

产 β -内酰胺酶革兰阴性杆菌的筛选和耐药性分析

易建云, 江洁华(广州医学院第一附属医院检验科 510120)

【摘要】 目的 以多重耐药革兰阴性菌为对象, 检测 β -内酰胺酶表型, 了解其耐药特性和分布特点。方法 采用纸片扩散初筛法、扩散确证法、头孢西丁三维试验、甘露聚糖结合凝集素(MBL)的协同试验进行确证; 采用法国梅里埃 API 生化鉴定试条或经 VITEK-2 鉴定系统将细胞鉴定到种; 药敏试验用琼脂纸片扩散(K-B)法, 经 WHO-NET5.0 软件进行统计学分析, 分析其耐药特性。结果 多重耐药革兰阴性杆菌 β -内酰胺酶总检出率为 26.4% (80/302), 主要由产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)引起, 占 16.56% (50/302); 其次为 ESBLs+ AmpC 引起, 占 6.62% (20/302); ESBLs+ AmpC+ MBL 引起, 占 1.66% (5/302), 单独由 AmpC 引起的仅占 0.66% (2/302), 有 3 株未能定型占 0.99% (3/302)。多重耐药革兰阴性杆菌对临床常用抗生素的总体耐药率最低的为阿米卡星(18.99%)、其次为亚胺培南(20.0%), 头孢哌酮/舒巴坦(21.7%)、哌拉西林/他唑巴坦(21.89%); 最高的为氨苄西林(98.33%), 其次为氨苄西林/舒巴坦(83.33%)、头孢曲松(76.25%)、头孢西丁(63.64%)及头孢噻肟(60.50%)等, 大部分细菌呈多重耐药性。结论 产多种 β -内酰胺酶的革兰阴性菌具有多重耐药。

【关键词】 β -内酰胺酶; 多重耐药; 革兰阴性杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.05.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)05-0545-02

Screen of β -lactamase in the multi-resistant gram-negative bacilli and analysis of drug resistance YI Jian-yun, JIANG Jie-hua (Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, 510120, China)

【Abstract】 Objective To screen the β -lactamase in the multi-resistant gram-negative bacilli, and to assess the characteristics of the drug resistant and distribution. Methods 302 multi-resistant gram-negative strains with suspected producing β -lactamase were detected by disc diffusion screen test, which were further ascertained by disc diffusion confirmatory test, a cefoxitin three dimensional test, metallo β -lactamases double-disc synergy test. These isolates were identified by using the API system. Antibiotics susceptibility was detected by K-B method, WHONET5.0 was used for data analysis. Results Among 302 clinical multi-resistant gram-negative isolates, total detection rate of stains produced β -lactamases was 26.4% (80/302), these rates of ESBLs, ESBLs combined with AmpC enzyme, ESBLs combined with AmpC enzyme and MBL, and AmpC enzyme producing strains were 16.56% (50/302), 6.62% (20/302), 1.66% (5/302) and 0.66% (2/302) respectively. Drug-sensitivity test showed that multi-resistant gram-negative isolates sensitive rates from low to high in turn were Amikacin (18.99%), Imipenem (20.0%), Cefoperazone/Sulbactam (21.7%), Ampicillin/Sulbactam (21.8%). Resistant rates from high to low in turn were Ampicillin (98.33%), Ampicillin/Sulbactam (83.33%), Ceftriaxone (76.25%), Cefoxitin (63.64%), Cefotaxime (60.50%).

Conclusion β -lactamase producing gram-negative bacilli can be resistant to multi antibiotics.

