

革兰阴性杆菌产超广谱 β -内酰胺酶头孢菌素酶状况及耐药性研究

唐劲松(广州医学院检验系/东莞市大朗医院检验科 523770)

【摘要】 目的 了解本院目前常见的革兰阴性杆菌菌种分布及产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和头孢菌素酶(AmpC)情况,分析产酶菌耐药谱特征。**方法** 用法国生物梅里埃公司的 VITEK-2 细菌鉴定与药敏系统对革兰阴性杆菌进行鉴定,对可疑产 ESBLs、AmpC 的菌株,用标准纸片扩散法和三维试验法进行两种酶的表型确证,再用纸片扩散法行药物敏感性检测。**结果** 检出单产 ESBLs、单产 AmpC、同时产 ESBLs 和 AmpC 的细菌分别为 175 株(43.8%)、54 株(13.5%)和 28 株(7.0%)。ESBLs 检出率以肺炎克雷伯菌最高,为 60.3%;AmpC 检出率在阴沟肠杆菌中最高,为 46.7%。单产 ESBLs 菌株对亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦以及哌拉西林/三唑巴坦的敏感性较高,耐药率分别为 2.3%、26.3%和 33.1%;单产 AmpC 菌株对亚胺培南和头孢吡肟具有较高的敏感性,耐药率分别为 3.7%和 29.6%;同时产 AmpC 和 ESBLs 的菌株仅对亚胺培南敏感,未发现耐药株。**结论** 革兰阴性杆菌产 ESBLs、AmpC 率较高,该类菌对大多数新型广谱 β -内酰胺类抗生素耐药,对亚胺培南敏感。

【关键词】 革兰阴性杆菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 头孢菌素酶; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.07.016 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)07-0804-03

Study on antimicrobial resistance and detection of extended-spectrum β -lactamases-producing and AmpC producing strains in Gram-negative bacilli TANG Jing-song (Department of Laboratory, Guangzhou Medical College, Department of Laboratory, Dongguan Dalang Hospital, Guangdong 523770, China)

【Abstract】 Objective To investigate the strains distribution of common Gram-bacterial bacilli and the prevalence of extended-spectrum β -lactamases(ESBLs) and AmpC-producing Gram-negative bacteria from our hospital, and to analyze their characteristics of drug resistance spectra. **Methods** Gram-negative bacteria were identified with VITEK-2 and the drug sensitivity system, suspected ESBLs-isolates were identified with the method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standard(NCCLS). AmpC-producing and AmpC-producing combined with ESBLs-producing strains were detected by three-dimensional test. The antimicrobial susceptibility of AmpC-producing and ESBLs-producing strains were detected by Kirby-Bauer methods. **Results** ESBLs, AmpC-producing and AmpC-producing combined with ESBLs-producing strains were found in 175 strains (43.8%), 54 strains (13.5%) and 28 strains (7.0%) respectively. Among ESBLs-producing strains, the most common isolates were *Klebsiella pneumoniae* (60.3%) and *Escherichia coli* (49.2%). The most common AmpC-producing strains was *Enterobacter cloacae* (46.7%). The AmpC-producing strains were more susceptible to imipenem and cefepime, its resistant rates were 3.7% and 29.6% respectively. The resistant rates of ESBLs-producing strains to imipenem, cefoperazone/sulbactam piperacillin/sulbactam and were 2.3%, 26.3% and 29.6% respectively. AmpC-producing combined with ESBLs-producing strains were only sensitive to imipenem, imipenem-resistant strain was not found. **Conclusion** ESBLs-producing and AmpC-producing gram-negative strains are common in clinical isolates from hospital, and resistant to the majority of new broad spectrum β -lactamas, but sensitive to imipenem.

