

• 调查报告 •

医院感染革兰阴性杆菌产 AmpC 酶状况及耐药性检测分析

李文波¹, 刘 琼², 卢青云¹, 高 武¹, 刘丽华¹, 王 沛¹, 张玉娟¹

(1. 甘肃省第二人民医院检验科, 兰州 730000; 2. 甘肃省兰州市城关区医院 730000)

摘要:目的 探讨产头孢菌素酶(AmpC 酶)革兰阴性杆菌医院内感染现状及对药物敏感性的影响。方法 对临床标本进行分离鉴定, 采用 K-B 法对常规药物进行耐药性检测, 采用美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的三维法检测 AmpC 酶。结果 在 331 株革兰阴性杆菌中检出产 AmpC 酶 109 株, 产酶率为 18.4%, 产酶菌株对第 3 代头孢菌素、头霉素类、环丙沙星及含酶抑制剂复合物药物敏感率下降明显, 对亚胺培南、头孢吡肟、丁胺卡那耐药率较低, 分别为 3.28%(2/61)、44.26%(27/61)、31.1%(19/61), 产酶菌株对抗菌药物的耐药率明显高于非产酶菌株。结论 革兰阴性杆菌耐药与产 AmpC 酶有关, 治疗该菌感染应选用亚胺培南、第 4 代头孢菌素等。

关键词:革兰氏阴性菌; 交叉感染; 头孢菌素酶; 抗药性, 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1069-03

Analysis on drug resistance in Gram-negative bacilli producing AmpC enzyme

Li Wenbo¹, Liu qiong², Lu Qingyun¹, Gao Wu¹, Liu Lihua¹, Wang pei¹, Zhang Yujuan¹

(1. Department of Laboratory, the Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. Hospital of Chengguan District, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the nosocomial infection status and drug resistance of Gram-negative bacilli producing cephalosporinase(AmpC enzyme). **Methods** Strains producing AmpC lactamases were detected by three-dimensional extract test. Drug susceptibility was determined by K-B disk diffusions method. **Results** The overall incidence rate of strains positive with AmpC lactamases was 18.4%(109/331). The susceptibility rate of AmpC enzyme positive strains to third-generation cephalosporins, cephamycins, monobactam and antibiotics combined with inhibitors decreased, and relatively lower to Imipenem, Cefepime and Amikacin, with resistance rate of (2/61), 44.26%(27/61) and 31.1%(19/61) respectively. Resistance rates of AmpC enzyme positive strains were obviously greater than those of negative strains. **Conclusion** Drug resistance of Gram-negative bacilli might be associated with AmpC enzyme. Imipenem and forth-generation cephalosporins could be considered firstly for treatment of infection caused by AmpC enzyme positive Gram-negative bacilli.

Key words: gram-negative bacteria; cross infection; cephalosporinase; drug resistance, bacterial

革兰阴性杆菌产生的 β -内酰胺酶(ESBLs 酶)种类繁多, 特性各异, 其中主要为染色体和质粒介导的 I 型头孢菌素酶(AmpC 酶)和 II 型中的超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)。ESBLs 的研究已经深入很久, 临床治疗和 ESBLs 的检测已趋成熟, 美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)两次明确规定了 ESBLs 的检测方法及适应被检测的菌种^[1-2]。但近年来高水平表达染色体介导的以及质粒介导的 AmpC 酶逐渐成为所面临的棘手问题, 由于质粒介导的 AmpC 酶基因可在同种或不同种细菌间广泛播散, 给抗菌治疗带来困难, 已引起广泛重视^[3], 其严重的耐药状况备受关注。不同地区、医院病原菌的多重耐药性不同, 对抗生素的反应不同。为了解本地区革兰阴性杆菌 AmpC 酶耐药情况, 作者对 331 株革兰阴性杆菌的耐药性及 AmpC 酶表达进行了分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 分离 2008 年 10 月至 2010 年 10 月兰州地区引发医院内感染的各类临床标本包括痰液、咽拭子、尿、伤口分泌物及脓汁等。菌种鉴定按第 3 版《临床微生物学和微生物检验》^[4]进行分离鉴定, 并鉴定到种, 共分离菌株 331 株。

1.2 分离及鉴定菌株 从各科患者感染部位采取标本, 接种于血平板、麦康凯平板, 35℃ 孵育 24 h 分纯菌落, 根据革兰染色、生化反应等进行鉴定, 必要时用微生物鉴定仪(法国梅里埃全自动微生物鉴定仪)进行鉴定。鉴定用主要培养基为 O-F

糖管系列(葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、蔗糖、木糖等), 炭末明胶微量管购于兰州荣昌生化试剂厂。

