

纸片扩散确认法与聚合酶链式反应检测超广谱 β -内酰胺酶的比较

李 蓉¹, 赵 林², 徐小文³, 李文林², 石小玉², 甘 泉¹, 王力薇¹

(1. 南昌大学医学院微生物学教研室, 江西 南昌 330006; 2. 江西省医学生物高技术重点实验室, 江西 南昌 330006;
3. 东湖区卫生监督所, 江西 南昌 330008)

摘 要: 【目的】分析纸片扩散确认法与聚合酶链式反应(PCR)检测超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)检出率。【方法】以分离保存的 30 株多重耐药(MDR), 对 3 种以上实验所用抗生素耐药)且 β -内酰胺酶阳性鲍曼不动杆菌(AB)菌株作为研究对象, 对其中 15 株经纸片扩散确认 ESBL⁺ AB 和 15 株 ESBL⁻ AB 菌株的分布、药敏、质粒谱及基因型作了比较分析, 并对两种方法检出 ESBL 的阳性率进行比较。【结果】通过纸片扩散确认法检出的 ESBL⁺ AB 和 ESBL⁻ AB 在不同科室间的分布($P > 0.05$)、不同标本间的分布($P > 0.05$)、对不同抗生素的耐药情况($P > 0.05$)及质粒谱都无明显差异, 且用聚合酶链式反应在 ESBL⁻ AB 质粒上也分离到了相同的 3 种耐药基因, PCR 法检测 ESBL 的阳性率高于纸片扩散确认法($P < 0.001$)。【结论】用 PCR 法检测 ESBL 更快更敏感, 对指导临床合理使用抗生素和降低医院感染率和病死率有重要意义。

关键词: 纸片扩散确认法; AB; PCR; ESBL

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0219-05

Comparison of Disc Dilution Confirmatory Test and PCR in Detection of Extended Spectrum Beta-lactamase

LI Rong¹, ZHAO Lin², XU Xiao-wen³, LI Wen-lin², SHI Xiao-yu², GAN Quan¹, WANG Li-wei¹

(1. Department of Microbiology, Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Key Laboratory of Medical Biotechnology, Nanchang 330006, China; 3. Donghu Health Supervising Hygiene, Nanchang 330006, China)

Abstract: 【Objective】To analyze the detecting rate of disc dilution confirmatory test and polymerase chain reaction (PCR) in extended spectrum beta-lactamases (ESBL) detection. 【Methods】Subjects were 30 conserved ESBL⁺ multi-drug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* (AB) isolates resistant to more than three antibiotics used in laboratory. We compared the distribution, drug sensitivity, plasmid profile, and genotypes of 15 ESBL⁺ AB isolates with 15 ESBL⁻ AB isolates confirmed by disc dilution confirmatory test. The detecting rates of disc dilution confirmatory were tested with PCR in ESBL detection, respectively. 【Results】Distribution in different units ($P > 0.05$), distribution in the different specimens ($P > 0.05$), drug resistance to different antibiotics ($P > 0.05$) and plasmid profile of ESBL⁺ and ESBL⁻ AB isolates confirmed by disc dilution confirmatory test showed no significant difference. By PCR, we also detected 3 same drug-resistant genes in ESBL⁻ AB isolates as those in ESBL⁺ AB isolates. The positive rate of ESBL detected by PCR was significantly higher than that detected by disc dilution confirmatory test ($P < 0.001$). 【Conclusion】ESBL detected by PCR is more quick and sensitive, which is important for supervising the appropriate use of antibiotics and decreasing the hospital infection and the fatality rate.

