

阴沟肠杆菌 AmpC 酶的检测及耐药性分析

钟白云, 张运丽, 祝林, 李宪, 刘文恩

(中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008)

[摘要] **目的** 了解某医院阴沟肠杆菌产 AmpC 酶情况及其对 10 种常用抗菌药物的耐药性, 以指导临床合理选择抗菌药物。**方法** 收集该院 2007 年 8 月—2008 年 7 月临床分离的非重复阴沟肠杆菌 98 株, 采用头孢西丁纸片扩散法进行 AmpC 酶初筛, 酶提取物三维试验确证阴沟肠杆菌高产 AmpC 酶, 聚合酶链反应检测 AmpC 酶基因。以 K-B 纸片扩散法进行药敏试验。**结果** 98 株阴沟肠杆菌中有 36 株携带 AmpC 酶, 检出率 36.73%。在 36 株产 AmpC 酶阴沟肠杆菌中, 检测到仅携带 *DHA* 基因株 6 株(16.67%); 仅携带 *ACC* 基因株 20 株(55.56%); 同时携带 *ACC* 和 *MIR* 基因株 8 株(22.22%); 同时携带 *ACC*、*MIR* 和 *FOX* 基因株 2 株(5.56%)。产 AmpC 酶菌株对头孢西丁全部耐药, 对第三代头孢菌素、联合抑酶剂、氨曲南、阿米卡星及环丙沙星均有不同程度耐药(44.44%~91.67%); 对头孢吡肟及亚胺培南较敏感, 耐药率分别为 27.78%、0.00%。**结论** 阴沟肠杆菌 AmpC 酶携带率高, 是导致其对第三代头孢菌素耐药的重要原因; 治疗阴沟肠杆菌感染应以药敏检测结果为依据。

[关键词] 阴沟肠杆菌; AmpC 酶; 三维试验; 聚合酶链反应; 抗药性; 微生物; 抗菌药物

[中图分类号] R378.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)04-0237-04

Detection of AmpC gene and investigation of drug resistance in *Enterobacter cloacae*

ZHONG Bai-yun, ZHANG Yun-li, ZHU Lin, LI Xian, LIU Wen-en (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the AmpC enzyme production in *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) of a hospital, and drug resistance of *E. cloacae* to 10 kinds of commonly used antimicrobials, so as to guide clinical rational choice of antimicrobials. **Methods** Ninety-eight strains of non-repeat clinical isolated *E. cloacae* were collected from the hospital from August 2007 to July 2008, cefoxitin disk diffusion method was used to screen AmpC enzyme, AmpC enzyme of *E. cloacae* was confirmed by enzyme extract three-dimensional high-yield tests, the AmpC enzyme gene was detected with polymerase chain reaction. Resistance of drugs was detected by Kirby-Bauer agar diffusion method. **Results** Among 98 clinical isolated *E. cloacae*, 36 strains produced AmpC β -lactamases, the detection rate was 36.73%. In 36 AmpC-positive strains, 6 only carried *DHA* gene (16.67%); 20 only carried *ACC* gene (55.56%); 8 carried *ACC* and *MIR* gene together (22.22%); 2 carried *ACC*, *MIR* and *FOX* genes together (5.56%). AmpC-positive strains were almost resistant to cefoxitin, and were sensitive to third generation cephalosporins, enzyme inhibitors, aztreonam, amikacin and ciprofloxacin with varying degrees (44.44%~91.67%), but sensitive to cefepime and imipenem, drug resistant rate was 27.78% and 0.00% respectively. **Conclusion** *E. cloacae* carries high rate of AmpC enzyme, which is the main cause of drug-resistance to the third generation cephalosporins, treatment of *E. cloacae* infection should be based on the results of antimicrobial susceptibility test.

