

## 呼吸重症监护室产质粒介导 AmpC 酶和 ESBLs 细菌的耐药性及基因型

姚丽英<sup>1</sup>, 李国保<sup>2</sup>, 李 沛<sup>2</sup>, 陆 坚<sup>2</sup>

(1 深圳市福田区人民医院, 广东 深圳 518033; 2 深圳市第三人民医院, 广东 深圳 518020)

**[摘要]** **目的** 了解深圳地区 2 所三级综合医院呼吸重症监护室(RICU)分离的革兰阴性(G<sup>-</sup>)菌产 AmpC 酶和超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)情况及其耐药性与基因型特征。**方法** 选择分离自上述 2 所医院 RICU 的对第一、二代及 1 种以上第三代头孢菌素耐药的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌,采用纸片扩散法及 E-test 进行药敏试验,酶提取物三维试验检测单产 AmpC 酶,美国临床实验室标准化研究所 (CLSI)推荐的表型筛选和确证试验检测产 ESBLs 菌株,聚合酶链反应(PCR)通用引物扩增 AmpC 酶和 ESBLs 基因及其序列测定以确定基因亚型。**结果** 检出单产 AmpC 酶、单产 ESBLs、合产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株分别为 9 株(9.38%)、52 株(54.17%)和 10 株(10.42%)。单产 AmpC 酶菌株对头孢吡肟和亚胺培南具有较高的敏感性,耐药率分别为 33.33%和 0.00%;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 0.00%、34.62%和 19.23%;合产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株仅对亚胺培南敏感,未发现耐药株。检出 AmpC 酶基因型为 DHA-1 和 ACT-1,分别占 76.92%和 26.08%;ESBLs 基因型为 CTX-M 系列和 SHV-5,分别占 96.77%和 3.23%。**结论** 该 2 所综合医院 RICU 存在产质粒介导 DHA-1、ACT-1 型 AmpC 酶和 CTX-M、SHV 型 ESBLs 的 G<sup>-</sup>菌流行株,其对大多数新型广谱 β-内酰胺类抗生素耐药,对亚胺培南敏感,值得临床关注。

**[关键词]** 重症监护室;医院感染;大肠埃希菌;肺炎克雷伯菌;AmpC 酶;超广谱 β-内酰胺酶;耐药基因;抗药性;微生物

**[中图分类号]** R969.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)02-0092-05

## Antimicrobial resistance and genotypes of plasmid-mediated AmpC β-lactamases-producing and extended-spectrum β-lactamases-producing strains in respiratory intensive care units

YAO Li-ying<sup>1</sup>, LI Guo-bao<sup>2</sup>, LI Pei<sup>2</sup>, LU Jian<sup>2</sup> (1 Futian People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518033, China; 2 The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate antimicrobial resistance, genotypes and the prevalence of AmpC β-lactamases-producing and extended-spectrum β-lactamases (ESBLs)-producing gram-negative strains from specimens of respiratory intensive care units(RICUs) in 2 hospitals of Shenzhen. **Methods** A total of 96 multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains were detected by three-dimensional test for AmpC β-lactamases and phenotypic confirmatory test based on Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) criteria for ESBLs. Antimicrobial susceptibility of AmpC β-lactamases- and ESBLs-producing strains was detected by Kirby-Bauer and E-test methods. Universal primer PCR for AmpC β-lactamases and ESBLs gene amplification and DNA sequencing were carried out for genotyping of these β-lactamases. **Results** AmpC β-lactamases, ESBLs and AmpC β-lactamases combined with ESBLs-producing strains were found in 9(9.38%), 52(54.17%) and 10 (10.42%) strains, respectively. AmpC β-lactamases-producing strains were more susceptible to cefepime and imipenem, the resistant rate being 33.33% and 0.00% respectively. ESBLs-producing strains were more susceptible to imipenem, piperacillin/tazobactam and cefoperazone/sulbactam, the resistant rate being 0.00%, 34.62% and 19.23% respectively. AmpC β-lactamases combined with ESBLs-producing strains were only sensitive to imipenem and no imipenem-resistant one was