Key words: disc dilution confirmatory test; *Acinetobacter baumannii*; polymerase chain reaction; extended spectrum beta-lactamase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2): 219-223]

收稿日期: 2008-03-17

基金项目: 江西省教育厅课题(200693)

作者简介: 李蓉, 博士, 副教授, 硕士生导师, 北京大学医学部免疫系博士后, 研究方向: 细菌耐药机制, E-mail: rongli@yahoo.com.cn

β -内酰胺类抗生素一直以来在临床上应用最多、最广泛。细菌对 β -内酰胺类抗生素多重耐药最常见的一个机制就是产 β -内酰胺酶(extended spectrum beta-lactamase, ESBL)。检测细菌产 ESBL 情况可指导临床抗 MDR AB 感染的治疗。我们对前期工作分离并保存的 30 株 ESBL⁺ MDR AB 用纸片扩散确认法确证的产 ESBL 率仅为 50%。改善 ESBL 检测的分子生物学技术对鲍曼不动杆菌很重要,以便直接治疗和减少这些质粒携带酶的扩散^[1]。为比较纸片扩散确认法和 PCR 法对 ESBL 检出率的差别,找出检测 ESBL 的更敏感方法,以降低细菌耐药滥用抗生素引起的高病死率和减轻因此引起的经济损失,我们对其中 15 株经纸片扩散确认 ESBL⁺ AB 和 15 株 ESBL⁻ AB 菌株的分布、药敏、质粒谱及基因型作了比较分析,并对两种方法检出 ESBL 的阳性率进行了比较。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2004 年 5 月至 11 月从南昌大学第一附属医院检验科从临床各科室送检的痰液、分泌物、血液等标本中分离保存的 30 株多重耐药(对 3 种以上实验所用抗生素耐药)且 β -内酰胺酶阳性 AB 菌株^[2]。

1.2 药敏试验

用 Microscan-autoscan- ϕ 型自动微生物分析仪通过微量稀释法直接报告临床分离菌对常用抗菌药物的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC),按美国临床实验室标准委员会(national committee for clinic laboratory standards, NCCLS) 2003 年版标准判断结果,大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853(江西省临床检验中心)作药敏实验质控菌;大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC700603 作 PCR 实验对照(北京协和医院王辉教授惠赠)。

1.3 试剂

TEM-1, PER-1, SHV-1, VEB-1 和 SHV 基因扩增引物按文献^[3],由 TaKaRa 公司合成。质粒 DNA 小量纯化试剂盒,Ex Taq™ Hot Start Version 购自 TaKaRa 公司, LB 培养基和 MH 培养基(英国 OXOID 公司)。

1.4 PCR 扩增 AB 耐药基因

PCR 反应总体积 50 μ L, 其中引物各 1 μ L, 10 $\times$ PCR(Mg²⁺)缓冲液 5 μ L, dNTP 4 μ L, Taq 酶 0.25 U, DNA 模板 2 μ L。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.5 数据分析

使用 SPSS 统计软件,超广谱 β -内酰胺酶(+) AB 与超广谱 β -内酰胺酶(-)MDR AB 的科室分布、标本分布及药敏情况区别用 Fisher 精确概率法计算 P 值。纸片扩散确认法和聚合酶链式反应检出 ESBL 的阳性数比较用配对 χ^2 检验。

2 结果

2.1 ESBL⁺ 和 ESBL⁻ AB 的科室分布

ESBL⁺ 和 ESBL⁻ AB 主要分布于重症监护病房(intensive care unit, ICU)、外科和呼吸内科,其具体分布情况见表 1,经 Fisher 精确概率法计算 P 值, $P > 0.05$, 无显著性差异。

2.2 ESBL⁺ 和 ESBL⁻ AB 的标本分布

ESBL⁺ 和 ESBL⁻ AB 主要来源于痰液和分泌物,其具体分布情况见表 2,经 Fisher 精确概率法计算 P 值, $P > 0.05$, 无显著性差异。

