

产 ESBLs 肺炎克雷伯菌耐药性及基因分型

刘晓春, 王国庆, 王 蓉, 刘运德

(天津医科大学医学检验学系, 天津 300203)

[摘要] 目的 了解某院临床分离的产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯菌的耐药性及基因型。

方法 收集临床分离的肺炎克雷伯菌, 采用美国临床实验室标准化委员会 2005 年推荐的方法进行 ESBLs 初筛及表型确证试验; K-B 纸片扩散法进行抗菌药物敏感性试验; 聚合酶链反应(PCR)法分析产 ESBLs 菌株的基因类型。

结果 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的检出率为 62.22%(56/90)。产 ESBLs 菌仅对第三代头孢菌素与 β -内酰胺酶抑制剂合剂、碳青霉烯类抗生素较敏感。基因型分析结果显示, 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中 SHV 型、CTX-M-1 型、TEM 型、CTX-M-9 型的检出率分别为 69.64%、51.79%、37.50%、0.00%, 同时携带 2 种、3 种耐药基因的菌株分别占 35.71% 和 14.28%。**结论** 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌耐药严重, 基因型以 SHV、CTX-M-1 为主。

[关键词] 肺炎克雷伯菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 基因型; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378.99⁺6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)01-0015-04

Antimicrobial resistance and gene typing of extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae*

LIU Xiao-chun, WANG Guo-qing, WANG Rong, LIU Yun-de (Department of Laboratory Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

[Abstract] **Objective** To investigate antimicrobial resistance and genotypes of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) isolated from clinic in a hospital. **Methods** *K. pneumoniae* were collected, ESBLs preliminary screen and phenotype confirmatory tests were carried out according to the NCCLS guidelines; antimicrobial susceptibility tests were determined by Kirby-Bauer test; gene types of β -lactamases were performed with PCR. **Results** The detection rate of ESBLs-producing *K. pneumoniae* was 62.22%(56/90). ESBLs-producing strains were only sensitive to the combination of the third generation cephalosporins with β -lactamases inhibitor and carbapenems. The detection rate of genes of SHV, CTX-M-1, TEM and CTX-M-9 was 69.64%, 51.79%, 37.50% and 0.00% respectively. 35.71% and 14.28% of ESBL-producing *K. pneumoniae* carried two or three genes respectively. **Conclusion** Antimicrobial resistance of *K. pneumoniae* is serious, the main gene types are SHV and CTX-M-1.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; extended-spectrum β -lactamase; genotype; drug-resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2010, 9(1): 15-18]

随着抗菌药物、免疫抑制剂、介入性诊疗技术的应用, 肺炎克雷伯菌引起的感染日渐增多。由于 β -内酰胺类抗生素在临床上的广泛应用, 产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)细菌引起的耐药问题越来越严重^[1]。各个国家和地区使用的抗菌药物不同, 流行的 ESBLs 基因型也不同^[2-3], ESBLs 的检测对于防止耐药性

传播, 指导临床治疗有很重要的意义。为了解本地区产 ESBLs 菌株的发生率、耐药率及基因型分布, 加强对产酶菌株的监控, 减少耐药菌的产生, 笔者对天津市某医院临床分离鉴定的肺炎克雷伯菌进行 ESBLs 表型及基因型分析, 现将结果报告如下。

[收稿日期] 2008-10-28

[作者简介] 刘晓春(1964-), 女(汉族), 天津市人, 副教授, 主要从事临床微生物检验及细菌耐药性研究。

[通讯作者] 刘运德 E-mail: yundeliu@126.com

1 材料与方法

1.1 菌株来源 天津市某医院 2006 年 4—11 月临床分离鉴定肺炎克雷伯菌 90 株, 菌株采用 VITEK300 系统鉴定。质控菌株肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 (产酶株)、大肠埃希菌 ATCC 25922 (敏感株) 由天津市人民医院惠赠。

1.2 ESBLs 表型初筛及确证试验 采用美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 2005 年标准^[4] 进行 ESBLs 表型初筛及确证试验。药敏纸片购自天津金章公司。

1.3 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法。氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢唑林、头孢呋辛、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、头孢西丁、亚胺培南、复方磺胺甲噁唑等药敏纸片为英国 OXOID 公司产品。

1.4 ESBLs 基因初步分型 采用煮沸法提取模板 DNA, 引物序列见表 1。聚合酶链反应 (PCR) 扩增引物由北京奥科生物技术公司合成。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 Sequences of PCR amplification primers

