

革兰阴性杆菌耐药性检测进展

华鑫科技有限公司技术部

吕苏成

2005、09

前言

- 革兰阴杆菌是院内感染的重要病原菌，在感染中常居首位，由于其具有多重耐药，而且耐药率高，特别是对第三代头孢菌素和单环酰胺类等新的广谱菌药耐药，给临床治疗带来很大困难，为止引起了国内外学者的高度关注，他们在研究简便、快速检出方法及其耐药机理和选择治疗用药等方面取得了很大进展，并已不少报道。

一、G-b的耐药机理

- 1.细菌产生 β -内酰胺酶可水解 β -内酰胺酶类抗生素，这是最重要和最常见的耐药机制。细菌产生氨基糖苷类钝化酶对氨基糖苷类如庆大霉素耐药，喹诺酮类耐药是由于DNA旋转酶改变或药物渗透性改变。

- 2. 抗生素的渗透障碍：由于细胞壁障碍或细胞膜通透性改变抗生素无法进入菌体内发挥抗菌作用，当细菌外膜微孔蛋白缺失后抗生素也不能进入菌体。

- 3.外膜存在着药物泵出系统（Tet膜蛋白介导）使进入菌体内的药物主动泵出导致菌体内药物浓度降低，如对四环素类和喹诺酮类耐药等。

- 4.靶位的改变： β -内酰胺酶类抗生素通过与青霉素结合蛋白（PBP_s）结合而抑制细菌生长，当靶位改变后抗菌药物不能与其结合而失去作用。对磺胺耐药是由于细菌改变体内二氢叶酸合成酶，与磺胺药的亲和力降低引起的。

- 5.非水解屏障机制：主要是染色体介导的1型 β -内酰胺酶细菌如绿脓杆菌，肠杆菌等对头孢类抗生素耐药并非抗生素的 β -内酰胺环水解，而是由于非水解屏障的形成，由于 β -内酰胺酶类药物与质周空间诱导产生的 β -内酰胺酶结合成无生物活性的复合物而不能进入靶位发挥抗菌作用。

- 细菌同时具有以上两种以上耐药机制就产生了对多种抗生素的耐药性。

- 二、新型 β -内酰胺酶的产生、传播，增加了G-杆菌的耐药性。

- 1.60年代初期从大肠杆菌中首次发现质粒介导的tem-1 β -内酰胺酶，随后在全球传播并在许多不同菌株中发现如肠杆菌科，铜绿假单胞菌等。

- 2.70年代开始，一些新的 β -内酰胺类抗生素应用于临床，试图来治疗一些革兰阴性杆菌引起的感染，因为这些细菌已对同类旧的一代抗生素产生了耐药性。这些新的药物包括第二、三代的头孢抗生素，如头孢呋新（cefuroxime）、头孢孟多（cefamandole）、头孢噻肟（cefotaxime）、和头孢他啶（ceftazidime），以及单酰胺菌素胺曲南。在新的 β -内酰胺类抗生素广泛使用后，出现了耐授这些新药的肺炎克雷伯菌。由这些异常耐药菌株所造成的感染也随之出现。

- 这种耐药性也播散到大肠埃希菌的某些菌株，还有少数其它革兰阴性杆菌。对这种耐药性产生机制的调查显示，由旧质粒介导的TEM和SHV β -内酰胺中还还存在新型式的酶。旧酶的结构基因编码发生突变，产生比亲代酶具有更广谱底物的衍生物。这些具有超广谱作用底物的新的酶包括第二、三代头孢类抗生素和胺曲南。因此它们被命名为超广谱 β -内酰胺酶（ESBLs）。

- 随着80年代初期发现产ESBL菌株。在80年代后期由于 β -内酰胺类抗生素与 β -内酰胺酶抑制剂联合应用不断增加，出现了耐抑制剂 β -内酰胺酶（Inhibitor-resistant β -Lactamases），研究发现耐克拉维酸的 β -内酰胺酶核酸序列是TEM-1或TEM-2的变种，称为IRT（Inhibitor resistant TEM β -Lactamases）。