【Key words】 β -lactamase; multi resistant; gram-negative bacilli

青霉素和头孢菌素等 β -内酰胺类抗生素的发现与使用为人类抵抗细菌感染作出了贡献, 挽救了无数人的生命。但是在长期使用中, 细菌逐渐对其产生抗药性, 使其抗菌作用减弱或消失, 经常出现使用效果不理想的现象。 β -内酰胺酶的产生是革兰阴性菌对该类抗生素耐药的主要机制之一, 临床上的 β -内酰胺酶主要是产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、AmpC β -内酰胺(AmpC)酶和甘露聚糖结合凝集素(MBL)。先用纸片扩散初筛法从临床分离的 302 株多重耐药革兰阴性杆菌中筛选出可疑产酶株, 然后用纸片扩散确证法、头孢西丁三维试验、MBL 的协同试验进行确证。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2005 年 6~10 月广州医学院第一附属医院临床分离的 302 株无重复的革兰阴性杆菌。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 和绿脓假单胞菌 ATCC27853 均购自卫生部药品鉴定所。

1.2 药敏纸片 头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、头孢他啶/克拉

维酸(ceftazidime/Clavulanic acid, CD2)、头孢噻肟(cefetaxime, CTX)头孢噻肟/克拉维酸(cefetaxime/Clavulanic acid, CD3)、头孢曲松(ceftriaxone, CRO)、头孢唑啉(cefazolin, CFZ)、头孢吡肟(cefepime, FEP)、头孢西丁(cefoxitin, FOX)、亚胺培南(imipenem, IMP)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、氨曲南(aztreonam, ATM)、阿米卡星(amikacin, AK)、庆大霉素(Gentamycin, GM)、哌拉西林/他唑巴坦(piperacillin/Tazobactam, TZP)、氨苄西林(ampicillin, AMP)、哌拉西林(piperacillin, PRL)、氨苄西林/舒巴坦(ampicillin/Sulbactam, SAM)、替卡西林/克拉维酸(ticarcillin/Clavulanic acid, TCC)等纸片购自 Oxoid 公司。VITEK-2 GNP 药敏卡购自生物梅里埃公司。

1.3 仪器与试剂 主要试剂、MH 琼脂培养基及胰蛋白胨、大豆胨肉汤为英国 Oxoid 公司产品; 氯唑西林为上海第四制药厂产品; 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)购自上海试剂一厂; 50 mmol/L 硫酸锌购自上海试剂总厂第二分厂。VITEK-2 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司); 超净

台(苏州净化设备厂);超声细胞粉碎仪(宁波新芝公司 JY92-11 型);电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);GS-6R centrifuge 冷冻离心机(美国 Beckman 公司);Optima L-90K 超高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细菌鉴定及药敏试验 法国梅里埃 API 生化鉴定试条或 VITEK-2 鉴定系统,细菌鉴定到种;药敏试验用琼脂纸片扩散(K-B)法,结果判定严格按照美国临床实验室国家标准化委员会(NCCLS) 2005 年 1 月制定的规则及标准进行。

1.4.2 菌株 ESBLs 表型检测 按 2005 年 1 月 NCCLS 推荐的纸片扩散初筛法 ESBLs 试验指南进行:用 MH 肉汤将菌液调为 0.5 麦氏浊度,再用棉拭子均匀涂抹于 MH 平板,然后贴上纸片头孢他啶、头孢曲松、头孢噻肟、氨曲南,于 35 °C 环境中放置 18~24 h 后观察结果。当受试菌对头孢他啶(30 μg/片)纸片的抑菌环直径小于或等于 22 mm、氨曲南(30 μg/片)纸片的抑菌环直径小于或等于 27 mm、头孢噻肟(30 μg/片)的抑菌环直径小于或等于 27 mm 或头孢曲松(30 μg/片)的抑菌环直径小于或等于 25,视为产 ESBLs 可疑菌株^[1]。

1.4.3 纸片扩散确证法 对初筛阳性菌株,采用头孢他啶(30 μg)、头孢他啶/克拉维酸(30 μg/10 μg)或头孢噻肟(30 μg)和头孢噻肟/克拉维酸(30 μg/10 μg)检测,一对纸片间相距 25 mm,于 35 °C 环境中放置 18~24 h 后观察结果。任一组药物的抑菌环直径相差大于或等于 5 mm 时,判定为 ESBLs 阳性菌株。