2.3 ESBL⁺ 和 ESBL⁻ AB 的药敏情况

ESBL⁺ 和 ESBL⁻ AB 对实验所用各种抗生素(氨苄西林,氨苄西林/舒巴坦,哌拉西林,头孢曲松,头孢他啶,头孢呋肟,头孢吡肟,氨曲南,亚胺培南,庆大霉素,阿米卡星,妥布霉素,磺胺甲噁唑和环丙沙星)的耐药情况见表 3,经 Fisher 精确概率法计算对各种抗生素的 P 值, P 值均 > 0.05 , 无显著性差异。

表 1 ESBL⁺ 和 ESBL⁻ 科室分布情况

Table 1 Distribution of ESBL⁺ ESBL⁻ MDR AB in different units

(strains)

Isolates	ICU	Surgery	Respiratory unit	Others
ESBL ⁺ AB	9	5	1	0
ESBL ⁻ AB	6	4	1	4

Fisher exact probability $P = 0.193$

表2 ESBL⁺和ESBL⁻标本分布情况Table 2 Distribution of ESBL⁺ ESBL⁻ AB in different specimens (strains)

Isolates	Sputum	Secretion	Others
ESBL ⁺ AB	10	3	2
ESBL ⁻ AB	11	2	2

Fisher exact probability $P=1.000$ 表3 ESBL⁺和ESBL⁻的药敏情况Table 3 Drug sensitivity of ESBL⁺ ESBL⁻ AB

Drug resistant isolates	Amp	A/S	Pi	CAX	CAZ	CFT	CPE	AZT	IMP	Gm	AK	TO	T/S	CP
ESBL ⁺ AB	11	8	9	11	11	12	11	13	6	12	11	12	12	8
ESBL ⁻ AB	13	6	8	8	8	8	6	8	6	8	7	6	8	6
$P^{1)}$	0.651	0.715	1.000	0.450	0.450	0.245	0.139	0.109	1.000	0.245	0.264	0.060	0.245	0.715

1) Fisher exact probability

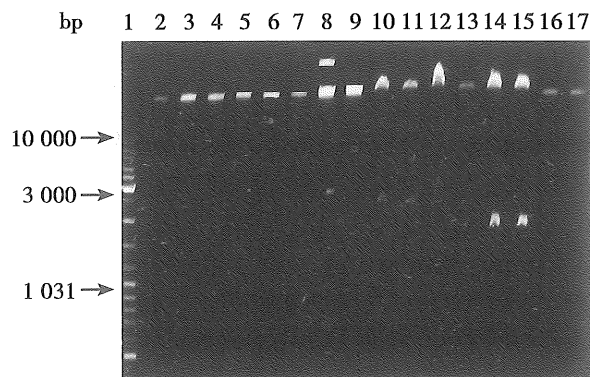
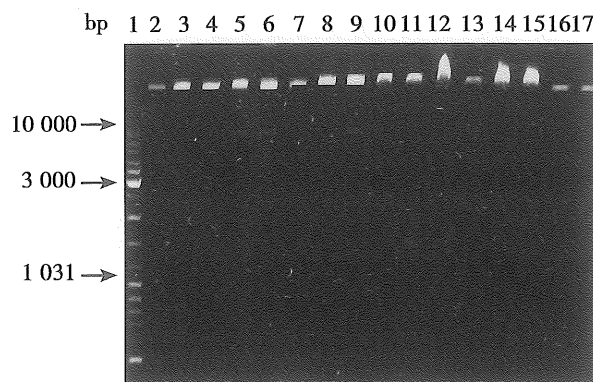


图1 产ESBL鲍曼不动杆菌的质粒谱型

Fig.1 Plasmid profiles of ESBL⁺ *A.baumannii*

Lane 1: GeneRuler™ DNA Ladder; Lane 2: *K.pneumoniae* ATCC700603; Lane 3-17: Clinic isolates number 28, 35, 137, 11, 43, 17, 69, 129, 23, 77, 102, 53, 58, 140, 52