- 以后用数字来表示如TEM-30为IRT-2，TEM-31为IRT-1，TEM-2为IRT-3等，共有IRT-23种；还有SHV-1的变种和相关的酶。耐抑制剂 β -内酰胺酶菌株有大肠埃希菌，肺炎克雷伯菌，产酸克雷伯菌，奇异变形杆菌和弗劳地枸橼酸杆菌。这些细菌对阿莫西林/克拉维酸，替卡西林/克拉维酸和氨苄西林/舒巴坦耐药。

- 90年代初期因头霉素如头孢西丁应用增多出现了质粒介导的AmpC酶，对头霉素耐药。
- 90年代后期因碳青霉稀酶，对碳青霉稀类 抗生素耐药。新酶的产生导致了G-杆菌耐药谱的变化，并对多种超广谱抗生素耐药。

一、超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs)

- ESBLs (Extended Spectrum β -lactamases) 特性:
- ESBLs是丝氨酸蛋白酶的衍生物能于 β -内酰胺环的羧基共价结合使酰胺键水解，可水解青霉素类，头菌孢素和单环酰胺类抗生素，特别是能水解第三代，如头孢他啶、头孢噻肟等和水解单环酰胺类，如氨曲南等并对四代头菌孢素如马斯平也能部分水解。ESBLs是质粒介导的能被克拉维酸抑制，不被EDTA抑制。

二、ESBLs产生机制

- ESBLs的产生是由于第三代头孢菌素的广泛应用，药物选择性压力导致广谱 β -内酰胺酶TEM-1，-2或SHV-1基因突变。1982年英国报道一株产TEM-1产酸克雷伯菌最初庆大耐药，对孢头他啶敏感，使用孢头他啶后对其耐药，基因分析发现TEM-1结构中第164位上精氨酸变为丝氨酸，命名为TEM-12。1983年德国首例报道的产ESBLs臭鼻伯菌在SHV-1第238位上的甘氨酸变成了丝氨酸，SHV-2。总之ESBLs是在TEM-1，-2或SHV-1结构中的少数位点1-4个氨基酸发生基因突变，使其产生ESBLs表型。

三、ESBLs在 β -内酰胺酶中的位置

- 根据Bush, Rasussen和Ambler等提出的 β -内酰胺酶的分类法具体见下表:

功能表	分子分类	β -内酰胺酶种类	作用最佳底物	被抑制 棒酸 EDTA	代表酶
1	C	AmpC型 β -内酰胺酶	头孢菌素类	— +	诱导酶来自肠杆菌、枸缘酸杆菌、沙雷菌和假单胞菌、质粒介导的酶ACT-1、CMY型、FOX型
2a	A	G+青霉素酶	青霉素类	+ —	金葡菌PCI青霉素酶
2b	A	广谱酶	青霉素和窄谱头孢菌素	+ —	TEM-1、-2、SHV-1、OHIO-1
2be	A	超广谱 β -内酰胺酶	青霉素，所有头孢菌素和单环酰胺类	+ —	TEM-3、-10、-26、其他TEM；SHV-2、-5、-7、其他SHV；CTX-M-1CTX-M-9，产酸克雷伯K1
2br	A	耐 β -内酰胺酶抑制剂	青霉素和窄谱头孢菌素类	— —	TEM-30到TEM-36，其他SHV；SHV-10
2c	A	水解羧苄西林， β -内酰胺酶	青霉素，包括羧苄青霉素	+ —	PSE-1，PSE-3，PSE-4；气单胞AER-1；CARB-3、-4

功能表	分子分类	β -内酰胺酶种类	作用最佳底物	被抑制 棒酸 EDTA	代表酶
2d	D	水解苯唑青霉素, β -内酰胺酶	青霉素类包括氯唑西林	\pm $-$	OXA-1到OXA-30
2e	A	被棒酸抑制的头孢菌素酶	头孢菌素类	$+$ $-$	脆弱类杆菌CepA, 变形杆菌FPM-1, 嗜麦芽窄食单胞菌L2
2f	A	非金属碳青酶稀酶	青霉素头孢菌素类和碳青酶稀类	$+$ $-$	IMI-1, NMC-ASme-1
3a	B	金属 β -内酰胺酶	青霉素类, 头孢菌素类, 碳青酶稀类	$+$ $-$	腊样芽孢杆菌11, CcrA、IMP-1、L1、VIM-1、VIM-2
3b	B	金属 β -内酰胺酶	碳青酶稀类	$-$ $+$	Cph、AsbM1、ASA-1、ImiS
3c	B	金属 β -内酰胺酶	头孢菌素类 碳青酶稀类	$-$ $+$	β -内酰胺酶来自高曼军团菌
4	ND	不被棒酸抑制青霉素酶	青霉素类	$-$ $-$	β -内酰胺酶来自洋葱伯克霍尔德菌, SAR-2

