

左束支传导阻滞等器质性心脏病鉴别,特别是非起搏因素所产生的 EMTV 更易误诊为器质性心脏病。国内已有报道,不论何种原因引起的 EMTV 改变可持续 1 天~1 个月不等^[11,12]。凡临床上无器质性心脏病证据(症状、危险因素、体征、实验室依据、心脏彩超、心脏 X 片、冠状动脉造影),T 波倒置未经任何处理而自行恢复者,T 波改变均应先应考虑 EMTV 改变,应加强医务人员对 EMTV 这一电生理现象的正确认识,患者可不必行动态心肌酶监测、冠状动脉造影等检查,以缩短患者的住院时间和减轻患者经济负担。

参考文献

- 1 Rosenbaum MB, Blanco HH, Elizari MV, et al. Electronic modulation of the T wave and cardiac memory[J]. Am J Cardiol, 1982, 50(2):222-213
- 2 吴祥,郑毅雄. 心脏记忆现象与电调整 T 波[J]. 心电图杂志, 1999, 18(3):181-214.
- 3 陈新. 临床心律失常学—电生理与治疗(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:1407-1440.
- 4 Shvilkin M, Danilo J, Wang PH, et al. Evolution and resolution of long-term cardiac memory[J]. Circulation, 1998, 97(10):1810-1817.
- 5 林加锋,杨麒麟,林佳选,等. 心室异常除极顺序与电调整性 T 波的相关性研究[J]. 心电图杂志, 2007, 26(4):197-202.
- 6 曾立,杜一平,管一平,等. 阵发性室上性心动过速后电调整性 T 波变化的观察[J]. 华西医学, 2005, 20(3):488-489.
- 7 林加锋,陈晓曙,张建华. 不同原因心脏电调整性 T 波的导联分布特征[J]. 心电图杂志, 2005, 24(2):67-69.
- 8 黄显南,陈向阳,潘征. 电调整性 T 波改变的临床观察[J]. 右江医学, 2007, 35(2):131-132.
- 9 Geller JC, Rosen MR. Persistent T wave changes after alteration of the ventricular activation sequence. New insight into cellular mechanisms of "cardiac memory"[J]. Circulation, 1993, 88(12):1811-1819.
- 10 Rosen MR. T wave memory[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 1996, 7(8):787-790.
- 11 Janse MJ, Sosunov EA, Coronel R, et al. Repolarization gradients in the canine left ventricle before and after induction of short-term cardiac memory[J]. Circulation, 2005, 112(12):1711-1718.
- 12 Zoghi M, Nalbantgil S. Electrical stunning and hibernation: suggestion of new terms for short-term and long-term cardiac memory[J]. Europace. 2004, 6(5):418-424.

[收稿日期 2009-03-02][本文编辑 韦捍德 刘京虹]

论 著

获得性金属 β 内酰胺酶表型检测法的研究

史映红, 冯 萍

作者单位:621000 四川,绵阳市疾病预防控制中心(史映红);610041 成都,四川大学华西医院感染性疾病中心(冯 萍)

作者简介:史映红(1978-),女,硕士学位,主治医师,研究方向:细菌耐药机制。E-mail: syh5880@sina.com

通讯作者:冯 萍,女,博士,副教授,传染科主任,研究方向:细菌耐药机制及抗生素作用机理。E-mail: FengP-62@163.com

【摘要】 目的 探讨适用于临床微生物实验室常规初筛获得性金属 β 内酰胺酶(MBLs)的实验方法,为指导临床合理选择抗生素提供依据。方法 以 EDTA 为 MBLs 的抑制剂,以亚胺培南 IMP 和头孢他啶 CAZ 为 MBLs 的底物,采用双纸片增效法作 MBLs 初筛试验,将两种初筛试验的结果与聚合酶链反应 PCR 的结果进行比较分析。结果 应用 PCR 法,在 70 株耐 IMP 和或 CAZ 的鲍曼不动杆菌中检出 VIM 型 MBLs 阳性株 4 株,IMP 型 MBLs 阳性株 6 株。IMP-EDTA 纸片法的敏感性 50%,特异性 28.6%;CAZ-EDTA 纸片的敏感性 85.8%,特异性 13.3%。结论 IMP-EDTA 纸片法方法简便、结果可靠,可作为获得性 MBL 的初筛方法在临床微生物室日常工作中开展。

【关键词】 金属 β 内酰胺酶; 亚胺培南; 头孢他啶; 表型检测法; PCR 扩增

【中图分类号】 R 969.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2009)04-0365-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.04.014

Study of methods of screening acquired metallo- β -lactamases SHI Ying-hong, FENG Ping. Mianyang Center for Disease Control and Prevention, Mianyang 621000, China

[Abstract] **Objective** To explore and establish a method for screening acquired metallo- β -lactamases (MBLs) in clinical microbiology laboratory. **Methods** Seventy *Acinetobacter baumannii* strains with an imipenem's MIC of $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ and a ceftazidime's MIC of $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ were selected for MBLs screening. Imipenem- or ceftazidime-EDTA double disks test were used to detect the metallo- β -lactamases production. blaIMP and blaVIM were amplified by PCR. And the results were evaluated with those of PCR analyses. **Results** Of the 70 clinical strains, there were 10 strains tested positive for MBLs genes by PCR: 6 for blaIMP and 4 for blaVIM. The imipenem-EDTA disks's sensitivity was 50% and the specificity was 28.6%. The ceftazidime-EDTA disks's sensitivity was 85.8% and the specificity was 13.3%. **Conclusion** The inhibitor potentiated disk diffusion test using IMP-EDTA is a convenient and credible method for detecting acquired MBLs producer in clinical microbiology laboratory.

