

• 论 著 •

阴沟肠杆菌高产 AmpC 酶和 ESBLs 的检测及其多重耐药机制的研究*

吴财铭, 粟俊杰, 廖奇峰, 陈志友, 庄 严

(深圳市南山区蛇口人民医院检验科, 广东深圳 518067)

摘要:目的 探讨深圳地区多重耐药阴沟肠杆菌的流行状况及耐药机制。方法 研究者对临床分离 82 株阴沟肠杆菌采用超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)表型确证试验和氟氯西林(FCC)双抑制剂扩散协同试验法(DIDST)分别检测 ESBLs、持续高产 AmpC 酶。结果 从 82 株临床分离的阴沟肠杆菌中, 检出 33 株(占 40.2%)产去阻遏持续高产 AmpC 酶, 25 株(占 30.5%)产 ESBLs, 14 株(占 17.1%)同时表达 AmpC 酶和 ESBLs, 10 株(占 12.2%)两种酶都不表达。结论 高产 AmpC 酶和 ESBLs 是阴沟肠杆菌对头孢菌素耐药的主要机制, 高产 AmpC 酶和 ESBLs 的产生与 β 酰胺类抗菌药物的广泛应用有着直接关系, 临床治疗多重耐药阴沟肠杆菌应首选碳青霉烯类药物。

关键词:阴沟肠杆菌; 多重耐药; β-内酰胺酶; 耐药机制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)12-1718-03

Detection of *Enterobacter cloacae* produced AmpC enzymes and ESBLs and study of its multi-drug resistance mechanism*

Wu Caiming, Li Junjie, Liao Qifeng, Chen Zhiyou, Zhuang Yan

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Shekou People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518067, China)

Abstract: Objective To explore the prevalence and antimicrobial resistance mechanism of multiple drug resistance *Enterobacter cloacae* in ShenZhen region. **Methods** We screened 72 strains of multi resistant strains from 82 strains of *Enterobacter cloacae* isolated from on clinical. And detected extended spectrum beta lactamases (ESBLs) and sustained high AmpC enzyme with ESBLs phenotypic confirmatory test and flucloxacillin (FCC) double inhibitor diffusion synergy test method (DIDST). **Results** In 82 strains of *Enterobacter cloacae* isolated on clinical, 33 strains (40.2%) derepressed Hyperproducing AmpC enzymes, 25 strains (30.5%) produced ESBLs, 14 strains (17.1%) produced AmpC enzyme and ESBLs parallelly, 10 strains (12.2%) didn't express the two enzymes. **Conclusion** High expression of AmpC enzyme and ESBLs is the main mechanism of cephalosporin resistant *Enterobacter cloacae*. High AmpC enzyme and ESBLs production and widely used of beta amide antibacterial drug have a direct relationship. The first choice of treatment of multi drug resistant *Enterobacter cloacae* should be carbapenem.

Key words: *Enterobacter cloacae*; multidrug resistance; beta lactamases; resistance mechanism

阴沟肠杆菌广泛存在于自然界中,在人和动物的粪便、水、泥土、植物中均可检出。是肠道正常菌群之一,但可作为条件致病菌,随着头孢菌素的广泛使用,阴沟肠杆菌成为医院感染的重要病原菌,可引起呼吸道、泌尿道、皮肤软组织等部位感染,甚至引起败血症。由于阴沟肠杆菌产生 ESBLs 和 AmpC 酶情况严重,给临床治疗带来严重挑战。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2011 年 1 月至 2013 年 12 月 3 年来本院临床痰、尿、脓液等标本分离 82 株多重耐药阴沟肠杆菌,标准菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、大肠埃希菌 ATCC35218,肺炎克雷伯菌 700603,标准产酶大肠埃希菌 TEM-12,购于卫生部临床检验中心。E. Cloacae 1194E(高度诱导型)、E. Cloacae 029(普通诱导型)、E. Cloacae 029M(持续高产 AmpC 酶),由北京协和医院徐英春教授惠赠。

1.2 药敏试验 琼脂扩散(K-B)法,药敏纸片:头孢吡新钠(CXM)、头孢曲松(CRO)、头孢哌酮(CFP)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢西丁(FOX)、头孢吡肟(FEP)、氨曲南(ATM)、亚胺培南(IPM)、哌拉西林(PRL)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(CN)、阿米卡星(AK)、头孢哌酮/舒巴坦(CFS)、哌

拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢他啶/克拉维酸(CD02)、头孢噻肟/克拉维酸(CD03)均为英国 Oxoid 产品。

