

## 铜绿假单胞菌 D-试验阳性 及阴性菌株产 $\beta$ -内酰胺酶的差异性分析\*

谢国艳<sup>1</sup>, 肖敏<sup>2</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院检验科, 上海 202150;

2. 解放军第306医院医学检验科, 北京 100101)

**摘要:**目的 探讨D-试验阳性现象的铜绿假单胞菌(PA)的发生率及其现象的发生机制。方法 使用纸片扩散法(K-B法)检测386株PA对亚胺培南和头孢他啶的耐药性,对D-试验阳性及阴性株分别检测AmpC和金属 $\beta$ -内酰胺酶(MBLs)。结果 386株PA分离株中,有132株为D-试验阳性株,D-试验阳性的PA发生率为34.2%,总产酶率为73.5%,其中MBLs占40.1%,AmpC酶占30.3%,混合酶占3.0%。D-试验阴性株总产酶率为9.0%,其中MBLs占3.0%,AmpC酶占6.0%。两者在总产酶率、产MBLs和产AmpC酶方面的差异具有统计学意义( $\chi^2=39.9, 26.4, 14.7$ , 均 $P<0.01$ )。其中98株(74.2%)菌株为D1型(亚胺培南耐药),34株(25.8%)菌株为D2型(亚胺培南敏感),D1型与D2型相比较,在产MBLs和产AmpC酶方面的差异具有统计学意义( $\chi^2=6.1, 3.9$ , 均 $P<0.05$ )。结论 实验室应高度重视D-试验阳性的PA株的检测。推测PA株D-试验阳性现象的产生可能与MBLs和AmpC酶的大量产生有关。

**关键词:**铜绿假单胞菌; $\beta$ -内酰胺酶;D试验

中图分类号:R378.991;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-130-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.033

## Study on the Difference of $\beta$ -Lactamases-Producing in D-Test Positive and D-Test Negative *Pseudomonas Aeruginosa*

XIE Guo-yan<sup>1</sup>, XIAO Min<sup>2</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, Chongming Branch of Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 202150, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the 306th Hospital of PLA, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Objective To investigate the incidence rate of D-test-positive phenomenon and the mechanism of the phenomenon-producing in *Pseudomonas aeruginosa* (PA). **Methods** 386 PA clinical isolates were detected to drug susceptibility of imipenem and ceftazidime by K-B method, and D-test positive and negative strains were detected to AmpC enzymes and MBLs, respectively. **Results** There were 132 D-test-positive strains in 386 PA clinical isolates, the incidence rate of D-test-positive strains was 34.2%. In D-test-positive strains, total enzymes-producing rate was 73.5%, and MBLs, AmpC enzymes and MBLs + AmpC enzymes were 40.1%, 30.3% and 3.0%, respectively. In D-test-negative strains, total enzymes-producing rate was 9.0%, and MBLs, AmpC enzymes were 3.0% and 6.0%, respectively. Compared with total enzymes-producing rate, AmpC enzymes and MBLs, D-test-positive strains had significant difference with negative ones ( $\chi^2=39.9, 26.4, 14.7$ , all  $P<0.01$ ). D1-type strains were 74.2% and D2-type strains were 25.8%. Compared with MBLs and AmpC enzymes, D1-type strains had significant difference with D2-type strains ( $\chi^2=6.1, 3.9$ , all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Clinical microbiological laboratory should highly pay attention to the detection in D-test-positive-PA strains. The production of MBLs and AmpC enzymes in great amount induced are probably related to the phenomenon-producing in D-test-positive PA.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*;  $\beta$ -lactamase; D test

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种条件致病菌,由于自身结构及抗生素诱导作用,该菌可产生几乎所有类型的 $\beta$ -内酰胺酶<sup>[1]</sup>,感染后极易发生耐药,成为临床上重要的耐药菌之一。笔者在日常工作中发现,在应用纸片法(K-B法)对PA进行药敏试验时,当亚胺培南与头孢他啶纸片相距15~26 mm,有时会出现D-试验

阳性现象(即亚胺培南诱导PA对头孢他啶耐药),有研究<sup>[2]</sup>表明,此现象产生可能与亚胺培南诱导AmpC酶的大量产生有关,是否还存在其它原因?本研究针对D-试验阳性及阴性的PA菌株,检测其AmpC酶和金属 $\beta$ -内酰胺酶(MBLs),比较两者的差异,探讨产生D现象的PA株在临床的发生率以及发生机制。

\* 作者简介:谢国艳(1974—),女,硕士,副主任技师,研究方向:主要从事医学检验与耐药基因分子诊断研究,E-mail:xieguoyan93@163.com。

通讯作者:肖敏,女,博士,副主任技师,E-mail:gaozhishen93@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 386株非重复PA分离株,收集于本院2015年1~10月住院病人的送检标本,所有菌株均经MicroScan-96全自动微生物鉴定仪鉴定到种,菌株以甘油肉汤-20℃保存备用。铜绿假单胞菌 ATCC27853,大肠埃希菌 ATCC25922,肺炎克雷伯菌 ATCC700603 购自上海市临检中心。

