

产超广谱 β -内酰胺酶及 AmpC 酶的阴沟肠杆菌的耐药性分析

王正兰 戎建荣 李连青 王淑峰 崔巧珍 梁红萍

基金项目:山西省回国留学人员重点科研资助项目(晋留管办发[2010]14号 项目编号:94)

作者单位:030001 太原市,山西医科大学(王正兰)

030012 太原市,山西省临床检验中心(戎建荣 李连青)

030001 太原市,山西医科大学第一医院(王淑峰)

030012 太原市,山西省人民医院(崔巧珍 梁红萍)

通讯作者:李连青, E-mail: sxlq@tom.com

【摘要】 目的 分析产超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum β lactamases, ESBLs)及 AmpC 酶的阴沟肠杆菌的分布情况及耐药特征。**方法** 选择 49 株阴沟肠杆菌,采用纸片扩散法进行药物敏感试验,按美国临床实验室标准化协会推荐的确证试验检测产 ESBLs 阳性菌株;头孢西丁纸片扩散法初步筛选产 AmpC 酶阳性菌株,采用 PCR 检测 AmpC 酶基因。**结果** 抗生素敏感试验结果显示阴沟肠杆菌对头孢西丁、替卡西林/克拉维酸、头孢曲松、氨曲南的耐药率均达 79.6%以上,对美罗培南敏感率较高,达 91.8%。49 株阴沟肠杆菌中对头孢西丁耐药的菌株 46 株(93.9%);产 ESBLs 菌株 29 株(59.2%),PCR 扩增产 AmpC 酶的阴沟肠杆菌 36 株(73.5%),同时产两种酶的菌株为 13 株(26.5%)。**结论** 产 ESBLs 及 AmpC 酶阴沟肠杆菌普遍且耐药现象严重。

【关键词】 阴沟肠杆菌;超广谱 β -内酰胺酶;AmpC 酶;耐药性;基因型

The drug resistance analysis of *Enterobacter cloacae* which produce AmpC and ESBLs

WANG Zheng-lan¹, RONG Jian-rong², LI Lian-qing², et al. ¹Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China ²Shanxi Center for Clinical Laboratories, Taiyuan 030012, China

【Abstract】 Objective To analysis the distribution and drug resistance characteristic of *Enterobacter cloacae* producing AmpC and extended spectrum β lactamases (ESBLs). **Methods** 49 strains *Enterobacter cloacae* were collected. The confirmatory test recommended by clinical and laboratory standards institute was carried out to detect ESBLs and the Kirby-Bauer method was used to determine drug sensitivity. AmpC positive strains were screened by cefoxitin disk diffusion method and the AmpC gene were detected by PCR. **Results** Antibiotics susceptibility test showed that the resistant rate of *Enterobacter cloacae* to cefoxitin, ticarcillin-CA, ceftriaxone, aztreonam were all above 79.6%. *Enterobacter cloacae* were sensitive to meropenem and the sensitive rate was 91.8%. There were 46 strains (93.9%) *Enterobacter cloacae* resistant to cefoxitin. There were 29 strains (59.2%) *Enterobacter cloacae* producing ESBLs. There were 36 strains (73.5%) producing AmpC by PCR amplification and 13 strains (26.5%) producing both ESBLs and AmpC at the same time. **Conclusion** *Enterobacter cloacae* producing ESBLs and AmpC are prevalent and the drug resistance phenomenon is serious.

【Key Words】 *Enterobacter cloacae*; ESBLs; AmpC; Drug resistance; Genotype

阴沟肠杆菌属于肠杆菌科细菌,广泛存在于自然环境中,是人体的正常菌群。近年来,由于各种广谱抗生素的广泛应用,阴沟肠杆菌对抗生素的耐药率不断上升,成为临床抗感染治疗的难题。AmpC 酶和超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum β lactamases, ESBLs)的产生是导致阴沟肠杆菌对抗生素耐

药的重要原因之一,而对于产 AmpC 酶和产 ESBLs 菌株感染的治疗亦十分棘手,是目前医院感染中急需控制的一个重点和难点^[1]。本文研究对山西省两家综合性医院临床分离的 49 株阴沟肠杆菌进行耐药性监测及 AmpC 酶和 ESBLs 的检测,为临床合理有效使用抗生素并预防和控制耐药菌株的扩散提供科

学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定 收集 2009 年 1 月至 2010 年 6 月山西医科大学第一附属医院、山西省人民医院细菌室临床送检标本中经培养鉴定的阴沟肠杆菌,共 49 株,细菌的鉴定采用全自动微生物分析仪 Vitek II 鉴定到种。

1.1.2 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 为携带 ESBLs 阳性的质控菌株,阴沟肠杆菌 029M 为产 AmpC 酶质控菌株。均购自卫生部临检中心。

