文章编号:1000-5404(2005)04-0353-03

论著

革兰阴性杆菌耐药与产 AmpC 酶的检测及其与耐药的关系分析

蔡瑜娇[1],刘 岚[2],刘昌林[2],刘 昕[1],黄正根[1],高玉梅[1],袁 科[1] ([1]第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038;[2]重医儿童医院检验科细菌室,重庆 400014)

提 要:目的 了解 274 株革兰阴性杆菌的耐药现状及产 AmpC 酶与耐药的关系分析。**方法** 采用 microscan walkaway-4.0 鉴定 274 株革兰阴性杆菌的药敏情况,并用酶粗提物头孢西丁三维实验检测 AmpC 酶。**结果** 32 株细菌产 AmpC 酶(占 11.7%),其中阴沟肠杆菌 13 株(占 30.2%)、产气肠杆菌 2 株(占 22.2%)、不动杆菌 6 株(占 21.4%)。274 株菌对 IPM、AK、CIP、FEP、CN、SXT、CAZ、ATM、CRO、PIP 的药物敏感率从高到低依次为:89.4%、78.8%、69.3%、55.5%、45.9%、39.1%、36.9%、31.4%、30.3%、18.2%。**结论** 革兰阴性杆菌的耐药状况严重,检测 AmpC 酶有助于临床抗菌药物的选用。

关键词: 耐药性;AmpC 酶;革兰阴性杆菌
中图法分类号: R378; R915 **文献标识码:** A

Detection of AmpC enzyme and its relationship with drug resistance in gram-negative clinical strains

CAI Yu-jiao[1], LIU Lan[2], LIU Chang-lin[2], LIU Xin[1], HUANG Zheng-gen[1], GAO Yu-mei[1], YUAN Ke[1] ([1]Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Clinical laboratory, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the status of the drug resistance and the relationship of AmpC enzyme with the drug resistance in 274 gram-negative clinical strains. **Methods** Microscan walkaway-4.0 was used for detecting the susceptibility of antimicrobial agents against gram-negative clinical strains. AmpC enzyme was detected by *Cefoxitin* in three dimensional test. **Results** A total of 32 strains produced AmpC enzyme, accounting for 11.7%. *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Acinetobacter accounted* for 22.2% (13/43), 22.2% (2/9), and 21.4% (6/28), respectively. The sensitivity rates of 274 strains to *Imipenem* (IPM), *Amikacin* (AK), *Ciprofloxacin* (CIP), *Cefepime* (FEP), *Gentamicin* (CN), *Sulphamethoxazole/trimethoprim* (SXT), *Ceftazidime* (CAZ), *Aztreonam* (ATM), *Ceft riaxone* (CRO), and *Piperacillin* (PIP) were 89.4%, 78.8%, 69.3%, 55.5%, 45.9%, 39.1%, 36.9%, 31.4%, 30.3%, and 18.2%, respectively. **Conclusion** The status of drug resistance of gram-negative clinical strains is severe. Detection of AmpC enzyme will be helpful in selection of antimicrobial agents in the treatment of hospital infection.

Key words: drug resistance; AmpC enzyme; gram-negative strain

近几年来,革兰阴性杆菌在临床引起的感染日益突出,其日益增加的耐药性也为临床治疗带来了极大的困难[1]。β-内酰胺类抗生素是目前临床使用最广泛的抗生素,革兰阴性杆菌对 β-内酰胺类抗生素最主要的耐药机制是产生多种具有水解 β-内酰胺环活性的 β-内酰胺酶,AmpC 酶是其中重要的一种。为研究革兰阴性杆菌引起的耐药状况及革兰阴性杆菌产 AmpC 酶的情况,我们对 274 株革兰阴性杆菌进行耐药性分析及 AmpC 酶的检测,并将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株

在重庆市几所医院病房患者送检的各种标本中共分离出革兰阴性杆菌 274 株,其中包括肠杆菌科 179 株(阴沟肠杆菌 43 株、大肠埃希氏菌 117 株、产气肠杆菌 9 株、液化沙雷氏菌 10 株)假单胞菌属 67 株和不动杆菌属 28 株。