1.3 药敏试验 采用 K-B 法, 药敏试验结果按国际临床实验室标准委员会(CISL)2006 年标准进行判读^[5]。

1.4 抗菌药物纸片 哌拉西林、头孢他啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦、环丙沙星、阿米卡星、泰能、氯霉素、复方新诺明(SXT)、头孢西丁等由杭州天河微生物试剂有限公司提供, 经质控检验合格后使用。

1.5 质控菌株 药敏试验用标准菌株(铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC25922)均购于甘肃省临床检验中心。阴沟肠杆菌为高产 AmpC 酶阳性对照菌, 购于杭州天河微生物试剂有限公司。

1.6 培养基 M-H 培养基购于杭州天河微生物试剂有限公司。

1.7 耐药酶检测(AmpC 酶检测)^[5]

1.7.1 初筛试验 将细菌菌落用生理盐水稀释成 0.5 mm 麦氏浊度, 均匀涂抹于 M-H 平板上, 贴 1 片头孢西丁药敏纸片, 头孢西丁抑菌环直径小于或等于 19 mm 为可疑产 AmpC 酶。

1.7.2 确证试验(三维法) 酶粗提液制备^[5]: 将待测菌放于肉汤中增菌, 接种于 M-H 平板, 置 37℃ 孵育 24 h 后刮取菌落于生理盐水中混匀, -20℃ 反复冻融 5 次, 12 000 r/min(离心半径 6.09 cm)离心 15 min, 取上清液 -20℃ 保存备用。

1.7.3 三维实验^[6] 用刀片在涂抹了质控大肠埃希菌 ATCC25922 的 M-H 平板上切个口,将冻融后菌液滴入刀口中,在其旁边贴头孢西丁药敏纸片 1 张,37℃ 孵育 24 h 后若在其旁边贴头孢西丁药敏纸片边缘出现矢状线既可确定产 AmpC 酶,见图 1。

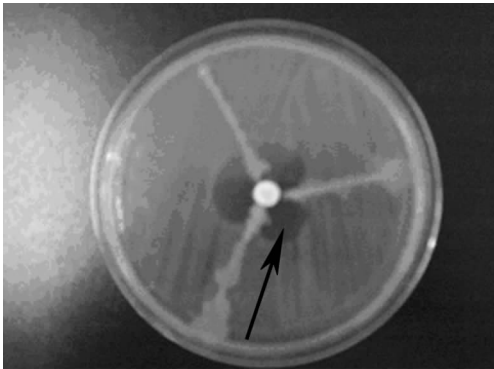


图 1 三维实验产 AmpC 酶平板图(产 AmpC 酶确证试验阳性)

2 结 果

2.1 革兰阴性杆菌产 AmpC 酶检出情况 331 株实验菌株中 109 株对头孢西丁耐药,经三维实验确认 61 株产 AmpC 酶阳性,分离率为 18.4%。各类细菌产 AmpC 酶检出情况,见表 1。

表 1 革兰阴性杆菌产 AmpC 酶检出情况

细菌名称	株数(n)	产 AmpC 酶(n)	构成比(%)
大肠埃希菌	77	0	0.00
肺炎克雷伯菌	46	0	0.00
阴沟肠杆菌	34	16	47.06
铜绿假单胞菌	51	27	52.94
鲍曼不动杆菌	36	16	44.44
产气肠杆菌	49	2	4.08
枸橼酸杆菌属	22	0	0.00
变形杆菌属	16	0	0.00

2.2 革兰阴性杆菌产 AmpC 酶菌株耐药情况 见表 2。

表 2 产 AmpC 酶菌株耐药率(%)

抗菌药物	铜绿假单胞菌(n=51)		鲍曼不动杆菌(n=36)		阴沟肠杆菌(n=34)		产气肠杆菌(n=49)	
	产 AmpC 酶 (n=27)	不产 AmpC 酶 (n=24)	产 AmpC 酶 (n=16)	不产 AmpC 酶 (n=20)	产 AmpC 酶 (n=16)	不产 AmpC 酶 (n=18)	产 AmpC 酶 (n=2)	不产 AmpC 酶 (n=47)
哌拉西林	80.0	50.0	81.3	75.0	80.4	14.4	100.0	14.9
头孢西丁	100.0	38.8	100.0	62.5	100.0	40.0	100.0	0.0
头孢噻肟	85.0	61.1	88.8	66.6	81.3	45.0	100.0	21.3
头孢他啶	78.7	55.5	70.0	50.0	68.7	35.0	100.0	17.0
头孢曲松	80.0	61.1	74.1	66.6	81.3	45.0	100.0	17.0
头孢哌酮	78.7	61.1	88.0	70.1	75.0	50.0	100.0	21.2
头孢吡肟	43.7	27.8	65.0	31.6	37.5	60.0	0.0	0.0
泰能	0.0	0.0	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
头孢哌酮/舒巴坦	100.0	33.3	100.0	25.0	100.0	0.0	100.0	0.0
环丙沙星	62.5	55.5	74.0	48.3	56.3	40.0	50.0	6.3
SXT	81.3	66.6	77.0	62.5	81.2	65.0	100.0	23.4
氯霉素	—	—	100.0	22.5	50.0	10.0	0.0	0.0
丁胺卡那	37.5	11.1	33.3	25.0	25.0	10.0	0.0	0.0

