

肠杆菌科细菌 AmpC 酶与基因的检测及耐药分析

陈枫, 唐小平, 王晓燕, 林雁, 陈庄, 黄永茂* (泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000)

摘要: 目的 研究肠杆菌科细菌产 AmpC 酶情况以及对抗生素的敏感性。方法 收集临床分离的第 3 代头孢菌素耐药肠杆菌科细菌 62 株。K-B 法对 13 种抗菌药物敏感性、头孢西丁(FOX)耐药性进行初步筛选; 酶粗提物头孢西丁三维实验检测 AmpC 酶; PCR 对产酶菌株 AmpC 结构基因进行分析。结果 62 株肠杆菌科细菌对亚胺培南、头孢吡肟及阿米卡星

基金项目: 四川省重点学科重点建设项目(SZD0421)

作者简介: 陈枫, 女, 副教授 Tel: (0830)3165788 E-mail: chenf6305@foxmail.com *通信作者: 黄永茂, 男, 硕士, 主任医师 Tel: (0830)3165788 E-mail: huang5616@sina.com

中国现代应用药学 2012 年 5 月第 29 卷第 5 期

Chin JMAP, 2012 May, Vol.29 No.5

· 433 ·

耐药率低,对氨苄西林-舒巴坦、头孢曲松、头孢他啶等抗菌药物的耐药率较高,FOX的初筛阳性菌有22株;其中17株检测到AmpC基因,并且8株细菌三维实验阳性。**结论** 产AmpC酶菌株对各种抗生素的耐药率比非产酶菌株明显增高。治疗产AmpC酶细菌所引起的感染以亚胺培南或头孢吡肟为首选,左氧氟沙星、阿米卡星等可作为选用药物之一。

关键词: AmpC酶; 肠杆菌科细菌; 三维实验

中图分类号: R978.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)05-0433-05

Detection and Analysis of Antibiotic Resistance of AmpC Enzyme and Its Gene in Enterobacteriaceae

CHEN Feng, TANG Xiaoping, WANG Xiaoyan, LIN Yan, CHEN Zhuang, HUANG Yongmao* (Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the production of AmpC enzymes and the sensitivity to antibiotics in the Enterobacteriaceae. **METHODS** Sixty two Enterobacteriaceae resistant to third generation cephalosporins were collected, the susceptibility to 13 kinds of antimicrobial drug and the drug tolerance to ceftazidime (FOX) were detected with K-B method. AmpC enzyme was detected by the enzyme extracts FOX three-dimensional test. And structural gene of AmpC was analyzed by PCR. **RESULTS** The resistant rate of 62 Enterobacteriaceae strains was low to cefepime, imipenem and amikacin, but high resistance to ampicillin/sulbactam, ceftriaxone, ceftazidime. There were 22 positive bacteria screened by FOX, 8 three-dimensional test positive bacteria; and 17 strains bacteria in which the AmpC gene were detected in the 22 screening-positive strains. **CONCLUSION** The resistant rate of the Enterobacteriaceae producing AmpC β -lactamases is significantly higher than those of non-producing AmpC. Imipenem or cefepime is the first-use drug for infections caused by AmpC-producing bacteria, and levofloxacin, amikacin are also effective for the treatment of such infections.

KEY WORDS: AmpC enzyme; enterobacteriaceae; three-dimensional test

随着 β -内酰胺类抗生素的广泛并且不合理的应用,细菌对其耐药日益增多,目前认为革兰氏阴性杆菌对第3代头孢菌素耐药的主要原因之一是由于细菌产生染色体和质粒介导的AmpC酶^[1]。本实验检测了62株肠杆菌科细菌产AmpC酶情况并分析其耐药性,了解本地区耐头孢类抗菌药物肠杆菌科细菌的分布、耐药发生率及耐药情况,为临床治疗产AmpC酶细菌的感染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 62株肠杆菌科细菌临床分离株(不含同一病例相同部位重复分离菌株,且至少对一种第3代头孢菌素耐药)来自我院2009年10月—2010年9月的各种不同细菌感染的住院患者。其中下呼吸道感染25例,泌尿系统感染16例,外科切口感染12例,全身感染5例,其它感染4例;全部菌株均重新经VITEK系统(法国BioMerieux)鉴定确认。大肠埃希菌ATCC25922(由国家临床检验中心购得),标准高产AmpC酶阴沟肠杆菌029M(由华中科技大学同济医学院检验科惠赠)。

