

# 107 株阴沟肠杆菌产 ESBLs 和 AmpC 酶检测及耐药性分析

宁兴旺, 朱惠斌, 匡敏, 谢小兵, 钱纯

湖南中医药大学第一附属医院医学检验中心, 湖南 长沙 410007

**摘要:** **目的** 了解近年来临床分离的阴沟肠杆菌对常用抗菌药物的敏感性, 并检测分离株产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBLs) 和 AmpC 酶的情况, 指导临床合理用药。 **方法** 收集 2016 年 1-12 月湖南中医药大学第一附属医院分离自临床标本的阴沟肠杆菌, 采用 Vitek-2 Compact 进行常规药敏试验, 采用表型确证试验检测 ESBLs, 采用三维试验检测 AmpC 酶。

**结果** 共收集非重复分离阴沟肠杆菌 107 株, 主要来源于呼吸内科 (26/107, 24.3%)、骨伤科 (21/107, 19.6%)、中心 ICU (20/107, 18.7%) 等科室, 以痰液 (38/107, 35.5%) 和伤口分泌物 (29/107, 27.1%) 等标本为主; 阴沟肠杆菌对青霉素类、三代头孢菌素和头霉素类高度耐药, 对哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、亚胺培南耐药率分别为 13.1%、22.4%、0.9%。共检测出单产 ESBLs 菌株 30 株 (28.0%), 单产 AmpC 酶的菌株 35 株 (32.7%); 同时产 ESBLs 和 AmpC 酶菌株 14 株 (13.1%); 同时产 ESBLs 和 AmpC 酶菌株对常用抗菌药物的耐药率高于不产酶株, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

**结论** 产 ESBLs、AmpC 酶是阴沟肠杆菌多重耐药的重要机制; 阴沟肠杆菌产酶株的检测, 对指导临床抗菌治疗具有重要意义。

**关键词:** 阴沟肠杆菌; ESBLs; AmpC 酶; SSBLs; 耐药性

**中图分类号:** R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)05-0534-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.05.006

## Detection of ESBLs and AmpC $\beta$ -lactamase in 107 strains of *Enterobacter cloacae* and analysis of their drug resistance

NING Xing-wang, ZHU Hui-bin, KUANG Min, XIE Xiao-bing, QIAN Chun

The Medical Laboratory Center, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: QIAN Chun, E-mail: 1036871340@qq.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the susceptibility to commonly-used antimicrobial agents in clinically isolated *Enterobacter cloacae* in recent years, to determine the prevalence of isolates producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and cephalosporinase (AmpC), and to provide reference for reasonable use of antibiotics in clinical practice. **Methods** We collected *Enterobacter cloacae* strains isolated from clinical specimens in the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine from January to November in 2016. The routine antibiotic susceptibility tests were conducted by Vitek-2 Compact fully automatic bacterial identification and drug susceptibility analyzer. ESBLs and AmpC were determined respectively by phenotypic confirmatory test and three dimensional test. **Results** A total of 107 non-repeatedly isolated *Enterobacter cloacae* strains were collected mainly from respiratory medicine department (26/107, 24.3%), bone traumatology department (21/107, 19.6%) and central ICU (20/107, 18.7%). The main specimens were sputum (38/107, 35.5%) and wound secretion (29/107, 27.1%). *Enterobacter cloacae* strains were highly resistant to penicillin, third-generation cephalosporins and cephamycins. The drug resistance rates to piperacillin/tazobactam, cefepime and imipenem were 13.1%, 22.4% and 0.9% respectively. 30 (28.0%) strains produced ESBLs, 35 (32.7%) strains AmpC, and 14 (13.1%) stains ESBLs and AmpC parallelly. The rates of resistance to commonly-used antimicrobial agents were higher in the stains produced both ESBLs and AmpC enzyme than in the non-enzyme-producing stains.

**Conclusions** Producing ESBLs and AmpC enzyme acts the important mechanism to multidrug resistance of *Enterobacter cloacae*; and hence, it is of great value to detect enzyme-producing isolates for antibiotic therapy.

