

鲍曼不动杆菌 AmpC 酶和 AmpC 耐药基因检测分析

张丽梅, 苏丹虹, 徐韫健(广州医学院第一附属医院检验科 510120)

【摘要】 目的 检测临床分离的 45 株鲍曼不动杆菌的 AmpC 酶和 AmpC 耐药基因,并探讨产 AmpC 酶菌株的耐药情况。**方法** 采用超声破碎法提取 45 株细菌的 β -内酰胺酶粗提物,进行三维试验,提取 45 株细菌的总 DNA,聚合酶链反应(PCR)扩增 AmpC 结构基因和 ACT-1、CMY-G1、CMY-G2、DHA、FOX 耐药基因,最低抑菌浓度药物敏感试验分析菌株的耐药性。**结果** 45 株鲍曼不动杆菌中三维试验和 PCR 检测 AmpC 基因同时阳性的有 11 株,确认产 AmpC 酶菌株为 11 株。三维试验方法和 PCR 基因检测方法比较对 AmpC 酶的检出率差异无统计学意义($\chi^2=3.500, P>0.05$)。ACT-1 的检出率为 4.4%,未检出 FOX、DHA、CMY-G1、CMY-G2。产 AmpC 酶菌株的药物敏感度最高是丁胺卡那霉素(90.9%),其次是亚胺培南(54.5%),产 AmpC 酶菌株耐药率高,对氨苄西林、氧曲南、头孢曲松、头孢替坦、头孢唑啉、哌拉西林、头孢他啶达到 100.0%,产 AmpC 酶菌株对抗菌药物的耐药性显著高于不产 AmpC 酶菌株。**结论** 三维试验方法和 PCR 基因检测方法对 AmpC 酶的检出率无明显差别,但仍存在假阳性与假阴性。产 AmpC 酶菌株耐药情况严重,提示临床应慎重用药。

【关键词】 鲍曼不动杆菌; AmpC 酶; 三维试验; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.013 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)21-2683-03

Detection on AmpC β -lactamases and AmpC gene of Acinetobacter baumannii ZHANG Li-mei, SU Dan-hong, XU Yun-jian(Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangdong, 510120, China)

【Abstract】 Objective To detect AmpC β -lactamases and ampC gene of 45 strains Acinetobacter baumannii and study the status of drug resistance of the AmpC-producing bacillus. **Methods** β -lactamases of the 45 strains was extracted by ultrasonic crushing, and AmpC β -lactamases was examined by Cefoxitin in three dimensional test. The total DNA of the 45 Acinetobacter baumannii was extracted, and AmpC gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The drug resistance was analysed by MIC method. **Results** There were 11 strains with three-dimensional test and PCR detection of ampC gene were both positive. These 11 strains were confirmed to be AmpC-producing strains. There was no significant difference ($\chi^2=3.500, P>0.05$) in the detection rate between three-dimensional test method and PCR method. Detecting rate of the genotypes of AmpC β -lactamases were ACT(4.4%) with 1 strain, FOX, DHA, CMY-G1, CMY-G2. Amikacin(90.9%) was the highest sensitive of the AmpC-producing strains, followed by imipenem(54.5%). AmpC-producing strains had high resistance rate, especially for Ampicillin, Aztreonam, Ceftriaxone, Aefotetan, Cefazolin, Nitrofurantoin and Ceftazidime reached 100%. Resistance rate of AmpC-producing strains was significantly higher than no AmpC-producing strains. **Conclusion** There is no significant difference in the detection rate between three-dimensional test method and PCR method, but there are high false positive rate and high false negative rate. This study can show the serious situation of drug resistance in AmpC-producing strains, and suggest ot use clinical medicine carefully.