1.1.3 培养基 麦康凯平板、血平板、MH 平板均购自杭州天和微生物试剂有限公司,药敏纸片头孢西丁、美罗培南、头孢吡肟、替卡西林/克拉维酸、头孢曲松、氨曲南、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸纸片为英国 OXOID 公司产品。API 鉴定编码条购于法国生物梅里埃公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成,Taq 酶、dNTP 等购于上海生工生物工程有限公司。

1.1.4 主要仪器 法国梅里埃全自动微生物分析仪 Vitek II、杭州博日科技有限公司 TC-25/H 型 PCR 扩增仪、伯乐凝胶成像系统、TE-HER 电热恒温孵育箱、Minispin 高速离心机、上海沪西分析仪器厂 NH-3 型微型漩涡混合仪、MyGenie96 Thermal Block PCR 扩增仪(BIONEER)。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感性试验 采用纸片扩散(K-B)法,试验方法与结果判读按美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) 2009 版规定。

1.2.2 ESBLs 测定法 按 2009 年 CLSI 推荐的确证试验测定 ESBLs,将被测菌株接种于 MH 平板上,在平板上贴上头孢他啶与头孢他啶/克拉维酸,头孢噻肟及头孢噻肟/克拉维酸纸片,经 35℃ 孵育,任一组药物的抑菌环的直径之差 ≥ 5 mm 时,判定为 ESBLs 阳性。

1.2.3 头孢西丁敏感试验 根据 CLSI 标准,抑菌圈 ≤ 18 mm 提示对头孢西丁中介或耐药者为疑产 AmpC 酶菌株。此为产 AmpC 酶的初步筛选方法。

1.2.4 PCR 法检测 AmpC 酶基因 制备模板:煮沸法提取细菌 DNA,在 1.5 ml EP 管中加入 200 μ l 灭菌去离子水,刮取新鲜菌苔一环置管中,充分混匀,于 100℃ 沸水中煮沸 20 min,以离心半径 6 cm,12

000 r/min 离心 5 min,吸取 100 μ l 上清液作为模板,-20℃ 保存备用。

引物序列:根据文献^[2,3]报道,确定 AmpC 酶引物序列 AmpC F:5'-CGACAGCAGGTGGAT-3';R:5'-GGTTAAGGTTGGCATG-3',产物长度为 510 bp。反应体系:共 20 μ l。其中 10 $\times$ buffer 2.0 μ l、dNTP 1.0 μ l、Mg²⁺ 1.2 μ l、每条引物各 1.5 μ l、TaqDNA 酶 0.7 μ l、ddH₂O 10.6 μ l、模板 1.5 μ l。反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 50 s,以上三步循环 30 个周期,延伸 72℃ 7 min。所得产物 4℃ 保存。

电泳成像:取 7 μ l PCR 产物与 2 μ l Loading Buffer 充分混匀,加入含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶的加样孔中,电压为 130 V,电泳 40 min,在凝胶成像系统观察成像。

2 结果

2.1 药物敏感试验结果 49 株阴沟肠杆菌的抗生素敏感试验显示头孢西丁、美罗培南、头孢吡肟、替卡西林/克拉维酸、头孢曲松、氨曲南、头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦的耐药率分别为 93.9%、8.2%、46.9%、79.6%、79.6%、81.6%、65.3%、49.0%。对美罗培南敏感率最高,达 91.8%。结果见表 1。

表 1 49 株阴沟肠杆菌药物敏感试验结果[n(%)]

抗菌药物	耐药率	中介	敏感率
头孢西丁	46(93.9)	0(0.0)	3(6.1)
美罗培南	4(8.2)	0(0.0)	45(91.8)
头孢吡肟	23(46.9)	6(12.2)	20(40.8)
替卡西林/克拉维酸	39(79.6)	0(0.0)	10(20.4)
头孢曲松	39(79.6)	2(4.1)	8(16.3)
氨曲南	40(81.6)	1(2.0)	8(16.3)
头孢他啶	32(65.3)	6(12.2)	11(22.4)
哌拉西林/他唑巴坦	24(49.0)	14(28.6)	11(22.4)

2.2 ESBLs 阳性菌株的检出率 49 株阴沟肠杆菌经 ESBLs 确证试验共检出产 ESBLs 菌株 29 株,检出率为 59.2%。其中有 13 株(26.5%)同时检出 AmpC 酶。

2.3 产 AmpC 酶菌株的检出率 49 株受试菌经表型筛选有 46 株疑为产 AmpC 酶菌株,筛选阳性率为 93.9%。经 PCR 扩增 AmpC 酶阳性菌株为 36 株,占 73.5%。见图 1。

3 讨论

阴沟肠杆菌属条件致病菌,是医院感染的常见病原菌,可引起泌尿道感染、呼吸道感染等机体多部位感染,在医院感染中占有重要地位。阴沟肠杆菌是

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 - + 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 M 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46