【Key words】 gram-negative bacteria; extended-spectrum β -lactamases; AmpC-producing; drug resistance

近年来,随着 β -内酰胺类抗生素,尤其是头孢菌素的广泛应用,革兰阴性杆菌产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和头孢菌素酶(AmpC)率越来越高,并出现了持续高产 AmpC 和质粒介导的 AmpC,导致耐药菌株广泛传播和临床对该类细菌感染的治疗困难。ESBLs 和 AmpC 酶是介导革兰阴性杆菌耐药最主要的两种酶,均能水解第 3 代头孢。但两者又有重要的区别,ESBLs 可被内酰胺酶抑制剂所抑制,但不被氯唑西林抑制,且部分产 ESBLs 菌对头孢西丁敏感;而 AmpC 酶则不被内酰胺酶抑制剂所抑制,可被氯唑西林等抑制剂所抑制,产酶菌对头孢西丁耐药^[1]。因此,准确检测和区分这两类酶,对临床选择用

药有重要意义。为了解本院革兰阴性杆菌菌种分布及产 ESBL、AmpC 的情况及产酶菌株的耐药性,为临床提供用药依据,现对本院 2011 年 7~10 月 400 株革兰阴性杆菌进行检测分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2011 年 7~10 月本院检验科微生物室鉴定为革兰阴性杆菌的菌株 400 株,收集过程连续且无重复,同一患者多次送检时,取首次分离到的敏感株或耐药株。

1.1.2 质控菌株 阴沟肠杆菌 029M 作为持续高产 AmpC 阳

性对照,肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 作为 AmpC 阴性对照;大肠埃希菌 ATCC 25922 作为 ESBLs 阴性对照;肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 作为 ESBLs 阳性对照。

1.1.3 仪器与试剂 VITEK-2 全自动细菌鉴定与药敏仪及相应的革兰阴性杆菌鉴定卡为法国梅里埃公司产品。

1.1.4 药敏纸片及培养基 阿莫西林、哌拉西林、头孢呋辛、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、头孢西丁、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、阿米卡星、环丙沙星、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/三唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦等药敏纸片来自杭州天和微生物试剂有限公司,M-H 琼脂由江门市凯林有限公司提供。三维试验用药品邻氯西林、三唑巴坦钠为美国 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定 所有分离株均由检验科微生物室从临床送检标本中分离,再用 VITEK-2 自动细菌鉴定与药敏系统对这些菌株进行鉴定。

1.2.2 ESBLs 表型筛选与确认试验 根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)规则,采用 ESBLs 检测的初筛及确证试验。通过头孢他啶、头孢噻肟及其与酶抑制剂克拉维酸的联合制剂对待检菌的抑制作用进行测定,当头孢他啶/克拉维酸

与头孢他啶抑菌圈直径差值大于或等于 5 mm 或头孢噻肟/克拉维酸与头孢噻肟抑菌圈直径差值大于或等于 5 mm 时,判定为 ESBLs 阳性。

1.2.3 AmpC 表型筛选与确认试验 初筛采用纸片扩散法,用头孢西丁(FOX)纸片检测受试菌株,根据 NCCLS 标准,抑菌圈直径小于或等于 17 mm 提示对 FOX 中介或耐药者为疑产 AmpC 菌株。确证试验参照张永标等^[2]报道的酶提取物三维试验方法进行。

1.2.4 同时产 AmpC 和 ESBLs 菌株检测 参照张永标等^[2]报道的方法进行。

1.2.5 药敏试验 采用纸片扩散法进行药敏试验,结果判读按照 NCCLS M100-S15 文件(2005 年版)推荐的标准进行。

2 结 果

2.1 400 株革兰阴性杆菌中共分离出 7 个属 10 种菌,其中前 5 位是大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌,见表 1。

2.2 400 株革兰阴性杆菌产 ESBLs 和 AmpC 情况见表 2。

2.3 产 AmpC 和 ESBLs 菌株的耐药情况见表 3。

表 1 标本类型与菌种分布(n)

标本类型	大肠埃希菌	肺炎克雷伯菌	铜绿假单胞菌	阴沟肠杆菌	鲍曼不动杆菌	其他杆菌	合计[n(%)]
痰液咽拭	61	90	33	15	14	12	225(56.3)
分泌物	23	15	10	4	4	6	62(15.5)
脓液	16	11	4	3	2	4	40(10.0)
尿液	22	2	1	3	1	3	32(8.0)
血	1	1	0	0	0	1	3(0.75)
其他	9	7	8	5	3	6	38(9.5)
合计[n(%)]	132(33.0)	126(31.5)	56(14.0)	30(7.5)	24(6.0)	32(8.0)	400(100.0)

表 2 400 株革兰阴性杆菌产 ESBLs 和 AmpC 情况[n(%)]

