

产酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的检测及耐药性分析

冯 强

(泰安市中心医院, 山东 泰安 271000)

[摘要] **目的** 研究某医院产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和质粒 AmpC 酶的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌耐药情况。**方法** 对 2006 年 11 月—2007 年 7 月分离的 139 株大肠埃希菌和 102 株肺炎克雷伯菌分别采用标准纸片扩散法检测 ESBLs, 头孢西丁三维试验检测质粒 AmpC 酶; 并用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验, 根据美国临床实验室标准化委员会 2002 年判断标准分析结果。**结果** 139 株大肠埃希菌产 ESBLs、AmpC 酶及 ESBLs + AmpC 酶菌株的检出率分别为 48.20%、9.35%、2.88%; 102 株肺炎克雷伯菌产 ESBLs、AmpC 酶及 ESBLs + AmpC 酶菌株的检出率分别为 55.88%、8.82%、2.94%。产 ESBLs 菌株对头孢菌素类、氨基糖苷类、单环酰胺类抗菌药物耐药率明显高于非产 ESBLs 菌株($P < 0.001 \sim 0.05$)。除碳青霉烯类及头孢他啶等抗生素外, 产 AmpC 酶菌株对二、三代头孢菌素及喹诺酮类等药的耐药率均明显增高($P < 0.001 \sim 0.05$)。**结论** 耐药酶的产生是导致细菌耐药的重要原因之一, 合理使用抗菌药物对预防耐药菌的产生和控制医院感染非常重要。

[关键词] 超广谱 β -内酰胺酶; AmpC 酶; 大肠埃希菌; 肺炎克雷伯菌; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378.2⁺1 R378.99⁺6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)01-0044-04

Detection of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases and analysis of antimicrobial resistance in clinical isolated strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

FENG Qiang (Taian Central Hospital, Taian 271000, China)

[Abstract] **Objective** To study the drug resistance of extended-spectrum beta-lactamases-producing and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) in a hospital. **Methods** One hundred and thirty-nine strains of *E. coli* and 102 strains of *K. pneumoniae* were collected from clinical specimens from November, 2006 to July, 2007. ESBLs production was detected by the standard disk diffusion method, and AmpC production was detected by cefoxitin three-dimensional test of enzyme-extraction. Drug susceptibility was detected by Kirby-Bauer disk diffusion method, the result were analysed by American NCCLS Standard. **Results** Among 139 strains of *E. coli*, ESBLs-producing, AmpC beta-lactamase-producing, both ESBLs and AmpC beta-lactamase-producing *E. coli* was 48.20%, 9.35% and 2.88% respectively; among 102 strains of *K. pneumoniae*, the isolation rate was 55.88%, 8.82% and 2.94% respectively. The resistant rate of ESBLs-producing strains to caphalosporins, aminoglycosides and monobactams was obviously higher than those of non-ESBLs-producing strains ($P < 0.001 \sim 0.05$), except carbapenem and ceftazime, plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing strains revealed a high drug resistance to the second and third generation cephalosporins and quinolones ($P < 0.001 \sim 0.05$). **Conclusion** Production of ESBLs and AmpC in bacteria are important factors in drug resistance. More attention should be paid to the use of antimicrobial agents and control of nosocomial infection.

[Key words] extended-spectrum beta-lactamases; AmpC enzyme; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2009, 8(1): 44-47]

[收稿日期] 2008-02-20

[作者简介] 冯强(1973-), 男(汉族), 山东省新泰市人, 主管技师, 主要从事临床检验及病原生物学研究。

[通讯作者] 冯强 E-mail: fengqiang@yahoo.com.cn

耐药细菌已成为医院感染的重要病原,耐药酶的产生是导致细菌耐药的重要原因之一。如大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为代表的肠杆菌科细菌产生超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)以及 AmpC 酶^[1]。更为严重的是,由质粒介导的耐药酶易在同种属甚至不同种属细菌之间传递而造成暴发和流行,国外已有多起耐药菌暴发流行的报道^[2]。为了解大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的流行情况及耐药性,笔者对某医院分离的 139 株大肠埃希菌和 102 株肺炎克雷伯菌进行了耐药酶的检测及药敏分析,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 某医院门诊和病房 2006 年 11 月—2007 年 7 月临床标本分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌,排除同一患者重复菌株。其中,大肠埃希菌 139 株,肺炎克雷伯菌 102 株。阴沟肠杆菌 029M 为持续高产 AmpC 酶阳性对照(由北京协和医院惠赠);肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 作为 ESBLs 的阳性对照;大肠埃希菌 ATCC 25922 作为阴性对照。以上菌株均由山东省临床检验中心提供。