1.2 试剂

增菌培养基为 M-H 肉汤,三维实验培养基为 M-H 平皿,头孢西丁(Cefoxitin, FOX, 30μg/片)为英国 Oxoid 公司产品。

作者简介:蔡瑜娇(1975-),女,安徽省无为县人,硕士研究生,医师,主要从事细菌耐药性及细菌耐药基因的分子流行病学方面的研究。电话:(023)68753879
通讯作者:刘 昕,电话:(023)68753934, E-mail: molegene@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-10-23;修回日期:2004-12-25

1.3 细菌耐药性的鉴定

274株细菌均经microscan walkaway-4.0鉴定到种并鉴定其耐药性，鉴定纸片包括以下12种：头孢他啶（*ceftazidime*，CAZ）、头孢曲松（*ceft riaxone*，CRO）、头孢吡肟（*cefepime*，FEP）、哌拉西林（*piperacillin*，PIP）、亚胺培南（*imipenem*，IPM）、氨曲南（*azt reonam*，ATM）、头孢西丁（*cefoxitin*，FOX）、阿米卡星（*amikacin*，AK）、庆大霉素（*gentamicin*，CN）、妥布霉素（*tobramycin*，TOB）、环丙沙星（*ciprofloxacin*，CIP）、复方新诺明（*sulphamethoxazole/trimethoprim*，SXT）。质量控制为大肠埃希氏菌ATCC25922，产AmpC酶的阳性标准菌株及阴性标准菌株阴沟肠杆菌029M、029、1194E由北京协和医院检验科王辉老师惠赠。

1.4 AmpC酶的检测

1.4.1 酶粗提物的制备 取单个菌落于4 ml M-H培养液中，36 ℃ 24 h震荡培养，4000 r/min，4 ℃离心，20 min，弃上清收集细菌，重悬于1.5 ml 0.01 mol/L（pH 7.0）PBS中，反复冻融5次，4 ℃ 12 000 r/min，离心60 min，取上清－20 ℃保存。

1.4.2 AmpC酶鉴定实验 取0.5麦氏单位标准菌株ATCC25922菌液均匀涂布于M-H琼脂平皿，将一30 μg头孢西丁纸片置于平皿中心，用无菌刀片在离纸片边缘5 mm处由里向外切割一道沟槽长约15 mm，宽约1 mm，将30 μl酶粗提物由里向外加入沟槽内，避免酶粗提物溢出沟槽，置M-H琼脂平皿36 ℃过夜。沟槽与抑菌圈交界处出现蚀环现象，提示AmpC酶实验阳性。以标准菌株阴沟肠杆菌029M的酶粗提物为阳性对照，阴沟肠杆菌029、1194E的酶粗提物为阴性对照。