1.1.2 试剂与培养基 哌拉西林(FEP)、氨曲三唑巴坦(TZP)、头孢噻肟-克拉维酸(CD03)、氨苄西林-舒巴坦(SAM)、头孢西丁(FOX)、头孢曲松(CRO)纸

片为英国OXOID公司产品;头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟南(ATM)、亚胺培南(IPM)、环丙沙星(CIP)、阿米卡星(AMK)、左氧氟沙星(LVF)纸片为北京天坛药物生物技术开发公司产品;胰大豆蛋白胨肉汤、M-H琼脂、头孢硝噻吩粉剂购于英国OXOID公司;PCR试剂盒、引物购自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感实验和AmpC酶的初步筛选 药敏实验采用CLSI推荐的纸片扩散法(Kirby-Bauer)进行,对LVF、CIP、AK、TZP、CD03、SAM、FOX、CTX、CRO、CAZ、FEP、ATM、IPM药物进行药物敏感实验。根据CLSI 2009年颁布的判断标准进行药敏结果判断。其中FOX耐药即抑菌环 ≤ 17 mm作为高产AmpC酶阳性初步筛选标准^[2]。

1.2.2 三维实验检测AmpC酶^[3] 酶提取物制备:取普通血平皿培养的受试菌落制成0.5麦氏单位菌液,取50 μ L菌液加入12 mL胰大豆蛋白胨肉汤中,35 $^{\circ}$ C恒温摇床170 $r \cdot min^{-1}$ 振荡培养18 h,4 $^{\circ}$ C,6 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心20 min,弃上清液,沉淀物用0.1 $mol \cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲液冲洗2次,收集沉淀置-80 $^{\circ}$ C快速冷冻,37 $^{\circ}$ C水浴快速解冻,反复5次;再用1.5 mL 0.01 $mol \cdot L^{-1}$ 磷酸盐缓冲液悬浮漩涡混匀,以4 $^{\circ}$ C 13 600 $r \cdot min^{-1}$ 离心1 h,弃沉淀吸上清液,经MH琼脂平板常规细菌培养阴性后于

-20 °C 保存。

酶提取物三维实验: 将 0.5 麦氏单位大肠埃希菌 ATCC 25922 按照纸片扩散法的规范化要求接种于 MH 琼脂平板, 取头孢西丁纸片(30 μg)置于平板中心, 用消毒的刀片在距纸片 5 mm 处放射状地由里向外划切出 2 条约 30 mm×1 mm 的沟槽, 用微量加样器取 40 μL 的待检细菌 β-内酰胺酶粗提物由里向外加入沟槽内, 尽量避免酶液溢出; 置于 35 °C 培养 18 h, 若观察到沟槽与抑菌环交接处出现蚀环现象, 表明该沟槽内的 β-内酰胺酶为 AmpC 酶, 这也说明该受试菌为产 AmpC 酶菌株, 以标准菌株阴沟肠杆菌 029M 为阳性对照。

1.2.3 PCR 检测 AmpC 结构基因 模板 DNA 的制备: 挑纯培养菌落置入 0.5 mL 离心管内(内预置 200 ng·mL⁻¹ 蛋白酶 K 溶液 200 μL), 56 °C, 水浴 2 h, 改 95 °C 水浴 10 min, 离心 15 000 r·min⁻¹, 30 s。上清液即为基因检测的模板液^[4]。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 5 μL, dNTP 1 μL, P1(5'CTGAT GAAAGCCAGTCTGT-3') 2 μL, P2(5'TTCGCG AGCATCACAATACC-3') 2 μL, 模板 DNA 5 μL, TaqDNA polymerase 3 U, ddH₂O 35 μL, 总反应体积 50 μL; 混匀离心, PCR 反应: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 50 s、55 °C 50 s、72 °C 1 min, 进行 35 个循环, 循环结束后 72 °C 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶 DNA 成像仪分析结果。以标准菌株阴沟肠杆菌 029M 和蒸馏水作为阳性和阴性对照。