β -内酰胺酶的命名

- 根据作用的底物如CARB、IMP、OXA、CAI、CTX等；
- 根据生化特性如SHV；
- 根据基因如Amp、CepA；
- 根据细菌如AER、PSE；
- 根据患者名如TEM、ROB；
- 根据医院如MIR、RHH、州名（OHIO）等命名

（四）ESBLs种类

- ESBLs现有TEM、SHV、CTX酶，CTX酶为一种新型酶。
- 1、TEM酶有90多种其中ESBLs63种，IRT23种，有些TEM酶有替代名称，如TEM-5为CAZ-1，TEM-8为CAZ-2，TEM-16为CAZ-7，TEM-25为CTX-2，TEM-35为IRT-4等。

- 2、SHV酶有30种，其中ESBLs24种，4种还未报道。
- 3、CTX酶为一种新型酶，CTX-M-1到CTX-M-9，这些酶与TEM和SHV酶没有密切关系，CTX-M-2为最常见流行的ESBL。

- OXA（苯唑西林）酶中发现有几个型是ESBLs，OXA酶属于Bush分类D组2d型。OXA-11，-14，-16和-17是OXA-10的衍生物，OXA-2是OXA-2的衍生物。这组ESBLs菌株对头孢菌素弱耐药。

（五）产ESBL菌株

- 1、肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌是最常见ESBLs菌株，从产酸克雷伯菌，阴沟肠杆菌，产气肠杆菌，沙雷菌和奇异变形杆菌等肠杆菌科细菌分离出产ESBLs菌株。
- 2、出产ESBLs菌株在全球传播。不同国家和地区都有不同报道，如产ESBLs肺炎克雷伯菌在美国的发生率为3%左右，但有的地区高达25%。荷兰16%，比利时31%，葡萄牙49%，土耳其9%，韩国23%，国内报道6%-57%，在大肠埃希菌中产ESBLs菌株检出率为17-30.2%左右。

- 产ESBLs菌株ICU病房和老年科发生率高，有报道由ESBLs菌株引起的爆发流行。

（六）产ESBLs菌株流行的原因

- 1、ESBLs是质粒介导的，在一定条件下细菌将耐药质粒转移给同种属或不同种属细菌而传播快。
- 2、药物选择性压力导致产ESBLs菌株不断增加。
- 3、医务人员通过手或使用气械传播。

- 4、患者之间传播。
- 5、正常人携带也是造成ESBLs传播和感染的重要因素，在芝加哥的老人疗养院中，从半数老人的胃肠道内分离出产ESBLs的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌。

（七）治疗选药和控制措施

- ESBLs的质粒上常常携带对其他抗生素如庆大霉素，环丙沙星和磺胺类等耐药基因，造成ESBLs菌株多重耐药。

1、ESBLs菌株治疗选药原则

- 碳青酶稀类如亚胺配能
- 含 β -内酰胺酶抑制剂复合抗生素，如舒普深，特治星等。
- 氨基糖苷类抗生素，阿米卡星
- 头酶稀类抗生素，头孢西丁

2、预防措施

- 控制超广谱抗生素第三代头孢菌素等的使用。
- 预防自身感染和交叉感染。
- 发现产ESBLs菌株爆发流行，应该立即采取感染控制的处理方法，如关闭病房彻底消毒等。
- 发现散发的ESBLs感染株应选择有效药物清除它，对环境要彻底消毒。

ESBLs菌株的检测方法

- 目前检测ESBLs菌株有几种方法（除外分子学方法）都共同应用一个原理，即头孢类抗生素与 β -内酰胺酶抑制剂克拉维酸联合应用，克拉维酸抑制ESBL，细菌对头孢类抗生素减少耐药性。具体检测方法有：