菌名	株数	产 ESBLs	产 AmpC	产 ESBLs+ AmpC
大肠埃希菌	132	65(49.2)	9(6.8)	9(6.8)
肺炎克雷伯菌	126	76(60.3)	14(11.1)	15(11.9)
铜绿假单胞菌	56	7(12.5)	6(10.7)	0(0.0)
阴沟肠杆菌	30	11(36.7)	14(46.7)	4(13.3)
鲍曼不动杆菌	24	10(41.7)	8(33.3)	0(0.0)
其他杆菌	32	6(18.8)	3(9.9)	0(0.0)
合计	400	175(43.8)	54(13.5)	28(7.5)

续表 3 480 株产 ESBLs 和 AmpC 酶菌株的耐药率(%)

抗生素	产 ESBLs 株 (n=175)	产 AmpC 株 (n=54)	AmpC+ ESBLs 株 (n=28)
头孢哌酮	98.3	94.4	100.0
头孢噻肟	100.0	100.0	100.0
头孢他啶	51.4	68.5	73.3
头孢西丁	52.0	100.0	100.0
头孢吡肟	56.0	29.6	70.0
氨曲南	92.0	88.9	100.0
亚胺培南	2.3	3.7	0.0
阿米卡星	57.7	68.5	66.7
环丙沙星	42.9	57.4	66.7
阿莫西林/克拉维酸	100.0	100.0	100.0
哌拉西林/三唑巴坦	33.1	53.7	76.7
头孢哌酮/舒巴坦	26.3	50.0	76.7

表 3 480 株产 ESBLs 和 AmpC 菌株的耐药率(%)

抗生素	产 ESBLs 株 (n=175)	产 AmpC 株 (n=54)	AmpC+ ESBLs 株 (n=30)
阿莫西林	100.0	100.0	100.0
哌拉西林	100.0	100.0	100.0
头孢呋辛	100.0	100.0	100.0

3 讨 论

3.1 革兰阴性杆菌的耐药机制 革兰阴性杆菌是目前细菌感

染主要的感染病原菌,在抗生素长期选择压力下表现出较高的耐药性,给临床抗感染治疗带来困难。研究显示,革兰阴性杆菌对内酰胺酶类抗生素耐药的主要机制为:(1)产生各种 β -内酰胺酶与药物 β -内酰胺环反应,水解抗生素;(2)钝化酶产生,使抗生素失活;(3)青霉素结合蛋白(PBPs)改变,导致对抗生素的亲和力下降;(4)细菌与抗生素结合靶位改变,使细菌与抗生素不易结合;(5)外膜蛋白减少,细菌外膜通透性下降;(6)外排泵作用,使菌体内的药物浓度不足以发挥抗菌作用;(7)生物膜的形成等^[3]。其中各种 β -内酰胺酶的产生为革兰阴性杆菌耐药的最主要机制。

3.2 β -内酰胺酶 β -内酰胺酶是由多种酶组成的酶家族,能水解酰胺类抗生素。这些酶基因存在于细菌的染色体或质粒上。根据 BUSH 分类法^[4], β -内酰胺酶按照各自的底物和对 β -内酰胺酶抑制剂的反应分为 4 组。ESBLs 属于第 II 组,绝大多数是 TEM-1、TEM-2 和 SHV-1 酶基因突变而来,其特点为水解青霉素类、头孢菌素类及单环类抗生素,同时多数产 ESBLs 菌株还耐氨基糖苷类、喹诺酮类及磺胺类,因其作用底物广泛被称作 ESBLs,此类细菌多由质粒介导耐药,易在同种或不同种细菌之间借助质粒传递其耐药性。AmpC 属于 BUSH 分类中的第 I 组,是一组头孢菌素酶,不被克拉维酸及乙二胺四乙酸(EDTA)抑制,由染色体及质粒介导,AmpC 对第 3 代头孢菌素及单环类抗生素氨基曲南有水解灭活作用,因此其产生菌可对第 3 代头孢菌素耐药而使临床抗感染治疗失败。ESBLs 和 AmpC 的水解底物存在一定差异,从而导致其产酶菌耐药谱的不同。产 ESBLs 株多数对头霉素类敏感,产 AmpC 株则耐药;前者对第 4 代头孢菌素头孢吡肟部分耐药,后者大多数对其敏感;ESBLs 多可被克拉维酸、舒巴坦和三唑巴坦抑制,而这些酶抑制剂一般不能抑制 AmpC^[5-6]。因此,准确检测和区分这两类酶,为临床提供合理使用抗生素依据,对临床选择用药有重要意义。