**Key words:** *Enterobacter cloacae*; ESBLs; AmpC  $\beta$ -lactamase; SSBLs; drug resistance

**基金项目:** 湖南省教育厅科学研究资助项目 (17B195)

**作者简介:** 宁兴旺 (1982-), 男, 湖南邵东人, 硕士, 主管技师, 主要从事细菌耐药监测和耐药机制研究工作。

**通信作者:** 钱纯, E-mail: 1036871340@qq.com。

阴沟肠杆菌是广泛存在于自然界和人体肠道的肠杆菌科细菌,是医院内获得性感染常见的条件致病菌。阴沟肠杆菌感染多与严重基础疾病、长期广谱抗菌药物的使用以及侵入性操作等因素有关<sup>[1]</sup>。随着三、四代头孢菌素的广泛和不合理使用,阴沟肠杆菌对β-内酰胺类抗菌药物的耐药率不断升高<sup>[2]</sup>,阴沟肠杆菌对β-内酰胺类抗菌药物耐药给临床抗感染治疗带来很大困扰,而产ESBLs和AmpC酶是其主要耐药机制<sup>[3]</sup>。本研究通过分析湖南中医药大学第一附属医院近1年来分离的阴沟肠杆菌对常用抗菌药物的敏感性,并检测分离株产ESBLs、AmpC酶的情况,为临床合理使用抗菌药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 临床分离株:收集2016年1-12月湖南中医药大学第一附属医院分离自临床标本的阴沟肠杆菌共107株,剔除来自同一患者同一解剖部位标本的重复分离株。质控菌株均购自国家卫计委临检中心:肺炎克雷伯菌ATCC 700603作为产ESBLs阳性质控菌株,阴沟肠杆菌029M作为产AmpC酶阳性质控菌株,大肠埃希菌ATCC 25922作为不产ESBLs和AmpC酶的阴性质控菌株。

1.2 仪器与试剂 VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定与药敏分析系统(法国生物梅里埃);AST-GN13药敏测试卡(法国生物梅里埃);M-H琼脂平板(法国生物梅里埃);头孢西丁(30 μg)、头孢他啶(30 μg)、头孢他啶/克拉维酸(30/10 μg)、头孢噻肟(30 μg)以及头孢噻肟/克拉维酸(30/10 μg)纸片均购自英国Oxoid公司。

1.3 方法

1.3.1 分离菌株鉴定和常规药敏试验 参照《全国临床检验操作规程》第4版对细菌进行分离和培养。挑取哥伦比亚血琼脂平板上纯培养菌落3~5个,调菌液浓度0.5~0.63麦氏浓度,采用VITEK-2 Compact全自动微生物鉴定与药敏分析系统结合传统手工法进行鉴定<sup>[4]</sup>,使用AST-GN13药敏卡进行常规药敏试验,以CLSI-M100S(第26版)标准对药敏试验结果进行判读。

1.3.2 阴沟肠杆菌ESBLs表型检测 依据CLSI推荐的表型确证试验纸片扩散法测定ESBLs。以肺炎克雷伯菌ATCC 700603和大肠埃希菌ATCC 25922分别作为ESBLs检测的阳性和阴性质控菌株。

1.3.3 阴沟肠杆菌AmpC酶检测 参照Coudron PE等<sup>[5]</sup>采用的酶提取物三维试验检测AmpC酶。(1)β

内酰胺酶提取物:将待测菌株接种于1.5 ml M-H肉汤,37℃孵育18~24 h后倒入30 ml M-H肉汤中,37℃振荡培养4 h,2 000 r/min离心后将沉淀置1 ml灭菌生理盐水中,-80℃冰箱中反复冻融5次(每次2 h以上)。于4℃,14 000 r/min离心45 min,上清液即为β内酰胺酶粗提物,于-20℃冰箱低温保存。(2)三维试验:在MH琼脂平板上均匀涂布0.5麦氏浓度大肠埃希菌ATCC 25922,将30 μg头孢西丁纸片贴于平板中央,用无菌刀片在距离纸片边缘5 mm处向外挖一约20 mm×2 mm的沟槽,在沟槽内加入酶粗提物,于35℃培养过夜。若头孢西丁纸片的抑菌圈有缺失现象即为AmpC酶阳性,若无变化者为AmpC酶阴性。以阴沟肠杆菌029M和大肠埃希菌ATCC 25922分别作为AmpC酶阳性和阴性质控菌株。