【Key words】 Acinetobacter baumanii; AmpC; three-dimensional test; antibiotic resistance

鲍曼不动杆菌广泛分布于自然界,是医院感染的重要条件致病菌之一。近年来,由于抗菌药物的广泛使用,临床出现越来越多的产 β -内酰胺酶的菌株,其中产 AmpC 酶的菌株占一定的比例,很多质粒介导的 AmpC 酶在世界各地陆续被报道,每年以发现 1~2 个新质粒 AmpC 酶的速度增加^[1],引起国内外的广泛关注。AmpC 酶存在于大多数革兰阴性杆菌中,是革兰阴性杆菌主要的耐药原因^[2]。它能水解青霉素,第 1、2、3 代头孢菌素和单环类 β -内酰胺抗菌药物,且不被克拉维酸抑制。质粒 AmpC 酶可以在菌种之间传递,使耐药问题越来越严峻,容易引起医院感染的爆发流行。本研究检测临床分离的 45 株鲍曼不动杆菌的 AmpC 酶和 AmpC 耐药基因,并探讨产 AmpC 酶菌株的耐药情况,讨论其临床意义,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 广州医学院第一附属医院临床分离鲍曼不动杆菌 45 株, AmpC 酶初筛阳性(抑菌环直径头孢西丁小于 18 mm,头孢他啶小于 18 mm 或(和)头孢噻肟/克拉维酸小于 22 mm 者初筛为可疑产 AmpC 酶菌株),并经法国生物梅里埃 Vitek-2 鉴定仪鉴定。

1.2 试剂与仪器 胰蛋白胨大豆肉汤(英国 Oxid 公司), DNA Marker、聚合酶链反应(PCR)配套试剂(日本 TaKaRa 公司产品),电泳用琼脂糖和溴化乙锭(北京鼎国公司产品); VITEK-2 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司产品), PCR 扩增仪(美国 BioRad PE 公司产品),双向电泳分析仪(北京六一仪器厂产品),UP 凝胶成像系统(英国 UVP 公司产

品),超声细胞粉碎仪(宁波新芝公司产品)。

1.3 PCR 引物 根据文献设计引物,引物由上海英俊公司合成,PCR 引物情况见表 1。

表 1 PCR 引物情况表

引物名称	引物序列	长度 (bp)	退火温度 (℃)
AmpC ^[3]	5'-TAAACAC CACAATGTGTTCCC -3'	663	56
	5'-ACTTACTTCAA CTCGCGACG-3'		
CMY-G1	5'-GCTTACAGCCTCTTTCTCCAC-3'	1 082	58
	5'-CCTCGACACGACAGGGTTA-3'		
CMY-G2	5'-GGTCTGGCCATGCGAGGTGA-3'	963	62
	5'-TGACTTTCGGTATTCGGGTAG -3'		
ACT-1	5'-ACCGTTACGCCGCTGATG -3'	1 326	57
	5'-CCACGAGCTGCCAAACCC-3'		
FOX	5'-ATCCAGCCGATGCTCAAGG -3'	941	57
	5'-GGCACGAACGCCACATAG -3'		
DHA ^[4]	5'-ATGGCGGTTGCCGTCTC-3'	967	57
	5'-TGACTCTTTCGGTATTCGGGTAG -3'		

1.4 β-内酰胺酶的粗提取 超声破碎法粗提取 β-内酰胺酶:将待检菌接种在 2 mL 营养肉汤中增菌 18~24 h,混匀增菌肉汤,将 1 mL 含菌的肉汤倒入约 20 mL 肉汤中摇菌 6 h,4 ℃离心集菌,8 000 r/min 离心 15 min,用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液冲洗后制成一定浓度的细菌悬液。超声破碎法破碎细菌细胞,再 12 000 r/min 离心 1 h,去除细菌碎片,收集上清液即为 β-内酰胺酶的粗提物。取部分上清液接种于 M-H 平板常规培养,证实无活菌,用 β-内酰胺酶纸片确定有 β-内酰胺酶的存在。