**[收稿日期]** 2010-02-08

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(5009113) 2008 年深圳市福田区公益性科研项目(FTWS048)

**[作者简介]** 姚丽英(1957-),女(汉族),山西省五台县人,主任护师,主要从事医院感染管理研究。

**[通讯作者]** 陆坚 E-mail: szlujian@163.net

found. The genotypes of AmpC  $\beta$ -lactamases were *DHA-1* and *ACT-1*, the incidence being 76.92% and 26.08% respectively. ESBLs genotypes were *CTX-M* series and *SHV-5*, the incidence being 96.77% and 3.23% respectively.

**Conclusion** There are epidemic strains of plasmid-mediated *DHA-1*, *ACT-1* type AmpC  $\beta$ -lactamases and *CTX-M*, *SHV* type ESBLs-producing gram-negative strains in RICUs in two hospitals, they are resistant to most new broad-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics, but sensitive to imipenem.

**[Key words]** intensive care unit; nosocomial infection; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; AmpC  $\beta$ -lactamases; extended-spectrum  $\beta$ -lactamases; drug-resistant gene; drug resistance; microbial

[Chin Infect Control, 2011, 10(2): 92-96]

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;感染病原菌以革兰阴性( $G^-$ )菌多见,耐药现象严重,给临床的感染控制带来严峻挑战<sup>[1-3]</sup>。目前认为, $G^-$ 菌产质粒介导的 AmpC 酶和超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)是导致其对广谱  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的主要原因<sup>[4-6]</sup>。为了解深圳地区 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质粒介导的 AmpC 酶和 ESBLs 情况进行了检测,并对其耐药特点和基因型进行了分析,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株及标本来源 临床分离株为 2005 年 10 月—2008 年 10 月,从深圳地区 2 所三级综合医院 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(无重复菌株),选择其中较为常见的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌进行研究。标本来源于不同患者的痰液、血液和尿液。采用 VITEK-32(BioMerieux, 法国)全自动微生物分析仪进行菌株鉴定。

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 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.1.2 实验用品 药敏纸片、硝基噻吩(Nitrocefin)及 Mueller-Hinton(M-H)琼脂或肉汤培养基,为英国 Oxoid 公司产品;E-test 为瑞典 AB BIO-

DISK 公司产品;三维试验用药品邻氯西林(CLO)、他唑巴坦钠(TZB)为美国 Sigma 公司产品;DNA 分子量标准、聚合酶链反应(PCR)试剂购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 药敏试验与最低抑菌浓度(MIC)测定 采用纸片扩散法及 E-test 进行药敏试验和 MIC 值检测,结果判读按照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)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 产 AmpC 酶初筛采用纸片扩散法,用 FOX 纸片检测受试菌株。根据 CLSI 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<sup>[7]</sup>报道的酶提取物三维试验方法进行。

1.2.3 同时产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株的检测 参照张永标等<sup>[7]</sup>报道的方法进行。

1.2.4 产 ESBLs 菌株表型筛选与确证试验 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 表型筛选与确证试验。操作与结果判读按照 CLSI 文件 M100-S15(2005 年版)推荐的标准进行,即头孢他啶(30  $\mu$ g)、头孢曲松(30  $\mu$ g)或头孢噻肟(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;头孢他啶(30  $\mu$ g)与头孢他啶/克拉维酸(CD02, 30  $\mu$ g/10  $\mu$ g)或头孢噻肟(30  $\mu$ g)与头孢噻肟/克拉维酸(CD03, 30  $\mu$ g/10  $\mu$ g)抑菌圈直径之差  $\geq 5$  mm 时判定为产 ESBLs 株。