1.2 试剂与仪器 MicroScan WalkAway-96 全自动微生物鉴定仪(西门子公司),MIC药敏试验为NC50板(西门子公司),药敏纸片为OXOID公司,MH平板为上海科玛嘉公司。

1.3 方法

1.3.1 D试验:纸片扩散法(K-B)<sup>[3]</sup>:将待测菌液配成0.5麦氏单位,涂布于MH培养基,分别贴亚胺培南(10 μg)和头孢他啶(30 μg),两片边缘之间的距离为15~26 mm,35℃培养16~18 h。若头孢他啶纸片的抑菌圈在靠近亚胺培南纸片一侧出现截平现象时,则判为D试验阳性。铜绿假单胞菌 ATCC 27853 为质控菌株。

1.3.2 β-内酰胺酶(MBLs)的表型确证检测:挑选

D试验阳性株与部分阴性株检测。

1.3.3 MBLs的检测:改良Hodge实验<sup>[4]</sup>:将肺炎克雷伯菌 ATCC700603(指示菌)调成0.5麦氏单位的菌悬液,再用生理盐水1:10稀释后均匀涂布MH平皿,室温放置10 min后,贴美罗培南(10 μg)纸片。挑取3~5个过夜生长的待测菌,从纸片边缘向外划直线,35℃培养16~20 h,观察指示菌有无出现向美罗培南纸片增强生长现象,若增强生长,即为MBLs阳性。

1.3.4 AmpC酶检测:均采用三维实验<sup>[5]</sup>,酶粗提液采用反复冻融法,AmpC酶采用的纸片为头孢西丁(30 μg),35℃培养24 h后,若在画线处有大肠埃希菌的矢状生长则可确定AmpC酶阳性。

1.4 统计学分析 资料分析采用χ<sup>2</sup>检验,应用SPSS12.0软件包统计。

2 结果

2.1 D试验 386株PA有132株为D-试验阳性株,占34.2%,其中98株(74.2%)菌株为亚胺培南耐药D1型,见图1。34株(25.8%)菌株为亚胺培南敏感D2型,见图2。

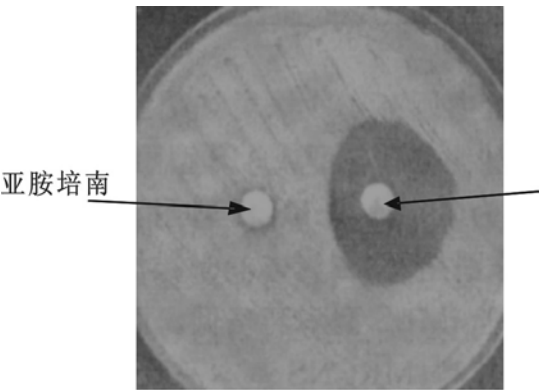


图1 D-试验阳性株

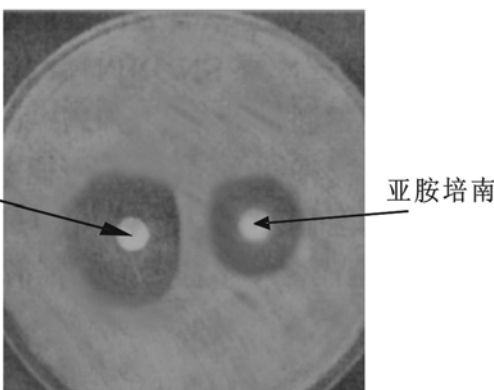


图2 D-试验阴性株

2.2 β-内酰胺酶检测 132株D试验阳性株和选取的100株D试验阴性株中,产β-内酰胺酶的类型

型比较见表1。98株D1型和34株D2型菌株的产酶情况见表2。

表1 PA阳性株与阴性株产β-内酰胺酶的类型比较[n(%)]					
组别	n	总产酶率	MBLs	AmpC酶	MBLs+AmpC酶
D试验阳性	132	97(73.5)*	53(40.2)*	40(30.3)*	4(3.0)
D试验阴性	100	9(9.0)	3(3.0)	6(6.0)	0

注:\*与D-菌株相比χ<sup>2</sup>=39.9,26.4,14.7,P<0.01。

表2 D1型株与D2型株产β-内酰胺酶的类型比较[n(%)]					
组别	n	总产酶率	MBLs	AmpC酶	MBLs+AmpC酶
D1	98	76(77.6)	48(49.0) <sup>#</sup>	25(25.5) <sup>#</sup>	3(3.1)
D2	34	21(61.8)	5(14.7)	15(44.1)	1(2.9)

