

我院2012年10月—2013年3月革兰阴性杆菌产ESBLs和AmpC酶检测及耐药性分析

闫丽娜^{1*}, 吴晓松^{2#}, 黄珈雯², 余广超²(1. 暨南大学药学院, 广州 510630; 2. 暨南大学附属第一医院, 广州 510630)

中图分类号 R378.2; R446.5; R969.3

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2014)10-0896-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.10.12

摘要 目的: 了解我院产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和头孢菌素酶(AmpC)革兰阴性杆菌的耐药性, 为临床合理用药提供参考。方法: 收集我院2012年10月—2013年3月临床分离出的革兰阴性杆菌。用头孢硝噻吩纸片检测革兰阴性杆菌产 β -内酰胺酶情况, 双纸片法检测产ESBLs情况, 头孢西丁三维试验检测产AmpC酶情况, 以确定产酶表型。用K-B法进行药敏检测。结果: 103株革兰阴性杆菌中, 单产AmpC酶菌42株(40.8%), 单产ESBLs菌21株(20.4%), 同时产ESBLs和AmpC酶菌12株(11.7%)。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对含酶抑制剂复方制剂如哌拉西林/他唑巴坦, 以及碳青霉烯类抗生素亚胺培南和氨基糖苷类抗生素阿米卡星的耐药率均较低。非发酵菌铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌对各抗生素耐药率均较高。结论: 各革兰阴性杆菌产酶菌株对多种抗生素的耐药率较高, 产ESBLs和AmpC酶可能是导致革兰阴性杆菌耐药的主要机制之一。

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

Detection and Drug Resistance Analysis of ESBLs and AmpC Enzyme Producing Gram-negative Bacilli Isolated from Our Hospital during Oct. 2012—Mar. 2013

YAN Li-na¹, WU Xiao-song², HUANG Jia-wen², YU Guang-chao² (1. School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510630, China; 2. The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the drug resistance of ESBLs and AmpC enzyme producing Gram-negative bacilli in our hospital, and to provide reference for rational drug use in the clinic. METHODS: Gram-negative bacilli were isolated from the hospital during Oct. 2012 to Mar. 2013. Nitrocefin paper assay was used to detect the situation of producing β -lactamase Gram-negative bacteria. Double-disk assay was used to detect ESBLs, and cefoxitin three-dimensional test was adopted to detect the emergence of AmpC enzyme in order to determine enzyme phenotype. K-B method was used for susceptibility test. RESULTS: Among 103 Gram-negative bacilli, there were 42 strains producing AmpC enzyme (40.8%), 21 strains producing ESBLs (20.4%), and 12 strains producing ESBLs and AmpC enzyme (11.7%). *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* had low drug resistance to Compound preparation containing enzyme inhibitors as piperacillin/tazobactam, and carbapenem antibiotics as imipenem and aminoglycoside amikacin. The non-fermenting bacteria *P. aeruginosa* and *A. baumannii* had high resistance to each antibiotic. CONCLUSIONS: The most enzyme producing Gram-negative bacilli stains show high drug resistance to various antibiotics. Producing ESBLs and AmpC enzymes may be one of the main causes to antibiotics resistance of Gram-negative bacilli.

KEYWORDS Gram-negative bacilli; ESBLs; AmpC; Drug resistance

大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌是临床常见的革兰阴性杆菌,也是引起感染的主要条件致病菌^[1]。随着抗菌药物的广泛使用,细菌耐药性越来越严重,甚至出现了“超级细菌”^[2],给临床抗感染治疗带来极大挑战。革兰阴性杆菌耐药机制之一是产生了 β -内酰胺酶,包括超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和头孢菌素酶(AmpC)等。为了解革兰阴性杆菌的产酶表型及其耐药性,本研究对我院临床分离的103株革兰阴性杆菌进行了产酶表型筛选及药物敏感性检测,为临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本菌株。收集2012年10月—2013年3月我院临床分

* 硕士研究生。研究方向: 临床药理学。E-mail: yanlina021@126.com

通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 医院药学、药剂学。电话: 020-38688595。E-mail: twxs@jnu.edu.cn

离出的革兰阴性杆菌103株,其中大肠埃希菌22株、肺炎克雷伯菌25株、铜绿假单胞菌16株、鲍曼不动杆菌40株,分别来自痰、血液、引流液、尿液、分泌物等标本,来源科室有呼吸病房、重症监护室、泌尿外科、神经内科等。