1.2 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验,根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)2002 年颁布的判断标准进行药敏结果判断。抗菌药物纸片和 E-test 条均为英国 Oxoid 公司产品;M-H 培养基、胰酶消化大豆肉汤为法国生物梅里埃公司产品。

1.3 产 ESBLs 菌株的检测

1.3.1 ESBLs 初筛试验 采用纸片扩散法。头孢他啶(30 μg /片)、头孢曲松(30 μg /片)、氨曲南(30 μg /片)、头孢噻肟(30 μg /片)、头孢泊肟(10 μg /片)抑菌圈直径分别 ≤ 22 mm、 ≤ 25 mm、 ≤ 27 mm、 ≤ 27 mm、 ≤ 22 mm 时判定为可疑产 ESBLs 菌株。

1.3.2 ESBLs 确证试验 操作与判读按照 NCCLS 文件 M100 - S11(2004 年)推荐的标准进行。头孢他啶(30 μg /片)与头孢他啶/克拉维酸(CD02, 30/10 μg)或头孢噻肟(30 μg /片)与头孢噻肟/克拉维酸(CD03, 30/10 μg)抑菌圈直径之差 ≥ 5 mm 时判定为产 ESBLs 菌株。

1.4 产 AmpC 酶菌株的检测

1.4.1 酶表型筛选试验 采用头孢西丁纸片药敏试验(K-B 法)。当抑菌环直径头孢西丁 < 17 mm,头孢他啶 < 18 mm 和/或头孢噻肟 < 22 mm 时,初筛为可疑产 AmpC 酶菌株。

1.4.2 酶提取物制备 参照文献^[3]进行酶粗提取物制备。

1.4.3 三维试验检测 AmpC 酶 将大肠埃希菌 ATCC 25922 制成浓度为 0.5 麦氏单位的菌悬液,用棉棒均匀涂布于 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 处用刀片向外(离心方向)切一裂隙,在此裂隙中加入 40 μL 待测菌株酶粗提液;阴性对照为向裂隙中加入 40 μL 的生理盐水,35 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。若裂隙与抑菌圈交接处出现扩大的长菌区,则提示产 AmpC 酶。

1.5 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件处理数据。

2 结果

2.1 产酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌标本分布见表 1。

表 1 产酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌标本分布(株,%)

Table 1 Specimen distribution of enzyme-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*(strain, %)

标本	产酶大肠埃希菌	产酶肺炎克雷伯菌
痰与咽拭子	39(51.32)	32(50.79)
尿液	23(30.26)	19(30.16)
血液	5(6.58)	4(6.35)
穿刺液	7(9.21)	5(7.94)
其他	2(2.63)	3(4.76)
合计	76(100.00)	63(100.00)

2.2 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产酶情况 139 株大肠埃希菌产 ESBLs、AmpC 酶及 ESBLs + AmpC 酶菌株的检出率分别为 48.20%、9.35%、2.88%;102 株肺炎克雷伯菌产 ESBLs、AmpC 酶及 ESBLs + AmpC 酶菌株的检出率分别为 55.88%、8.82%、2.94%。

2.3 产 AmpC 酶与非产 AmpC 酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药情况 见表 2。

表 2 产 AmpC 酶与非产 AmpC 酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药率(%)

Table 2 Drug-resistant rates of AmpC-producing and non-AmpC-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* (%)

抗菌药物	大肠埃希菌		χ^2	P	肺炎克雷伯菌		χ^2	P
	产 AmpC 酶(n=13)	非产 AmpC 酶(n=126)			产 AmpC 酶(n=9)	非产 AmpC 酶(n=93)		
氨苄西林	100.00	84.15	0.12	>0.05	100.00	76.34	0.09	>0.05
哌拉西林	100.00	83.24	0.16	>0.05	100.00	70.96	0.08	>0.05
头孢呋辛	92.31	35.23	11.56	<0.01	88.89	10.89	11.93	<0.001
头孢曲松	92.31	61.46	4.51	<0.05	88.89	29.47	6.94	<0.01
头孢噻肟	92.31	42.38	6.87	<0.01	88.89	30.24	6.83	<0.01
左氧氟沙星	92.31	35.56	7.54	<0.01	77.78	39.64	5.54	<0.05
氨曲南	38.46	22.46	3.98	<0.05	55.56	35.57	3.90	<0.05
复方磺胺甲噁唑	92.31	64.20	4.88	<0.05	66.67	40.26	4.32	<0.05
环丙沙星	84.62	55.60	4.62	<0.05	66.67	25.63	9.80	<0.01
氨苄西林/舒巴坦	69.23	9.60	18.54	<0.00	66.67	10.23	9.63	<0.01
萘替米星	53.85	36.44	4.06	<0.05	55.56	30.32	4.16	<0.05
庆大霉素	53.85	32.82	4.24	<0.05	55.56	36.18	3.92	<0.05
阿莫西林/克拉维酸	30.77	23.40	0.24	>0.05	44.44	29.42	1.05	>0.05
头孢吡肟	38.46	20.37	1.58	>0.05	33.33	15.36	3.21	>0.05
头孢他啶	23.08	22.84	0.73	>0.05	33.33	25.63	0.16	>0.05
阿米卡星	30.77	30.64	0.06	>0.05	44.44	27.67	2.54	>0.05
头孢哌酮/舒巴坦	23.08	12.65	2.06	>0.05	33.33	19.24	3.04	>0.05
亚胺培南	0.00	0.00	-	-	0.00	0.00	-	-
美罗培南	0.00	0.00	-	-	0.00	0.00	-	-