图2 ESBL⁻鲍曼不动杆菌的质粒谱型Fig.2 Plasmid profiles of ESBL⁻ *A.baumannii*

Lane 1: GeneRuler™ DNA Ladder; Lane 2: *K.pneumoniae* ATCC700603; Lane 3-17: Clinic isolates number 5, 22, 33, 34, 136, 141, 73, 110, 145, 66, 29, 6, 139, 21, 84

2.4 ESBL⁺和ESBL⁻AB的质粒谱比较

提取15株产ESBL AB菌株的质粒,经0.7%的琼脂糖凝胶电泳,共有4种谱型,但都有一个同分子质量的质粒,与肺炎克雷伯菌 ATCC700603的质粒分子质量近似(图1)。15株ESBL⁻ AB有2种谱型,但均有与ESBL⁺ AB相同分子质量的质粒(图2)。结果证明ESBL⁺和ESBL⁻ AB都带有相同

分子质量的耐药质粒。

2.5 ESBL⁺和ESBL⁻MDR AB的基因型比较

我们使用TEM-1、SHV-1、PER-1和VEB-1型ESBL基因的4对特异性引物对每株细菌进行PCR,然后用琼脂糖进行凝胶电泳,对其扩增产物分析,15株经纸片扩散增强法确认的产ESBL AB获得3种基因型,且同一菌株可同时带2种基因;15株ESBL⁻ MDR AB也分离到3种基因型,有的同时带2种基因。未分离到耐药基因的菌株可能带有我们未筛选的其它耐药基因或耐药基因在染色体上,所分离的3种基因型PCR产物如图3所示,两者的基因型种类比较见表4。药敏结果表

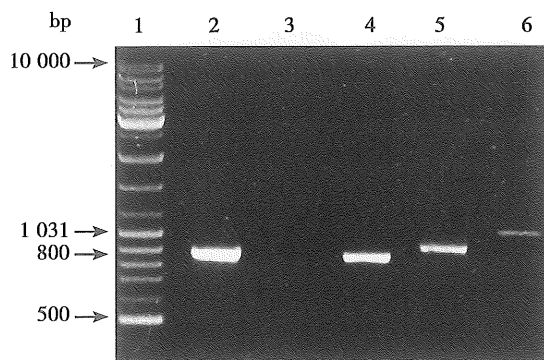


图3 PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Electrophoresis result of PCR product agarose gel

Lane 1: GeneRuler™ DNA Ladder; Lane 2: PCR product of *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 amplified with primer SHV (positive comparison); Lane 3: PCR product of *Escherichia coli* ATCC25922 amplified with primer SHV (negative comparison); Lane 4-6: Amplification of TEM-1, PER-1 and SHV-1 by PCR of clinic strains

明,AB 对 β -内酰胺类抗生素的耐药谱与携带产 ESBL 基因型的数量无明显相关。

2.6 两种方法检出 ESBL 阳性数比较

由于通过纸片扩散确认法检出的 ESBL⁺ AB 和 ESBL⁻ AB 在不同科室间的分布、不同标本间的分布、对不同抗生素的耐药情况及质粒谱都无明

显差异,且用聚合酶链式反应在 ESBL⁻ AB 质粒上也分离到了相同种类和比例的耐药基因,本课题对两种方法检出 ESBL 的阳性数进行了比较(表 5),经配对 χ^2 检验, $P < 0.001$,两种方法有明显差异,表明 PCR 法检测 ESBL 的阳性率远远高于纸片扩散确认法。

表 4 ESBL⁺ 和 ESBL⁻ MDR 的 PCR 基因型

Table 4 Genotype of ESBL⁺ ESBL⁻ MDR AB

(strains)

Genotype(+) isolates	SHV-1	TEM-1	PER-1	TEM-1, SHV-1	TEM-1, PER-1
ESBL ⁺ AB	0	5	2	1	6
ESBL ⁻ AB	1	8	1	0	4

表 5 纸片扩散确认法和聚合酶链式反应检出 ESBL 的阳性数比较

Table 5 Comparison of ESBL positive rates in disc dilution confirmatory test and PCR