[Key words] Metallo- β -lactamases; Imipenem; Ceftazidim; MBLs screen; PCR amplify

金属 β -内酰胺酶 (metallo- β -lactamases, MBLs)是一类活性依赖二价金属阳离子(主要是锌)的 β 内酰胺酶,能广泛水解多种 β 内酰胺类抗生素,对常用 β 内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸、舒巴坦等)不敏感,但其活性可被金属螯合剂(EDTA)抑制。绝大多数获得性金属 β 内酰胺酶的基因位于整合子等可移动的基因元件上,可借助结合性质粒、转座子等发生转移,所以产金属 β 内酰胺酶的革兰阴性菌被公认为重要的多重耐药病原体。产金属 β 内酰胺酶的细菌种属包括假单胞菌属、不动杆菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属等。目前世界上已有30多个国家陆续发现了金属酶,类型多样,每种类型都有不同的变异,而且其宿主菌种不断扩大,给抗感染治疗带来重大挑战。因此,需要及时检测菌株产金属酶的情况,以防耐药菌爆发流行。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 70株鲍曼不动杆菌来源于华西医院临床微生物实验室日常送检标本。检测金属 β 内酰胺酶的阳性对照菌株(产VIM-2型金属酶的恶臭假单胞菌、产IMP-1型金属酶的肺炎克雷伯菌)及检测金属 β 内酰胺酶的阴性对照菌株(大肠埃希菌ATCC25922),均由四川大学华西医院感染性疾病中心抗感染药物研究室提供。

1.1.2 抗菌药物纸片及实验试剂 胺培南纸片($10 \mu\text{g}/\text{片}$),头孢他啶纸片($30 \mu\text{g}/\text{片}$),均为英国OXOID公司产品;金属螯合物:乙二胺四乙酸(EDTA)、分析纯(重庆化学试剂厂);PCR试剂(TaKaRa Ex Taq, $10 \times$ Ex Taq Buffer, MgCl_2 , dNTP Mixture)和DNA凝胶电泳 marker,均为大连宝生物工程有限公司产品。

1.1.3 PCR引物 参照文献^[1]合成,序列见表1。

表1 PCR引物序列

Primer	Sequence(5'→3')	Expected amplicon size(bp)	Reference
IMP-R	GAAGCGTTTATGTTTCATAC	587	[1]
IMP-F	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC		
VIM-R	GTTTGGTGCATATCGCAAC	382	[1]
VIM-F	AATGCCGAGCACCAGGATAG		

1.2 方法

1.2.1 金属酶表型测定 将菌株接种在M-H琼脂平皿上,35℃温箱孵16~18h后形成菌落;挑取单个菌落,用生理盐水比浊菌液浓度为 10^5cfu/ml ,用棉拭子均匀涂抹菌液于M-H平板上;在每个平板的上部贴上2张亚胺培南纸片,下部贴上2张头孢他啶纸片,每两张相同抗生素纸片之间的距离为4~5cm,上部与下部之间距离为5~6cm;分别在其中一张亚胺培南纸片和头孢他啶纸片上滴加EDTA($37.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $20 \mu\text{l}$,共 $750 \mu\text{g}$,之后将每个M-H平板放入35℃温箱孵育过夜。结果判定:对同一菌株,滴加EDTA后抑菌圈直径增大 $\geq 7 \text{mm}$,则为金属酶表型阳性。

1.2.2 PCR扩增 采用煮沸法提取质粒DNA。PCR反应体系: Taq DNA聚合酶($5 \text{U}/\mu\text{l}$) $0.25 \mu\text{l}$, Buffer (Mg^{2+} Free) $5 \mu\text{l}$, MgCl_2 (25mM) $4 \mu\text{l}$, dNTP Mixture (各 2.5mM) $4 \mu\text{l}$, 引物(10pmol/L)各 $2 \mu\text{l}$, DNA模板 $2 \mu\text{l}$,加灭菌双蒸水至 $50 \mu\text{l}$ 。PCR反应条件:94℃预变性5min,94℃变性1min,54℃退火1min,72℃延伸1.5min,共35个循环,最后72℃延伸7min。PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果,凝胶成像系统扫描成像。

2 结果

2.1 表型检测结果 70株耐亚胺培南和(或)头孢

他啉的鲍曼不动杆菌中,用亚胺培南加 EDTA 纸片共检测出 35 株菌的金属酶表型阳性,占 50%;头孢他啶加 EDTA 纸片检测出 60 株菌的金属酶表型阳性,占 85.8%。