[Key words] *Enterobacter cloacae*; AmpC β -lactamases; three-dimensional test; PCR; drug resistance, microbial; antimicrobial agents

[Chin Infect Control, 2009, 8(4): 237-240]

[收稿日期] 2009-04-29

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(06JJ4104)

[作者简介] 钟白云(1970-), 女(汉族), 湖南省邵阳市人, 副主任检验师, 主要从事临床检验医学研究。

[通讯作者] 刘文恩 E-mail: liuwenen@hotmail.com

阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)是医院感染的重要病原菌,常呈现出对抗菌药物的多重耐药而导致难治性医院感染^[1]。AmpC 酶是革兰阴性(G⁻)菌产生的最重要的β-内酰胺酶之一,因其能对第三代头孢菌素、单环类、头霉素类等β-内酰胺类抗菌药物耐药,而且不受临床常用的β-内酰胺酶抑制剂抑制而受到重视^[2]。阴沟肠杆菌是重要的 AmpC 酶高产菌,为了解中南大学湘雅医院高产 AmpC 酶菌株的耐药情况,对分离自门诊和住院患者临床标本的 98 株阴沟肠杆菌进行该酶的检测及其耐药性分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2007 年 8 月—2008 年 7 月中南大学湘雅医院临床微生物室分离的非重复阴沟肠杆菌,共 98 株。细菌的分离鉴定参照《全国临床检验操作规程》第 3 版进行,并采用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 细菌鉴定仪鉴定。标准质控菌株:阴沟肠杆菌 029M 作为 AmpC 酶阳性对照,大肠埃希菌 ATCC 25922 作为阴性对照。阴沟肠杆菌 029M 由北京医院检验科惠赠。

1.1.2 仪器与试剂 VITEK-2 细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司),聚合酶链反应(PCR)扩增仪(英国 HYBAID 公司),电泳仪(Bio-Rad 公司),Tanon GIS-2010 型数码凝胶图像处理系统仪(上海天能公司);M-H 琼脂、胰酶消化大豆肉汤(LB 培养液)为浙江杭州天和微生物公司产品;Premix Taq 酶与 100 bp DNA Marker 购自上海生工生物技术有限公司。

1.1.3 药敏纸片 阿米卡星(AMK, 30 μg)、头孢噻肟(CTX, 30 μg)、头孢他啶(CAZ, 30 μg)、头孢西丁(FOX, 30 μg)、头孢吡肟(FEP, 30 μg)、复方磺胺甲噁唑(SXT, 25 μg)、哌拉西林(PFP, 30 μg)、氨曲南(ATM, 30 μg)、亚胺培南(IPM, 10 μg)、左氟沙星(LVX, 5 μg)、环丙沙星(CIP, 30 μg),均为英国 OXOID 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 AmpC 酶表型筛选试验 采用头孢西丁 K-B 法^[3]。用含 30 μg 头孢西丁的纸片检测菌株,抑菌圈直径≤18 mm 为可疑产 AmpC 酶菌株。

1.2.2 产 AmpC 酶菌株确证试验

1.2.2.1 酶粗提物制备 反复冻融法制备酶粗提

物。将挑取 M-H 琼脂平皿过夜培养的疑产 AmpC 酶菌株数个菌落加入 30 mL 胰酶消化大豆肉汤中 35℃ 恒温摇床 200 r/min 孵育 12~16 h, 4 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 弃上清液, 沉淀中加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0) 1 mL 重悬, 4 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 弃上清液, 旋涡混匀后于 -80℃ 和 37℃ 各 30 min 反复冻融 6 次, 10 000 r/min 4℃ 离心 30 min, 将上清液经滤过膜孔径为 0.22 μm 的细菌过滤器过滤, 滤液即为酶粗提物。取滤液, 经 M-H 琼脂平板常规细菌培养阴性后置 -20℃ 冻存备用。