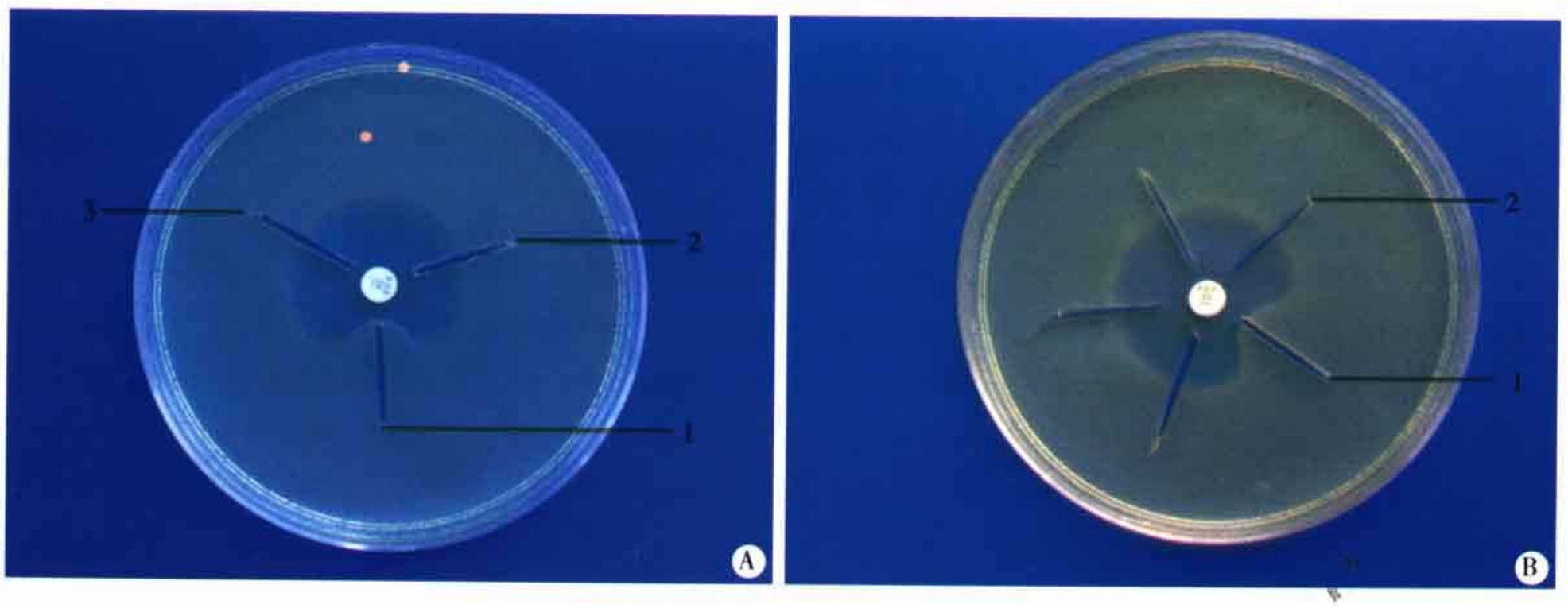
1.5 统计学方法

采用SAS8.2软件进行χ^2检验。

2 结果

2.1 产AmpC酶的结果

在274株革兰阴性杆菌中，有32株细菌产AmpC酶，产AmpC酶的总阳性率为：11.7%，其中不动杆菌6株（占21.4%）、产气肠杆菌2株（占22.2%）、铜绿假单胞菌6株（占8.9%）、沙雷氏菌1株（占10.0%）、大肠杆菌4株（占3.4%）、阴沟肠杆菌13株（占30.2%），产AmpC酶的阳性率大于20%的有不动杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌，见图1。



A: Positive and negative control 1: Positive control, *Enterobacter cloacae* 029M; 2: Negative control, *Enterobacter cloacae* 029; 3: Negative control, *Enterobacter cloacae* 1194E; B: Positive and negative sample 1: Positive sample; 2: Negative sample

图1 表型分型

Fig 1 Phenotypic assay

2.2 受试菌的耐药状况

2.2.1 274株革兰阴性杆菌的耐药情况 274株革兰阴性杆菌对10种抗生素的药物敏感率从高到低依次为IPM 89.4%、AK 78.8%、CIP 69.3%、FEP 55.5%、CN 45.9%、SXT 39.1%、CAZ 36.9%、ATM 31.4%、CRO 30.3%、PIP 18.2%。

2.2.2 产或不产AmpC酶的革兰阴性杆菌的耐药情况 将产AmpC酶的阳性率大于20%的不动杆菌（产酶6株）、产气肠杆菌（产酶2株）、阴沟肠杆菌（产酶13株），共80株菌的耐药状况进行分析：产AmpC酶的21株细菌的耐药情况与不产AmpC酶的59株细菌明显不同。其中，对产AmpC酶的菌株的耐药率大于90%的抗生素有：CRO95.2%、PIP95.2%、CAZ85.7%、ATM90.4%，而对不产AmpC酶的菌株的耐药率大于50%的抗生素有CN54.2%、PIP52.5%、CRO50.8%、ATM50.8%。