1.4 统计学方法 计数资料采用例数及百分比(%)表示,阴沟肠杆菌对常用抗菌药物的耐药率采用WHONET 5.6软件进行统计,ESBLs和AmpC酶同时阳性的菌株与二者均为阴性的菌株之间的耐药率比较采用Fisher精确概率计算法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本来源及科室分布情况 2016年1-12月,共检出107株非重复分离阴沟肠杆菌,标本来源及科室来源分别见表1和表2。

表1 107株阴沟肠杆菌的标本来源分布构成比

标本来源	菌株数( $n=107$ )	构成比(%)
痰	38	35.5
伤口分泌物	29	27.1
尿液	19	17.8
血液	13	12.1
导管尖端	6	5.6
腹水	2	1.9

表2 107株阴沟肠杆菌的临床科室分布构成比

科室类别	菌株数( $n=107$ )	构成比(%)
呼吸内科	26	24.3
骨伤科	21	19.6
中心ICU	20	18.7
普外科	13	12.1

续表 2

科室类别	菌株数( <i>n</i> = 107)	构成比(%)
泌尿外科	12	11.2
心胸外科	9	8.4
神经外科	4	3.7
内分泌内科	2	1.9

2.2 阴沟肠杆菌产 ESBLs 和 AmpC 酶检测结果  
107 株阴沟肠杆菌中,单产 ESBLs 菌株 30 株(28.0%),单产 AmpC 酶菌株 35 株(32.7%),同时产 ESBLs 和 AmpC 酶菌株 14 株(13.1%),2 种酶均不产的菌株 28 株(26.2%)。

2.3 阴沟肠杆菌对常用抗菌药物耐药率 107 株阴沟肠杆菌对常用抗菌药物均表现出一定程度的耐药,不同产酶株的耐药率差异有统计学意义,见表 3。

表 3 107 株阴沟肠杆菌对常用抗菌药物耐药率(%)

药物名称	阴沟肠杆菌 ( <i>n</i> = 107)	单产 ESBLs ( <i>n</i> = 30)	单产 AmpC 酶 ( <i>n</i> = 35)	ESBLs+AmpC 酶均为阳性 ( <i>n</i> = 14)	ESBLs+AmpC 酶均为阴性 ( <i>n</i> = 28)	<i>P</i> 值
氨苄西林 <sup>a</sup>	92.5	100.0	100.0	100.0	71.4	0.04
氨苄西林/舒巴坦 <sup>a</sup>	89.7	100.0	80.0	100.0	14.3	0.01
哌拉西林/他唑巴坦 <sup>a</sup>	13.1	15.0	14.3	42.9	0.0	0.00
头孢唑林	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	—
头孢他啶 <sup>a</sup>	71.0	85.0	94.3	85.7	14.3	0.01
头孢曲松 <sup>a</sup>	71.9	90.0	97.1	64.3	21.4	0.02
头孢吡肟 <sup>a</sup>	22.4	45.0	11.4	50.0	14.3	0.01
头孢西丁 <sup>a</sup>	94.4	90.0	100.0	100.0	85.7	0.04
氨基南 <sup>a</sup>	58.9	90.0	42.9	92.9	25.0	0.01
亚胺培南 <sup>a</sup>	0.9	0.0	0.0	7.1	0.0	0.00
阿米卡星 <sup>a</sup>	20.6	20.0	25.7	28.6	17.9	0.04
庆大霉素 <sup>a</sup>	20.6	15.0	25.7	42.8	14.3	0.03
环丙沙星 <sup>a</sup>	33.6	45.0	48.6	50.0	10.7	0.02
左氧氟沙星 <sup>a</sup>	19.6	25.0	20.0	50.0	7.1	0.01