(strains)

ESBL ⁺ isolates	Disc dilution confirmatory test -	Disc dilution confirmatory test +
PCR -	1	1
PCR +	14	14

3 讨 论

3.1 研究设计背景

耐药菌的感染在严重感染病人中很常见^[4],AB 是引起院内感染爆发的一种机会致病菌,是院内菌血症、肺炎和尿路感染的一个重要源泉^[5]。MDR AB 的报道逐年增加,常对广谱头孢菌素耐药,其重要机制之一就是产 ESBL^[6]。产 ESBL 菌感染病人比非产 ESBL 菌感染病人死亡率高,临床预后差^[7],因此,快速、准确地检测很重要。目前,临床实验室主要使用纸片扩散确认法检测 ESBL^[8],而我们对 30 株多重耐药且 β -内酰胺酶阳性 AB 菌株用纸片扩散确认法进行 ESBL 检测,只检测出 15 株(50%)ESBL⁺ AB。

分子生物学方法已成为诊断微生物学的主要手段,用分子生物学方法直接分析病原体 and 单个的基因将成为诊断微生物学的一个重要部分^[9]。1985 年 Kary^[10]发明的 PCR 技术是目前应用最广泛的分子生物学技术,也是用于证实产 ESBL 基因的最有效的方法^[11]。

为了比较纸片扩散确认法确定的 ESBL⁺ AB 与 ESBL⁻ AB 的不同以及纸片扩散确认法和 PCR 法检测 ESBL 的阳性率的差别,本课题对其在不同科室间的分布、不同标本间的分布、对不同抗生素

的耐药情况、质粒同源性及质粒上所携带的耐药基因数量进行了比较。同时对两种方法检测 ESBL 的阳性数进行了统计分析。

3.2 研究结果分析

通过纸片扩散确认法检出的 ESBL⁺ AB 和 ESBL⁻ AB 在不同科室间的分布($P > 0.05$)、不同标本间的分布($P > 0.05$)、对不同抗生素的耐药情况($P > 0.05$)及质粒谱都无明显差异,且用聚合酶链式反应在 ESBL⁻ AB 质粒上也分离到了相同种类和比例的耐药基因。以上结果提示我们,虽然纸片扩散确认法 ESBL⁻,但从细菌的分布、来源和药敏结果看来,这些菌株极可能为 ESBL⁺ AB,由于纸片扩散确认法检出率低而遗漏,用 PCR 对耐药基因进行分型的结果证明了我们的推断。我们同时对两种方法检出 ESBL 的阳性数进行了比较, $P < 0.001$,两种方法有明显差异,表明 PCR 法检测 ESBL 的阳性率远远高于纸片扩散确认法。

3.3 研究结论

本研究结果提示,必须综合考虑抗生素的使用方案,不能单纯靠 ESBL 纸片扩散确认结果来指导临床用药。只要检测到 1 种产 ESBL 基因,不论体外药敏实验结果如何,都建议不使用 β -内酰胺类抗生素。纸片扩散确认法检测 ESBL 阳性率低,许多产 ESBL 菌的 ESBL 纸片扩散确认仍为阴性;PCR 法可更快更敏感的检测产 ESBL 基因,对临

床上早期使用有效抗生素治疗从而减少住院时间以减少开支和保存医院资源有重要意义。因此,用PCR法代替纸片扩散确认法作为临床实验室检测ESBL的常规方法有其应用前景。

参考文献:

- [1] Beceiro A, Bou G, Class C. β -lactamases: an increasing problem worldwide [J]. Rev in Med Microbio, 2004,15(4):141-152.
- [2] 李 蓉,李文林,石小玉,等. 医院分离致病菌的临床分布和耐药性监测 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2007,28(3):154-158.
- [3] 李 蓉,李文林,石小玉,等. 产ESBL鲍曼不动杆菌的耐药特性及其耐药基因分型 [J]. 中国抗生素杂志,2006,31(4):219-222.
- [4] Toltzis P, Dul M, O'Riordan MA, et al. Comparative effects of single-dose ceftriaxone versus three oral antibiotic regimens on stool colonization by resistant bacilli in children [J]. Pediatr Infect Dis J, 2007,26(1):25-30.
- [5] Hodle AE, Richter KP, Thompson RM. Infection control practices in U.S. burn units [J]. J Burn Care Res, 2006,27(2):142-151.
- [6] Kennedy PJ, Haertsch P, Maitz P. The Bali Burn Disaster: Implications and Lessons Learned [J]. J Burn Care Rehabil, 2005,26(2):125-131.
- [7] De Gheldre Y, Avesani V, Berhin C, et al. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum beta-lactamases [J]. J Antimicrob Chemother, 2003,52(4):591-597.
- [8] Laurent P, Olivier M, Nathalie A, et al. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital [J]. J Clin Microbiol, 2003,41(8):3542-3547.
- [9] Versalovic J. Diagnostic molecular microbiology: Nucleic acid probes and microbes [J]. Path Case Rev, 2003,8(4):137-144.
- [10] Linscott AJ. Molecular diagnostics for infectious disease [J]. Pathol Case Rev, 2002,7(2):64-69.
- [11] Andrea MH, Malcolm GPP, Marion SH, et al. Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detecting and quantifying CMY-2 and SHV β -Lactamases [J]. J Clin Microbio, 2002,40(6):1947-1957.

(编辑 徐 杰)

(上接第218页 from page 218)

研究,仍是我们下一步工作的重点。

综上所述,HA局部注药能够诱导基底部玻璃体脱离。本试验首次采用基底部玻璃体注药的方法,同时首次采用UBM对其进行了评价。该结果为临床上如何彻底清除基底部玻璃体从而预防aPVR的发生提供了理论和实验依据。

参考文献:

- [1] Robert E, Foster, Sanford M. Recurrent retinal detachment more than 1 year after reattachment [J]. Ophthalmology, 2002,109(10):1821-1827.
- [2] 刘 文. 切除基底部玻璃体的临床意义 [J]. 中华眼底病杂志, 2001,17(2):161-162.
- [3] Flemming S, Veronika N, Peter J. Enzyme-assisted vitrectomy in enucleated pig eyes: a comparison of hyaluronidase, chondroitinase, and plasmin [J]. Cur Eye Res, 2004,29(4-5):261-268.
- [4] 邹秀兰,赖明莹,曾祥凤. 复杂性人工晶体眼裂孔性视网膜脱离玻璃体切除术的疗效 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006,27(4):459-462.
- [5] Gandorfer A. Experimental evaluation of microplasmin—an alternative to vital dyes[J]. Dev Ophthalmol, 2008, 42(9):153-159.
- [6] Los LI, van Luyn MJ, Nieuwenhuis P. Organization of the vitreous body: Lamellae, Cloquet's channel and a novel structure, the 'Alae Canalis Cloqueti' [J]. Exp Eye Res, 1999,69(3):343-350.
- [7] Hageman GS, Russel SR. Chondroitinase-mediated disinsertion of the primate vitreous body [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994,35(4):1260-1256.
- [8] Gandorfer A, Putz E, Welge-luben U, et al. Ultrastructure of the vitreoretinal interface following plasmin assisted vitrectomy [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(1):6-10.
- [9] Gentile RC, Berinstein DM, Liebmann J, et al. High-resolution ultrasound biomicroscopy of the pars plana and perioheral retina [J]. Ophthalmology, 1998,105(3):478-484.
- [10] 王莉菲,马景学,刘建宗,等. 兔眼玻璃体视网膜交界面溶解分离研究[J].中华眼科杂志, 2004,40(7):459-464.

(编辑 刘清海)