2.3 细菌产AmpC酶与细菌耐药情况的相关分析

将80株细菌根据产与不产AmpC酶分为阳性21株（产）和阴性59株（不产），并根据细菌耐药性将80株细菌分为两组：耐药（R）、敏感（S）。研究得出CAZ（$\chi^2 = 11.703$，$P < 0.01$）、CRO（$\chi^2 = 13.021$，$P < 0.01$）、PIP（$\chi^2 = 12.217$，$P < 0.01$）、ATM（$\chi^2 = 10.248$，$P < 0.01$），说明革兰阴性杆菌中产AmpC酶的细菌对CAZ、CRO、PIP、ATM的耐药性明显增高，与不产AmpC酶的细菌的耐药性有显著性差异。

3 讨论

在临床感染性疾病中，细菌耐药性问题已日趋严重，其中由革兰阴性杆菌引起的耐药性在其中占有越来越重要的地位。革兰阴性杆菌产生β-内酰胺酶是对β-内酰胺类抗生素耐药的主要机制，β-内酰胺酶可由染色体或质粒介导的AmpC酶引起，或由质粒介导的经典酶TEM、SHV引起[2]。由于实验条件的限制，我们

仅对实验菌株进行产 AmpC 酶的检测。AmpC 酶属于 Bush 分类中的Ⅰ类酶或 Ambler C 类酶，是一种能水解青霉素类，1、2、3 代头孢菌素类和单环类抗生素的 β-内酰胺酶，β-内酰胺酶抑制剂不能抑制其水解活性[3]。AmpC 酶的产生可分为染色体介导和质粒介导两种，以染色体介导为主[4]。根据 ampC 基因表达的不同[5]，可将带有 ampC 基因的细菌分为两种表型：①持续低水平表达(组成性表达)，当有合适的诱导物存在时，可诱导表达约相当于 10～100 倍低水平表达量的 AmpC 酶；②持续高水平表达(去阻遏突变)。鉴于目前美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)对 AmpC 酶的检测尚无统一方法，本实验中我们采用酶粗提物头孢西丁三维实验提取 AmpC 酶，对 274 株革兰阴性杆菌进行检测发现，仅有 32 株细菌阳性，产 AmpC 酶的总阳性率为：11.7%，其中阴沟肠杆菌 13 株(占 30.2%)、产气肠杆菌 2 株(占 22.2%)、不动杆菌 6 株(占 21.4%)、沙雷氏菌 1 株(占 10.0%)、铜绿假单胞菌 6 株(占 8.9%)、大肠埃希氏菌 4 株(占 3.4%)，产 AmpC 酶的阳性率大于 20% 的有阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、不动杆菌，而铜绿假单胞菌、沙雷氏菌、大肠杆菌产 AmpC 酶的阳性率仅为 8.9%、10.0%、3.4%。由于产 AmpC 酶的总阳性率仅有 11.7%，并且不同菌属高产 AmpC 酶的菌株数不同，所以我们只是对产 AmpC 酶的阳性菌株在革兰阴性杆菌中分布情况的流行病学进行调查，并对调查结果进行初步分析后得知：在革兰阴性杆菌中，产 AmpC 酶阳性率较高的是肠杆菌属及不动杆菌属，这一调查结果与 Takahashi[6]、张丁丁[7]及徐春英[8]在几年前的研究结果基本一致。