1.2.5 AmpC 酶与 ESBLs 耐药基因的检测及基因分型 对表型确证试验提示产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株,提取质粒进行耐药基因的检测和基因分型,方法分别参照张永标等<sup>[8]</sup>和陆坚等<sup>[9]</sup>报道的方法进行,PCR 引物序列见表 1。

表 1 检测 AmpC 酶和 ESBLs 基因的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for detection of AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBLs genes

基因型	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段大小(bp)	
AmpC 酶基因	ACT	ACT-F	ACCGTTACGCCGCTGATG	937
		ACT-B	CCACGTAGCTGCCAAACCC	
	DHA	DHA-F	ATGGCGGTTGCCGTCTC	967
		DHA-B	TGACTCTTTCGGTATTCGGGTAG	
ESBLs 基因	TEM	TEM-F	ATAAAATTCTTGAAGAC	1 075
		TEM-B	TTACCAATGCTTAATCA	
	SHV	SHV-F	GGTTATGCGTTATATTCGCC	867
		SHV-B	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	
	CTX-G <sub>1</sub>	CTX-G <sub>1</sub> -F	AGTGCAACGGATGATGT	792
		CTX-G <sub>1</sub> -B	GGCTGGGTAAAATAGGTC	
	CTX-G <sub>2</sub>	CTX-G <sub>2</sub> -F	ACGCTACCCCTGCTATT	830
		CTX-G <sub>2</sub> -B	CAGAAACCGTGGGTACGA	
	CTX-G <sub>3</sub>	CTX-G <sub>3</sub> -F	ACGCTGTTGTTAGGAAGTG	759
		CTX-G <sub>3</sub> -B	TTGAGGCTGGGTGAAGT	

2 结果

2.1 常见 G<sup>-</sup> 杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的检出率

53 株肺炎克雷伯菌与 43 株大肠埃希菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的检出情况见表 2。

2.2 产 AmpC 酶与 ESBLs 菌株的耐药性 见表 3。

9 株单产 AmpC 酶的 G<sup>-</sup> 杆菌对亚胺培南和第四代头孢菌素头孢吡肟具有较高的敏感性;对广谱青霉素类、第二及三代头孢菌素、氨基糖苷类以及酶抑制

剂复合制剂显示出较高耐药性。52 株单产 ESBLs 的 G<sup>-</sup> 杆菌对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦及头孢哌酮/舒巴坦显示出较高的敏感性;对阿莫西林/克拉维酸、广谱青霉素类、第二~四代头孢菌素和氨基糖苷类具有较高的耐药性。10 株合产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株仅对亚胺培南敏感,对其他  $\beta$ -内酰胺抗生素耐药性较高。此外,上述产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株还表现出对氨基糖苷类和氟喹诺酮类等抗菌药物较高的多重耐药性。

表 2 96 株 RICU 常见 G<sup>-</sup> 杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的检出情况(株数,%)

Table 2 Detection of AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBLs produced by 96 strains of gram-negative bacilli in RICU (strain,%)

G <sup>-</sup> 杆菌	株数	单产 AmpC 酶	单产 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)
合计	96	9(9.38)	52(54.17)	10(10.42)

表 3 ICU 产 AmpC 酶和 ESBLs 菌株的耐药率(%)

Table 3 Drug-resistant rates of AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBLs-producing strains in RICU(%)

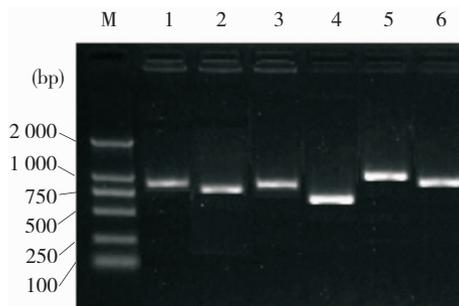
抗菌药物	单产 AmpC 酶株(n=9)	单产 ESBLs 株(n=52)	产 AmpC 酶 + ESBLs 株(n=10)
氨苄西林	100.00	100.00	100.00
哌拉西林	100.00	100.00	100.00
头孢呋辛	100.00	100.00	100.00
头孢哌酮	88.89	94.23	100.00
头孢噻肟	100.00	100.00	100.00
头孢他啶	66.67	51.92	70.00
氨基糖苷	88.89	90.38	100.00
头孢西丁	100.00	48.08	100.00
头孢吡肟	33.33	75.00	60.00
亚胺培南	0.00	0.00	0.00
阿米卡星	66.67	55.77	70.00
环丙沙星	55.55	44.23	70.00

