

## · 实验研究 ·

呼吸重症监护室常见细菌产 AmpC 酶和超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的检测及耐药性研究

李国保, 李沛, 陆坚

(深圳市第三人民医院, 广东 深圳 518020)

**[摘要]** **目的** 了解呼吸重症监护室(RICU)分离的常见革兰阴性( $G^-$ )耐药菌产 AmpC 酶和超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)情况及其耐药谱特征。**方法** 采用酶提取物三维试验检测单产 AmpC 酶、同时产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株,以美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)表型筛选和确认试验检测单产 ESBLs 菌株,纸片扩散法及 E-test 进行药物敏感性检测。**结果** 检出单产 AmpC 酶、单产 ESBLs、同时产 AmpC 酶和 ESBLs 的细菌分别为 28 株(16.67%)、71 株(42.26%)和 12 株(7.14%)。AmpC 酶检出率在阴沟肠杆菌中最高,为 57.14%;ESBLs 检出率以肺炎克雷伯菌最高,其次为大肠埃希菌,分别为 71.70%和 55.81%。单产 AmpC 酶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 3.57%和 28.57%;单产 ESBLs 菌株对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦及头孢哌酮/舒巴坦的敏感性较高,耐药率分别为 2.82%、32.39%和 25.35%;同时产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株仅对亚胺培南敏感,未发现耐药株。**结论** RICU 常见  $G^-$  耐药菌的 AmpC 酶和 ESBLs 检出率较高,该类菌对大多数新型广谱  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药,对亚胺培南敏感。

**[关键词]** 重症监护室;呼吸系统;医院感染;AmpC 酶;ESBLs;抗药性;微生物;抗菌药物

**[中图分类号]** R378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)04-0271-04

## Study on antimicrobial resistance and detection of AmpC and extended-spectrum $\beta$ -lactamases-producing strains in a respiratory intensive care unit

LI Guo-bao, LI Pei, LU Jian (The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate antimicrobial resistance and the prevalence of AmpC  $\beta$ -lactamases and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases(ESBLs)-producing gram-negative bacteria from specimens of a respiratory intensive care unit(RICU). **Methods** AmpC  $\beta$ -lactamases-producing and AmpC  $\beta$ -lactamases combined with ESBLs-producing strains were detected by three-dimensional test, ESBLs-producing isolates were identified with the method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standard(NCCLS). Antimicrobial susceptibility of AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBLs-producing strains were detected by Kirby-Bauer and E-test methods. **Results** AmpC  $\beta$ -lactamases, ESBLs and AmpC  $\beta$ -lactamases combined with ESBLs-producing strains were found in 28(16.67%), 71 (42.26%)and 12(7.14%) strains respectively. The most common AmpC  $\beta$ -lactamases-producing strains was *Enterobacter cloacae* (57.14%); Among ESBLs-producing strains, the most common isolates were *Klebsiella pneumoniae* (71.70%)and *Escherichia coli* (55.81%). The AmpC  $\beta$ -lactamases-producing strains were more susceptible to imipenem and cefepime, the resistant rate of which was 3.57% and 28.57% respectively. The resistant rate of ESBLs-producing strains to imipenem, piperacillin/tazobactam and cefoperazone/sulbactam was 2.82%, 32.39% and 25.35% respectively. AmpC  $\beta$ -lactamases combined with ESBLs-producing strains were only sensitive to imipenem, imipenem-resistant strain was not found. **Conclusion** AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBLs-producing gram-negative strains are common in clinical isolates from RICU, and resistance to the majority of new broad-spectrum  $\beta$ -lactamas, but sensitive to imipenem.

[收稿日期] 2009-03-06

[基金项目] 广东省自然科学基金(5009113)

[作者简介] 李国保(1965-),男(汉族),河南省内黄县人,副主任医师,主要从事呼吸系统感染性疾病研究。

[通讯作者] 陆坚 E-mail: szlujian@163.net

**[Key words]** intensive care unit; respiratory system; nosocomial infection; AmpC  $\beta$ -lactamases; extended-spectrum  $\beta$ -lactamases; drug resistance, microbial; antimicrobial agents

[Chin Infect Control, 2009, 8(4): 271 - 273, 276]