1.5 三维试验 将鲍曼不动杆菌按美国临床实验室标准化协会的 K-B 法涂布在 M-H 平板上。在平板的中央贴一张 FOX 纸片,从距离纸片 5 mm 处用无菌刀片在平板的琼脂上向外(离心方向)切一裂隙(一块平板可切 4~5 条裂隙)。每一裂隙中加入 25~30 mL 的一种待测菌株的 β-内酰胺酶粗提物(注意 β-内酰胺酶粗提物不可溢出裂隙)。35 ℃培养 24 h,观察裂隙的内侧端(头孢西丁纸片的抑菌环内)周围有无细菌生长。判断标准:裂隙的内侧端周围有细菌生长,导致头孢西丁纸片的抑菌环有缺失者为阳性。

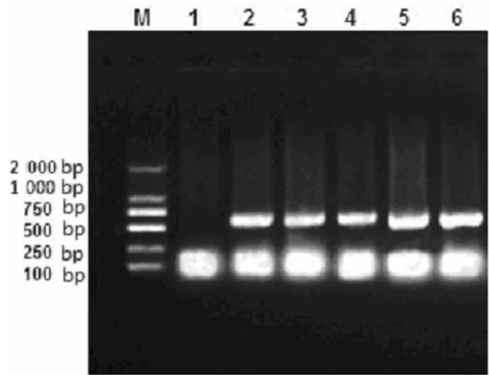
1.6 PCR 基因筛选 引物稀释,先离心,再加水溶解,稀释为 100 mmol/L。反应体系为 20 mL,上下游引物各 1 mL,10×PCR 缓冲液 2 mL,150 mL/L dNTP 1 mL,Taq 酶 0.25 mL,DdH₂O 12.75 mL,DNA 模板 2 mL。反应条件为 95 ℃预变性 3 min,95 ℃ 35 s,56 ℃ 35 s,72 ℃ 50 s,共循环 35 次,最后 72 ℃再延伸 10 min。扩增产物以 1.2%琼脂糖凝胶(加 EB)电泳,上样 5 μL,5 V/cm×45 min,凝胶成像系统观察结果。PCR 产物送上海英俊生物公司进行双向测序,测序结果在 GenBank 上进行查询比对。

1.7 统计学方法 用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理,资料采用 χ^2 检验和 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 三维试验结果 在初步筛选对头孢西丁耐药的 45 株鲍曼不动杆菌中,检出三维试验阳性 14 株,阳性率 31.1%。裂隙与抑菌环处出现抑菌环矢状缺失,细菌扩大生长。

2.2 AmpC 结构基因和 AmpC 耐药基因检测结果 在 45 株鲍曼不动杆菌中用 PCR 检测出 AmpC 基因阳性菌株 22 株,在 663 bp 处有明亮条带,如图 1 所示,此法阳性率 48.6%。AmpC 耐药基因检测:ACT-1 阳性 2 株(4.4%),未检出 FOX、DHA、CMY-G1、CMY-G2。



注:M 为 DL2000 DNA Marker;1 为 ampC 基因阴性;2~6 为 ampC 基因阳性。

图 1 AmpC 基因 PCR 产物电泳图

2.3 三维试验和染色体 AmpC 结构基因的统计 三维试验、AmpC 基因检测同时阳性 11 株;三维试验阳性、AmpC 基因检测阴性 3 株;三维试验阴性、AmpC 基因检测阳性 11 株。三维试验与 PCR 检测法的比较见表 2。两种检测方法差异无统计学意义($\chi^2=3.500,P>0.05$)。