注:a 同时产 ESBLs 和 AmpC 酶菌株耐药率高于不产酶株耐药率,经 Fisher 精确概率计算同种药物两组之间耐药率,均 *P*<0.05。

3 讨 论

本研究共收集 107 株非重复分离阴沟肠杆菌,主要来源于痰液、伤口分泌物、尿液和血液等标本,与部分文献报道相似<sup>[6-7]</sup>。来自呼吸内科、中心 ICU 和神经外科的分离株主要引起呼吸道感染,常见于老年和重症患者,且有机械通气;而骨科、普外科、泌尿外科的分离株主要引起伤口或泌尿系统感染,常与侵入性操作有关<sup>[8]</sup>。

阴沟肠杆菌对 β-内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制是产 ESBLs 和 AmpC 酶<sup>[9]</sup>。大部分的 ESBLs 是由质粒介导,属于丝氨酸蛋白酶类。ESBLs 不仅对青霉

素类、头孢菌素具有水解作用,对单环 β-内酰胺类抗菌药物也呈现出高度耐药的现象,但加酶抑制剂的复合制剂以及碳青霉烯类抗菌药物则对 ESBLs 阳性的菌株具有较好的抗菌活性<sup>[10]</sup>。阴沟肠杆菌携带的 ESBLs 基因质粒通常也会携带其他多种抗菌药物的耐药基因,从而导致多重耐药的产生<sup>[11]</sup>。AmpC 酶,即头孢菌素酶,主要由染色体介导,具有比 ESBLs 更广的水解底物谱,可水解包括第三代头孢菌素、单环类和头霉素等 β-内酰胺类抗菌药物,且不受舒巴坦等酶抑制剂所抑制<sup>[12]</sup>。本研究共检出单产 ESBLs 菌株 30 株(28.0%),单产 AmpC 酶阴沟肠杆菌 35 株(32.7%),

与国内部分报道<sup>[13-14]</sup>不一致,说明不同地区阴沟肠杆菌单产 ESBLs 和单产 AmpC 酶的检出率不一致,这可能与实验室的不同检测方法、临床科室分布结构以及临床经验用药习惯的差异有关。单产 ESBLs 和单产 AmpC 酶阴沟肠杆菌,对氨苄西林、第一代头孢菌素、第三代头孢菌素、头霉素类抗菌药物均表现为高度耐药。由于第四代头孢菌素具有更强的细胞外膜穿透性,头孢吡肟对单产 AmpC 酶阴沟肠杆菌的耐药率相对较低,可供临床选择性使用。对于加酶抑制剂的复合制剂,氨苄西林/舒巴坦耐药率显著高于哌拉西林/他唑巴坦,推测不同的酶抑制剂的抑制能力存在较大差异,这与谭友坤等<sup>[15]</sup>报道相似。由于携带 ESBLs 的质粒可同时携带氨基糖苷类耐药基因<sup>[16]</sup>,以及临床对氨基糖苷类抗菌药物的广泛使用,阴沟肠杆菌对氨基糖苷类抗菌药物也表现出一定程度的耐药。

对于 ESBLs 与 AmpC 酶均为阳性的菌株,有研究者称之为产超-超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(SSBLs),其表现为对第三代头孢菌素、头霉素及酶抑制剂复合制剂均耐药<sup>[17]</sup>。本研究发现,产 SSBLs 阴沟肠杆菌对青霉素类、第三代头孢菌素、氨基糖苷类均表现为高度耐药,加酶抑制剂复合制剂、氨基糖苷类抗菌药物的耐药率也显著高于单产 ESBLs 和单产 AmpC 酶菌株。除第一代头孢菌素均表现为高度耐药以外,产 SSBLs 阴沟肠杆菌对常用抗菌药物的耐药率均高于 ESBLs 和 AmpC 酶均为阴性的菌株( $P<0.05$ )。值得注意的是,碳青霉烯类抗菌药物对所有分离株均表现为很好的敏感性(99.1%),仅检出 1 株对亚胺培南耐药的阴沟肠杆菌,且为产 SSBLs 菌株。因此,产 SSBLs 导致的阴沟肠杆菌高度耐药及多重耐药,应引起临床高度关注<sup>[18]</sup>。