1.2.2.2 头孢西丁三维试验 参照 Coudron 等^[4]推荐的三维试验方法。将 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌 ATCC 25922 菌液密涂于 M-H 琼脂平板, 稍干后在平板中心贴一片 30 μg/片的头孢西丁纸片。用无菌刀片在离纸片 5 mm 处放射状地切一条狭缝(15 mm×1 mm), 用微量加样器加 25 μL 酶提取液于狭缝内, 避免酶液溢出, 待酶液稍干后置于 35℃ 孵育箱内过夜。若在狭缝与抑菌环的交界处出现扩大的长菌区域, 判为三维试验阳性, 即 AmpC 酶阳性。标准菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 为 AmpC 酶的阴性对照; 阴沟肠杆菌 029M 作为 AmpC 酶的阳性对照。

1.2.3 模板 DNA 的制备 采用煮沸裂解法。挑取纯培养菌落置入含 100 μL 生理盐水的 0.5 mL 离心管内, 95℃ 水浴 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为扩增的模板液。

1.2.4 多重 PCR 检测 AmpC 酶基因 引物设计参照 Perez-Perez 等^[5]的方法, 由上海生工生物技术有限公司合成, 6 对引物及相应扩增片段长度见表 1。PCR 反应体系 25 μL, 包括 Premix Taq 9 μL, 引物 12 μL [10 pmol/L MOX、CIT、DHA、ACC、MIR (ACT-1)、FOX 各 2 μL], 模板 DNA 4 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 64℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 25 个循环; 之后以 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 持续 10 个循环; 最后再 72℃ 延伸 10 min。采用热裂解法提取阴沟肠杆菌 029M 基因组 DNA 作为 AmpC 酶阳性对照菌株, 大肠埃希菌 ATCC 25922 为阴性对照株, 蒸馏水代替模板作为空白对照, 同时进行多重 PCR。

1.2.5 PCR 扩增产物电泳分析 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶(含溴乙锭)电泳, 电压 110 V, 30 min。电泳结果应用 Tanon GIS-2010 型数码凝胶

图像处理系统分析。

表 1 AmpC 酶基因多重 PCR 扩增引物

Table 1 The primers of AmpC enzyme gene in nested polymerase chain reaction

基因类型	引物碱基序列(5'→3')	扩增片段长度 (bp)
MOX	P1:GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT P2:CACATTGACATAGGTGTGGTCC	520
CIT	P1:TGGCCAGAACTGACAGGCAAA P2:TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462
DHA	P1:AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T P2:CGTACGCATACTGGCTTTGC	405
ACC	P1:ACCAGCCTCAGCAGCCGGTTA P2:TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346
MIR (ACT-1)	P1:TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG P2:CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302
FOX	P1:AACATCGGGTATCAGGGAGATG P2:CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190

1.2.6 药敏试验 采用纸片扩散法进行药敏试验,大肠埃希菌 ATCC 25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC 27853 作为药敏试验质控菌株。结果判断参照美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 2008 年的标准进行。

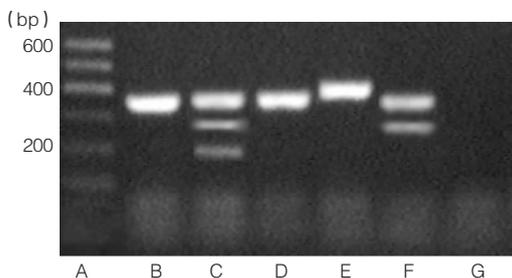
1.2.7 统计方法 采用 SPSS 11.5 软件对数据进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AmpC 酶表型检测结果 98 株阴沟肠杆菌经头孢西丁 K-B 法初步筛选出抑菌圈直径 ≤ 18 mm 的菌株 47 株。继续对这 47 株细菌进行头孢西丁三维试验,其中 36 株受试菌的三维试验为阳性,检出率 36.73%(36/98)。

