

DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-9638. 2013. 05. 005

• 论 著 •

某院分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 基因检测及分型

王喜仁^{1,2}, 王笑峰¹, 赵淑堂³

(1 青岛大学医学院微生物学教研室, 山东 青岛 266021; 2 威海市立医院, 山东 威海 264200; 3 威海卫人民医院, 山东威海 264200)

[摘 要] 目的 了解某院分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产生的超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)基因型。方法

采用表型确证试验测定并收集该院产 ESBLs 大肠埃希菌(40 株)和肺炎克雷伯菌(20 株),提取质粒 DNA。采用特异性引物扩增 TEM、SHV 和 CTX-M 系列基因,测序后进行序列分析。结果 60 株表型确证试验阳性的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌,聚合酶链反应(PCR)扩增均阳性,包括 TEM、SHV、CTX-M-3 组和 CTX-M-9 组 4 种基因型。大肠埃希菌中上述 4 种基因型阳性率分别为 37.50%(15 株)、2.50%(1 株)、62.50%(25 株)、50.00%(20 株);肺炎克雷伯菌上述 4 种基因型阳性率分别为 40.00%(8 株)、90.00%(18 株)、65.00%(13 株)、40.00%(8 株)。100.00%的大肠埃希菌和 80.00%的肺炎克雷伯菌产生 bla_{CTX-M},12.50%(5/40)的大肠埃希菌和 25.00%(5/20)的肺炎克雷伯菌携带 2 种 CTX-M 酶基因。23 例 TEM 基因皆为 TEM-1 型;19 例 SHV 型基因包括 SHV-1 型 6 株、SHV-11 型 6 株、SHV-12 型 5 株及 SHV-25 型 2 株,仅 SHV-12 为 ESBLs 基因,且均来源于肺炎克雷伯菌;66 例 CTX-M 型基因,其中 CTX-M-14 在大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的检出率分别为 45.00%和 35.00%,CTX-M-55 检出率均为 35.00%,CTX-M-15 检出率分别为 20.00%和 15.00%,检出少量 CTX-M-3、CTX-M-65、CTX-M-101 及 CTX-M-123 基因型。结论 该院分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 基因型以 CTX-M 为主,其次为 SHV-12。CTX-M 基因型中以 CTX-M-14 最为常见,CTX-M-101 及 CTX-M-123 型 ESBLs 为山东省首次检出。

[关键词] 大肠埃希菌;肺炎克雷伯菌;超广谱 β -内酰胺酶;基因[中图分类号] R181.3⁺2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2013)05-0339-05Detection and genotyping of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from a hospitalWANG Xi-ren^{1,2}, WANG Xiao-feng¹, ZHAO Shu-tang³ (1 Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China; 2 Weihai Municipality Hospital, Weihai 264200, China; 3 Weihaiwei People's Hospital, Weihai 264200, China)

[Abstract] **Objective** To investigate genotypes of extended-spectrum β -lactamases(ESBLs) produced by *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) isolated from a hospital. **Methods** Clinical isolates of ESBLs-producing *E. coli* ($n=40$) and *K. pneumoniae* ($n=20$) were collected according to ESBLs confirmatory test. Plasmid DNA was extracted by alkaline lysis method. PCR analysis was used to amplify TEM, SHV, and CTX-M genes, sequence analysis was performed to identify β -lactamase genotype. **Results** Sixty confirmatory test positive *E. coli* and *K. pneumoniae* were positive for PCR amplification, including TEM, SHV, CTX-M-3 and CTX-M-9. The positive rate of above four genotypes among *E. coli* was 37.50%(15 isolates), 2.50%(1 isolate), 62.50%(25 isolates) and 50.00%(20 isolates) respectively; the positive rate of above four genotypes among *K. pneumoniae* was 40.00%(8 isolates), 90.00%(18 isolates), 65.00%(13 isolates) and 40.00%(8 isolates) respectively. 100.00% of *E. coli* and 80.00% of *K. pneumoniae* expressed bla_{CTX-M}, 12.50%(5/40) of *E. coli* and 25.00%(5/20) of *K. pneumoniae* carried two types of CTX-M gene. Twenty-three isolates with TEM gene were