注:<sup>#</sup>与D2型菌株相比,χ<sup>2</sup>=6.1,3.9,P<0.05。

3 讨论 通过实验发现,D-试验阳性的 PA 的发生率为 34.2%,并存在着 D1 型和 D2 型两种耐药表型,其中以 D1 型为主,占 74.2%,D2 型占 25.8%。比较两种类型的 D-试验阳性株,两者的总产酶率相差不大,但在产 MBLs 和 AmpC 酶方面的差异具有统计学意义;即 D1 型产 MBLs 显著高于 D2 型,而 D2 型产 AmpC 酶显著高于 D1 型。D1 型表现为亚胺培南耐药,而文献报道<sup>[6]</sup>PA 对碳青霉烯类抗生素产生耐药性的重要机制多因由产金属酶所引起,与 D1 型以产 MBLs 为主的结论相吻合,推测 D1 型菌株发生 D-试验现象的原因可能与 MBLs 的产生有关。而 D2 型表现为亚胺培南敏感,主要产 AmpC 酶,推测产 AmpC 酶可能为 D2 型菌株发生 D-试验现象的主要发生机制,与此现象产生可能与亚胺培南诱导 AmpC 酶的大量产生有关的观点<sup>[2]</sup>相一致。

比较 D 试验阳性株与阴性株在总产酶率、产 MBLs 和产 AmpC 酶方面的差异,发现阳性株在三个方面均显著高于阴性株,两者的差异具有统计学意义,由此推测导致 PA 菌株发生 D-试验现象的原因可能与 MBLs 和 AmpC 酶的大量产生有关。

PA 是临床常见的条件致病菌,在医院感染率居首位<sup>[7]</sup>,它能够通过不同的机制对各类抗生素产生严重耐药,导致临床治疗 PA 感染过程中反复感染,难以治愈。有研究<sup>[8]</sup>发现,先前应用碳青霉烯类抗生素是碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌感染的危险因素,因此,当 D-试验筛选出 D-试验阴性株时,由于此类菌株产 MBLs 和 AmpC 酶的几率较低,应及时提示临床尽量避免使用碳青霉烯类抗生素;而当筛选出 D-试验阳性菌株,特别是 D2 型菌株时,由于此时菌株并未产生亚胺培南耐药,应及时提示临床谨慎使用碳青霉烯类抗生素,延缓碳青霉烯类耐药的 PA 的产生。

D 试验阳性 PA 株发生率较高,不容忽视,D-试验是一种简便的表型初筛试验,在日常工作开展 PA 的 D-试验是有必要的,可以指导临床医师更合理使用抗生素。

#### 参考文献:

- [1] Hanson ND. AmpC beta-lactamases what do we need to know for the future[J]. J Antimicrob Chemother, 2003,52(1):2-4.
- [2] 邓 群,刘佳霖,祝伶俐. 铜绿假单胞菌的药敏试验中 D-现象的探讨[J]. 微生物学杂志,2009,29(6):80-82.  
Deng Q, Liu JL, Zhu LL. The D-phenomenon in drug sensitively test to *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Microbiology, 2009,29(6):80-82.
- [3] National Committee of Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. fourteenth informational supplement [S]. Wayne, Pennsylvania, NCCLS document M100-S14, 2004:1-159.
- [4] 谢国艳,高志生,许 俊,等. PAE-MHT 法检测铜绿假单胞菌金属  $\beta$ -内酰胺酶的临床适用性的评估[J]. 中国实验诊断学,2014,18(6):982-985.  
Xie GY, Gao ZS, Xu J, et al. Evaluation of pseudomonas aeruginosa-modified hodge test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chin J Lab Piagn, 2014,18(6):982-985.
- [5] 胡 琴,聂署萍,吴润香,等. 耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药表型及基因型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012,33(11):1305-1307.  
Hu Q, Nie SP, Wu RX, et al. Genotypes and phenotypes analysis of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Int J Lab Med, 2012, 33(11):1305-1307.
- [6] 杜 艳,陈瑞春,穆玉姣,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌及其产金属酶的相关基因 bla<sub>VIM-2</sub> 研究[J]. 中国抗生素杂志,2012,37(7):507-509,527.  
Du Y, Chen RC, Mu YJ, et al. The research of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and its metallo- $\beta$ -lactamase relative gene bla<sub>VIM-2</sub> [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012,37(7):507-509,527.
- [7] 厉世笑,周 鹏,金芝艳,等. 多药耐药铜绿假单胞菌 III 型分泌系统相关毒力基因的检测[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(17):3845-3847,3868.  
Li SX, Zhou P, Jon ZY, et al. Detection of type III secretion system virulence-related genes in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chin J Nosocomiol, 2015,25(17):3845-3847,3868.
- [8] 袁莉莉,丁百兴,沈 震,等. 碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌的临床研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017,17(2):121-126.  
Yuan LL, Ding BX, Shen Z, et al. Clinical investigation of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Huashan hospital [J]. Chin J Infect Chemother, 2017,17(2):121-126.

收稿日期:2018-03-25

修回日期:2018-04-10