—:表示未测。

3 讨 论

在医院感染性疾病中细菌耐药性问题已日趋严重,其中革兰阴性杆菌引起的耐药性占越来越重要的地位。革兰阴性杆菌产 ESBLs 酶是对β-内酰胺类抗生素耐药的主要机制,β-内酰胺抗生素还可诱导由染色体介导的 AmpC 酶产量大大增加,呈持续高水平表达,其基因可通过转化、接合等方式转移给其他菌种^[7]。随着抗生素广泛应用,临床出现的耐药菌株日益严重,产 AmpC 酶菌对第 3 代头孢菌素、单环类、头霉素等β-内酰胺抗生素耐药,不被酶抑制剂所抑制,因此受到临床广泛重视^[8]。

本研究结果显示,兰州地区 331 株革兰阴性杆菌中产 AmpC 酶率为 18.4%,其中阴沟肠杆菌产 AmpC 酶 16 株,鲍曼不动杆菌 16 株,铜绿假单胞菌 27 株,产气肠杆菌 2 株,鲍曼

不动杆菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌的检出率相对较高,大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属未检出产 AmpC 酶菌,各地区对 AmpC 酶分离率不尽相同,应对所有革兰阴性杆菌进行 AmpC 酶的检测。亚胺培南对革兰阴性杆菌均有较高的抗菌活性,但甘肃省第二人民医院 2008 年发现 2 株耐药菌,均为鲍曼不动杆菌,因此在监测产 AmpC 酶时应密切注视对亚胺培南的耐药情况。本研究 109 株菌对头孢西丁耐药,经确证实验 61 株产 AmpC 酶,细菌一旦产 AmpC 酶,就意味着只能选用第 4 代头孢菌素和亚胺培南,停用第 1、2、3 代头孢菌素及单环内酰胺药物,临床用药相当局限,因此,必须进行确证试验,不能草率报告产酶结果,造成临床治疗失败。

从本研究药敏试验结果看,第 3 代头孢菌素中头孢他啶对不产 AmpC 酶菌的抗菌作用较强,产气肠杆菌对其耐药率为

17.0%，头孢吡肟耐药率为 0.0%，可能是由于易产 ESBLs 酶所致；第 1 代头孢菌素对病原菌抗菌活性较差，目前已不适用于临床经验用药；对于环丙沙星的耐药性，所有铜绿假单胞菌的总耐药率为 60.7% (51/57)、产酶菌株耐药率为 62.5%，不产酶菌株耐药率为 55.5%；鲍曼不动杆菌产酶菌株与不产酶菌株的耐药率分别为 74.0%、48.35%，阴沟肠杆菌产酶菌株与不产酶菌株的耐药率分别为 56.3%、40.0%，显然产 AmpC 酶菌的耐药率高于不产 AMPC 酶菌。本研究未检出产 AMPC 酶的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌属，因此，头孢西丁、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌属菌仍具较高敏感性，但随着头孢西丁的临床使用有报道大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌也出现了耐药，应引起临床高度警惕。高产 AmpC 酶菌对大多数 β -内酰胺类抗生素以及含酶抑制剂药物均高度耐药，对环丙沙星、SXT 有一定耐药性，临床需根据药敏试验结果选用，对丁胺卡那的耐药性较低，均在 40.0% 以下，建议将丁胺卡那用于治疗产 AmpC 酶菌引起的感染。由于铜绿假单胞菌能产生 ESBLs，降解亚胺培南的金属 β -内酰胺酶，同时能够产生对氨基糖苷类抗生素修饰酶而使该类抗生素失活^[9]。因此，在使用亚胺培南、头孢吡肟、丁胺卡那治疗铜绿假单胞菌感染时应慎重。另外经调查产 AmpC 酶菌感染者大多数有严重基础病，而且住院时间较长，在分离菌株前均用过大量 β -内酰胺类抗生素，尤其第 3 代头孢菌素，其对染色体介导 AmpC 酶产生是一种诱导剂，可诱导产生低水平 AmpC 酶，但不直接导致细菌耐药，若使用不当，在药物选择性压力的作用下可筛选出持续高产 AmpC 酶突变株^[9]，长时间使用抗生素是导致高产 AmpC 酶菌感染的主要因素。因此，对存在基础疾病的患者应避免长期使用抗生素。对于产 AmpC 酶菌引起的严重感染，临床可选用碳青霉烯类抗生素治疗，但必须合理使用以延缓耐药性的产生。产 AmpC 酶菌与不产 AmpC 酶菌在耐药性上存在明显