1.4.4 AmpC 酶的检测筛选试验 采用头孢西丁纸片药敏试验,将抑菌环直径头孢西丁小于或等于 17 mm,头孢他啶小于或等于 18 mm 或/和头孢噻肟/克拉维酸小于或等于 22 mm 者初筛为可疑产 AmpC 酶菌株^[2]。确定试验(1)β-内酰胺酶的提取:将 1~2 个菌落接种至 12 mL 胰蛋白胨大豆胨肉汤中,放入 35 °C 恒温摇床中,200 r/min 孵育 6 h,离心集菌,反复冻溶 5 次后,加入 1.5 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0),4 °C 12 000 r/min 离心 60 min,取部分上清液经 MH 琼脂平板常规细菌培养阴性后-20 °C 保存。(2)头孢西丁三维试验:将大肠埃希菌 ATCC25922 制成浊度为 0.5 麦氏单位的菌悬液,用棉拭子均匀涂布于 MH 平板上,在平皿中央帖一头孢西丁纸片,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 β-内酰胺酶粗提液,35 °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^[3]。

1.4.5 金属酶的检测 用 MH 肉汤将菌液调为 0.5 麦氏浊度,再用棉拭子均匀涂抹于 MH 平板,每个平板放两张亚胺培南纸片,纸片中心间距为 4~5 cm。协同试验:在其中之一亚胺培南纸片旁放一空白无菌滤纸片,与两纸片中心距离为 1~2.5 cm,加 5 μL EDTA-Na₂ 于空白纸片,于 35 °C 环境中放置 18~24 h 后观察结果,如两纸片之间的抑菌圈有所扩大,判断 MBL 阳性。增效试验:直接在其中之一亚胺培南纸片上加 5 μL EDTA-Na₂,于 35 °C 环境中放置 18~24 h 后观察结果,若两纸片抑菌圈直径差值大于或等于 7 mm 判断 MBL 阳性^[4]。

1.5 统计学方法 采用 WHONET5.0 软件进行统计学分析、检验分析多重耐药革兰阴性杆菌的耐药率。

2 结果

2.1 标本的病区分布 80 株 β-内酰胺酶表型初筛阳性多重耐药革兰阴性杆菌的病区来源有:呼吸监护室 6 株,心血管监

护室 6 株,神经内科 5 株,肾内科 4 株,呼吸内科 3 株,传染内科 2 株,血液内科 7 株,骨外科 2 株,胸外科 1 株,海印泌尿外科 8 楼 5 株,海印泌尿外科 9 楼 8 株,海印普外 ICU 3 株,海印 10 楼(外科)5 株,海印 11 楼(外科)4 株,海印普外 7 株,妇科 2 株,门诊 3 株。多重耐药革兰阴性杆菌的临床分布以病房为主,其中以外科病房分布最多,其次是 ICU 病房,肿瘤血液病免疫力低下的患者多见。

2.2 标本类型的分布 菌株的标本类型来源有:痰 32 株、中段尿 23 株、引流液 5 株、胸腔积液 4 株、血液 3 株、咽拭子 2 株、腹腔积液 1 株、胆汁 1 株、伤口分泌物 3 株、粪便 2 株、盆腔积液 2 株,其他 2 株。主要从呼吸道标本(深部痰、咽拭子)和尿液标本中分离获得。

2.3 多重耐药革兰阴性杆菌 β-内酰胺酶表型与确证试验阳性结果的分布 多重耐药革兰阴性杆菌 β-内酰胺酶的总检出率为 26.49% (80/302),主要由产 ESBLs 引起,占 16.56% (50/302);其次为 ESBLs+ AmpC 引起,占 6.62% (20/302);其次为 ESBLs+ AmpC+ MOL 引起,占 1.66% (5/302),单独由 AmpC 引起的仅占 0.66% (2/302),有 3 株未能定型 0.99% (3/302)。80 株多重耐药革兰阴性杆菌对临床常用抗生素耐药率最低为阿米卡星(18.99%)、其次为亚胺培南(20.0%),头孢哌酮/舒巴坦(21.7%)、哌拉西林/他唑巴坦(21.89%);最高为氨苄西林(98.33%),其次为氨苄西林/舒巴坦(83.33%)、头孢曲松(76.25%)、头孢西丁(63.64%)及头孢噻肟(60.50%)等,大部分细菌呈多重耐药性。

