

医院感染阴沟肠杆菌多重耐药基因分析

罗甫花, 蒋晓军, 王朝艳

(邵阳市第一人民医院, 湖南 邵阳 422001)

[摘要] **目的** 了解医院感染阴沟肠杆菌的耐药性及其耐药基因, 为防控感染提供依据。**方法** 对 40 株临床分离的阴沟肠杆菌, 以纸片扩散法和琼脂稀释法进行药敏试验, 聚合酶链反应(PCR)及序列分析法分析 12 种耐药相关基因。**结果** 40 株阴沟肠杆菌仅对亚胺培南和美罗培南高度敏感, 敏感率均为 100.00%; 对头孢吡肟耐药率较低, 为 15.00%; 对其他 15 种抗菌药物耐药率较高, 为 42.00%~92.50%。共检出 8 种耐药基因, 分别为 *TEM-1*、*SHV-2a*、*CTX-M-3*、*CTX-M-9*、*AmpC*、*aac(3')-I*、*Int I 1*、*sul1*, 大多数菌株携带 *sul1 + Int I 1* 型基因; 耐药谱共分为 A~I 9 型, 以 C 和 D 型为主。抗菌药物耐药谱分型和基因分型有一定相关性。**结论** 阴沟肠杆菌呈现多重和高度耐药性, 耐药机制复杂且呈多种耐药机制共同作用。

[关键词] 阴沟肠杆菌; 医院感染; 抗药性; 微生物; 耐药基因; 聚合酶链反应; 序列分析; 多重耐药

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)05-0318-04

Multiple drug-resistant genes of *Enterobacter cloacae* in hospital infection

LUO Fu-hua, JIANG Xiao-jun, WANG Zhao-yan (The First People's Hospital of Shaoyang, Shaoyang 422001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate drug-resistance and multiple drug-resistant genes of *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) in nosocomial infection(NI), so as to provide evidence for the treatment of IN. **Methods** Forty strains of *E. cloacae* isolated from clinic were performed antimicrobial susceptibility test by disc agar diffusion and agar dilution method, twelve kinds of antimicrobial-resistant genes were detected by polymerase chain reaction(PCR) and DNA sequencing. **Results** Forty strains of *E. cloacae* were only highly sensitive to imipenem and meropenem, sensitive rate were all 100.00%; the resistant rate to cefepime was low(15.00%); and resistant rates to the other 15 kinds of antimicrobial agents were high (42.00%~92.50%). Eight kinds of drug-resistant genes were detected, which was *TEM-1*, *SHV-2a*, *CTX-M-3*, *CTX-M-9*, *AmpC*, *aac(3')-I*, *Int I 1* and *sul1*, *sul1 + Int I 1* was the main pattern; drug-resistant pattern was divided into A~I 9, the main pattern were C and D. **Conclusion** *E. cloacae* shows a multiple and high drug-resistance, resistant mechanisms are complicated and varied.

[Key words] *Enterobacter cloacae*; nosocomial infection; drug-resistance; microbial; drug-resistance genes; polymerase chain reaction; sequence analysis; multiply drug-resistance

[Chin Infect Control, 2009, 8(5): 318-321]

阴沟肠杆菌是肠杆菌科细菌中的常见条件致病菌。近年来, 由于第三代和第四代头孢菌素、碳青霉烯类以及氟喹诺酮类等广谱抗菌药物在临床的广泛使用, 阴沟肠杆菌多重耐药现象日趋严重, 已成为医院感染的重要病原菌, 给临床治疗带来了极大的困难。为了解临床分离的阴沟肠杆菌耐药基因存在状况, 我们采用细菌药敏试验与分子生物学技术进行

基因检测, 现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源及鉴定 40 株试验菌株均分离自 2007 年 5 月—2008 年 12 月本院住院患者送检的各种临床标本, 其中创伤创面分泌物 15 份, 痰液 12

[收稿日期] 2009-06-15

[基金项目] 湖南省医药卫生科研计划课题项目(B2007181)

[作者简介] 罗甫花(1978-), 女(汉族), 湖南省邵阳市人, 主管技师, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通讯作者] 罗甫花 E-mail: luofuhua0527@163.com