综上所述,碳青霉烯类抗菌药物如亚胺培南可用于治疗同时产 ESBLs 和 AmpC 酶阴沟肠杆菌引起的感染,临床可选用哌拉西林/他唑巴坦治疗由单产 ESBLs 阴沟肠杆菌引起的感染,对于单产 AmpC 酶的菌株,临床可选用哌拉西林/他唑巴坦或第四代头孢菌素如头孢吡肟。常规检测 ESBLs 和 AmpC 酶,对于监测阴沟肠杆菌多重耐药菌株的流行及指导临床合理使用抗菌药物具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 刘琪,杨山虹,孙各琴,等.阴沟肠杆菌医院感染分布及耐药性分析[J].中国病原生物学杂志,2012,7(2):149-151.
- [2] 陈玉娇,任爱民,王红,等.主动外排系统介导阴沟肠杆菌耐药机

- 制新进展[J].中华医院感染学杂志,2013,23(23):5894-5896.
- [3] 王凤霞,宿振国.阴沟肠杆菌对临床常用抗菌药物耐药机制的研究进展[J].国际流行病学传染病学杂志,2013,40(2):133-135.
- [4] Yang FC, Yan JJ, Hung KH, et al. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese University Hospital[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2):223-226.
- [5] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. 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.
- [6] 许惠根,严达尊.129 株阴沟肠杆菌感染分布与耐药分析[J].齐齐哈尔医学院学报,2012,33(2):212-213.
- [7] 桑建列,胡丽庆.2007-2009 年社区医院临床分离的阴沟肠杆菌分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(12):2622-2623.
- [8] 汪艳,陈乐,周易.重症监护病房与普通住院科室医院感染中阴沟肠杆菌的耐药性对比[J].中华医院感染学杂志,2017,27(2):272-275.
- [9] Jeong HS, Bae IK, Shin JH, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase in *Enterobacteriaceae*[J]. Korean J Lab Med, 2011, 31(4):257-264.
- [10] 赵永新,李素敏,张卫群,等.产生 ESBLs 和 AmpC 酶的肠杆菌科细菌检测及耐药性分析[J].中国抗生素杂志,2012,37(3):240.
- [11] Robert J, Pantel A, Mérens A, et al. Incidence rates of carbapenems-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(10):2706-2712.
- [12] 赵德军,胡昭宇,武静,等.产 ESBLs 及 AmpC 酶阴沟肠杆菌的监测及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(10):1118-1119.
- [13] 杨洪芬,李美,刘宝,等.阴沟肠杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 的监测及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(24):3400-3402.
- [14] 苏国娟,王国庆.阴沟肠杆菌、奇异变形杆菌 AmpC 酶和 ESBLs 的监测及其耐药性研究[J].中国实验诊断学,2015,19(5):719-722.
- [15] 谭友坤.678 株革兰阴性杆菌的耐药监测分析[J].实用预防医学,2010,17(9):1873-1875.
- [16] 赵永新,李素敏,张卫群,等.产生 ESBLs 和 AmpC 酶的肠杆菌科细菌检测及耐药性分析[J].中国抗生素杂志,2012,37(3):240-243.
- [17] Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, et al. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: survey of laboratories in connecticut[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(12):4065-4070.
- [18] 邹明祥,邹靖敏,李军,等.湘雅医院细菌耐药性检测[J].实用预防医学,2011,18(10):1823-1826.

收稿日期:2017-08-15