续表 3

抗菌药物	单产 AmpC 酶株(n=9)	单产 ESBLs 株(n=52)	产 AmpC 酶+ ESBLs 株(n=10)
阿莫西林/克拉维酸	100.00	100.00	100.00
哌拉西林/他唑巴坦	66.67	34.62	70.00
头孢哌酮/舒巴坦	66.67	19.23	70.00

2.3 AmpC 酶和 ESBLs 的基因型分布 见图 1 与表 4。表型确证试验阳性的 9 株单产 AmpC 酶菌株中,6 株检测出 AmpC 酶耐药基因;10 株合产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株中,7 株检测出 AmpC 酶耐药基因;基因型以 DHA-1 为主,占 76.92%(10/13),其余为 ACT-1,占 23.08%(3/13)。

表型确证试验阳性的 52 株单产 ESBLs 株与 10 株合产 AmpC 酶和 ESBLs 的菌株中均检测出 ESBLs 耐药基因;基因型主要为 CTX-M 型,包括 CTX-M-14、CTX-M-9、CTX-M-3 和 CTX-M-5,占 96.77%(60/62),少数为 SHV-5 型,占 3.23%(2/62)。



M:DNA 分子量标准;1:SHV 型 ESBLs 基因;2:CTX-M-G1 型 ESBLs 基因;3:CTX-M-G2 型 ESBLs 基因;4:CTX-M-G3 型 ESBLs 基因;5:DHA 型 AmpC 酶基因;6:ACT 型 AmpC 酶基因

图 1 PCR 检测 AmpC 酶和 ESBLs 基因型电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of AmpC β-lactamases and ESBLs genes by PCR

表 4 RICU 常见 G<sup>-</sup> 杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的基因型分布

Table 4 Distribution of the genotypes of AmpC β-lactamases and ESBLs produced by gram-negative bacilli in RICU

G <sup>-</sup> 杆菌	株数	单产 AmpC 酶		单产 ESBLs		产 AmpC 酶+ ESBLs	
		株数	基因型	株数	基因型	株数	基因型
肺炎克雷伯菌	44	3	DHA-1	15	CTX-M-14	3	DHA-1+ CTX-M-14
		1	ACT-1	9	CTX-M-3	1	DHA-1+ CTX-M-3
		2	阴性	5	CTX-M-9	1	ACT-1+ CTX-M-3
大肠埃希菌	27			2	SHV-5	2	CTX-M-14+ AmpC*
		2	DHA-1	11	CTX-M-14	1	DHA-1+ CTX-M-14
		1	阴性	6	CTX-M-3	1	ACT-1+ CTX-M-3
				3	CTX-M-9	1	CTX-M-3+ AmpC*
				1	CTX-M-5		

\*:未检出耐药基因

### 3 讨论

G<sup>-</sup> 杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 是其对新型广谱 β-内酰胺类抗生素耐药的重要原因。ESBLs 主要由质粒介导,而 AmpC 酶最初被认为仅由染色体介导,但近几年临床上不断分离到产质粒介导 AmpC 酶的耐药株<sup>[4-6,10]</sup>。由于编码这 2 种酶的耐药质粒可在不同菌属细菌之间水平传播导致医院感染的暴发,因此监测这些产酶株的耐药性及流行状况已成为医学界研究的热点之一。