2.2 多重 PCR 结果 提取 36 株三维试验阳性受试菌的 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增。在 36 株产 AmpC 酶的阴沟肠杆菌中,检测到仅携带 DHA 基因株 6 株 (16.67%); 仅携带 ACC 基因株 20 株 (55.56%); 同时携带 ACC 和 MIR 基因株 8 株 (22.22%); 同时携带 ACC、MIR 和 FOX 基因株 2 株 (5.56%)。阳性对照菌株在约 346 bp 处出现一明亮条带,经反复试验,结果具有很好的重复性,代表性菌株 AmpC 酶基因扩增条带见图 1。

2.3 药敏试验结果 产 AmpC 酶菌对头孢噻肟、头孢吡肟、氨曲南及左氟沙星等抗菌药物的耐药率明显高于非产 AmpC 酶菌,见表 2。



A:DNA marker;B:阳性对照(029M);C:ACC、MIR 及 FOX 基因(23 号菌);D:ACC 基因(6 号菌);E:DHA 基因(11 号菌);F:ACC 及 MIR 基因(35 号菌);G:阴性对照(ATCC 25922)

图 1 多重 PCR 检测 AmpC 酶基因电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of the AmpC enzyme gene by Nested PCR

表 2 产与非产 AmpC 酶菌耐药率比较(耐药株,%)

Table 2 Drug resistant rates between AmpC-positive and AmpC-negative strains (strain, %)

抗菌药物	非产 AmpC 酶菌 (62 株)	产 AmpC 酶菌 (36 株)	χ^2	P
CTX	22(35.48)	33(91.67)	29.19	0.00
CAZ	15(24.19)	30(83.33)	0.77	0.38
PFP	33(53.23)	26(72.22)	3.43	0.06
FEP	6(9.68)	10(27.78)	5.46	0.02
ATM	15(24.19)	23(63.89)	15.12	0.00
AMK	18(29.03)	16(44.44)	2.39	0.12
LVX	15(24.19)	20(55.56)	9.76	0.00
CIP	27(43.55)	22(61.11)	2.81	0.09
IPM	0(0.00)	0(0.00)	0.00	1.00
SXT	30(48.39)	21(58.33)	0.90	0.34

3 讨论

AmpC 酶是由染色体或质粒介导产生的一类 β -内酰胺酶,属 Ambler 分子结构分类法中的 C 类和 B-J-M 功能分类法中的第 I 组。按其产生方式可分为 3 类:诱导高产酶、持续高产酶和持续低产酶。阴沟肠杆菌是最常见的产诱导型 AmpC 酶细菌,是肠杆菌属中最具代表性的菌株,为条件致病菌;近年来成为医院感染的主要病原菌之一,引起的感染逐年增加,并呈现多重耐药性^[6]。本研究通过纸片初筛法、三维确认试验检测临床分离的 98 株阴沟肠杆菌耐药表型,检出产 AmpC 酶菌株 36 株 (36.73%); 低于北京顾怡明等^[7]的研究结果,高于长沙刘建明^[8]的研究结果,分析其原因可能与临床抗菌药物的使用习惯有关。细菌处于第三代头孢菌素的选择压力下,易筛选出持续高产 AmpC 酶突变株,导致耐药菌的传播。

分析本医院产 AmpC 酶阴沟肠杆菌的基因型,

发现其 AmpC 酶基因复杂多样,检测到仅携带 DHA 基因的菌株、仅携带 ACC 基因的菌株、同时携带 ACC 和 MIR 基因的菌株、同时携带 ACC、MIR 和 FOX 基因的菌株 4 种型别。其基因型以 ACC 型为主,与国内很多学者的研究结果一致。有学者对解放军第 98 医院分离的菌株所进行的研究表明^[9],该院阴沟肠杆菌中质粒 AmpC 酶基因阳性率达 81.80%,且以 ACC 基因为主,占 79.50%;本研究与之相比,阳性率相对低,基因型的构成却更加复杂,说明 AmpC 酶基因的流行有明显的地域特征。