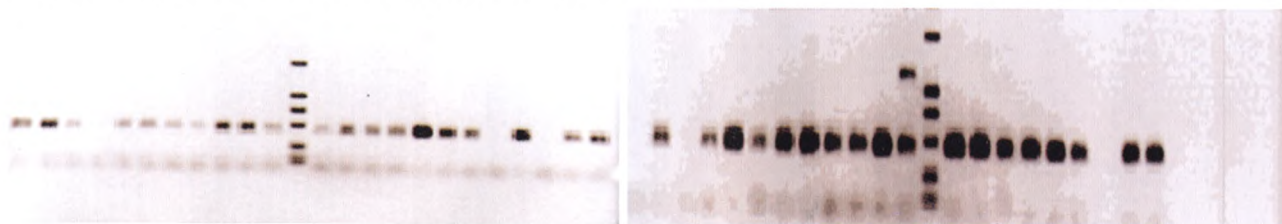


图 1 AmpC 酶 PCR 电泳图

注:M 为相对分子质量 2000 bp Marker, 从上至下 Marker 条带依次为 2000 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp。1 号标本为阳性对照, -, + 分别为阴性和阳性对照。阳性结果为: 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42

产 ESBLs 和 AmpC 酶的主要菌种, 也是其对第一、二、三代头孢菌素耐药的主要原因。AmpC 酶是由染色体或质粒介导的革兰阴性杆菌产生的一类 β -内酰胺酶, 属 Ambler 分类中 C 类酶, Bush 分类中 I 类酶。AmpC 酶可水解三代头孢菌素而不被 β -内酰胺酶抑制剂所抑制。ESBLs 是一种丝氨酸蛋白酶, 主要由质粒介导, 少部分由染色体介导, 该酶能够灭活三代头孢菌素和氨基糖苷类等抗菌药物, 能够被克拉维酸所抑制。

目前, 美国 CLSI 对阴沟肠杆菌 AmpC 酶的检测尚无统一的方法。除了表型检测方法采用三维试验以外, 较为公认的是分子生物学方法确证。本文研究采用的是分子生物学方法确证。

ESBLs 和 AmpC 酶在不同地区、不同医院之间有着明显的差异, 在西安地区阴沟肠杆菌 ESBLs 的检出率为 24.03%, AmpC 酶的检出率为 27.92%^[4]; 在浙江地区阴沟肠杆菌中 ESBLs 的检出率为 68.2%, AmpC 酶的检出率为 29.5%^[5]。本文研究检测的 49 株阴沟肠杆菌, AmpC 酶的检出率为 73.5%, 产 ESBLs 检出率为 59.2%, 同时产两种酶的检出率为 26.5%。分析不同地区检测结果的差异性, 可能与不同的检测方法以及不同地区抗菌药物的使用习惯不同有关。

本文研究结果显示, 阴沟肠杆菌对美罗培南敏感率最高, 达 91.8%, 与王辉等^[6]报道的阴沟肠杆菌体外药敏试验敏感度最好的药物是美罗培南

(95.0%) 基本相符。由表 1 可见, 阴沟肠杆菌对头孢西丁、替卡西林/克拉维酸、氨曲南、头孢曲松耐药率分别高达 93.9%、79.6%、81.6%、79.6%, 分析原因主要由本地区阴沟肠杆菌 ESBLs 和 AmpC 酶检出率高造成, 可能和本地区三代头孢菌素使用较早、较普遍有关系。

本文研究结果提示, 治疗产 ESBLs 和 AmpC 酶的阴沟肠杆菌感染, 应首选碳青霉烯类药物。临床上应根据正确的药敏试验结果合理使用抗生素, 避免因滥用抗菌药物而造成多重耐药菌株的出现, 给临床治疗带来困难。

4 参考文献

- 1 马均宝, 赖胜华, 崔东岚, 等. 各类抗生素对阴沟肠杆菌的抗菌活性分析. 国际检验医学杂志, 2006, 27: 781-786.
- 2 Jones RN. Important and emerging β -lactamase-mediated resistance in hospital-based pathogens: the AmpC enzymes. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998, 31: 461-466.
- 3 Petrosino JF, Pendleton AR, Weiner JH, et al. Chromosomal system for studying AmpC-mediated β -lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 1535-1539.
- 4 耿燕, 张王刚, 王香玲, 等. 阴沟肠杆菌高产 AmpC 和 ESBLs 的检测及耐药性研究. 实用医技杂志, 2007, 14: 1089.
- 5 周铁丽, 陈莉莉, 潘饮石, 等. 革兰阴性杆菌中 ESBLs 和 AmpC 酶的检测与分析. 温州医学院学报, 2003, 33: 386.
- 6 王辉, 陈民钧. 1994-2001 年中国重症监护病房革兰阴性菌耐药性研究. 中国医学论坛报, 2003, 83: 385-390.

(收稿日期: 2011-10-21)

(本文编辑: 杨军)