份,烧伤创面分泌物 6 份,静脉血 3 份,鼻窦分泌物、脓液、溃疡分泌物、脑脊液各 1 份。采用 VITEK-2 系统鉴定菌种。标准菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853。标准菌株及阳性参考菌株由上海交通大学附属医院倪语星教授和上海第六人民医院蒋燕群教授惠赠。

1.2 药敏试验 以纸片扩散(K-B)法测定抗菌药物的敏感性和琼脂稀释法测定其最低抑菌浓度 MIC₅₀ 和 MIC₉₀。阿莫西林(AMX)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、替卡西林/克拉维酸(TIM)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢噻吩(CEF)、头孢唑林(CFZ)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢曲松(CRO)、头孢吡肟(FEP)、头孢哌酮/舒巴坦(CFS)、头孢西丁(FOX)、亚胺培南(IPM)和美罗培南(MEM)、妥布霉素(TOB)、阿米卡星(AMK)、左氧氟沙星(LVX)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、头孢他啶/克拉维酸(CD02)、头孢噻肟/克拉维酸(CD03)均为英国 Oxoid 公司产品。根据美国临床实验室标准化研究所(CLSI) 2008 年版标准进行抗菌药物敏感性判断。

1.3 耐药基因检测 均采用聚合酶链反应(PCR)法。以煮沸法制备 DNA 扩增模板。共检测 12 种耐药基因,分别为 8 种 β-内酰胺酶基因: *blaTEM-1*、*blaSHV-2a*、*blaCTX-M-2*、*blaCTX-M-3*、*blaCTX-M-9* 群、*VEB-1*、*PRE-1* 和 AmpC 酶基因; 2 种氨基糖苷类修饰酶(AMEs)基因: *aac(6′)-I* 和 *aac(3′)-I*, I 类整合酶基因(*Int I 1*)及磺胺耐药相关基因(*sul1*)。引物根据 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中已发布的各型基因序列设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成。耐药基因检测盒及 DNA 标志物由北京天根生化科技有限公司提供。纯水为阴性对照。按说明设置各型扩增参数,于 PE9700 基因扩增仪扩增。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,于紫外凝胶成像仪下观察并记录结果。

1.4 序列测定及分析 部分扩增阳性基因 PCR 产物经纯化后,采用双脱氧末端终止法在美国 ABI 公司 3730 仪上进行序列测定,由上海生工生物工程技术有限公司完成。测序结果在 PUBMED 的 BLAST 程序中进行同源性分析。

2 结果

2.1 药敏试验结果 本组菌株呈严重多重耐药性,仅对 IPM 和 MEM 高度敏感;对 FEP 的耐药率较

低,为 15.00%,但对 FEP 的 MIC₅₀ 已达 32 μg/mL, MIC₉₀ 达 256 μg/mL。对其他 14 种抗菌药物的药敏结果详见表 1。

表 1 40 株阴沟肠杆菌对 18 种抗菌药物的药敏结果和 MIC 值
Table 1 Antimicrobial susceptibility test results and MIC values of 40 strains of *E. cloacae* to 18 antimicrobial agents

抗菌药物	耐药 (%)	中介 (%)	敏感 (%)	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)
AMX	80.00	2.00	18.00	128.00	256.00
AMC	75.00	5.00	20.00	128.00	256.00
TIM	74.50	0.00	25.50	128.00	256.00
TZP	75.00	0.00	25.00	64.00	256.00
CEF	70.50	2.50	27.50	32.00	256.00
CFZ	72.00	0.00	28.00	32.00	256.00
CAZ	52.50	25.00	22.50	128.00	512.00
CTX	55.00	22.50	22.50	32.00	256.00
CRO	56.00	10.00	34.00	32.00	256.00
FEP	12.50	2.50	85.00	32.00	256.00
CFS	42.00	0.00	58.00	64.00	128.00
FOX	92.50	0.00	7.50	256.00	512.00
IPM	0.00	0.00	100.00	0.50	1.00
MEM	0.00	0.00	100.00	0.25	0.50
TOB	82.00	2.00	16.00	128.00	256.00
AMK	55.00	0.00	45.00	32.00	64.00
LVX	25.00	20.00	55.00	1.00	4.00
SXT	90.00	0.00	10.00	32.00	64.00