引物	序列	ESBLs 基因型	扩增片段 (bp)
1 ^[5]	5'-AAG ATC CAC TAT CGC CAG CAG-3' 5'-ATT CAG TTT CCC AGC GG-3'	SHV	862
2 ^[5]	5'-GAG TAT TCA ACA TTT CCG TGT C-3' 5'-TAA TCA GTG AGG CAC CTA TCT C-3'	TEM	822
3 ^[6]	5'-TCG TCT CTT CCA GA-3' 5'-CAG CGC TTT TGC CGT CTA AG-3'	CTX-M-1 组	217
4 ^[6]	5'-GTC ACA GCC CTT CGG CGA TGA TTC-3' 5'-CGC ATG GTG ACA AAG AGA GTG CAA-3'	CTX-M-9 组	850
5 ^[7]	5'-TGC AAC GGA TGA TGT TCG CGG-3' 5'-ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC-3'	TOHO-2 组	164

PCR 反应体系 25 μ L: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 20 pmol/L 引物各 0.5 μ L, 2.5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶 0.25 μ L, 4 μ L 模板 DNA 及双蒸水 14.25 μ L。PCR 扩增条件, SHV: 96 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 96 $^{\circ}$ C 30 s 变性, 55 $^{\circ}$ C 30 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 1 min 延伸, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; TEM: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 45 s 变性, 48 $^{\circ}$ C 45 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 1 min 延伸, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; CTX-M-1 组: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 45 s 变性, 52 $^{\circ}$ C 45 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 1 min 延伸, 共 35 个循

环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; CTX-M-9 组: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 45 s 变性, 58 $^{\circ}$ C 45 s 退火, 72 $^{\circ}$ C 1 min 延伸, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 在凝胶成像系统下观察结果。

1.5 统计方法 肺炎克雷伯菌产酶株与非产酶株的耐药率比较, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ESBLs 表型检出情况 90 株肺炎克雷伯菌中检出产 ESBLs 株 56 株, 阳性率 62.22%。标本主要来自重症监护室 (ICU), 占 41.07%, 其次为胆胰外科 21.43%; 标本类型主要为痰 (41.07%)、引流液 (25.00%)、胆汁 (17.86%)、分泌物 (5.36%)、血 (3.57%)。

2.2 产酶株与非产酶株的耐药率比较 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌耐药率显著高于非产 ESBLs 株, 详见表 2。

表 2 ESBLs 阳性与 ESBLs 阴性肺炎克雷伯菌耐药率比较

Table 2 Antimicrobial resistant rates of ESBLs positive and negative *K. pneumoniae*

抗菌药物	产酶株 (56 株)		非产酶株 (34 株)		χ^2	P
	耐药株数	耐药率 (%)	耐药株数	耐药率 (%)		
氨苄西林	56	100.00	33	97.06	-	-
氨苄西林/舒巴坦	54	96.43	5	14.71	62.57	<0.001
头孢唑林	56	100.00	6	17.65	66.95	<0.001
头孢呋辛	56	100.00	4	11.76	74.12	<0.001
头孢他啶	48	85.71	2	5.88	54.61	<0.001
头孢噻肟	46	82.14	2	5.88	49.43	<0.001
头孢吡肟	37	66.07	0	0.00	38.15	<0.001
头孢哌酮/舒巴坦	8	14.29	0	0.00	3.71	>0.05
阿米卡星	37	66.07	2	5.88	31.21	<0.001
庆大霉素	53	94.64	9	26.47	45.88	<0.001
环丙沙星	49	87.50	8	23.53	37.28	<0.001
左氧氟沙星	50	89.29	7	20.59	42.99	<0.001
头孢西丁	45	80.36	5	14.71	36.93	<0.001
亚胺培南	3	5.36	0	0.00	0.59	>0.05
复方磺胺甲噁唑	48	85.71	10	29.41	29.27	<0.001

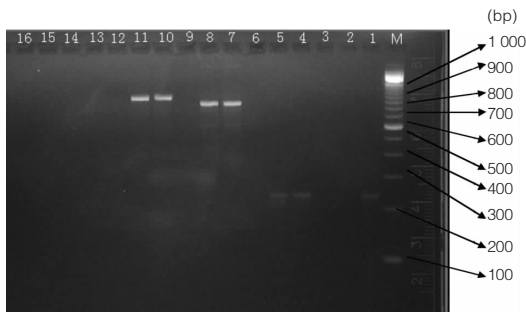
2.3 ESBLs 编码基因 PCR 检测结果 56 株 ESBLs 表型阳性肺炎克雷伯菌中, SHV、TEM、CTX-M-1、CTX-M-9 基因扩增阳性率分别为 69.64%、37.50%、51.79%、0.00%; 其中 3 株菌 4 种基因扩增均阴性; 同时携带 2 种、3 种耐药基因的菌株分别