1.1.2 质控菌株。金黄色葡萄球菌ATCC 29213、粪肠球菌ATCC 29212分别为产 β -内酰胺酶的阳性和阴性对照;肺炎克雷伯菌ATCC 700603、铜绿假单胞菌ATCC 27853分别为产ESBLs阳性和阴性对照;阴沟肠杆菌029M、大肠埃希菌ATCC 25922分别为产AmpC酶阳性和阴性对照,均为暨南大学附属第一医院惠赠。

1.1.3 药敏纸片。均购自英国Oxoid公司。

1.2 方法

1.2.1 β -内酰胺酶的检测。用头孢硝噻吩纸片检测,取少许菌落到药敏纸片上,红色出现为阳性结果,1 h无颜色改变为阴性。

1.2.2 ESBLs的检测^[3]。根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)2010推荐的产ESBLs的筛选和确证实验方法“双纸片

法”进行检测。按规定将菌株接种于M-H平板,贴抗生素纸片(头孢他啶30 μg、头孢他啶/克拉维酸30 μg/10 μg、头孢噻肟30 μg、头孢噻肟/克拉维酸30 μg/10 μg),35℃培养16~18 h。初筛:头孢他啶抑菌圈直径≤22 mm,头孢噻肟抑菌圈直径≤27 mm判断为可疑产ESBLs;确证:对两个中任何一个药物,加克拉维酸后抑菌圈直径与不加克拉维酸的抑菌圈直径相比,增大值≥5 mm时判定为产ESBLs。

1.2.3 AmpC酶的检测^[1]。初筛:采用头孢西丁纸片药敏试验,将抑菌环直径头孢西丁≤17 mm,头孢他啶≤18 mm或和头孢噻肟/克拉维酸≤22 mm者初筛为可疑产AmpC酶菌株。

头孢西丁三维试验:(1)β-内酰胺酶的提取。将1~2个菌落接于肉汤中,放入35℃恒温摇床中,200 r/min培养6 h,4 000 r/min离心(离心半径13.5 cm,下同)30 min,沉淀反复冻融5次后,加入0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0),4℃12 000 r/min离心60 min,取部分上清液经M-H琼脂平板常规细菌培养阴性后于-20℃保存,备用。(2)确证试验。将大肠埃希菌ATCC 25922制成浊度为0.5麦氏单位的菌悬液,用棉签均匀涂布于M-H平板上,在平皿中央贴一头孢西丁纸片,从距离纸片边缘5 mm处用锥子钻一小孔,在此孔中加入50 μl待测菌株β-内酰胺酶粗提液,35℃过夜培养,若小孔与抑菌圈交接处出现扩大的长菌区,则提示产AmpC酶。

1.2.4 药敏试验。采用K-B法,参照CLSI 2010^[2]文件的标准,判读药敏结果。

1.3 统计方法

采用WHONET 5.0和SPSS 18.0软件进行统计学分析,计数资料采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各菌株产酶情况

103株革兰阴性杆菌产酶情况具体见表1。

表1 革兰阴性杆菌产酶情况

Tab 1 Enzyme emergence of Gram-negative bacteria

菌名	总菌株数	非产酶菌株数	产两种酶		单产ESBLs		单产AmpC酶	
			菌株数	检出率,%	菌株数	检出率,%	菌株数	检出率,%
大肠埃希菌	22	7	1	4.6	12	54.6	2	9.1
肺炎克雷伯菌	25	10	3	12.0	7	28.0	5	20.0
铜绿假单胞菌	16	8	2	12.5	1	6.3	5	31.3
鲍曼不动杆菌	40	3	6	15.0	1	2.5	30	75.0
合计	103	28	12	11.7	21	20.4	42	40.8

2.2 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产酶株与非产酶株的耐药性

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产酶株与非产酶株均对β-内酰胺类抗生素亚胺培南、氨基糖苷类抗生素阿米卡星敏感;肺炎克雷伯菌所有菌株均对美罗培南耐药。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的非产酶株与产酶株对多种抗菌药物的耐药率差异有统计学意义($P<0.05$),详见表2、表3。

2.3 非发酵菌铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌产酶株与非产酶株的耐药性

铜绿假单胞菌产酶株和非产酶株均对头孢曲松耐药;鲍曼不动杆菌对美罗培南全部耐药;铜绿假单胞菌全部菌株均对阿米卡星敏感;单产AmpC酶的铜绿假单胞菌对庆大霉素、妥布霉素和喹诺酮类抗生素环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率均为20%,其他菌株对以上抗生素均敏感。鲍曼不动杆菌和