3 讨论

3.1 菌株的病区分布特征 从本院分离出的 80 株多重耐药革兰阴性杆菌主要分布于病房,构成比 96.25%,而门诊仅占 3.75%。在病房分布中,比较集中于外科病房,其次是 ICU 病房、血液肿瘤病房,其他各病房较少见。由于可能由于肾结石合并细菌感染的外科患者及 ICU 患者长期应用抗菌药物,实施放、化疗干预并常伴呼吸机使用史,极易导致天然耐药性较强的革兰阴性杆菌在治疗中被筛选出来造成二重感染^[5]。因此加强 ICU 病房和外科病房的环境消毒是避免革兰阴性杆菌向其他病房播散,控制医院感染的有效途径。

3.2 医院感染的发生部位 以呼吸道和泌尿道为主,主要从呼吸道标本(深部痰、咽拭子)和尿液标本中分离获得,尤其是呼吸道标本更为突出。这可能与入住呼吸科和泌尿科的患者自身免疫力下降及这些科室大量使用相关医疗器械如呼吸机、氧气湿化瓶、输尿管和使用其他侵入性治疗、检查手段逐年增多有关。应该加强医护人员的消毒意识,对所使用的各种医疗器械及时严格要求消毒、更换,以防医院感染的发生。

3.3 病原菌分布 细菌监测结果显示:本院所分离出的革兰阴性杆菌中,产 β-内酰胺酶最常见的菌种是大肠埃希菌 22.5%、肺炎克雷伯菌 20%、铜绿假单胞菌 15%、鲍曼不动杆菌 12.5%及阴沟肠杆菌 10%。对许多 β-内酰胺类的药物以及其他抗生素呈多重耐药,给临床抗感染构成严重威胁,造成治疗失败。在产 β-内酰胺酶的代表菌株以外的革兰阴性细菌也检出了大量的产 β-内酰胺酶菌株,阴沟肠杆菌、弗劳地枸橼酸杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、脑膜炎败血黄杆菌等非发酵细菌中也可检出 β-内酰胺酶,说明携带 β-内酰胺酶耐药的基因在不同种类的菌属中进行了广泛转移。因此在今后的临床耐药性监测工作中,进行整个革兰阴性细菌的产酶菌株检测的必要性。

3.4 产 β-内酰胺酶多重耐药革兰阴性杆菌的(下转第 548 页)

2.2 TIA 组与对照组 EEG 的各频段平均功率值比较 TIA 组 δ 、 θ 频段的平均功率值较健康对照组明显增高 ($P < 0.05$)。TIA 组的 α 频段平均功率值较健康对照组明显下降 ($P < 0.05$)。TIA 组的 β 频段平均功率值与健康对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 TIA 组与对照组 EEG 各频段平均功率值比较 (μV^2)

组别	n	δ	θ	α	β
TIA 组	45	10.42±2.78 [#]	18.42±3.12 [#]	60.43±23.62 [#]	13.84±6.73
对照组	40	8.14±2.64	11.25±6.63	91.76±41.38	12.97±6.89

注:与对照组比较, [#] $P < 0.05$ 。

2.3 TIA 组 TCD 和 EEG 相互比较及相关分析 45 例 TIA 患者 TCD 检测异常者为 35 例,异常率 77.8%; EEG 检测异常者为 31 例,异常率为 68.9%,二者比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.74, P > 0.05$)。45 例患者的 90 条 MCA、VA 的 V_p 分别与 EEG 的 α 频段的平均功率值进行相关分析,显示 MCA 的 V_p 与 EEG 的 α 频段的平均功率值呈负相关关系 ($r = -0.44, P < 0.05$), VA 的 V_p 与 EEG 的 α 频段平均功率值呈正相关关系 ($r = 0.55, P < 0.05$)。

3 讨 论

至今为止,短暂性脑缺血发作的起病原因和发病机制仍未研究清楚,大多数人认为动脉硬化脑血管狭窄是该疾病的主要病理基础^[2]。CT、MIR 等影像学检查均难以获得阳性结果。而各种诱发电位及脑电图可能在 TIA 发作后短期内可能出现明显异常^[3]。