1、双纸片协同法

- 按照标准纸片扩散法操作，在测试菌涂布在M-H琼脂平版上后将含克拉维酸（棒酸）的阿莫西林纸片贴在平板中央，然后在其周围分别贴上头孢他定（CAZ）、头孢噻肟（CTX），氨曲南（AZT）纸片，与含棒酸纸片距离为15mm-20mm（纸片边缘到边缘），放置35℃18h，出现协同现象为ESBLs菌株。在检测大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌时用CTX和AZT较CAZ易于观察结果，试验中发现阴沟肠杆菌中产ESBLs菌株用CAZ优于CTX。因此检测产ESBLs菌株时最好同时使用CAZ和CTX以利于提高检出率。

2、三维试验

- 什么叫三维？
- 纸片上的药物向培养基中扩散为一维。
- 琼脂平板上的细菌产生的抗药性酶向培养基中扩散是二维。
- 在纸片旁边的琼脂刻一裂缝，在其中加入受试菌液，该菌产生的抗药性酶向四周的琼脂中扩散是第三维。

2、三维试验有2种方法

- 直接法（用同一菌株）
- 间接法（用不同菌株）

直接法

- 平板表面涂布的细菌和裂缝中的细菌相同，首先按标准纸片扩散法操作，贴上CAZ，CTX，AZT药敏纸片，距离纸片3mm处刻一裂缝加入浓度为 10^3 - 10^6 cfu/ml菌液，35过夜，抑菌环形状改变为阳性。

间接法

- 平板表面涂布的细菌是用已知对检测用的药物敏感菌株如ATCC25922，裂缝中为受试菌；如果受试菌干扰敏感菌株形成抑菌环的现象为阳性。

3、Etest法

- 按照标准纸片扩散法操作，贴上CAZ/CAZ+CLA、CTX/CTX+CLA等用于检测ESBLs的E-试验纸条，放置35℃ 18h。结果判读：加克拉维酸的MIC值比不加克拉维酸的MIC值降低3个倍数为产ESBLs菌株。

4、自动化仪器

- 如Vitek-Ams仪器，用专门检测ESBLs的药敏卡进行检测被试菌，仪器自动读取结果。

○

- 5、NCCLS推荐的检测肺炎克雷伯菌，产酸克雷伯菌，大肠埃希菌和2005年NCCLS推荐的检测变形杆菌中ESBLs的筛选和确证试验具体方法有纸片扩散法和稀释法（包括琼脂稀释法和肉汤稀释法）。

(1) 纸片扩散筛选试验

- 方法同标准纸片扩散法标准纸片扩散法，选用头孢泊肟（10ug/片）、头孢他定、氨曲南、头孢噻肟或头孢曲松（30ug/片）药敏纸片中的至少两种进行试验，放35℃16-18h，按NCCLS标准进行判断凡头孢泊肟或头孢他定抑菌环直径 $\leq 22\text{mm}$ ，头孢曲松 $\leq 25\text{mm}$ ，氨曲南或头孢噻肟 $\leq 27\text{mm}$ ，均应高度怀疑为ESBL菌株并进一步作确证试验。

确证试验

- 用CAZ, 30ug/片和CAZ/CLA (30ug/10ug) ; CTX, 30ug/片和CTX/ CLA (30ug/10ug) ; 35°C 16-18h读取结果, 分别测量两种纸片单独及加克拉维酸的抑菌环直径, 加克拉维酸与不加克拉维酸的抑菌环直径之差 $\geq 5\text{mm}$ 判断为产ESBL。

质控菌株

- 大肠埃希菌ATCC25922（药物联合克拉维酸后与单药的抑菌环直径之差 $\leq 2\text{mm}$ ；
- 肺炎克雷伯菌ATCC700603（CAZ联合CLA的抑菌环直径与单独CAZ抑菌环直径之差 $\geq 5\text{mm}$ ），CTX联合CLA的抑菌环直径与单独CTX抑菌环直径之差 $\geq 3\text{mm}$ ）。
- 肺炎克雷伯菌ATCC700603质控范围；头孢泊肟抑菌环直径为7-16mm，头孢他定为10-18mm，氨曲南为9-17mm，头孢噻肟为17-25mm，头孢曲松为16-24mm。