表2 大肠埃希菌产酶株与非产酶株的耐药率(%)

Tab 2 Drug resistance of *E. coli* enzyme producing and non-enzyme producing strains (%)

药品名称	总菌株耐药率	产两种酶菌株耐药率	单产ESBLs菌株耐药率	单产AmpC酶菌株耐药率	非产酶菌株耐药率
头孢唑林	72.7	100*	91.7*	100*	28.6
头孢呋辛	68.2	100*	83.3*	100*	28.6
头孢美唑	4.6	0	0	50.0*	0
头孢曲松	72.7	100*	91.7*	100*	28.6
头孢吡肟	27.3	0	41.7*	0	0
哌拉西林/他唑巴坦	4.6	0	8.3*	0	0
阿莫西林/克拉维酸	18.2	0*	16.7	50.0*	14.3
头孢哌酮/舒巴坦	4.6	0	8.3*	0	0
环丙沙星	54.6	100*	58.3*	50.0	42.9
左氧氟沙星	54.6	100*	58.3*	50.0	42.9

与非产酶菌株比较: * $P<0.05$

vs. non-enzyme producing strains: * $P<0.05$

表3 肺炎克雷伯菌产酶株与非产酶株的耐药率(%)

Tab 3 Drug resistance of *K. pneumoniae* enzyme producing and non-enzyme producing strains (%)

药品名称	总菌株耐药率	产两种酶菌株耐药率	单产ESBLs菌株耐药率	单产AmpC酶菌株耐药率	非产酶菌株耐药率
头孢唑林	72.0	100*	85.7*	100*	40.0
头孢替坦	24.0	33.3*	0	100*	0
头孢他啶	20.0	0*	28.6	0*	30.0
头孢曲松	64.0	100*	57.1*	100*	40.0
头孢吡肟	32.0	33.3*	14.3	80.0*	20.0
氨基南	52.0	100*	57.1*	40.0	40.0
厄他培南	20.0	33.3*	0	80.0*	0
亚胺培南	8.0	0	0	40.0*	0
哌拉西林/他唑巴坦	20.0	0*	0*	80.0*	10.0
环丙沙星	36.0	66.7*	42.9	0*	40.0
左氧氟沙星	28.0	33.3*	85.7*	0*	40.0
庆大霉素	44.0	33.3*	71.4*	0*	50.0
妥布霉素	32.0	33.3*	14.3	100*	10.0

与非产酶菌株比较: * $P<0.05$

vs. non-enzyme producing strains: * $P<0.05$

铜绿假单胞菌的非产酶株与产酶株对多种抗菌药物的耐药率差异有统计学意义($P<0.05$),详见表4、表5。

表4 铜绿假单胞菌产酶株与非产酶株的耐药率(%)

Tab 4 Drug resistance of *P. aeruginosa* enzyme producing and non-enzyme producing strains (%)

药品名称	总菌株耐药率	产两种酶菌株耐药率	单产ESBLs菌株耐药率	单产AmpC酶菌株耐药率	非产酶菌株耐药率
头孢他啶	18.8	0*	0*	40.0*	12.5
头孢吡肟	12.5	0	0	40.0*	0
亚胺培南	12.5	0*	0*	20.0	12.5
哌拉西林/他唑巴坦	18.8	0*	0*	40.0*	12.5

与非产酶菌株比较: * $P<0.05$

vs. non-enzyme producing strains: * $P<0.05$

3 讨论

革兰阴性杆菌是临床上常见致病菌^[6]。收集的菌株主要来自痰、尿液、血液、分泌物,其中大肠埃希菌主要来自尿液,常见于泌尿系统感染;肺炎克雷伯菌主要来自痰和尿液,分布在泌尿外科、小儿病房及神经内科,可导致消化道、呼吸道、泌尿道等的感染,并可引起危及人类生命的重症感染,如肝

表5 鲍曼不动杆菌产酶株与非产酶株的耐药率(%)

Tab 5 Drug resistance of *A. baumannii* enzyme producing and non-enzyme producing strains(%)

