消毒后，在距FOX纸片3mm处切一横行裂缝，最后在裂缝里加离心浓缩后的待测菌液或离心浓缩液经5次反复冻融之后的酶粗提物，注意液体不能外溢。35℃孵育18～24h后观察结果。如果试验菌切割线附近的抑菌圈缩小或变形均提示细菌产酶使头孢西丁失活，为头孢西丁三相试验阳性。如果抑菌圈无丝毫变化则为三相试验阴性[4]。

1.3.3 ESBLS与AmpC酶的鉴别：AmpC酶阳性菌株用K-B法测定其对FEP的敏感性，如FEP＞18mm则为单纯产AmpC酶，如FEP≤18mm则为同时产AmpC酶和ESBLS[5]。

2 结果

2.1 AmpC酶筛选试验

共检测86株菌，其中大肠埃希菌为54株，肺炎克雷伯菌为32株，FOX≤14mm的菌为9株，其中大肠埃希菌为6株，肺炎克雷伯菌为3株，结果见表1。

表1 AmpC酶筛选试验

菌株	FOX>14(mm)	FOX≤14(mm)
大肠埃希氏菌（54株）	48	6
肺炎克雷伯菌（32株）	29	3

2.2 头孢西丁三相试验结果

对AmpC酶筛选试验阳性的9株菌用头孢西丁三相试验确证，共检出5株阳性，其中大肠埃希菌为3株，肺炎克雷伯菌为2株，产酶率分别为5.5%，9.4%。三相试验阳性结果见图1，阴性结果见图2。

统计5株产质粒介导的AmpC酶的菌株对16种抗生素的耐药表型，结果显示除对泰能（亚胺培南）和哌拉西林/他唑巴坦高度敏感外，对其它药物都具有很高的耐药性，结果见表2。

2.3 ESBLS与AmpC酶的鉴别

5株AmpC酶阳性菌中，3株菌对头孢西丁耐药，对头孢吡肟敏感，为单纯产AmpC酶，另2株菌对头孢西丁和头孢吡肟都耐药（1株大肠埃希菌，1株肺炎克雷伯菌），表明这两株菌既产AmpC又产ESBLS。

表2 5株产质粒介导AmpC酶菌株对16种抗生素的耐药表型

抗生素名称	耐药株数	耐药率（%）
氨苄西林（AMP）	5	100
头孢唑啉（CFZ）	5	100
庆大霉素（GEN）	5	100
阿米卡星（AKN）	3	60
环丙沙星（CIP）	4	80
阿莫西林+棒酸（AMC）	5	100
哌拉西林+他唑巴坦（PTZ）	0	0
头孢呋新（FRX）	5	100
头孢吡肟（FEP）	2	40
头孢噻肟（CTX）	5	100
头孢曲松（CRO）	5	100
泰能（IMP）	0	0
哌拉西林（PIP）	5	100
复方新诺明（SXT）	5	100
氨曲南（ATM）	5	100
头孢他啶（CAZ）	4	80

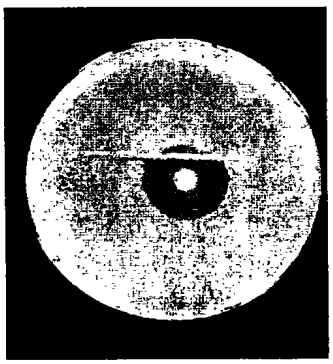


图1 头孢西丁三相试验阳性
切割线以上部分抑菌环明显缩小

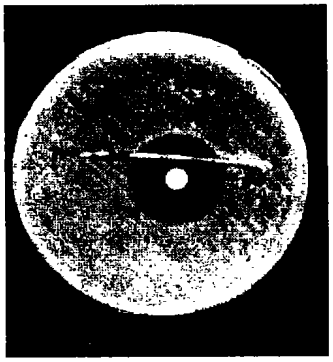


图2 头孢西丁三相试验阴性
切割线以上部分抑菌环没有变化

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

1989年Bauernfeid在汉城首次发现了质粒介导的AmpC酶。近年来，世界各地陆续报道了各种型别的由染色体和质粒介导的AmpC酶。目前认为很多革兰阴性杆菌如肠杆菌属、枸橼酸杆菌属、铜绿假单胞菌等绝大多数均可产生低水平染色体介导的诱导型AmpC酶，因而对染色体介导的诱导型AmpC酶的检测无多大的临床意义[6]。质粒介导的持续高产型AmpC酶可见于克雷伯菌、沙门菌、大肠埃希菌等，此种质粒同时编码对其他抗生素的耐药性，表现为对第一代至第三代头孢菌素、头霉素、氨基糖苷类及抗假单胞菌青霉素均耐药，但对碳青霉烯类、第四代头孢菌素和氟喹诺酮类敏感，故对此类质粒介导的持续高产型AmpC酶的检测对于及早发现并控制耐药性的传播具有重要的意义[7]。