1.2.4 8 株高产 AmpC 酶的菌株药物敏感实验 8 株高产 AmpC 酶的菌株采用纸片扩散法, 对 LVF、CIP、AK、TZP、CD03、SAM、FOX、CTX、CRO、CAZ、FEP、ATM、IPM 药物进行药物敏感实验。

2 结果

2.1 62 株肠杆菌科细菌的药敏和 AmpC 酶的初步筛选结果

62 株肠杆菌科细菌对 SAM(51.61%)、CRO(48.38%)、CAZ(48.39%)、CTX(45.16%)、CIP(45.16%)的耐药率较高。对 CD03、FOX 和 ATM 的耐药率在 40%左右。而对 LVF(22.58%)、哌拉西林-三唑巴坦(27.41%)的耐药率较低, 对头孢吡肟和阿米卡星的耐药率在 10%以下; 对 IPM 的耐药率仅为 4.84%, 62 株受试肠杆菌科细菌中 22 株(35.48%)对 FOX 耐药即抑菌环 ≤ 17 mm, 为初筛阳性菌。见表 1。

表 1 62 株肠杆菌科细菌的药敏情况

Tab 1 The antimicrobial susceptibility of 62 Enterobacteriaceae

抗生素	耐药/株(%)	中介/株(%)	敏感/株(%)
哌拉西林-三唑巴坦(TZP)	37(59.67)	8(12.90)	17(27.41)
头孢噻肟-克拉维酸(CD03)	33(53.22)	4(6.45)	25(40.32)
氨苄西林-舒巴坦(SAM)	16(25.80)	14(22.58)	32(51.61)
头孢西丁(FOX)	30(48.38)	10(16.12)	22(35.48)
头孢噻肟(CTX)	26(41.94)	8(12.90)	28(45.16)
头孢曲松(CRO)	23(37.09)	9(14.51)	30(48.38)
头孢他啶(CAZ)	27(43.55)	5(8.06)	30(48.39)
头孢吡肟(FEP)	52(83.87)	4(6.45)	6(9.68)
氨基青(AM)	23(37.10)	14(22.58)	25(40.32)
亚胺培南(IPM)	57(91.94)	2(3.23)	3(4.84)
环丙沙星(CIP)	29(46.77)	5(8.06)	28(45.16)
阿米卡星(AK)	27(43.55)	27(43.55)	8(12.90)
左氧氟沙星(LVF)	44(70.97)	4(6.45)	14(22.58)

2.2 三维实验结果

22 株初筛阳性菌中, 8 株三维实验阳性, 为高产 AmpC 酶菌株, 占初筛阳性菌的 36.36% (8/22), 占全部受试菌的 12.90%(8/62), 结果见表 2、图 1。

表 2 62 株肠杆菌科细菌的菌种分布和产酶情况

Tab 2 The distribution and enzymes producing of 62 strains Enterobacteriaceae

细菌(株数)	FOX 初筛(+)	AmpC 酶(+)
阴沟肠杆菌(10)	5	3
大肠埃希菌(15)	4	1
肺炎克雷伯菌(18)	5	2
结肠炎耶尔森菌(3)	2	1
戴维斯西地西菌(3)	3	1
弗劳地枸橼酸杆菌(3)	1	0
普通变形杆菌(3)	0	0
产气肠杆菌(3)	1	0
产酸克雷伯菌(2)	0	0
深红沙雷氏菌(2)	1	0
总计	22	8

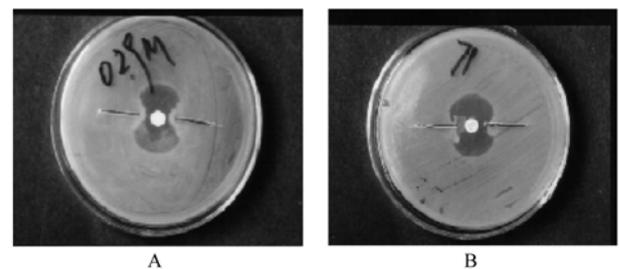


图 1 三维实验结果

A-标准高产 AmpC 酶阴沟肠杆菌 029M; B-大肠杆菌阳性菌株

Fig 1 Results of three-dimensional test

A-standard *Enterobacter cloacae* 029M of AmpC enzyme heavy producing; B-positive strains of *E.coli*