药品名称	总菌株耐药率	产两种酶菌株耐药率	单产ESBLs菌株耐药率	单产AmpC酶菌株耐药率	非产酶菌株耐药率
头孢他啶	90.0	83.3*	100*	93.3*	66.7
头孢曲松	90.0	83.3*	100*	93.3**	66.7
头孢吡肟	90.0	83.3*	100*	93.3*	66.7
亚胺培南	65.0	50.0*	100*	73.3*	0
氨曲南	90.0	83.3*	100*	93.3*	66.7
哌拉西林/他唑巴坦	75.0	83.3*	100*	76.7*	33.3
环丙沙星	90.0	83.3*	100*	93.3*	66.7
左氧氟沙星	67.5	33.3	100*	76.7*	33.3
庆大霉素	85.0	83.3*	100*	90.0*	33.3
妥布霉素	80.0	66.7	100*	80.0*	66.7

与非产酶菌株比较: * $P < 0.05$

vs. non-enzyme producing strains: * $P < 0.05$

脓肿,世界各地也相继报道;铜绿假单胞菌主要来自于痰液,分布在呼吸病房、骨科及神经外科,其感染可发生于人体的任何部位和组织,已成为医院感染重要病原菌;鲍曼不动杆菌主要来自于痰,以重症监护室和呼吸病房常见,属于条件致病菌,具有很强的医院流行性,其耐药问题日益严重。随着抗菌药物种类和数量的增加,细菌在抗生素选择性压力作用下,产生了耐药性,耐药机制包括产生灭活酶、靶位改变、通透性降低等^[6]。细菌产生 β -内酰胺酶是 β -内酰胺类抗生素耐药的主要机制之一,其中ESBLs和AmpC酶成为目前导致革兰阴性杆菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要原因^[7]。

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是产ESBLs的典型菌株,本研究单产ESBLs大肠埃希菌比例最高(54.6%),其次是单产ESBLs肺炎克雷伯菌(28.0%);单产AmpC酶鲍曼不动杆菌比例最高(75.0%),其次为单产AmpC酶铜绿假单胞菌(31.3%);同时产两种酶菌株占有所有菌株的11.7%。

本研究结果显示,大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对含酶抑制剂复方制剂如哌拉西林/他唑巴坦,以及碳青霉烯类抗生素亚胺培南和氨基糖苷类抗生素阿米卡星的耐药率均较低,因此临床对这类细菌导致的感染进行治疗时,可考虑选用上述药物。对于所检测的各类革兰阴性杆菌,产酶菌株对头孢菌素类抗生素的耐药率高于非产酶菌株,而 β -内酰胺类复方制剂对各产酶菌株的耐药率低于头孢菌素类,说明 β -内酰胺酶抑制剂对于产酶菌株具有一定的抑制作用。对于非发酵菌鲍曼不动杆菌,头孢菌素类抗生素耐药率较高,产ESBLs+AmpC酶菌株对抗生素的耐药率高于产ESBLs菌株,说明对于鲍曼不动杆菌,单产AmpC酶和产ESBLs+AmpC酶菌株对多数抗生素的耐药率更高,原因可能是AmpC酶的底物谱比ESBLs更宽,

且对酶抑制剂不敏感^[8]。临床上针对这类细菌可用氨基糖苷类抗生素与 β -内酰胺类抗生素联用,能够有效地抑制细菌,但应注意其不良反应,并定期检查肝肾功能。

本研究结果显示,产ESBLs和AmpC酶可能是导致革兰阴性杆菌耐药的主要因素之一,且产酶种类不同的菌株对抗菌药物的敏感性存在差异。今后若进一步对通过菌株进行产酶亚型的检测,并结合临床用药的病例分析,将对临床抗感染药物治疗方案的选择和优化更有参考价值。

参考文献

- [1] 李文波,卢青云,张玉娟,等. 2009年10月—2012年6月我院ICU患者感染革兰阴性杆菌分布及产酶、耐药相关性分析[J]. 中国药房,2013,24(18):1675.
- [2] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(9):597.
- [3] Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-second informational supplement: M100-S22*[S]. Wayne, PA: CLSI, 2012.
- [4] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(5):1791.
- [5] 高秀清,刘玉媛,马春花. 我院2008—2012年抗菌药物使用量与革兰阴性菌耐药性分析[J]. 中国药房,2013,24(30):2829.
- [6] Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2011, 34(1):75.
- [7] 赵永新,李素敏,张卫群,等. 产生ESBLs和AmpC酶的肠杆菌科细菌检测及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(3):240.
- [8] Li Y, Li Q, Du YZ, et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type AmpC β -lactamase resistance in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4):1317.

(收稿日期:2013-09-05 修回日期:2013-10-17)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