为便于对 AmpC 酶和 ESBLs 的检出情况进行较为准确的分析,我们选择了 RICU 中较为常见的 G<sup>-</sup> 耐药菌——肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌进行耐药性检测以及基因型研究。结果显示,ESBLs 的检

出率高达 64.58%(62/96),AmpC 酶的检出率为 19.79%(19/96)。ESBLs 仍是介导这 2 种细菌对 β-内酰胺类抗生素耐药的主要因素;AmpC 酶的频繁检出,提示 AmpC 酶也可以通过质粒介导而使其耐药性在临床病原菌中广泛传播。7 株肺炎克雷伯菌和 3 株大肠埃希菌同时产 AmpC 酶和 ESBLs,提示 β-内酰胺酶耐药基因在抗菌药物选择压力下出现质粒介导的耐药性聚集整合现象;该类产酶菌仅对碳青霉烯类抗生素敏感,给临床抗感染治疗带来严峻挑战。

产 AmpC 酶或 ESBLs 菌株的药敏结果显示,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、三代头孢菌素类及单环 β-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;近一半产 ESBLs 的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>[8-9]</sup>。本研究结果也显示,深圳地区 RICU 耐药菌的 ESBLs 基因型以 CTX-M 型为主,占 96.77%。由于 CTX-M 型 ESBLs 对头孢他啶的水解活性较低,体外试验往往显示为敏感,体内应用的临床疗效有待证实。合产 AmpC 酶与 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 分离的该类细菌中,部分菌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,临床上应重视临床微生物学检验,以便为合理选择抗菌药物提供依据。

本研究对耐药基因进行分型的结果显示,质粒介导的 ESBLs 主要以 CTX-M 型为主,少数为 SHV 型;质粒介导的 AmpC 酶主要以 DHA-1 型为主,少数为 ACT-1 型。与国内既往研究结果<sup>[8-9]</sup>相似,提示上述耐药基因以质粒为介导在临床病原菌中广泛流行,应引起我们的高度重视。

#### [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] Jacoby G A. AmpC beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2009,22(1):161-182.
- [7] 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  $\beta$ -内酰胺酶的检测[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003,3(4):220-222.
- [8] 张永标,张扣兴,唐英春,等. 产质粒介导 AmpC 酶和 ESBLs 细菌的耐药性及  $\beta$ -内酰胺酶基因型研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004,24(7):577-582.
- [9] 陆坚,唐英春,吴本权,等. 华南地区质粒介导超广谱  $\beta$ -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.
- [10] 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.

## 《中国感染控制杂志》征订征稿启事

《中国感染控制杂志》(ISSN 1671-9638, CN 43-1390/R, 邮发 42-203)是国家教育部主管,中南大学(湘雅医院)主办的国内外公开发行的国家级感染性疾病专业学术期刊。本刊为中国科技论文统计源与核心期刊,并被美国化学文摘(CA)、俄罗斯文摘杂志(AJ)、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、万方数据—数字化期刊群等重要检索机构收录。本刊涉及感染病学基础(微生物、病理生理、流行病学等)与临床(各科感染性疾病)及医院感染控制等内容,栏目丰富(专家论坛、论著、临床研究、实验研究、经验交流、病例报告、医学教育、综述、国内外学术动态、译文等),可读性与实用性强,欢迎各相关专业医务人员及疾病预防与控制人员订阅(双月刊,12元/期,全年72元)、赐稿(稿件审理费40元)。为满足作者及读者需求,尽早刊登高质量研究论文,本刊承诺,投至本刊的国家级基金项目论文如审稿通过,在收稿4个月内刊登;省级基金项目论文审稿通过,在收稿6个月内刊登。本刊已开通网络审稿系统(网址:zggrkz.com),欢迎广大医务人员登录浏览、投稿。稿件一经刊用,编辑部将赠送第一作者《中国感染控制杂志》6期。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号 中国感染控制杂志社 邮编:410008

电话(传真):0731-84327658 E-mail:zggrkz2002@yahoo.com.cn 网址:zggrkz.com