呼吸重症监护室(RICU)的患者由于基础疾病严重,机体免疫功能低下,易并发各种医院感染。感染病原菌中以革兰阴性( $G^-$ )菌多见,耐药现象严重,给临床感染控制带来严峻挑战<sup>[1-3]</sup>。目前认为, $G^-$ 菌产 AmpC 酶和超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)是导致其对广谱  $\beta$ -内酰胺类抗生素产生耐药性的主要原因<sup>[4-5]</sup>。为了解 RICU 常见感染病原菌的耐药机制,以便为临床合理使用抗菌药物提供依据,我们对 RICU 分离的常见耐药株产 AmpC 酶和 ESBLs 情况进行检测,并对其耐药特点进行分析,现报告如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株来源 临床分离株为 2005 年 10 月—2008 年 10 月从本院 RICU 分离的对第一、二代及 1 种以上第三代头孢菌素耐药的  $G^-$  杆菌(无重复株),分离自不同患者的痰液、血液和尿标本。菌株鉴定采用 VITEK-32 (BioMerieux, 法国)全自动微生物分析仪。

产 AmpC 酶标准株:阴沟肠杆菌 029M(产染色体介导 AmpC 酶)、大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 2919(产质粒介导 ACT-1);产 ESBLs 标准株:肺炎克雷伯菌 CF104(产 TEM-3)、大肠埃希菌 J53 pMG266(产 SHV-18),由美国 Lahey 临床医疗中心 George A Jacoby 教授惠赠。

质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.1.2 试验用品 药敏纸片、硝基噻吩(Nitrocefin)及 M-H 琼脂或肉汤培养基为英国 Oxoid 公司产品;E-test 为瑞典 AB BIODISK 公司产品;三维试验用药品邻氯西林(CLO)、三唑巴坦钠(TZB),为美国 Sigma 公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 药敏试验及最低抑菌浓度(MIC)测定 采用纸片扩散法及 E-test 进行药敏试验及 MIC 值检测,结果判读按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)M100-S15 文件(2005 年版)推荐的标准

进行。

1.2.2 产 AmpC 酶菌株初筛与确证试验 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 $\leq 17$  mm 提示对 FOX 中介或耐药者为疑产 AmpC 酶菌株。确证试验参照张永标等报道的酶提取物三维试验方法<sup>[6]</sup>进行。

1.2.3 同时产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株检测 参照张永标等报道的方法<sup>[6]</sup>进行。

1.2.4 产 ESBLs 菌株表型筛选与确认试验 采用纸片扩散法对非单产 AmpC 酶、非同时产 AmpC 酶和 ESBLs 的其他菌株进行 ESBLs 表型筛选与确认试验。操作与结果判读按照 NCCLS 文件 M100-S15 (2005 年版)推荐的标准进行,即头孢他啶(CAZ, 30  $\mu$ g)、头孢曲松(CRO, 30  $\mu$ g)或头孢噻肟(CTX, 30  $\mu$ g)抑菌圈直径分别 $\leq 22$  mm、 $\leq 25$  mm、 $\leq 27$  mm 时判定为疑产 ESBLs 株;CAZ(30  $\mu$ g)与 CAZ/克拉维酸(CD02, 30/10  $\mu$ g)或 CTX(30  $\mu$ g)与 CTX/克拉维酸(CD03, 30/10  $\mu$ g)抑菌圈直径之差 $\geq 5$  mm 时判定为产 ESBLs 株。

## 2 结 果

2.1  $G^-$  杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 株的检出 见表 1。

表 1 168 株 RICU 常见  $G^-$  杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的检出(株,%)

**Table 1** Detection of AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBLs produced by 168 strains of gram-negative bacilli in RICU (strain, %)

$G^-$ 杆菌	株数	产 AmpC 酶	产 ESBLs	产 AmpC 酶 + ESBLs
肺炎克雷伯菌	53	6(11.32)	31(58.49)	7(13.21)
大肠埃希菌	43	3(6.98)	21(48.84)	3(6.98)
阴沟肠杆菌	21	10(47.62)	8(38.10)	2(9.52)
鲍曼不动杆菌	15	5(33.33)	6(40.00)	0(0.00)
铜绿假单胞菌	36	4(11.11)	5(13.89)	0(0.00)
合计	168	28(16.67)	71(42.26)	12(7.14)

2.2 产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株的耐药性 见表 2。

表 2 RICU 产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株的耐药率(%)

Table 2 Drug resistant rates of AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBLs-producing strains in RICU(%)