肉汤稀释法筛选试验

- 头孢泊肟、头孢他定、氨曲南、头孢噻肟或头孢曲松药敏均为1ug/ml，使用一种以上药物进行筛选，MIC \geq 2ug/ml，可疑产ESBL。

确证试验

- 头孢他定0.25 -128/ml，头孢他定/克拉维酸0.25/4-128/4ug/ml，头孢噻肟0.25-64ug/ml，头孢噻肟/克拉维酸/ 0.25 4-128/4ug/ml，两组药物同时使用。结果加克拉维酸后MIC比不加的MIC值降低3个以上倍比稀释度，判断为产ESBL（如：头孢他定MIC=8ug/ml，头孢他定/克拉维酸的MIC为1ug/ml）。

6、PCR方法

- PCR方法进行扩增ESBLs的特异基因片段（选用TEM、SHV和CTX的通用引物），通过DNA测序进行分型。

以上几种方法的评价

- 以上几种方法各有优缺点，PCR方法和DNA测序适用于科研。
- Etest法和自动化仪器法简便快速，但价格也较贵。
- 三维法准确但较烦琐，双纸片协同法的试验结果受双纸片之间距离很大影响，国外也有同样的报道，双纸片之间距离为15mm时比20mm时提高ESBLs菌株的检出率。

- NCCLS推荐的纸片扩散法简便，价廉而且检出率高，适合于各级实验室常规应用，琼脂稀释法实用于同时检测大批量菌株，NCCLS推荐的方法应该做为检测ESBLs的标准方法。
- 在试验中注意保存含棒酸的抗生素纸片以避免棒酸失效。国外也有报道含棒酸的抗生素纸片在-20℃冰箱内可保存2周。

二、AmpC β -内酰胺酶及检测

1、AmpC β -内酰胺酶是头孢菌素酶，为Bush分类c组1型酶，通常称1型AmpC。

产该酶菌株对 β -内酰胺类抗菌素广泛耐药如窄谱、广谱、超广谱头孢菌素类和 β -内酰胺类联合酶抑制的抗菌素以及氨基糖苷类耐药。

2、产生酶AmpC的菌株

- 肠杆菌属（阴沟肠杆菌、产气肠杆菌）、
- 弗劳地枸橼酸杆菌、粘质沙雷菌、
- 铜绿假单胞菌、普通/奇异变形杆菌、
- 大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、摩根菌。

3、AmpC酶特性

- AmpC酶是由染色体或质粒编码的酶

(1)、染色体编码的AmpC酶

- AmpC酶由激活—抑制基因ampR进行调节控制，AmpD基因为ampR基因提供抑制子蛋白，在正常情况下使AmpC酶处于抑制状态或AmpC酶低水平表达。
- 该组酶不被 β -内酰胺酶抑制剂如克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦所抑制。

- AmpC酶是通过诱导产生的（除外部分大肠埃希菌和志贺菌是结构酶）。在用头孢菌素治疗过程可促使AmpC酶控制基因突变，当启动子内选择性的某一个基因突变后而去控制作用，即发生AmpC酶持续高水平表达，导致对头孢菌素和头霉素类及AmpC β -内酰胺酶抑制剂耐药。

(2) 质粒介导AmpC β -内酰胺酶

- 产生机制：是由染色体上的AmpC β -内酰胺酶基因转移到质粒，质粒上的耐药基因又可转移给其它细菌。大多数质粒介导AmpC β -内酰胺酶失去ampR调节基因而持续高产AmpC酶。

质粒介导的AmpC β -内酰胺酶菌株检出情况

- 1989年韩国首次报道质粒介导的AmpC β -内酰胺酶（CMY-1），美国philip E、coudron等人报道AmpC β -内酰胺酶大肠埃希菌为1.6%（11/638），肺炎克雷伯菌1.1%（4/37），奇异变形杆菌为0.4%（1/232），希腊Gazouli等报道从10所医院检出产AmpC酶大肠埃希菌2.6%（55/2133），上海第六人民医院蒋燕群等人报道检出产AmpC酶大肠埃希菌为0.3%（131），肺炎克雷伯菌为0.4%（1/24）。