2.3 AmpC 基因检测结果

对 22 株初筛阳性的肠杆菌科细菌进行 PCR 扩增, 有 17 株 PCR 扩增阳性(包含 8 株三维实验阳性菌株), 5 株阴性。图 2 可见标准产酶菌和临床产酶菌经 PCR 扩增出 968 bp 的 DNA 片段。

2.4 8 株高产 AmpC 酶的菌株药物实验结果。

8 株高产 AmpC 酶的菌株, 对亚胺培南(IPM) 耐药率为 0, 对 FEP、LVF 和 AK 的耐药较低, 对第 3 代头孢菌素、单环类抗生素及 β -内酰胺类抗生素-酶抑制剂复合物高耐药, 结果见表 3。

3 讨论

AmpC 酶为 ClassC 类酶, 在 Bush-J-M 的分类中属 Group 1^[5], 能水解第 3 代头孢菌素, 不被克

表 3 8 株肠杆菌科细菌的药物实验结果

Tab 3 Drug test results of 8 Enterobacteriaceae

序号	细菌	LVF	CIP	AK	TZP	CD03	SAM	FOX	CTX	CRO	CAZ	FEP	ATM	IPM
1	阴沟肠杆菌	R	R	S	I	I	R	R	R	R	R	S	I	S
2	阴沟肠杆菌	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
3	肺炎克雷伯菌	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S
4	阴沟肠杆菌	S	S	R	R	R	R	R	I	I	R	S	R	S
5	肺炎克雷伯菌	I	R	I	I	S	R	R	R	R	R	S	I	S
6	结肠炎耶尔森菌	S	S	I	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S
7	大肠杆菌	R	R	I	I	R	I	I	R	R	R	S	R	S
8	戴维斯西地西菌	S	I	S	I	R	R	R	R	R	R	S	I	S

注: R-耐药; I-中介; S-敏感

Note: R-resistant; I-intermediate; S-sensitive

拉维酸及 EDTA 抑制, 可由染色体及质粒介导。近年来临床上第 3 代头孢菌素耐药菌的增多, 一方面是由于细菌产生了超广谱酶的量明显增多, 另外, 有相当部分的耐药菌是由于产生 AmpC 酶而引起的。研究肠杆菌科细菌产 AmpC 酶的状况及耐药特点, 对于临床治疗此类耐药菌引起的感染具有指导意义。62 株肠杆菌科细菌的药敏检测结果分析, 对于碳青霉烯类 IPM、第四代头孢菌素 FEP 及氨基糖苷类 AK 的耐药率较低。而第 3 代头孢菌素 CTX、CRO、CAZ 耐药率较高, 这与临床大量使用第 3 代头孢菌素有一定关系。由于 IPM 对 β -内酰胺酶具有高度稳定性, 与所有革兰氏阴性菌的青霉素结合蛋白(PBPs)具有较强的亲和力, 同时 IPM 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。CTX 对 AmpC 酶的亲和力较低, 且能快速地通过细菌的外膜屏障与 PBPs 结合, 抗 AmpC 酶突变株的活性较第 3 代头孢菌素强。喹诺酮类抗菌药物中, CIP 的耐药率明显高