占 35.71% 和 14.28%，详见表 3。PCR 扩增产物电泳结果见图 1。

表 3 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌基因型扩增结果

Table 3 Results of *K. pneumoniae* genotype amplification

基因型	株数	构成比(%)
SHV	14	25.00
TEM	7	12.50
CTX-M-9	0	0.00
CTX-M-1	4	7.14
SHV、TEM	3	5.36
SHV、CTX-M-1	14	25.00
TEM、CTX-M-1	3	5.36
CTX-M-1、CTX-M-9	0	0.00
SHV、TEM、CTX-M-1	8	14.28
4 种基因型均阴性	3	5.36
合计	56	100.00



M: Marker; 1-3: 分别为 CTX-M-1 阳性对照、阴性对照、空白对照; 4-5: CTX-M-1 基因 PCR 扩增阳性产物; 6: CTX-M-1 基因扩增阴性; 7-8: TEM 基因 PCR 扩增阳性产物; 9: TEM 基因扩增阴性; 10-11: SHV 基因扩增阳性产物; 12: SHV 基因扩增阴性; 13-16: TOHO-2 组基因扩增阴性

图 1 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Polymerase chain reaction fingerprints

3 讨论

1983 年德国首次发现 SHV-2 型 ESBLs，之后的 15 年里，各国都出现产 SHV-2 细菌的报道，表明在第三代头孢菌素使用的第 1 个 10 年里，抗菌药物的选择性压力与细菌变异是有联系的^[7]。随着第三代头孢菌素在临床的广泛使用，产 ESBLs 耐药菌的检出率逐年增多。ESBLs 由质粒介导，可水解青霉素类、单环类抗菌药物、第三甚至第四代头孢菌素，一般对头霉素、碳青霉烯及酶抑制剂敏感；产 ESBLs 菌株常同时携带对氨基糖苷类、喹诺酮类等抗菌药物的多重耐药基因^[2,8]。头孢菌素酶又称为 AmpC 酶，不受酶抑制剂作用，一般对第四代头孢菌素和碳青霉烯类抗生素敏感^[9]。

本研究中产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的检出率较高(62.22%)。究其原因：菌株主要来自于 ICU 和胆胰外科病房，患者病情较重，免疫力较低，同时存在长期使用抗菌药物及其他药物治疗的可能；另外，近期外科手术也是产 ESBLs 菌株流行不容忽视的危险因素。从标本来源分析，产酶菌株多分离自痰标本，与文献报道^[10]相似，可能与患者因呼吸系统疾病而使用呼吸机进行创伤性治疗有关。提示临床医生应慎重选择抗菌药物，同时加强对医院感染的监测。

本研究显示，产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对头孢西丁的耐药率达 80% 以上，可能与细菌细胞外膜改变或产 ESBLs 菌同时合并高产 AmpC 酶有关；对头孢哌酮/舒巴坦较敏感，故第三代头孢菌素和酶抑制剂合剂是治疗产 ESBLs 细菌感染值得关注的药物。应引起注意的是，对碳青霉烯类抗生素耐药的 ESBLs 菌株罕见，但本研究中的 56 株耐药菌中有 3 株对亚胺培南耐药，其耐药机制正在研究中。有报道^[11]，质粒介导的 AmpC 酶与外膜蛋白丢失的菌株可出现对碳青霉烯类药物耐药，并可通过转化、接合等方式转移给其他细菌，导致耐药性广泛传播。Martinez^[12]也发现碳青霉烯类耐药的产生可能是由于外膜孔道蛋白丢失和质粒介导的 β-内酰胺酶的共同作用。另外，也有可能存在水解碳青霉烯类抗生素的 β-内酰胺酶；与碳青霉烯类抗生素相关的青霉素结合蛋白发生改变也可能是产酶株耐受亚胺培南的原因之一。总之，产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的耐药问题严重，且呈多重耐药性，应引起临床足够重视。