药敏结果显示,AmpC 酶阳性菌对第三代头孢菌素头孢噻肟和头孢他啶均已高度耐药。AmpC 酶能够水解灭活第三代头孢菌素和单环 β -内酰胺类抗生素,使产 AmpC 酶细菌对第三代头孢菌素耐药,导致临床治疗无效。第三代头孢菌素是 AmpC 酶的弱诱导剂,所产生的低水平 AmpC 酶不足以导致耐药,如果不正确使用,使细菌处于第三代头孢菌素的选择压力下,易筛选出持续高产 AmpC 酶突变株,并可导致耐药菌的流行。头孢噻肟的耐药率很高,可能与临床医生的用药习惯有关。亚胺培南对产 AmpC 酶菌的敏感率为 100%,目前国内对亚胺培南耐药的肠杆菌科细菌非常少见,因此亚胺培南可用于产 AmpC 酶菌株感染的治疗。这是由于亚胺培南对 β -内酰胺酶具有高度稳定性,与所有 G^- 杆菌的青霉素结合蛋白(PBPs)具有较强的亲和力,同时亚胺培南极易进入细菌的微孔蛋白 D2 通道,从而显示出强大的抗菌活性。因此,在阴沟肠杆菌中及时检测 AmpC 酶,对防止产 AmpC 酶菌的广泛

传播和指导临床合理用药具有重大意义。

[参考文献]

- [1] 李岩,许淑珍,苏建荣,等. 阴沟肠杆菌产超广谱 β -内酰胺酶、AmpC 酶的检测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007,17(12):1586-1589.
- [2] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification for β -lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995,39(6):1211-1214.
- [3] 蒋燕群,倪语星,王坚强,等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒 β -内酰胺酶的筛选[J]. 上海医学检验杂志, 2001,16(1):10-12.
- [4] Coudron P E, Moland E S, Thomson K S. Occurrence and detection of AmpC Beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veterans medical center[J]. J Clin Microbiol, 2000,38(5):1791-1796.
- [5] Perez-Perez F J, Hanson N D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases genes in clinical isolates by using multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6):2053-2162.
- [6] 周强,黄宪章,张文,等. 147 株阴沟肠杆菌 AmpC 酶及 ESBLs 的表型测定[J]. 广东医学,2007,28(9):1444-1446.
- [7] 顾怡明,张杰,俞云松,等. 多重耐药阴沟肠杆菌流行情况及耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志,2004,12(14):1321-1324.
- [8] 刘建明,聂新民,孙圣华,等. 产 AmpC 酶及或产超广谱 β -内酰胺酶的阴沟肠杆菌的检测及耐药性研究[J]. 中国现代医学杂志,2008,18(21):3096-3099.
- [9] 黄支密,仵蕾,糜祖煌,等. 阴沟肠杆菌 β -内酰胺酶基因检测[J]. 东南国防医药, 2005, 7(5): 324-326.
- [10] Roth W K, Marijke M, Detlev P. NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety[J]. Transfusion, 2002, 42(7): 869-872.
- [11] Comanor L, Holland P. Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas[J]. Vox Sanguinis, 2006, 91(1): 1-12.
- [12] Weare J A, Robertson E F, Madsen G, et al. Improvement in the specificity of assays for detection of antibody to hepatitis B core antigen[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(3): 600-604.
- [13] Cheng Y, Dubovoy N, Hayes-Rogers M E, et al. Detection of IgM to hepatitis B core antigen in a reductant containing, chemiluminescence assay[J]. J Immunol Methods, 1999, 230(1-2): 29-35.

(上接第 244 页)

- [7] Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(1): 75-91.
- [8] 叶贤林,曾昭鉴. 乙型肝炎病毒血液核酸筛查进展[J]. 中国输血杂志, 2007, 20(6): 537-540.
- [9] Nantachit N, Thaikruea L, Thongsawat S, et al. Evaluation of a multiplex human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus nucleic acid testing assay to detect viremic blood donors in northern Thailand[J]. Transfusion, 2007, 47(10): 1803-1808.
- [10] Roth W K, Marijke M, Detlev P. NAT for HBV and anti-HBc