中介计为耐药

2.2 耐药谱分型 耐药谱共分为 9 型,详见表 2。

表 2 40 株阴沟肠杆菌耐药谱分型

Table 2 Antimicrobial resistant patters of 40 strains of *E. cloacae*

谱分型	抗菌药物敏感性								菌株号
	CD02	CD03	CTX	FOX	LVX	CAZ	IPM	FEP	
A	S	S	R	R	R	R	S	S	1 2 21 40
B	R	R	R	R	R	R	S	S	7 11 12 19 20 22
C	S	S	S	R	S	R	S	S	16 29 30 34 35 38 39
D	S	S	R	R	S	S	S	S	6 15 17 25 26 27 36
E	S	S	R	R	R	R	S	R	14 28 32
F	R	R	R	R	S	R	S	S	4 5 8 24 37
G	R	R	R	R	R	R	R	R	9 10 13
H	R	R	R	R	R	R	S	R	3 18
I	S	R	R	R	S	S	S	S	23 31 33

S:敏感;R:耐药

2.3 基因检测结果 共检出 8 种基因,基因分型结果及其同源菌株见表 3。部分基因 PCR 产物电泳见图 1~2。

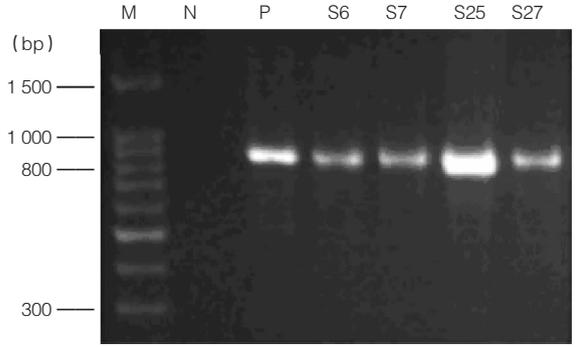
2.4 序列分析结果 AmpC 酶取 5、10、12、18 号菌株测序,与 AmpC 酶核苷酸序列(AF411149)99% 同源。超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)基因 *CTX-M-3*

组取 2、33 号菌株测序,均为 *CTX-M-3* 亚型;*SHV-2a* 组取 8、16、21、25 号菌株测序,为 *SHV-2a*; *TEM-1* 组取 3、13、21、27 号菌株测序,为 *TEM-1* 亚型。*aac(3′)-I* 组取 14、32、33、40 号菌株测序,均为 *aac(3′)-I*; *sull* 组取 2—5 号菌株测序,均为 *sull*。部分测序结果见图 3。

表 3 40 株阴沟肠杆菌基因检测结果

Table 3 Gene test results of 40 strains of *E. cloacae*

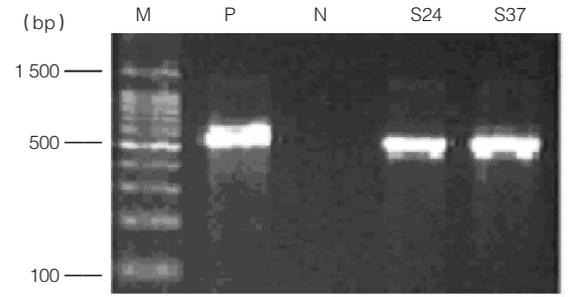
菌株号	<i>TEM-1</i>	<i>SHV2a</i>	<i>CTX-M-3</i>	<i>CTX-M-9</i>	<i>AmpC</i>	<i>aac(3′)-I</i>	<i>Int I 1</i>	<i>sull</i>
1	+					+	+	
2			+	+		+	+	+
3 9 13	+					+		+
4	+						+	+
5					+	+		+
6		+				+	+	+
7	+	+				+	+	+
8 16 29	+	+					+	+
35 39								
10					+	+	+	+
11 23 30								+
31								
12 18					+		+	
14						+		+
15 40						+	+	+
17	+			+			+	+
19 24 37					+		+	+
20 22 34					+			+
21 27 38	+	+			+		+	+
25		+					+	+
26	+					+		+
28	+	+						+
32	+					+	+	+
33			+		+	+	+	+
36							+	+