2.4 产 ESBLs 与非产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药情况 见表 3。

表 3 产 ESBLs 与非产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药率(%)

Table 3 Drug-resistant rates of ESBLs-producing and non-ESBLs-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* (%)

抗菌药物	大肠埃希菌		χ^2	P	肺炎克雷伯菌		χ^2	P
	产 ESBLs(n=67)	非产 ESBLs(n=72)			产 ESBLs(n=57)	非产 ESBLs(n=45)		
阿莫西林/克拉维酸	29.85	26.38	0.206	>0.05	7.37	26.67	4.56	<0.05
氨苄西林/舒巴坦	71.64	36.11	4.082	<0.05	63.16	26.67	13.44	<0.001
头孢呋辛	95.52	15.28	20.85	<0.001	100.00	4.44	81.76	<0.001
头孢曲松	97.01	9.72	23.84	<0.001	98.25	4.44	86.41	<0.001
头孢噻肟	92.54	11.11	26.84	<0.001	96.49	6.67	77.03	<0.001
头孢他啶	28.36	8.33	9.43	<0.01	35.09	2.22	14.57	<0.001
头孢哌酮/舒巴坦	29.85	4.17	5.65	<0.05	28.07	0.00	13.06	<0.001
头孢吡肟	37.31	16.67	14.75	<0.001	38.60	2.22	17.19	<0.001
头孢西丁	38.81	1.38	30.02	<0.001	45.61	2.22	22.37	<0.001
氨曲南	40.30	27.78	2.43	>0.05	73.68	17.78	29.8	<0.001
亚胺培南	0.00	0.00	-	-	0.00	0.00	-	-
美罗培南	0.00	0.00	-	-	0.00	0.00	-	-
阿米卡星	32.84	23.61	1.46	>0.05	45.61	3.33	12.17	<0.001
萘替米星	55.22	38.89	3.71	>0.05	56.14	13.33	15.39	<0.001
左氧氟沙星	91.04	58.33	19.35	<0.001	75.44	60.00	2.78	>0.05
环丙沙星	89.55	70.83	7.56	<0.01	70.16	62.22	0.71	>0.05

3 讨论

近年来,β-内酰胺酶介导的耐药性发展迅速,几乎每当一种新的β-内酰胺类抗生素应用于临床不久,即有新的能水解该抗生素的β-内酰胺酶产生。ESBLs 的检出以肠杆菌科中的大肠埃希菌和肺炎

克雷伯菌较多见。本实验中同时产 ESBLs 与 AmpC 酶的大肠埃希菌检出率为 2.88%,同时产 ESBLs 与 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌检出率为 2.94%,低于邹明祥^[4]等的报道。

本实验结果显示,产 ESBLs 菌株对头孢菌素类、氨基糖苷类、单环酰胺类抗生素耐药率明显高于非产 ESBLs 菌株。产 ESBLs 菌株仅对亚胺培南、美罗培南、

头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸较敏感,其中对亚胺培南、美罗培南的耐药率为 0.00%。

介导 ESBLs 的质粒可以通过接合、转化和转导等形式使耐药基因在细菌中传播,甚至在不同种属的菌种之间传递。质粒 AmpC 酶于 1988 年首先由 Bauernfeid 等报道,并逐渐引起人们的关注^[5]。第三代头孢菌素是 AmpC 酶的诱导剂,所诱导产生低水平 AmpC 酶菌株去除诱导剂可恢复敏感,但若不正确使用,使细菌处于第三代头孢菌素的选择压力之下,即能筛选出持续高产 AmpC 酶的突变株,导致产酶菌流行^[6]。