表 2 三维试验、PCR 法检测 AmpC 结构基因方法学评价

三维试验	PCR 法		合计
	+	-	
+	11	3	14
-	11	20	31
合计	22	23	45

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

2.4 产 AmpC 酶菌株与不产 AmpC 酶菌株药敏试验结果的比较 三维试验、PCR 法检测 AmpC 基因均阳性者确证为产 AmpC 酶。产 AmpC 酶阳性率为 24.4%(11/45),其中痰标本 8 株,尿标本 1 株,深静脉导管 1 株,胆汁 1 株。对产 AmpC 酶菌株敏感度最高的是丁胺卡那霉素 90.9%(10/11),其次是亚胺培南 54.5%(6/11),产 AmpC 酶菌株高度耐药,对青霉素、4 代头孢菌素类抗生素耐药率几乎为 100%。11 株产 AmpC 酶菌株对抗生素的耐药性明显高于不产酶菌株。产 AmpC 酶菌株与不产酶菌株药敏试验结果的比较,有 8 种抗生素的耐药率差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 3。

表 3 产 AmpC 酶菌株与不产 AmpC 酶菌株
耐药情况[n(%)]

抗菌药物	产 AmpC 酶	不产 AmpC 酶
氨苄西林	11(100.0)	34(100.0)
氨苄西林/舒巴坦	9(81.8)	13(38.2)*
丁胺卡那霉素	1(9.1)	2(5.9)
氨基曲南	11(100.0)	20(58.8)*
环丙沙星	10(90.9)	15(44.2)*
头孢替坦	11(100.0)	34(100.0)

续表 3 产 AmpC 酶菌株与不产 AmpC 酶菌株
耐药情况[n(%)]

抗菌药物	产 AmpC 酶	不产 AmpC 酶
头孢曲松	11(100.0)	33(97.1)
头孢唑啉	11(100.0)	34(100.0)
头孢吡肟	10(90.9)	14(41.2)*
呋喃妥因	11(100.0)	34(100.0)
庆大霉素	8(72.7)	11(32.4)*
亚胺培南	5(45.4)	9(26.5)
左旋氧氟沙星	8(72.7)	13(38.2)
复方新诺明	9(81.8)	13(38.2)*
头孢他啶	11(100.0)	14(41.2)*
妥布霉素	7(63.6)	7(20.6)*
哌拉西林/他唑巴坦	7(63.6)	11(32.3)

注：与产 AmpC 酶比较，* $P<0.05$ 。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌已经在全球各地出现流行甚至造成了爆发性流行,并且其耐药性得到不断增强。临床分离的菌株常呈多重耐药,甚至泛耐药、全耐药株也日益增多。由泛耐药株引起的感染常常无药可治,病死率高。在其复杂耐药机制中,产 AmpC 酶是其主要耐药机制之一^[5]。AmpC 酶由 AmpC 基因编码,AmpC 操纵子具有 β -内酰胺酶表达的调节模型。诱导性产 AmpC 酶革兰阴性杆菌,有较高频率的自发突变,可达 $10^{-6} \sim 10^{-9}$,突变可发生在 AmpC 操纵子上,包括 AmpC 基因突变,AmpC 启动子或衰减子突变,调节基因的突变等,导致 AmpC 酶活性或表达水平改变^[6]。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。自 20 世纪 80 年代末首次分离出质粒介导的 AmpC 酶以来,新的质粒介导的 AmpC 酶在世界各地被陆续报道,如 MIR、ACT、DHA、CMY、FOX、MOX 型质粒 AmpC 酶等,迄今已有近 30 种^[7]。本实验对染色体 AmpC 基因和 ACT、DHA 等耐药基因进行 PCR,从基因角度对 AmpC 酶进行检测。

在本实验结果中,三维试验法、PCR 法检测 AmpC 酶通过配对 χ^2 检验得出差异无统计学意义,三维试验阳性率为 31.1%,PCR 阳性率为 48.8%。与杨雪静和李向阳^[8]的结果不一致:三维试验阳性率为 62.2%,PCR 阳性率为 46.5%,可能因为地域性质的差别,菌株来源相差大而导致。三维试验对 PCR 而言,假阳性率为 21.4%,PCR 对三维试验而言,假阳性率为 50.0%。对三维试验,假阳性可能是由于在酶的提取物中存在水解头孢西丁的酶类或者其他的头孢西丁诱导酶,或可能由于菌膜通透性的改变、青霉素结合蛋白亲和力降低等其他原因;假阴性可能是持续低产酶菌株,不能有效水解头孢西丁。三维试验、PCR 基因检测均能比较准确地检测出产 Ampc 酶菌株,但三维试验操作较为繁琐,PCR 试验结果不稳定,容易出现假阳性和假阴性,临床或实验室可根据具体情况选择合适的检测方法。