本研究结果显示,ESBLs 的检出率以肺炎克雷伯菌最高,高达 72.2%(91/126),其次为大肠埃希菌,为 56.1%(74/132),表明 ESBLs 仍是介导这两种细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要因素。AmpC 在阴沟肠杆菌中的检出率最高,检出率高达 60.0%(18/30),这与阴沟肠杆菌 AmpD 基因有较高的突变率,导致其去阻遏持续高水平表达 AmpC 有关^[5-6]。研究结果显示,鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌产 ESBLs 和 AmpC 菌的检出率分别为 75.0%(18/24)和 23.2%(13/56),提示假单胞菌属细菌产 β -内酰胺水解酶也是其耐药性产生的重要机制。但是部分假单胞菌属细菌可以屏蔽广谱 β -内酰胺水解酶的表型特征,因此 ESBLs 表型筛选与确认试验用于假单胞菌属细菌产 ESBLs 的检测可能会低估了该类菌的产酶率^[5-6]。

本研究还检测到了 28 株同时产 ESBLs 和 AmpC 菌株,其中肺炎克雷伯菌 15 株、大肠埃希菌 9 株、阴沟肠杆菌 4 株,提示 β -内酰胺酶耐药基因在抗生素选择压力下的聚集整合现象。药敏结果显示,无论是单产 ESBLs 还是单产 AmpC 的菌株,对

广谱青霉素类和前 3 代头孢菌素及单环 β -内酰胺类抗生素均高度耐药。单产 ESBLs 菌株对碳青霉烯类抗生素(亚胺培南)敏感,对头霉素类、氨基糖苷类抗生素、喹诺酮类抗生素及酶抑制剂复合制剂部分耐药,这是由于产酶菌株在携带 ESBLs 的质粒上往往同时携带有对氨基糖苷类和喹诺酮类等抗生素的耐药基因,部分产 ESBLs 菌株对头孢他啶敏感,与我国流行菌株 ESBLs 基因型以 CTX-M-G1 型为主有关^[7];单产 AmpC 菌株对第 4 代头孢菌素和碳青霉烯类抗生素较为敏感,对酶抑制剂复合制剂敏感度不高,这与 AmpC 酶水解特征基本一致。而同时产 AmpC 和 ESBLs 的菌株仅对碳青霉烯类抗生素敏感,碳青霉烯类抗生素作为最广抗菌谱的药物,几乎对所有由质粒或染色体介导的 β -内酰胺酶敏感,但药敏结果显示 3 株嗜麦芽窄食单胞菌对亚胺培南天然耐药,同时有 2 株产 ESBLs 菌株铜绿假单胞菌对其耐药,这可能与铜绿假单胞菌同时产金属 β -内酰胺酶,导致菌体缺失外膜蛋白 D2 对亚胺培南耐药有关^[8];而且据报道铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药率越来越高,这必须引起足够的重视^[9]。因此临床上应重视微生物学鉴定与药敏结果,为合理选择抗生素提供依据。

参考文献

- [1] 袁海燕.肺炎克雷伯菌产 ESBL 和 AmpC 酶的检测及耐药性分析[J].西部医学杂志,2010,3(22):542-543.
- [2] 张永标,张扣兴,唐英春,等.下呼吸道感染细菌产 AmpC 酶和超广谱 β -内酰胺酶的检测[J].中国抗感染化疗杂志,2003,3(4):220-222.
- [3] 倪语星,尚红.临床微生物学和检验[M].4 版.人民卫生出版社,2007:530-533.
- [4] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995,39(6):1211-1233.
- [5] Macgowan AP. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(Suppl 2):105-114.
- [6] 彭少华,金正江,罗兰,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌致医院感染危险因素的患者对照研究[J].中华流行病学杂志,2005,26(7):511-515.
- [7] 孙宏莉,宁永忠,廖康,等.全国 10 所教学医院产 ESBLs 和质粒 AmpC 酶大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌的研究[J].中国感染与化疗杂志,2007,10(7):323-328.
- [8] 赵羽,夏梦岩.156 株铜绿假单胞菌感染分布及耐药性分析[J].解放军医药杂志,2011,4(2):39-41.
- [9] 孔阳英.铜绿假单胞菌医院感染的耐药性分析[J].检验医学与临床,2011,8(9):1064-1065.

(收稿日期:2011-11-27)