本组结果显示,产 AmpC 酶菌株对第三代头孢菌素的耐药率除头孢他啶外均已超过 60%,有的甚至已超过 90%,耐药现象相当严重。产 AmpC 酶菌株对除美罗培南、亚胺培南、头孢他啶外的其他第二、三代头孢菌素及喹诺酮类抗菌药物的耐药率均明显高于非产 AmpC 酶菌株,说明产 AmpC 酶也是导致临床菌株耐药的主要原因之一。对产 AmpC 酶菌感染,不能使用第三代头孢菌素、头霉素类和 β -内酰胺酶抑制剂复合制剂类抗生素治疗。尤其是产质粒介导的和去阻遏表达的 AmpC 酶菌株,耐药谱比产 ESBLs 菌株还要广,应引起临床高度关注。

细菌耐药机制越来越复杂,产各种酶类的细菌也在不断增加,随着三、四代头孢菌素的广泛应用,耐药状况也将愈加严重。因此,加强 ESBLs 及

AmpC 酶等耐药酶的检测和临床根据药敏结果正确选用抗菌药物,对减少滥用抗菌药物和预防耐药菌株的产生显得尤为重要。

[参 考 文 献]

- [1] 唐朝贵,郑绍同,孙海平,等. 社区及医院感染大肠埃希菌产 AmpC 酶、ESBLs 检测与耐药分析[J]. 中国感染控制杂志, 2007,6(4):255-257.
- [2] Philippon A, Arlet G, Jacoby G A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 45:1-11.
- [3] Bradford P A, Urban C, Mariano N, et al. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACI-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997,41:563-569.
- [4] 邹明祥,范学工,张艳亮,等. 临床分离革兰阴性杆菌耐药性分析及金属 β -内酰胺酶的检测[J]. 中国感染控制杂志, 2006,5(3):239-243.
- [5] Black J A, Thomson K S, Buynak J D, et al. Evaluation of beta-lactamase inhibitors in disk tests for detection of plasmid mediated AmpC beta-lactamase in well-characterized clinical strains of *Klebsiella spp* [J]. J Clin Microbil, 2005, 43(8): 4168-4171.
- [6] 王冬国,周铁丽. 质粒介导产 AmpC 酶大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌 AmpC 基因型检测与分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007,17(7): 782-785.

(上接第 49 页)

养为确诊血流感染的唯一“金标准”。因此,应尽量在未使用抗菌药物前采血,并对使用抗菌药物治疗者不在静脉给药时及以后马上采血,以提高培养阳性率。总之,临床应注重对血培养病原菌的检测及耐药性分析,依据菌株的药敏特性合理用药,避免盲目使用广谱高效抗菌药物,以减缓和控制耐药菌株的产生。

[参 考 文 献]

- [1] 陈琼,胡红兵,夏维,等. 儿童血培养中常见病原菌及耐药性分析[J]. 中华医学杂志, 2007,31(4):307-308.
- [2] Mullett C J, Thomas J G, Smith C L, et al. Computerized antimicrobial decision support: An offline evaluation of a database driven empiric antimicrobial guidance program in hospitalized patients with a bloodstream infection[J]. Int J Med Inform, 2004,73:455-460.
- [3] 胡亚美,江载芳,诸福棠. 实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫

生出版社,2003:939.

- [4] Norton E B, Archibald L K, Nwangwu O C, et al. Clinical predictors of bloodstream infections and mortality in hospitalized Malawian children[J]. Pediatr Infec Dis J, 2004,23(2):145.
- [5] Gray J M. A 7-year study of bloodstream infections in an English children's hospital[J]. Eur J Pediatr, 163(9):530-535.
- [6] 吴跃平,章文,陈运生,等. 儿童血培养病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006,16(4):463.
- [7] 廖扬,张晓兵,龚雅利,等. 血培养病原菌的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2005,15(4):451-453.
- [8] 邓健康,郭晓兰,黄义山. 我院凝固酶阴性葡萄球菌感染临床分析[J]. 中国感染控制杂志, 2006,5(1):58-61.
- [9] 曾贱高,刘利辉,张华,等. 1055 株革兰阴性菌种分布及耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2006,5(1):62-64.
- [10] 章清,魏丽,魏光美,等. 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌的耐药性变迁[J]. 中华医院感染学杂志, 2004,14(2):220-222.
- [11] 郭清莲,周新. 医院感染革兰阴性菌的耐药性变迁[J]. 中华医院感染学杂志, 2004,14(1):89-90.