本研究中发现,45 株鲍曼不动杆菌中产 AmpC 酶阳性株全部为多重耐药菌株,对氨苄西林、氨曲南、头孢曲松、头孢替坦、头孢唑啉、呋喃妥因、头孢他啶耐药率达到 100.0%。不但

对青霉素、第 3 代头孢菌素类抗生素高度耐药,并且对第 4 代头孢菌素类药物高度耐药,对碳青霉烯类,如亚胺培南虽有一定的敏感度(54.5%),但与文献^[9]相比,敏感度已明显下降,由此说明产 AmpC 酶菌株的耐药情况近年来又逐渐加重。综合国内外其他报道,目前临床治疗产 AmpC 酶菌株感染疗效最好的是碳青霉烯类抗生素和氨基糖苷类抗菌药物。本研究发现,丁胺卡那霉素有较高的敏感度(90.9%),与文献^[10]相符,临床医生可根据实际情况用药。在 11 株菌携带 AmpC 结构基因的鲍曼不动杆菌其耐药性明显高于耐药基因阴性菌株,而 2 株同时携带 ACT-1 和 AmpC 结构基因 3 种耐药基因的菌株表现为全部耐药。因此表明这些多重耐药菌株携带 AmpC 耐药基因是本组菌株对 β -内酰胺类抗生素耐药的重要原因之一。

临床细菌耐药机制越来越多,形势越来越严重,耐药菌的出现给临床治疗带来严重的难题,最大的原因是临床抗菌药物的滥用。所以,采用有效快速的方法检测细菌耐药性及适当应用抗生素成为当务之急。

参考文献

[1] 王锦娜,邵海枫. 大肠埃希菌高产 AmpC 酶的研究进展[J]. 医学研究生学报,2006,19(2):167-171.

[2] 叶惠芬,周小棉,陈惠玲,等. 三种检测阴沟肠杆菌 AmpC 酶方法的比较[J]. 实用医学杂志,2008,24(4):654-655.

[3] 叶惠芬,陈惠玲,刘朝晖,等. 广州地区鲍曼不动杆菌 AmpC 酶检测及耐药性分析[J]. 实用医学杂志,2009,25(1):134-135.

[4] Zhang Y, Zhang K, Tang Y, et al. Drug resistance and genotype of β -lactamase in bacteria producing AmpC enzyme mediated by plasmids and ESBLs[J]. Zhong Hua Microbiology and Immunology Journal 2004, 24(4):577-582.

[5] Germán B, Gonzalo C, Angeles D, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant acinetobacter baumannii strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme;highlevel carbapenem resistance in A. baumannii is not due solely to the presence of β -Lactamases [J]. J Clin Microbiol,2000,38(9):3299-3305.

[6] 李乃健,徐韞健,孙慧冰,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性与 AmpC 耐药基因研究[J]. 热带医学杂志,2010,10(6):699-701.

[7] Philippon A, Arlet GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(1):1-11.

[8] 杨雪静,李向阳. 耐药不动杆菌 AmpC 酶及其相关基因分析[J]. 现代实用医学,2007,19(2):96-100.

[9] 华建平,夏涌. 517 株革兰阴性杆菌耐药分析[J]. 当代医学,2007,19(10):38-40.

[10] 江洁华,廖伟娇,徐军,等. 多重耐药革兰阴性杆菌 β -内酰胺酶的表型与基因型研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007,17(5):492-495.