1.3 微生物鉴定系统 采用德国西门子 MicroScan auto SCAN4 微生物自动鉴定/药敏分析系统。

1.4 细菌鉴定和药敏试验 采用德国西门子 MicroScan auto SCAN4 微生物自动系统鉴定,NC50 阴性板和 15 种抗菌药物复合药敏板。按照德国西门子微生物自动鉴定/药敏分析系统操作规定和 NCCLS 标准方法操作。鉴定为阴沟肠杆菌时,发现对头孢他啶、头孢噻肟、氨曲南大于 2 μg/mL,头孢西丁大于 16 μg/mL 的菌株疑为 AmpC 株;头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、氨曲南(ATM)大于 2 μg/mL,头孢西丁小于或等于 8 μg/mL 的菌株疑为 ESBLs 株。

1.5 扩散协同试验 氟氯西林(FCC)双抑制剂扩散协同试验法(DIDST)检测持续高产 AmpC 酶,在 M-H 平板上均匀涂布待检菌株,中央贴一空白纸片,并在其周围 20~25 mm 处贴上头孢他啶(CAZ)、头孢曲松(CRO)、头孢哌酮(CFP)、氨曲南(ATM)、头孢噻肟(CTX)和头孢吡肟(FEP)纸片,再在空白纸片上滴加 10 μg/mL FCC 20 μL,35 °C 孵育 18~24 h。观察纸片之间的抑菌情况。FCC 与任何一种头孢菌素协同为阳性,

* 基金项目:深圳市科技创新委员会基础研究项目(JCYJ20140416143712739)。 作者简介:吴财铭,男,副主任技师,主要从事临床微生物学检验研究。

提示产 AmpC 酶。同时以大肠埃希菌 ATCC25922 作阴性对照,并以 *E. Cloacae* 029M(持续高产 AmpC 酶)作阳性对照。

1.6 ESBLs 表型确证试验 在 M-H 琼脂平皿上按 NCCLS 标准方法接种待检菌,并用 IPM、FEP、CD02、CD03、CTX 5 种纸片进行表型筛选。判断标准:FEP、IPM 表现为敏感,而 CTX、CD02 和 CD03 表现为耐药,或在 CD02、CD03 和 CTX 的抑菌环内存在散在菌落判定为去阻遏持续高产 AmpC 酶;CD03 的抑菌环直径比 CTX 的大 5 mm,或 FEP 与 CD02 间出现协同抗菌判定为产 ESBLs;IPM 敏感而 FEP、CTX、CD02、CD03 均耐药判定为高产 AmpC 酶和 ESBLs 同时存在。并进行 ESBLs 确证试验,头孢他啶(CAZ)、头孢他啶/克拉维酸(CD02)、头孢噻肟(CTX)、头孢噻肟/克拉维酸(CD03)。35℃ 温育 18~24 h 观察结果,两对纸片中的任何一对的抑菌环相差 5 mm 以上,确认为 ESBLs。同时以肺炎克雷伯菌

ATCC700603 作阳性对照。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 菌株表型分布 从 82 株临床分离的阴沟肠杆菌中,检出 33 株(占 40.2%)产去阻遏持续高产 AmpC 酶,25 株(占 30.5%)产 ESBLs,14 株(占 17.1%)同时表达 AmpC 酶和 ESBLs,10 株两种酶都不表达。

2.2 药物敏感试验 14 株同时表达高水平的 AmpC 酶和 ESBLs 的阴沟肠杆菌,除对亚胺培南和哌拉西林/他唑巴坦敏感外,对其他 13 种抗菌药物均为 100% 耐药;仅产 AmpC 酶或 ESBLs 菌株也表现出对 15 种抗抗菌药物不程度的耐药,出现交叉耐药,两种酶都不表达除对头孢吡新钠高度耐药外,对其他抗菌药物表现高度敏感。见表 1。

表 1 高产 AmpC 酶或 ESBLs 阴沟肠杆菌及不产酶菌株对抗菌药物的耐药率

抗菌药物	产 AmpC 酶菌(n=33)		产 ESBLs 菌(n=25)		产 AmpC 和 ESBLs 菌(n=14)		不产酶菌(n=10)		P
	耐药数(n)	耐药率(%)	耐药数(n)	耐药率(%)	耐药数(n)	耐药率(%)	耐药数(n)	耐药率(%)	
CXM	33	100	25	100	14	100	9	90	>0.05
CTX	33	100	25	100	14	100	2	20	<0.01
CAZ	33	100	25	100	14	100	1	10	<0.01
CRO	33	100	25	100	14	100	1	10	0.01
CFP	33	100	25	100	14	100	1	10	<0.01
FEP	6	18	24	96	14	100	0	0	—
ATM	33	100	25	100	14	100	2	20	<0.01
CN	28	83	22	88	14	100	1	10	<0.01
AK	28	83	22	88	14	100	3	30	<0.01
CIP	28	83	21	88	14	100	1	10	<0.01
CFS	33	100	3	12	14	100	0	0	<0.01
TZP	0	0	2	8	2	14	0	0	>0.05
FOX	33	100	11	44	14	100	2	20	<0.01
PRL	33	100	25	100	14	100	1	10	<0.01
IPM	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.05