差异，在治疗细菌感染时必须认真进行细菌培养及药敏试验。细菌耐药性发展非常迅速，且分布广泛，重视和开展产 AmpC 酶菌的监测，同时定期对检测结果进行总结，及时与临床联系沟通，为临床合理选用抗生素提供依据，并采取有效措施减少耐药菌株的产生。

参考文献：

- [1] 韩伟,张铁,王春光,等. 大肠埃希菌耐药机制研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(1):51-53.
- [2] Samaha-Kfoury JN, Araj GF. β -内酰胺酶和超广谱 β -内酰胺酶的研究新进展[J]. 英国医学杂志(中文版),2004,7(4):220-224.
- [3] Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 1-11.
- [4] 张卓然. 临床微生物学和微生物检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2000:12.
- [5] CLSI. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational supplement. 2008, 国际临床实验室标准化研究所(1):M100-S11, M2-A7.
- [6] 陈燕,叶英,王谦,等. 质粒介导 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌耐药性和基因型研究[J]. 临床检验杂志,2008,26(1):10-12.
- [7] Stapleton P, Shannon K, Phillips I. The ability of lactam antibiotics to select mutants with derepressed lactamase synthesis from *citrobacter freundii*[J]. Antimicrob Agents Chem Other, 1995, 36:483-496.
- [8] 赵虎,涂婉,方毅,等. 阴沟肠杆菌染色质 AMPD 基因研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(8):769-771.
- [9] 张栋武,方毅,胡记妹,等. 171 例革兰阴性菌感染及其药敏结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(8):697-699.

(收稿日期:2012-01-08)

(上接第 1068 页)

也是接触有机磷农药最常用的生物监测和健康监护指标^[8-9]。本研究对某农药厂工人在本科 3 年的 ChE 检测资料进行了分析,旨在探讨环境条件改变对工人健康的影响。

该厂 2008 年前使用的是旧生产线,厂房设施较陈旧,工人长期慢性接触有机磷农药,身体可能产生了耐受性,本身无有机磷中毒自觉症状^[10]。现场调查中虽然记录显示工作场所空气中农药浓度尚未超过国家规定的卫生标准(0.05 mg/m³),但因设施老化,通风不良,加上工人在操作中有时不带手套,在农药少量泄漏时通过皮肤和呼吸道吸收。2008 年年底更新了生产线,加大、加高了厂房,通风设施功率增加,故 2008 年 ChE 测定均值和异常率与 2009 年、2010 年比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);2009 年与 2010 年比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。而对照组因不直接接触有机磷农药,3 年体检结果比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。因此,有机磷农药生产企业应在生产工艺上力求完善,通风设施应完好,还应加强对生产工人的职业防护教育,以降低职业性慢性有机磷农药中毒发生率,提高生产工人的整体健康水平。

参考文献：

- [1] Repetto R, Baliga SS. Pesticides and the immune system; the public health risks[Z]. World Resources Institute, 1996:17-58.

- [2] Richter E. Organophosphorus Pesticides, A Multinational Epidemiologic Study[Z]. World Health Organization Regional Office for Europe. Copenhagen, 1993:5-55.
- [3] 孙运光,周志俊,顾祖维. 有机磷农药生物标志物研究进展[J]. 劳动医学,2000,17(1):58-60.
- [4] 王吉耀,廖二元,胡品津. 内科学:下册[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.
- [5] 孙东红,赵丽红,周宏东,等. 血液胆碱酯酶活力测定方法的进一步研究[J]. 工业卫生与职业病,1994,20(3):154-157.
- [6] 欧云亭,王汉斌,林华生. 纸片法监测全血胆碱酯酶活性在救治有机磷农药中毒中的指导作用[J]. 临床荟萃,2001,16(22):1038-1039.
- [7] 陈佳,周志俊,顾祖维. 乙酰胆碱酯酶研究进展对更新有机磷毒作用机理的认识[J]. 劳动医学,2001,18(1):55-57.
- [8] WHO. Task Group. Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace[R]. Geneva:WHO,1996:252-262.
- [9] 陈克芳. 快速动态胆碱酯酶活力测定在急性有机磷农药中毒救治中的应用[J]. 中国医学理论与实践,2001,11(8):1038-1039.
- [10] 匡兴亚,周志俊,马欣新,等. 有机磷农药工人酯酶活力特征及基因多态对酶活力的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2006,24(6):333-336.

(收稿日期:2012-01-08)