另一方面，革兰阴性杆菌的耐药状况日益严重，在 10 种抗生素中，敏感性低于 50% 的有：CN 45.9%、SXT 39.1%、CAZ 36.9%、ATM 31.4%、CRO 30.3%、PIP 18.2%。引起这种日益严重的耐药状况的耐药机制十分复杂，其中对 β-内酰胺类抗生素产生耐药性的机制有：β-内酰胺酶的产生、青霉素结合蛋白的改变、菌体蛋白结构和功能的变化以及外膜蛋白通透性的降低等，而细菌产 AmpC 酶只是产生耐药的机制之一。细菌产 AmpC 酶的量通常与 β-内酰胺类抗生素的使用有关。持续高产 AmpC 酶的菌株对大多数抗菌药物均呈耐药状态，但对碳青霉烯类抗生素(如 IPM)的敏感性较高，我们的研究结果显示：高产 AmpC 酶的菌株的敏感率为 100%，未检出有耐药菌株，可能因其有特殊的空间构象；对四代头孢菌素(如 FEP)亦有较高的敏感性，高产 AmpC 酶的菌株的敏感率为 57.1%，原因是由于第四代头孢菌素对 AmpC 酶的亲和力较低，且能快速地通过细菌的外膜屏障，与 pBp 结合，所以其抗 AmpC 酶突变株的活性大于第三代头孢菌素。由于产 AmpC 酶在不同菌种中的阳性率有差别，我们根据文献[6～8]报道及本次实验的初步结果筛选出肠杆菌属及不动杆菌属共 80 株细菌，并对其耐药性进行初步分析：产 AmpC 酶的菌株(21 株)的耐药率大于 90% 的抗生素有：CRO 95.2%、PIP 95.2%、CAZ 85.7%、ATM 90.4%，应用统计学方法 χ^2 检验对细菌产酶的菌株数及耐药情况的数据进行分析发现：革兰阴性杆菌中肠杆菌属及不动杆菌属产 AmpC 酶的细菌对 CAZ、CRO、PIP、ATM 的耐药性明显增高，与不产 AmpC 酶的细菌的耐药性有显著性差异，说明高产 AmpC 酶的菌株对广谱青霉素类(如 PIP)、三代头孢菌素类(如 CRO、CAZ)及单环 β-内酰胺类(如 ATM)抗生素高度耐药。在所检测的 274 株细菌中，FEP 及 IPM 的敏感率分别为 55.5%、89.4%，虽然仍可说明革兰阴性杆菌所引起的感染对四代头孢菌素(如 FEP)及碳青霉烯类抗生素(如 IPM)敏感，但我们此次流行病学调查提供的数据提示这两种抗生素的敏感性有下降的趋势。以上调查结果提示在临床选择用药时，在未明确革兰阴性杆菌尤其是肠杆菌属及不动杆菌属细菌产 AmpC 酶的情况时，不能笼统用药；治疗持续高产 AmpC 酶株感染时仍可采用碳青霉烯类如(IPM)或四代头孢菌素(FEP)[9]。

参考文献：

[1] 周志慧，李兰娟，俞云松，等. 阴沟肠杆菌耐药及 ampC 基因表达状况研究[J]. 中华传染病杂志，2002，20(6)：337－340.

[2] Pitout J D, Sanders C C, Sanders W E Jr. Antimicrobial resistance with focus on β-lactam resistance in Gram-negative bacilli [J]. Am J Med, 1997, 103(1): 51－59.

[3] Lister P D, Gardner V M, Sanders C C. Clavulanate induces expression of the Pseudomonas aeruginosa AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. [J]. Antimicrob Agent Chemother, 1999, 43(4): 882－889.

[4] Bennett P M, Chopra I. Molecular basis of β-lactamase induction in bacterial [J]. Antimicrob Agent Chemother, 1993, 37(2): 153－158.

[5] Coudron P E, Moland E S, Thomoson 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.

[6] Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, *et al*. Detection of carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii in a hospital [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 526－529.

[7] 张丁丁，范昕建，雷秉钧，等. 产 AmpC 酶阴沟肠杆菌的耐药性及耐药结构基因的序列分析[J]. 华西医学，2002，17(4)：492－494.

[8] 徐英春，陈民钧. AmpC 酶与革兰阴性菌的耐药特征[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2001，21(增刊)：14－16.

[9] 吴伟元，陈民钧. AmpC 酶的研究进展[J]. 中华抗感染化疗杂志，2001，1(1)：54－57.

(编辑　栗　嘉)