2.2 PCR 扩增结果 70 株耐药菌中,有 4 株携带 VIM 型金属酶基因,6 株携带 IMP 型基因。见图 1~2。

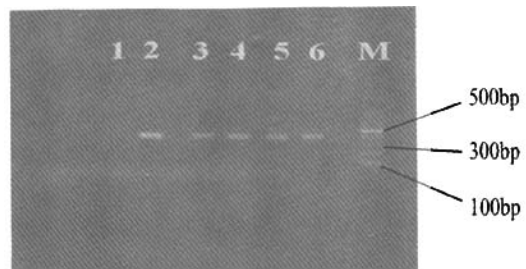


图 1 VIM 型基因扩增电泳图

1:阴性对照;2:产 VIM 型 MBLs 的阳性对照株;3~6:产 VIM 型 MBLs 的鲍曼不动杆菌临床分离株;M:DNA marker (100~1000 bp)

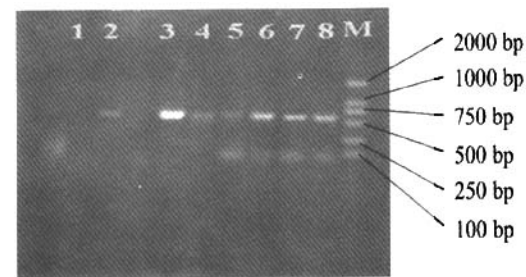


图 2 IMP 型基因扩增电泳图

1:阴性对照;2~7:产 IMP 型 MBLs 的鲍曼不动杆菌;8:产 IMP 型 MBLs 的阳性对照株;M:DNA marker (100~2000 bp)

2.3 表型检测与基因检测结果比较 表型检测阳性数高于 PCR 检测。见表 2。

表 2 金属酶表型与 PCR 检测比较

检测方法	总数	IMP 纸片 (+)	CAZ 纸片 (+)
表型检测	70	35	60
PCR 检测	70	10	8

2.4 表型检测法比较 IMP 纸片敏感性低于 CAZ 纸片,但特异性高于 CAZ 纸片。见表 3。

表 3 比较两种表型检测法

	IMP 纸片	CAZ 纸片
敏感性	50% (35/70)	85.8% (60/70)
特异性	28.6% (10/35)	13.3% (8/60)

3 讨论

3.1 近 10 年来,获得性金属 β 内酰胺酶已被广泛检出,以 IMP、VIM 型为主,并可分为多种亚型。此外,还包括 SPM^[2]、GIM^[3]和 SIM^[4]型等多种类型。亚洲地区以 IMP、VIM 型金属酶多见。研究发现,不仅对碳青霉烯类抗生素耐药的菌株可能产金属 β

内酰胺酶,对碳青霉烯类抗生素敏感但对头孢他啶高度耐药的菌株也可能产金属 β 内酰胺酶。所以本研究选用亚胺培南和头孢他啶作为金属酶底物进行检测,以此探讨适宜于临床微生物实验室广泛开展的检测方法。

3.2 从以上实验结果可发现用亚胺培南加 EDTA,检出 MBLs 为 50%,而以头孢他啶加 EDTA 纸片法检出 MBLs 为 85.8%。由于酶底物选择不同而使检出率相差较大。可能因为耐药菌中还存在其他 β 内酰胺酶如 ESBLs 酶, AmpC 酶等,均可导致对 CAZ 耐药,加入 EDTA 后,又因其自身的抑菌作用使抑菌圈扩大而致金属酶表型检测假阳性。所以 CAZ 作为 MBLs 底物特异性较差。

3.3 研究结果还显示,金属酶表型检测与 PCR 检测结果相差较大,可能的原因是:(1)纸片法中,EDTA 本身可以抑制细菌生长而导致抑菌圈扩大,造成假阳性;(2)PCR 检测存在假阴性:①本研究只检测了五种金属酶基因型中的 IMP 和 VIM 型两种,可能有其它三种基因型存在;②本研究进行的是以质粒为模板的耐药基因扩增,受质粒提取过程及质量的影响,可能有部分细菌携带有金属酶基因,但在质粒提取中丢失了,这些均可导致 PCR 检测阳性率低。

3.4 本研究结果认为 IMP-EDTA 纸片法操作简便、结果可靠,可作为获得性 MBLs 的初筛方法在临床微生物实验室日常工作中开展。需要改进的是如何提高表型检测的阳性率。临床微生物实验室应尽早建立合适的筛选方法,以指导临床合理用药,并控制产酶菌的流行。

参考文献

- 1 Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, et al. Detection of pseudomonas aeruginosa producing metallo- β -lactamase in a large centralized laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3129-3135.
- 2 Sader HS, Reis AO, Silbert S, et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in a Brazilian hospital [J]. J Clin Microbiol Infect, 2005, 11: 73.
- 3 Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, et al. Molecular characterization of β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 4654.
- 4 Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1-integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (11): 4485.

[收稿日期 2009-01-21][本文编辑 宋卓孙 黄晓红]