—:无数据。

3 讨 论

阴沟肠杆菌是医院感染的一种重要条件致病菌,近年来其多重耐药现象十分严重,对常用抗菌药物耐药率逐年上升^[1],在本药敏试验中,除 IPM、FEP 外,对其他 13 种抗菌药物的耐药性均较高。本组试验菌株对 FEP 耐药率为 18%,相对第三代头孢菌素较低,临床对于产 AmpC 酶阴沟肠杆菌可以选用 FEP,但碳青霉烯类抗菌药物如 IPM 对临床分离的阴沟肠杆菌具有高度抗菌活性,未发现耐药株,在治疗多重耐药阴沟肠杆菌的重症感染患者时,仍可作为首选药物,但应慎重使用,以免诱导耐药菌株产生,造成医院播散^[2]。82 株阴沟肠杆菌检出 33 株持续高产 AmpC 酶,检出率为 40.2%,25 株 ESBLs 检出率 30.5%,分别低于有关报道 58.3%、41.8%^[3-4],这可能和本院对第三代头孢类菌素的相对控制使用有关。阴沟肠杆菌对 β -内酰胺类抗菌药物的主要耐药机制是产生 β -内酰胺酶^[5-7],包括 AmpC 酶、ESBLs、碳青霉烯酶(MBL)等。由表 1 可以看出,产酶的阴沟肠杆菌耐药率明显高于不产酶的阴沟肠

杆菌($P < 0.01$),高产 AmpC 酶的菌株对头孢霉素类(头孢西丁)、二、三代头孢菌素和它们的复合制剂(头孢哌酮/舒巴坦)等耐药率为 100%,而对头孢吡肟敏感,其耐药率为 18%;而产 ESBLs 菌株对所有头孢类耐药率均大于 90%,但对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率仅为 12%。两种酶对喹诺酮类和氨基糖甙类耐药均较高(>80%)。对于产 AmpC 酶和 ESBLs 的阴沟肠杆菌,可首选亚胺培南或哌拉西林/他唑巴坦作为经验用药,对不产酶的阴沟肠杆菌可以选用不包括一、二代头孢菌素的任何一种抗菌药物作为经验预防用药。因此临床应用第三代头孢菌素治疗阴沟肠杆菌引起的感染时很容易导致抗菌治疗的失败,根据药敏结果正确地选用抗菌药物至关重要^[8]。

克拉维酸、舒巴坦和三唑巴坦对 ESBLs 具有不同程度的抑制作用,而对 AmpC 酶无抑制作用或抑制效果很弱,所以酶抑制剂复合抗菌药物如头孢哌酮/舒巴坦是治疗产 ESBLs 菌株的经验用药。ESBLs 不能水解头孢霉素类,故头孢西丁可用于治疗产 ESBLs 菌株引起的感染。第四(下转第 1722 页)

2.3.4 失控比对 用自制血清质控品用于甲状腺激素检测 IQC6 个月的应用, 出现失控 4 次: 其中 FT4 出现 1 次 1_{3s} , 是由于试剂过期引起, 更换试剂后重做质控结果在控; TMA 出现 1 次 1_{3s} 和 1 次 R_{4s} , 均是由于定标过期引起, 重新定标后重做质控结果在控; TG 出现 1 次 2_{2s} , 更换质控品后重做质控结果在控。

3 讨论

全自动发光分析仪用于甲状腺激素检测越来越普遍, 其配套的原装进口质控品成本非常昂贵, 而且还常常更换靶值, 对开展日常室内质控工作造成极大不便^[3]。临床实验室每天有大量的患者血清需要废弃, 有研究资料显示采用患者血清自制室内质控品存在来源方便, 成本低廉的优点^[4], 但来自患者血清的甲状腺激素检查项目的自制血清在发光仪器上的应用较少见^[5]。鉴于本院是肿瘤专科医院, 异常的甲状腺激素检查结果比较容易收集, 不存在综合医院制备高水平质控物较难的情况^[6]。同时, 由于临床甲状腺激素检查常常是组合项目, 考虑临界水平的质控品对临床质控的价值更高, 故本实验室尝试采用患者临界值水平血清制做甲状腺激素混合室内质控品。

在临床实验室保证检验结果的措施中, 规范实施统计学室内质量控制是重要的环节, 可有效监测检测系统的人、机、料、环、法各环节因素导致的结果不稳定, 检验科据实际需求和规范要求, 制定切实可行的质量目标, 采取相对应的纠正措施, 可避免出现不能接受的误差, 从而保证临床的质量要求^[7]。本实验结合室内质控和室间质评制定的质量目标, 在运行期间, 6 项甲状腺激素检测指标月均值及累计均值未出现明显变化, 未出现漂移或趋势变化, 每月的 CV 及累计 CV 均在可控范围内, 说明本实验室甲状腺激素检测系统运行中, 精密度性能良好, 检测结果具有良好的可重复性。