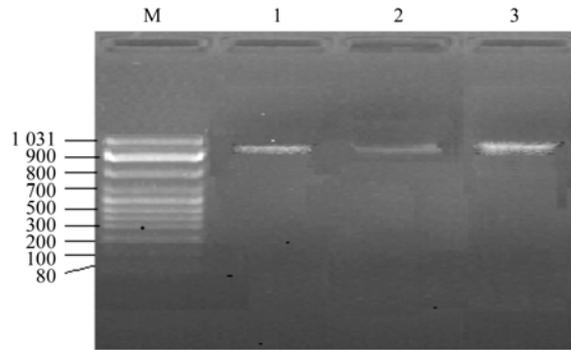


图 2 PCR 产物的电泳图谱

M-Marker; 1-阴沟肠杆菌 029M; 2-大肠埃希菌; 3-阴沟肠杆菌

Fig 2 Electropherogram of PCR products

M-Marker; 1-*Enterobacter cloacae* 029M; 2-*E.coli*; 3-*Enterobacter cloacae*

于左氧氟沙星, 除与 CIP 使用时间较长、用量较大有关外, 可能还与 GyrA 和 ParC 基因的突变^[6]、AcrA 的高表达有关。

笔者采用酶粗提物头孢西丁三维实验方法对 22 株初筛阳性的肠杆菌科细菌进行 AmpC 酶检测。检出产 AmpC 酶 8 株, 检出率为 12.90%, 低于国内其他文献报道的检出率^[7], 分析原因可能与本实验菌株分布较广泛有关(本实验菌株来自 10 种肠杆菌)。8 株产 AmpC 酶的菌株在药敏实验中, 对 IPM 全部敏感, 对 FEP 有 1 株表现为耐药, 原因可能与头孢菌素酶 H10 螺旋上 6 个氨基酸缺失有关。2 株产 AmpC 酶菌株对氨基糖苷类抗菌药物 AK 耐药, 一般认为是编码产生 AmpC 酶的质粒常同时携带对此类抗生素耐药基因所造成的。值得注意的是, 含 β -内酰胺酶抑制剂抗生素中, TZP 的耐药率显著低于 SAM 和 CD03, 原因在于三唑巴坦对诱导性 AmpC 酶无诱导作用, 同时对 AmpC 酶分子有灭活作用, 在与 FEP 联用时增强了 FEP 的杀菌作

用。但是关于三唑巴坦与 β -内酰胺类抗生素联用来对抗高产 AmpC 酶的耐药仍有待实验室和临床进一步研究。

AmpC 酶由 AmpC 基因编码, 其表达受由 AmpC、ampR、ampD 和 ampG 这 4 个不连锁的基因组成的复合操纵子调控。AmpC 基因的分布较为广泛, 部分肠杆菌科细菌都存在染色体介导的 AmpC 基因, 且在肠杆菌科细菌中具有高度同源性^[8]。22 株初筛阳性的菌株经 PCR 证实 17 株含有 AmpC 结构基因, 这 17 株中 8 株三维实验阳性, 另外 9 株三维实验阴性菌株, 预示着他们有可能成为潜在的耐药菌, 这些菌株如果不接触 β -内酰胺类抗生素时, 只产生少量 AmpC 酶, 一旦有诱导作用的 β -内酰胺类抗生素存在如第 3 代头孢菌素等, 可使这些菌株 AmpC 酶产量显著上升而成为耐药菌。

实验结果提示: 肠杆菌科细菌耐药状况较为严重; 产 AmpC 酶菌株对各种抗生素的耐药率比非产酶菌株明显增高, 应对 AmpC 酶检测及监测给予足够重视; 治疗产 AmpC 酶细菌所引起的感染以 IPM 或 FEP 为首选, LVF 和 AK 等可作为选用药物之一。目前临床上治疗高产 AmpC 酶菌株感染除第 4 代头孢菌素和碳青霉烯类外, 可供选择的 β -内酰胺类抗生素非常有限。因此, 临床实验室对肠杆菌科细菌进行 AmpC 基因及酶的相关

监测, 对于指导临床正确合理使用抗生素及延缓细菌耐药性的产生具有重要意义。

REFERENCES

- [1] WU D R, ZHANG Y A, ZHANG S, et al. Genotype of β -lactamases in plasmid-mediated AmpC of *Escherichia coli* in Hainan [J]. *China J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2011, 21(1): 14-18.
- [2] CLSI M100-S19. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. 2009, 26(3): 25-30.
- [3] COUNDRON 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.
- [4] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(9): 597-602.
- [5] DUAN J J, LIU Z L, ZHANG R M, et al. Detection and analysis of AmpC-producing Gram-negative bacilli by three-dimensional extract tests [J]. *Chin Rem Clin*(中国药物与临床), 2007, 7(4): 257-260.
- [6] JIANG J, HU D C. The mechanism of resistance in *E. coli* to quinolone [J]. *Med Recapit*(医学综述), 2008, 4(5): 767-768.
- [7] YANG F X, XU Z Q, WAGN K Q, et al. Distribution and resistance of AmpC enzyme producing Gram-negative bacilli [J]. *Chin J Nosocomiol*(中华医院感染学杂志), 2009, 19(13): 1725-1727.
- [8] BAUERNFEIND A, WAGNER S, JUNGWIRTH R, et al. A novel class C beta-lactamase (FOX-2) in *Escherichia coli* conferring resistance to cephamycins [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(9): 2041-2046.

收稿日期: 2011-09-13