抗菌药物	产 AmpC 酶株 (n=28)	产 ESBLs 株 (n=71)	产 AmpC 酶 + ESBLs 株(n=12)
氨苄西林	100.00	100.00	100.00
哌拉西林	100.00	100.00	100.00
头孢唑辛	100.00	100.00	100.00
头孢哌酮	92.86	95.77	100.00
头孢噻肟	100.00	100.00	100.00
头孢他啶	64.29	50.70	75.00
氨基南	89.29	91.55	100.00
头孢西丁	100.00	46.48	100.00
头孢吡肟	28.57	53.52	66.67
亚胺培南	3.57	2.82	0.00
阿米卡星	67.86	57.75	66.67
环丙沙星	57.14	40.85	66.67
阿莫西林/克拉维酸	100.00	100.00	100.00
哌拉西林/他唑巴坦	46.43	32.39	75.00
头孢哌酮/舒巴坦	42.86	25.35	75.00

比较非发酵菌(铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌)与肠杆菌科(大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌)产酶株的耐药性,非发酵菌对亚胺培南和酶抑制剂复合制剂的耐药率明显增高( $P < 0.05$ ),其他抗菌药物间无明显差别。

### 3 讨论

$G^-$  杆菌是目前 RICU 最为常见的感染病原菌,在抗菌药物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严峻挑战。因此,明确其耐药产生机制及其耐药谱特征,可为临床合理使用抗菌药物提供依据<sup>[1-3,7]</sup>。

研究显示, $G^-$  杆菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的主要机制为:(1)产生各种  $\beta$ -内酰胺水解酶;(2) $\beta$ -内酰胺类抗生素作用靶位青霉素结合蛋白(PBPs)的改变;(3)细菌外膜通透性下降;(4)外排泵作用;(5)生物膜的形成等<sup>[4-5]</sup>。各种  $\beta$ -内酰胺水解酶的产生为其主要机制。AmpC 酶和 ESBLs 是介导  $G^-$  杆菌对广谱青霉素类和头孢菌素类及单环  $\beta$ -内酰胺类抗生素产生耐药性的两大类  $\beta$ -内酰胺酶。AmpC 酶和 ESBLs 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 酶株则耐药;前者对第四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 酶<sup>[4-5,7]</sup>。因此,为更合理地选择抗菌药物,对临床分离的  $G^-$  杆菌高耐药株中 AmpC 酶和 ESBLs 的检测显得尤为重要。

本研究中,AmpC 酶在阴沟肠杆菌中的检出率最高,其次是鲍曼不动杆菌。阴沟肠杆菌中 AmpC 酶的检出率为 57.14%(12/21),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 酶有关<sup>[4,7]</sup>。ESBLs 的检出率以肺炎克雷伯菌最高,其次为大肠埃希菌,分别为 71.70%(38/53)和 55.81%(24/43),表明 ESBLs 仍是介导这两种细菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的主要因素。我们还检测到了 7 株肺炎克雷伯菌、3 株大肠埃希菌和 2 株阴沟肠杆菌同时产 AmpC 酶和 ESBLs,提示  $\beta$ -内酰胺酶耐药基因在抗菌药物选择压力下的聚集整合现象。近年来,发现假单胞菌属细菌产广谱  $\beta$ -内酰胺水解酶耐药的发生率呈上升趋势,与生物膜形成和主动外排机制等共同导致了其多重耐药性的产生<sup>[7-8]</sup>。我们的研究结果也显示,铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的检出率高达 25.00%(9/36)和 73.33%(11/15),提示 RICU 分离的假单胞菌属细菌产  $\beta$ -内酰胺水解酶也是其耐药性产生的重要机制。由于假单胞菌属细菌的耐药机制较为复杂,可以屏蔽广谱  $\beta$ -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<sup>[4-5]</sup>。

对产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株的药敏分析显示,无论是单产 AmpC 酶还是单产 ESBLs 的菌株,对广谱青霉素类和第二、三代头孢菌素及单环  $\beta$ -内酰胺类抗生素均高度耐药。单产 AmpC 酶菌株对第四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不敏感,与 AmpC 酶水解特征一致。单产 ESBLs 菌株对碳青霉烯类抗生素敏感,对部分头霉素类、酶抑制剂复合制剂耐药,提示合并有其他耐药机制;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 型为主有关<sup>[9]</sup>。同时产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株仅对碳青霉烯类抗生素敏感,临床上可供选择的抗菌药物种类极为有限。RICU 分离的该类细菌部分还具有对氨基糖苷类和氟喹诺酮类等抗菌药物的多重耐药性,提示合并多种耐药机制,临床上应重视微生物学检查,为合理选择抗菌药物提供依据。