通过表 1 和表 2 数据显示, 患者血清来源的自制多项甲状腺激素临界值水平质控血清在观察期内是稳定的^[8], CV 变化均在质控目标内, 且以仪器配套原装进口质控品作为参照, 自制质控品的 s 和变异系数与其接近, 甚至比原装质控品更理想。在两者的配对检验中, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明了两者的相关性良好。

由此可见, 自制甲状腺激素血清质控品质量稳定, 通过选

择合适的质控规则, 可应用于甲状腺激素检测的室内质量控制活动中。同时, 该质控品来源方便, 成本低廉, 不仅为科室节约了成本, 还提供长期的、稳定的、靶值均一的室内质控数据^[9-10]。

在本研究中, 由于经验有限, 对结果的信心不足, 仅仅选择单一浓度水平, 下一步将考虑高、低浓度水平的甲状腺激素质控品; 同时, 由于开展时间短, 没能建立更长效期的稳定性评价体系, 这将在以后的工作中完善。

参考文献

- [1] 向盈, 魏军平. 甲状腺结节诊断方法述评[J]. 医学综述, 2014, 20(4): 679-681.
- [2] 李鼎, 陆云, 刘兴党. 血清 TGA、TMA 复合室内质控血清的制备与应用评价[J]. 放射免疫学杂志, 2012, 25(3): 336-337.
- [3] 戴卉, 钟志敏, 周小棉, 等. 肿瘤标志物质控血清的研制及其初步应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(19): 2557-2558.
- [4] 董莉, 易青, 杜肖彦. 自制质控品在化学发光仪上的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9): 1172-1174.
- [5] 何思春, 王利君, 焦鑫. 质控血清冷冻保存对电化学发光测定甲状腺激素的影响[J]. 检验医学, 2010, 25(4): 321-322.
- [6] 申子瑜, 李萍. 临床实验室管理学误差及允许误差[J]. 检验医学, 2004, 19(1): 6-9.
- [7] Wilson JF. Survey of reference ranges and clinical measurements for psychoactive drugs in serum[J]. Ther Drug Monit, 2003, 25(2): 243-247.
- [8] 钟志敏, 王维, 莫云丹, 等. 自制肿瘤标志物复合质控血清稳定性的研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(15): 1137-1138.
- [9] 陈文虎, 张剑英, 张毅敏, 等. 多项目复合肿瘤标志物冻干质控品的制备[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(6): 559-561.
- [10] 杨悦林, 胡大春, 钱净, 等. 血清肿瘤标志物检测自制质控品的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1): 158-161.

(收稿日期: 2015-02-14)



(上接第 1719 页)

代头孢菌素(头孢吡肟)对 AmpC 酶亲和力较低, 能快速地通过细菌的外膜屏障, 对高产 AmpC 酶菌株具有强大的抗菌活性是治疗高产 AmpC 酶突变株的一线用药。碳青霉烯类药物虽然是 AmpC 酶的强诱导剂, 但由于它对 β -内酰胺酶具有高度的稳定性, 并能通过独特的外膜孔道迅速进入细胞, 是目前治疗同时产 ESBLs 和 AmpC 酶阴沟肠杆菌感染的最可靠的药物。高产 AmpC 酶和 ESBLs 的产生与 β -内酰胺类抗菌药物的广泛应用有着直接关系。因此, 临床医生应提高警惕避免继续使用第三代头孢菌素, 以减少新型耐药菌的出现。

参考文献

- [1] 王凤霞, 胡祎明, 胡志东, 等. 阴沟肠杆菌的耐药性分析及其耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(21): 5128-5130.
- [2] 刘晔华, 王世瑜, 陈锦艳, 等. 831 株阴沟肠杆菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(15): 3759-3761.
- [3] 蒙雨明, 韦柳华, 彭华. 阴沟肠杆菌的感染分布及耐药性分析[J].

中华医院感染学杂志, 2013, 23(17): 4284-4285.

- [4] 张世勇, 胡佳林, 许涛. 106 株阴沟肠杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1519-1520.
- [5] Paterson DL, Bonomo RA. Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 657-659.
- [6] Pai H, Hong JY, Yeon JH, et al. High prevalence of extended spectrum β -lactamase-producing strains among blood isolates of Enterobacter spp. Collected in a tertiary hospital during an 8-year period and their antimicrobial susceptibility patterns[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(8): 3159-3162.
- [7] Moland ES, Hanson ND, Black JA, et al. Prevalence of newer beta-lactamase in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(9): 3318-3322.
- [8] 王凯. 123 株阴沟肠杆菌的临床分布和耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(1): 187-189.

(收稿日期: 2015-03-02)