质粒AmpC酶的检测可用头霉素耐药作为筛选指标，并用头霉素三相试验证实[7]。头孢西丁三相试验是目前检测AmpC酶的最可靠的实验[3]，其原理是当纸片中的头孢西丁扩散到加了试验菌的切割线时，如果试验菌产质粒AmpC酶，那么AmpC酶将水解头孢西丁，使其失活，导致抑菌圈的缩小或变形，反之如果抑菌圈没有丝毫变化，则说明该试验菌未产生AmpC酶。

头孢西丁三相试验分直接法和间接法。目前常用的方法为间接法。直接法与间接法不同的是直接法在MH平板上涂布的是待测菌液，而间接法在MH平板上涂布的则是不产酶的大肠埃希菌ATCC25922，间接法因指示菌对FOX敏感，其抑菌圈大，抑菌圈缩小，变形与否易于观察，结果清晰可靠。在实验中采取两种方法制备待测菌液，第一种方法是让待测菌在牛肉汤中增菌16～24h后，离心，弃去上清液，制成浓缩菌悬液。第二种方法是让浓缩菌悬液反复冻融5次，促使菌体破裂，获得酶粗提物。反复冻融菌液的制备方法明显优于未经处理的浓缩菌悬液。因未经处理的菌液如果有溢出则细菌能在MH平板上生长，干扰结果的观察，而酶粗提物因含酶量高，结果更为清晰。头孢西丁三相试验阳性菌株仍有待于用分子生物学的方法进一步鉴定。

对5株产AmpC酶的菌株的药敏试验中发现除对泰能（亚胺培南）和哌拉西林/他唑巴坦高度敏感，头孢吡肟耐药性较低外，对其它药物都具有很高的耐药性。对于单纯产AmpC酶的菌株，可选用四代头孢如FEP治疗。但如产ESBLS则不能选用四代头孢。在一般情况下临床上并不需要准确测知细菌是否同时产这两种酶，因为两者均可首选碳青酶烯类抗生素如亚胺培南治疗，此外还可选用哌拉西林/他唑巴坦。重要的是药敏试验是否准确测知其耐药性，以便及时恰当地选用抗生素治疗[8]。

参 考 文 献

[1] Brsh K, Jacoby GA, Medeiros. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrobil Angents Chemother, 1995;39:1211-1233.

[2] Bradford, PA, Urban C, et al. Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein[J]. Antimicrobil Angents Chemother, 1997;41(3):563-569.

[3] Smith Moland E, Thomsion KS and Pitout JDD. Detection of plasmid-encoded AmpC β -lactamases in Eschrichia coli and Klebsiella pneumoniae[M]. In abstracts of the 96th general meeting of the American Society for Microbiology, 1996;140, P …American Society for Microbiology. Washington, D.C.

[4] Philip E, Condron, E. S. Moland, et al. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among Eschrichia coli, Klebsiella pneumoniae and Proteus mirabilis isolates at a veteran's medical center[J]. J Clin Microbiol, 2000;38(5):1791-1793.

[5] 吴伟元，陈民钧. AmpC酶的研究进展[J]. 中国抗感染化疗杂志，2001;1:67-71.

[6] 陈民钧. 细菌对β-内酰胺药的耐药性及检测方法[J]. 中华检验医学杂志，2001;24(4):197-200.

[7] 倪语星. 革兰阴性菌β-内酰胺酶的耐药性问题[J]. 中华检验医学杂志，2001;24(4):201-203.

[8] Yan Jing-Jou, Wen-chien KO, Shu-huei tsai, et al. Dissemination of CTX-M-3 and CYM-2 β -lactamases among clinical isolates of Eschrichia coli in sonthern Tai wan[J]. J Clin Microbiol, 2000;38(12):4320-4325.