不同国家、同一国家的不同地区流行的 ESBLs 基因型不同。欧洲、美国等以 TEM、SHV 型为主，CTX-M 型多见于南美、东欧、亚洲等国家。我国有学者报道^[10]产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 SHV 型携带率高。本研究 56 株产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌中，SHV 型最多(39 株，69.64%)，与文献报道相似；TEM 型 21 株(37.50%)，CTX-M-1 型 29 株(51.79%)，未发现 CTX-M-9 型。携带 1 种基因者 25 株(44.64%)，同时携带 2 种基因者 20 株(35.71%)，同时携带 3 种基因者 8 株(14.28%)，3 株菌 4 种基因型扩增均阴性，但不排除携带其他型 ESBLs 的可能(如 OXA 等)。南美地区已发现 PER 型 β-内酰胺酶^[13]，在鼠伤寒沙门菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌等细菌中均有检出^[13-14]。另外本研究发现，从同一时期住院，且住在同一 ICU 病房的 2 位患者体内

均分离出 CTX-M-1 型肺炎克雷伯菌,提示有细菌在患者之间传播的可能性。长期住院、病情严重的患者是易于被产 ESBLs 菌感染的高危人群,医院应制定相关感染控制措施,防止耐药基因的播散。

本研究 PCR 使用已知标准酶基因的特异性引物进行循环扩增,灵敏度高,但无法区分广谱酶与超广谱酶,有待进一步用核苷酸序列分析等方法深入研究。

[参考文献]

[1] 陈民钧. 细菌对 β -内酰胺药的耐药性及检测方法[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(4): 197-200.

[2] Conque T M, Oliver A, Pérez-Díaz J C, *et al.* Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000) [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(2): 500-510.

[3] Chanawong A, M'Zali F H, Heritage J, *et al.* Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(3): 630-637.

[4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement (M100-S15) [S]. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2005.

[5] Weldhagen G F, Poirei L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(8): 2385-2392.

[6] 邵剑春, 胡大春, 杨绍敏, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的检测及其基因分析 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2005, 26(12): 872-876.

[7] Paterson D L, Bonomo R A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 657-686.

[8] Paterson D L, Mulazimoglu L, Casellas J M, *et al.* Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamases production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia [J]. Clin Infect Dis, 2000, 30(3): 473-478.

[9] 沈定霞, 罗燕萍, 曹敬荣, 等. 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌 AmpC β -内酰胺酶的表型检测 [J]. 临床检验杂志, 2007, 25(1): 4-6.

[10] 卢月梅, 何林, 张阮章, 等. 215 株产 ESBLs 菌株 bla(SHV) 基因检测 [J]. 中国医师杂志, 2005, 7(7): 978-979.

[11] Bradford P A, Urban C, Mariano N, *et al.* Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(3): 563-569.

[12] Martínez L, Pascual A, Hernández-Allés S, *et al.* Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(7): 1669-1673.

[13] Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, *et al.* Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(3): 616-620.

[14] Petroni A, Corso A, Melano R, *et al.* Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(5): 1462-1468.

沉痛悼念我刊顾问、我国著名传染病学家张铮教授

我刊顾问,我国传染病学奠基人之一,著名传染病学家、中南大学湘雅医院传染病学教研室主要创始人张铮教授于 2010 年 1 月 3 日 21 时在广州病逝,享年 90 岁。

早在 1981 年,张铮教授以访问学者的身份赴美国耶鲁大学医学院考察和学术交流传染病学及医院感染学,带回许多医院感染方面的资料,回国后指导有关人员积极开展医院感染的调查和研究。1984 年他为首在长沙主办了卫生部和丹麦开发署委托的全国医院内感染讲习班,使湘雅医院成为国内开展医院内感染研究的先驱和培训基地。

张铮教授生前十分关心本刊的建设与发展,本刊 2002 年创刊以来,张铮教授一直担任本刊顾问。尽管患有严重的白内障,凡是寄去的杂志,他老人家每期必看,并能提出宝贵意见和建议。

张铮教授一生致力于医学临床、教育和科学研究,先后任卫生部科学委员会病毒性疾病组和血吸虫病组委员、中华传染病和寄生虫病学委员会副主任委员,为我国传染病学和医院感染学的发展作出了重要贡献。张铮教授 1992 年起享受国务院政府特殊津贴。张铮教授的逝世是我国感染病学界的巨大损失。

张铮教授永远地离开了我们,但他老人家的道德精神与世长存。我们要努力学习他严谨求实、孜孜不倦的治学态度;学习他廉洁行医、医德高尚的人格魅力;学习他为人师表,关爱学生、关心他人的高尚情操,时刻牢记我们肩负的使命和职责,努力把《中国感染控制杂志》办得更好!