M: Marker; N: 阴性对照; P: 阳性对照; S6、S7、S25、S27: 阳性标本, 目的产物长度为 867 bp

图 1 *SHV-2a* 组 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products in *SHV-2a* group



M: Marker; N: 阴性对照; P: 阳性对照; S24、S37: 阳性标本, 目的产物长度为 580 bp

图 2 *AmpC* 组 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products in *AmpC* group

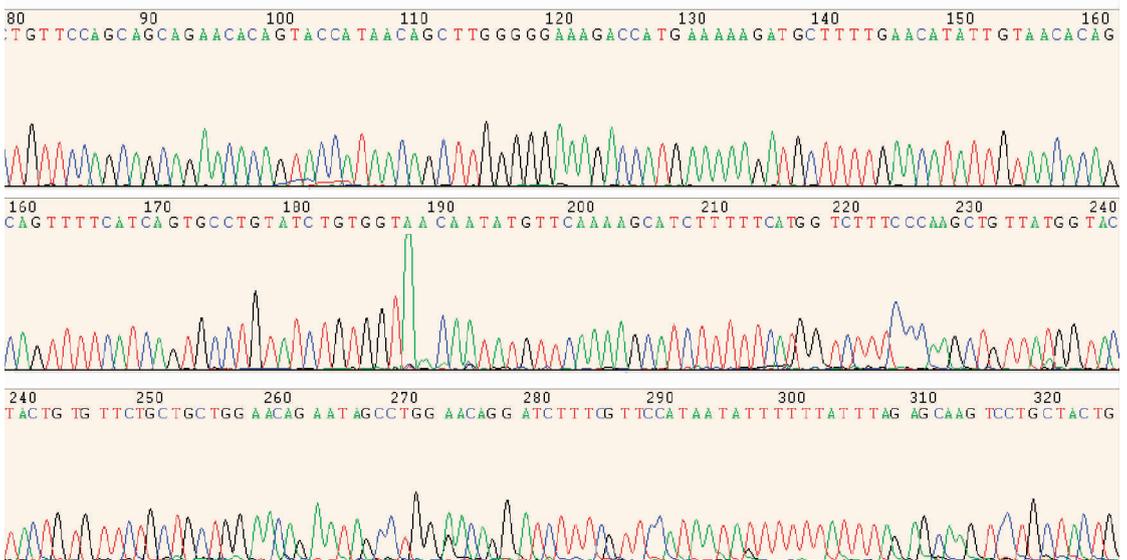


图 3 *CTX-M-3* 基因 PCR 产物部分测序图

Figure 3 Partial sequence map of PCR product of *CTX-M-3* gene

3 讨论

阴沟肠杆菌是医院感染的一种重要条件致病菌,近年来其多重耐药十分严重,对常用抗菌药物的耐药率逐年上升^[1]。在本药敏试验中,除 MEM、IPM、FEP 外,对其他 15 种抗菌药物的耐药性均较高。本组试验菌株对 FEP 耐药率为 15.00%,相对第三代头孢菌素较低,临床对于产 AmpC 酶阴沟肠杆菌,可以选用 FEP。目前碳青霉烯类抗生素如 IPM 对本院临床分离的阴沟肠杆菌仍具有高度抗菌活性,未发现耐药株,在治疗广泛耐药的重症感染患者时,仍可作为首选药物。但应慎重使用,以免诱导或筛选出耐药菌株,造成播散。