- 近年报道AmpC酶有20多种基因型如MIR和ACT-1起源于阴沟杆菌；BiL, CMY-2, -3, -4, -5和LAT-1, -2, -3, -4起源于弗劳地枸橼酸杆菌；CMY-1, FOX-1, -2, -3, -4起源于铜绿假单胞菌；DHA-1来自摩根摩根菌；ACC-1来源于蜂房哈夫尼亚菌染色体编码的AmpC酶，并发现携带ACC-1酶肺炎克雷伯菌在一个ICU病房爆发流行。质粒介导的AmpC β -内酰胺酶菌株对头孢菌素类和头霉素类耐药。CMY-2酶和相关的 β -内酰胺酶对他唑巴坦敏感。

4、质粒介导的AmpC β -内酰胺酶检测方法

- 纸片法筛选法：
 - (1) 检测原理是AmpC酶不被克拉维酸和EDTA抑制而被氯唑西林（Cloxacillin）抑制。

- (2) 试验菌株对头孢西丁耐药而对氯唑西林敏感为可凝产AmpC酶菌株。PHILIP E.COURON等用头孢西丁(30ug/片)药敏纸片筛选AmpC酶菌株,若抑菌环直径 $< 18\text{mm}$ 就用三维方法做确证试验。(头孢西丁药敏纸片筛选法敏感好但特异性差,特别是对肺炎克雷伯菌,因为对头孢西丁耐药还有其它机理如外膜微孔缺失等)。

三维方法与检测ESBLs的相同

- (1) 酶粗提取物的制备：挑取血平板上过夜生长的菌落制成0.5号麦氏单位菌悬液，取50ug加入12ml胰化大豆肉汤中35℃培养4h，离心沉淀，弃去上清，将沉淀物反复冻融5次，离心取上清（直接涂片无细菌及细菌培养为阴性）加1.5ml磷酸盐缓冲液，于1200转4℃离心。-20℃保存。

(2) 操作方法和结果判读

- 按标准纸片扩散法操作，将ATCC25922大肠埃希菌制成0.5号麦氏单位的菌悬液，均匀涂布于M-H平板上。将30ug/片头孢西丁贴在M-H平板上，使用刮胡刀片在离纸片边缘5mm处由里向外放射性的开一条狭缝然后取25~30ul酶粗提物由里向外加入狭缝内，避免液体溢出。35℃培养过夜，若看到狭缝与抑菌环交接处的抑菌环变形并且在此有细菌扩大生长区，可判断为三维试验结果阳性。反之，在交接处无细菌生长，抑菌环呈圆形，为阴性。同时使用AmpC酶阳性和阴性菌株做质控。

(3) PCR方法

5、对产AmpC酶菌株的治疗选药

- (1) 第四代头孢菌素如头孢吡肟对AmpC酶是低诱导，对 β -内酰胺酶是低亲和力，对产AmpC酶菌株有较强的抗菌作用，其敏感性与泰能相似，可作为替代性首选药。

- (2) 碳青酶烯类如泰能，虽然其能诱导产生AmpC酶，但只是暂时性增加，如果更换另一种抗生素，这种诱导会消失。碳青酶烯类耐酶性强，耐药率低，仍可选择敏感药治疗。

- (3) 选择非 β -内酰胺酶类如氟喹诺酮类和氨基糖苷类药物。
- (4) 避免使用三代头孢菌素及其酶抑制剂。

三、金属 β -内酰胺酶及其检测

随着产ESBLs和AmpC酶菌株不断增加，碳青霉烯类抗生素如亚胺配能的使用量也增多，而后出现了水解碳青霉烯 β -内酰胺酶

(一) 碳青酶烯酶的分类, 功能及来源

- 1、水解碳青酶烯 β -内酰胺酶有两大类, 一类是Bush分类A组2f型酶, 在酶的活性部位有一丝氨酸, 称为非金属碳青酶烯酶, 该酶能被克拉维酸抑制, 不被EDTA抑制。非金属碳青酶烯酶能水解青霉素类, 头孢菌素类和碳青酶烯类抗生素。还发现某些菌株同时具有AmpC酶, 因此对 β -内酰胺类抗生素耐药谱广。研究发现IMI-1和NMC-A酶来自阴沟肠杆菌, Sme-1酶来自粘质沙雷菌, 但是非金属碳青酶烯酶的发生率极低。
- 另一类是Bush分类B组酶, 在酶的活性部位有金属锌, 称为金属 β -内酰胺酶。