也是我院医院感染最主要的致病菌之一。2008 年 1 月 1 日—2009 年 5 月 1 日,本院在不重复标本中培养出 538 株铜绿假单胞菌,耐药现象突出,尤其对于以往我们认为对铜绿假单胞菌疗效较好的亚胺培南,耐药率达 69.52%,远高于彭少华等的统计数据<sup>[5]</sup>,提示可能存在亚胺培南耐药株在病房的流行。药敏结果显示本院分离的铜绿假单胞菌对美罗培南耐药率为 56.88%,提示该菌对美罗培南的耐药情况在本院也日趋严峻。

本次统计的细菌主要来源于痰标本,占 87.50%,在 ICU、呼吸科、神经外科呈较高分布。上述科室患者大多为危重患者,住院时间较长且免疫功能低下,同时往往联合应用广谱抗菌药物时间较长,部分患者还进行了气管切开治疗。统计 28 例 PDRPA 感染患者的住院资料,分析患者年龄、感染前住院时间、抗菌药物应用种类及时间、入住 ICU 及气管插管情况并与对照组比较,发现发生 PDR-PA 感染的高危因素有:气管插管、长时间入住 ICU 及长期联合应用抗菌药物,与魏树全等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。这一结果提示我们,对于重症细菌感染可采取降阶梯治疗,迅速控制感染并尽量避免长期应用抗菌药物<sup>[7]</sup>;同时也提示,在日常工作中需严格执行无菌操作,尤其对于气管插管的患者<sup>[8]</sup>。铜绿假单胞菌对超广谱抗菌药物的敏感性几乎都在下降,对临床常用的 6 类抗菌药物(包括青霉素类、头孢菌素类、单环类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类、碳青霉烯类)同时耐药。PDRPA 的出现使该菌的耐药性问

题日趋严重。铜绿假单胞菌耐药机制包括药物外排泵机制、耐药岛、碳青霉烯酶等多种机制。加强耐药机制研究,深入分析影响铜绿假单胞菌耐药的因素,仍是需深入研究的领域。

#### [参 考 文 献]

- [1] Harris A D, Perencevich E, Roghmann M C, *et al.* Risk factors for piperacillin-tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(3): 854-858.
- [2] 沈翠芬, 金文君, 戴利成, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌的耐药性研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(6): 631-634.
- [3] Asano K. Attention-getting cross infections: Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections [J]. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*, 2007, 96(11): 2465-2469.
- [4] Macgowan A P. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(Suppl 2): 105-114.
- [5] 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病例对照研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(7): 511-515.
- [6] 魏树全, 赵子文, 钟维农, 等. 泛耐药铜绿假单胞菌肺炎危险因素的病例对照研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(6): 673-677.
- [7] 欧阳今鸣, 褚云卓, 丁丽萍, 等. 铜绿假单胞菌耐药性的临床调查[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(1): 84-86.
- [8] Falagas M E, Rafailidis P I, Kofteridis D, *et al.* Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60(5): 1124-1130.

(上接第 273 页)

#### [参 考 文 献]

- [1] Nseir S, Di Pompeo C, Diarra M, *et al.* Relationship between immunosuppression and intensive care unit-acquired multidrug-resistant bacteria: a case-control study [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(5): 1318-1323.
- [2] Nseir S, Deplanque X, Di Pompeo C, *et al.* Risk factors for relapse of ventilator-associated pneumonia related to nonfermenting Gram negative bacilli: a case-control study [J]. *J Infect*, 2008, 56(5): 319-325.
- [3] Rello J, Ollendorf D A, Oster G, *et al.* Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database [J]. *Chest*, 2002, 22(6): 2115-2121.
- [4] Paterson D L. Resistance in gram-negative bacteria; Enterobacteriaceae [J]. *Am J Infect Control*, 2006, 34(5 Suppl 1): S20-28.
- [5] Livermore D M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(Suppl 1): 3-10.
- [6] 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.
- [7] Yang K, Guglielmo B J. Diagnosis and treatment of extended-spectrum and AmpC beta-lactamase-producing organisms [J]. *Ann Pharmacother*, 2007, 41(9): 1427-1435.
- [8] McGowan J E. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria; multidrug resistance to the maximum [J]. *Am J Infect Control*, 2006, 34(5 Suppl 1): S29-37.
- [9] 陆坚, 唐英春, 吴本权, 等. 华南地区质粒介导超广谱 β-内酰胺酶的基因分型研究 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(6): 638-643.