阴沟肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素的主要耐药机制是产生 β -内酰胺酶^[2-4],包括 AmpC 酶、ESBLs 和碳青霉烯酶(MBL)等。本实验研究了 12 种 β -内酰胺酶基因,其中 5 种 β -内酰胺酶基因扩增阳性,分别为 *blaTEM-1*、*blaSHV-2a*、*blaCTX-M-3*、*blaCTX-M-9*、AmpC 酶基因。本组菌株 *blaTEM* 基因携带率很高,为 45.00%,经测序均为 *TEM-1* 亚型;*blaSHV* 基因携带率为 30.00%,测序为 *SHV-2a*,说明 *SHV-2* 型 ESBLs 在本院并不少见;*blaCTX-M-9* 基因携带率为 5.00%;AmpC 酶基因的检出率为 35.00%。同时发现产 ESBLs 与 AmpC 酶菌 4 株,10 株菌同时携带 *TEM* 和 *SHV* 基因。当菌株中 *TEM* 与 *SHV* 型 ESBLs 同时存在或 ESBLs 与 AmpC 酶同时表达时,其耐药表型更趋复杂,临床治疗也变得更加困难。因此,应引起临床的高度重视。检测结果表明,产生 ESBLs 与 AmpC 型 β -内酰胺酶是阴沟肠杆菌对第三代头孢菌素耐药的重要原因。未检出 *PRE-1*、*VEB-1*、*CTX-M-2*,可见各地阴沟肠杆菌中流行的 β -内酰胺类抗生素耐药相关基因类型不尽相同。

产生 AMEs 为细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药的主要机制。本组试验菌株中有 37.50% 的菌株携带 *aac(3')-I* 基因,说明本地区 AMEs 基因以 *aac(3')-I* 为主。与黄支密的报道^[5] 存在一定差异,主要为地区差异所致。整合子可以通过存在于质粒、转座子等可移动基因元件而在同种菌属和不同种菌属间进行基因的水平转移,从而使细菌的耐药性得以传播。本组 40 株阴沟肠杆菌中有 26 株(65.00%) *Int I 1* 基因阳性,低于文献报道的 95.00%^[6]。这说明整合子在阴沟肠杆菌中普遍存

在,它的存在无疑是阴沟肠杆菌可以不断摄取新基因并进行水平播散的重要基础条件。整合子机制参与了多重耐药的传播,因其高效性,应引起足够的重视,以采取积极有效的措施,进而控制耐药基因的水平转移^[7]。近年来,对细菌可移动性遗传元件的研究发现,I 类整合子的耐药基因盒中常携带二氢叶酸合成酶的编码基因 *sull*,其阳性提示细菌对磺胺类药物耐受。40 株阴沟肠杆菌 *sull* 基因的阳性率已达 90.00%。磺胺耐药基因的高检出率,提示人们在日常生活中过度使用消毒剂,可能加速了细菌获得耐消毒剂基因的进程,引起医院感染暴发。基因同源菌株的存在,说明有感染小流行。

研究显示,抗菌药物的耐药谱分型和基因分型相关性较差,与阴沟肠杆菌耐药机制复杂且多种耐药机制共同作用,致耐药谱广、耐药特征复杂有关。我们应该采取措施减少医源性感染,及时为临床提供细菌培养和药敏试验结果,对医院感染进行监测,这对于降低医院感染的发生至关重要。

(致谢:感谢中南大学湘雅医院黄勋副主任医师在本文撰写过程中给予的指导!同时感谢中南大学湘雅三医院药理学实验室全体教师给予的帮助)

[参考文献]

- [1] 李岩,许淑珍,苏建荣,等. 2002 年至 2006 年阴沟肠杆菌耐药性监测分析[J]. 中国实验诊断学杂志,2007,11(2):241-243.
- [2] Paterson D L, Bonomo R A. Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4):657-659.
- [3] Pai H, Hong J Y, Byeon J H, et al. High prevalence of extended spectrum β -lactamase-producing strains among blood isolates of *Enterobacter spp.* collected in a tertiary hospital during an 8-year period and their antimicrobial susceptibility patterns [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(8):3159-3162.
- [4] Moland E S, Hanson N D, Black J A, et al. Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(9):3318-3322.
- [5] 黄支密,仵雷,陈榆,等. 44 株阴沟肠杆菌耐药基因分析[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(2):139-142.
- [6] 黄支密,诸葛青云,糜祖煌,等. 阴沟肠杆菌 I 类整合酶基因及质粒 AMPC 酶基因检测[J]. 江西医学检验,2005,23(1):21-24.
- [7] Ploy M C, Lamber T, Couty J P, et al. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system [J]. Clin Chem Lab Med, 2000, 38(6):483-487.