- 2、大多数 β -内酰胺酶是由染色体介导的酶不被 β -内酰胺酶抑制剂克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦抑制，但是能被EDTA抑制。

- 3、产生金属 β -内酰胺酶菌株：1982年 Saino从嗜麦芽窄食单孢菌中发现，此后在腊样芽孢杆菌，洋葱伯克霍尔德菌，脆弱类杆菌，*Chryseobacterium*（以前称黄杆菌属*Flavobacterium*）菌种，高曼军团菌，芳香黄杆菌，窄食单孢菌和气单孢菌中的不同种中发现。洋葱伯克霍尔德菌，AsbM1和CphA来自气单孢菌。

4、金属 β -内酰胺酶分类及功能:

- Bush分类B组中金属 β -内酰胺酶有3a、3b、3c三个型。3a型酶能水解青霉素类，头孢菌素类和碳青霉烯类抗生素。3a型中有的酶来自腊样芽孢杆菌，CcrA来源于脆弱类杆菌，L1酶来自嗜麦芽窄食单孢菌，以及质粒介导的酶IMP-1；3b型酶选择性地水解碳青霉稀类抗生素，该型酶活性部位有锌离子时酶才有最大的活性，3b型酶发现在芳香黄杆菌，3c型水解头孢菌素类和碳青霉烯类， β -内酰胺酶来自高曼军团菌。

5、质粒编码的金属 β -内酰胺酶

- 90年代初期在日本，从沙雷菌中发现了由质粒编码的IMP-1金属 β -内酰胺酶，同时也发现这些酶存在于肺炎克雷伯菌和绿脓杆菌中。最近在福氏志贺菌中发现一个新的质粒介导MET-1酶，对亚胺配能低耐药。
- 意大利在鲍曼不动杆菌中，新加坡在肺炎肺炎克雷伯菌株中都发现这种酶，而法国也有同样报道。目前虽然检出率不高，但是由的质粒介导细菌易于传播，加强对其检测十分必要。

(二) 质粒介导金属 β -内酰胺酶检测方法

- 1、纸片扩散试验（过筛试验）
- （1）原理：金属 β -内酰胺酶抑制剂能阻断金属 β -内酰胺酶的产生，重金属盐如 CuCl_2 和 FeCl_2 在纸片周围形成环形沉淀并有杀菌作用，其抑制生长圈能扩散到含CAZ的纸片。

2、试验材料

- (1) CAZ纸片 2张 (30ug/片)
- (2) 无菌滤纸片 1张
- (3) 被测菌是对CAZ耐药的革兰阴性菌株
- (4) 质控菌株：产ESBLs菌株，高产AmpC酶菌株，产IMP-1酶菌株
- (5) 金属 β -内酰胺酶抑制剂：CuCl₂和FeCl₂或EDTA或硫化化合物（颈基乙酸、二颈基丙酸和颈基乙醇）

3、方法

- 制备测试菌悬液浓度为 10^6 CFU/ml，按照NCCLS推荐的纸片扩散法进行操作，将两片CAZ纸片（30ug/片）贴在M-H平板上，两纸片中心距离为4~5CM。在距离CAZ纸片1~2.5CM（纸片中心距离）贴一张无菌滤纸片并在此纸片上加入2~5ul的金属 β -内酰胺酶抑制剂（任选下列一种：CUCL₂，100mM（5ul），或Fecl₂100mM（5ul）或EDTA，100mM（5ul），或硫化化合物未稀释液（2~3ul）放置35℃过夜。

4、判断结果

- 重金属盐如 CuCl_2 和 FeCl_2 在纸片周围形成环形沉淀抑制生长圈扩大到含CAZ的纸片为产金属 β -内酰胺酶。对产AmpC和ESBLs菌株未出现抑制生长圈扩大到含CAZ的纸片，为阴性。
- 根据文献报道 HgCl_2 的试验结果比 CuCl_2 和 FeCl_2 的试验结果易于观察，但是因其对人体有害不易才用。

PCR方法

- PCR方法检测金属 β -内酰胺酶bla_{IMP}基因。
PCR引物见参考文献。（J.of
clin.micro.Jan 2000, p40-43）