采用 TCD 检查方法可以无创伤性的评估脑底动脉血流动力学情况,据大多数研究认为,TIA 起病病因均可导致脑血流动力学状况出现明显改变^[4]。本组研究中 TIA 患者的颈内动脉系多以血流增快为主要表现,此结果说明颈内动脉系 TIA 是因为动脉硬化脑血管狭窄和脑血管痉挛等因素所致,而椎

基底动脉系则多以血流速度减慢为主要临床表现,其研究结果与国外的相关研究观点相一致^[5]。而 TIA 发作期的脑电图改变与缺血发作的区域、程度和持续时间的永久性 or 短暂性有一定关联。本研究结果显示,患者的脑电图异常率为 68.9%,与 77.8% 的 TCD 异常率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

本研究结果提示 TCD 和 EEG 两种检查存在明显的相关性。单纯利用 TCD 检查患者的血流流速和搏动指数,可直接反映患者的血流动力学状况,结合血流频谱分析可肯定或者排除某些血管性疾病,但缺乏特异性,只要将两个检测手段相结合,分别从血流动力学和电生理学两个方面反映大脑供血及脑细胞的功能情况,就可以明确诊断 TIA 疾病。

参考文献

[1] 全国第四届脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379.
 [2] 顾慎为. 经颅多普勒检测与临床[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 108-109.
 [3] 黄华品, 郑安, 刘楠, 等. 药物定量脑电图对短暂性脑缺血发作患者疗效判断的研究[J]. 临床脑电图学杂志, 2000, 9(2): 83.
 [4] Thomassen L, Waje-Andreassen U, Naess H, et al. Doppler ultrasound and clinical findings in patients with acute ischemic stroke treated with intravenous thrombolysis[J]. Eur J Neurol, 2005, 12(6): 432-435.
 [5] Kumral E, Kisabay A, Atac C, et al. The mechanism of ischemic stroke in patients with dolichoectatic basilar artery [J]. Eur J Neurol, 2005, 12(6): 437-444.

(收稿日期: 2011-09-21)

(上接第 546 页)

耐药特征 80 株产 β -内酰胺酶多重耐药革兰阴性杆菌耐临床常用抗生素耐药率最低为阿米卡星 (18.99%)、其次为亚胺培南 (20.0%)、头孢哌酮/舒巴坦 (21.7%)、哌拉西林/他唑巴坦 (21.89%); 最高为氨苄西林 (98.33%), 其次为氨苄西林/舒巴坦 (83.33%)、头孢曲松 (76.25%)、头孢西丁 (63.64%) 及头孢噻肟 (60.50%)。亚胺培南的耐药百分率为 20.0%, 有些菌株金属酶的表达试验为阳性, 有可能产生了新型耐碳青霉烯类抗生素的 β -内酰胺酶。

从本院分离出的多重耐药革兰阴性杆菌主要分布于 ICU 和外科病房, 医院感染的发生部位以呼吸道和泌尿道为主。产 β -内酰胺酶最常见的菌种是大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌, 携带 β -内酰胺酶的耐药基因在不同种类的菌属中进行了广泛转移。对临床常用抗生素的总体耐药率最低为阿米卡星、其次为亚胺培南, 头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦。要合理使用抗生素、延缓抗生素对细菌耐药选择性的产生, 以便有效控制医院内感染。

参考文献

[1] Coudron PE, Moland ES, Thomoson KS. Occurrence and

detection of AmpC beta-lactamases among Escherichia Ecoli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veteran's medical center[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 1791-1796.

[2] 吴伟元, 陈民钧, 王辉. 阴沟肠杆菌去阻遏持续高产 AmpC 酶和超广谱 β -内酰胺酶的检测[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17(1): 104-109.
 [3] Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient test for screening metallo-p-lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 401.
 [4] Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase reducing clinical isolates of Pseudomonas spp and Acinetobacter spp[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3798.

(收稿日期: 2011-10-11)