[收稿日期] 2013-03-02

[作者简介] 王喜仁(1970-),女(汉族),山东省威海市人,主管技师,主要从事细菌耐药机制研究。

[通讯作者] 王笑峰 E-mail:wangxf212@163.com

TEM-1; nineteen isolates with SHV gene included 6 isolates of genotype SHV-1, 6 of SHV-11, 5 of SHV-12 and 2 of SHV-25, only SHV-12 was ESBLs gene, all these types were from *K. pneumoniae*; 66 isolates were with CTX-M gene, the detection rate of CTX-M-14 among *E. coli* and *K. pneumoniae* was 45.00% and 35.00% respectively, CTX-M-55 were both 35.00%, CTX-M-15 was 20.00% and 15.00% respectively, CTX-M-3, CTX-M-65, CTX-M-101 and CTX-M-123 genotypes accounted for fewer percentage of CTX-M genotype. **Conclusion** The majority of ESBL gene in *E. coli* and *K. pneumoniae* in this hospital is CTX-M, the next is SHV-12. The most prevalent ESBL genotype is CTX-M-14. CTX-M-101 and CTX-M-123 are initially detected in Shandong province.

[Key words] *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; extended-spectrum β -lactamase; gene

[Chin Infect Control, 2013, 12(5): 339-343]

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是临床常见的病原菌,产生超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是这两种菌对 β -内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制之一。目前我院分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中,产 ESBLs 株已超过 50%。社区感染者,如急性化脓性阑尾炎患者,肠道分离的大肠埃希菌中也有相当高的比例产 ESBLs。产 ESBLs 细菌一般为多重耐药菌,给临床抗感染治疗带来极大挑战。不同地区 ESBLs 基因型差异较大,即使在同一地区、不同时间段,基因型的分布也有变化。细菌产生的 ESBLs 基因型不同,使细菌对头孢菌素的耐药情况也有所区别。我们对本院大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 基因分型进行研究,以期能够有效控制产酶菌株的产生及流行,为本地区合理使用抗菌药物提供帮助。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2012 年 3—9 月威海市立医院门诊及住院部送检标本分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌(不包括同一患者分离的重复菌株)。所有

菌株采用 API 系统鉴定到种;药敏试验采用纸片扩散法,药敏纸片均为 OXOID 公司产品, M-H 培养基为 Merieux 产品。按美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2012 M100-S22 版双纸片表型确证试验方法对这两种细菌常规检测 ESBLs,随机收集到表型确证试验阳性的大肠埃希菌 40 株,肺炎克雷伯菌 20 株。质控菌株:阴性对照为大肠埃希菌 ATCC 25922,阳性对照为大肠埃希菌 ATCC 35218,肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。聚合酶链反应(PCR)扩增以各型标准产酶株作阳性对照。

1.2 试剂与器材 药敏纸片头孢他啶、头孢噻肟、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟/克拉维酸均为英国 OXOID 公司产品。Taq 酶、dNTP、10× buffer 为青岛生工生物科技有限公司产品;其他分子生物学试剂为大连宝生物有限公司产品。根据文献[1-2]合成引物,引物由南京金斯瑞生物工程技术有限公司合成,见表 1。PCR 扩增仪为 ABI-7000 荧光定量 PCR 仪,凝胶成像系统为美国 UVP 公司产品。由北京六合华大基因科技股份有限公司青岛测序部完成测序。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers used for screening ESBLs gene

Target gene	Primer sequence (5'-3')	Size of product(bp)	Genbank accession number	Nucleotide position	Annealing temperature(°C)
SHV-1f	GGTTATGCGTTATATTCGCC	865	AF124984	195-214	55
SHV-1r	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			1 059-1 042	
TEM-1f	ATAAAATTCTTGAAGAC	1 075	AB282997	1-17	42
TEM-1r	TTACCAATGCTTAATCA			1 075-1 059	
CTX-M-3f	CTTCCAGAATAAGGAATC	908	JQ686201	92-109	48
CTX-M-3r	CCGTTTCCGCTATTACAA			999-982	
CTX-M-2f	ACGCTACCCTGCTATT	830	AY750915	46-63	55
CTX-M-2r	CAGAAACCGTGGGTTACGA			875-858	
CTX-M-9f	AACACGGATTGACCGTATTG	906	DQ304478	65-84	52
CTX-M-9r	TTACAGCCCTTCGGCGAT			970-953	

1.3 试验方法

1.3.1 双纸片法 ESBLs 表型确证试验 按照

CLSI 2012 版标准, 头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸纸片, 若任一复合纸片抑菌圈直径与相应单一纸片抑菌圈直径相比 ≥ 5 mm, 即判定为产 ESBLs 菌; 若 < 5 mm 则不收集该菌株作研究对象。

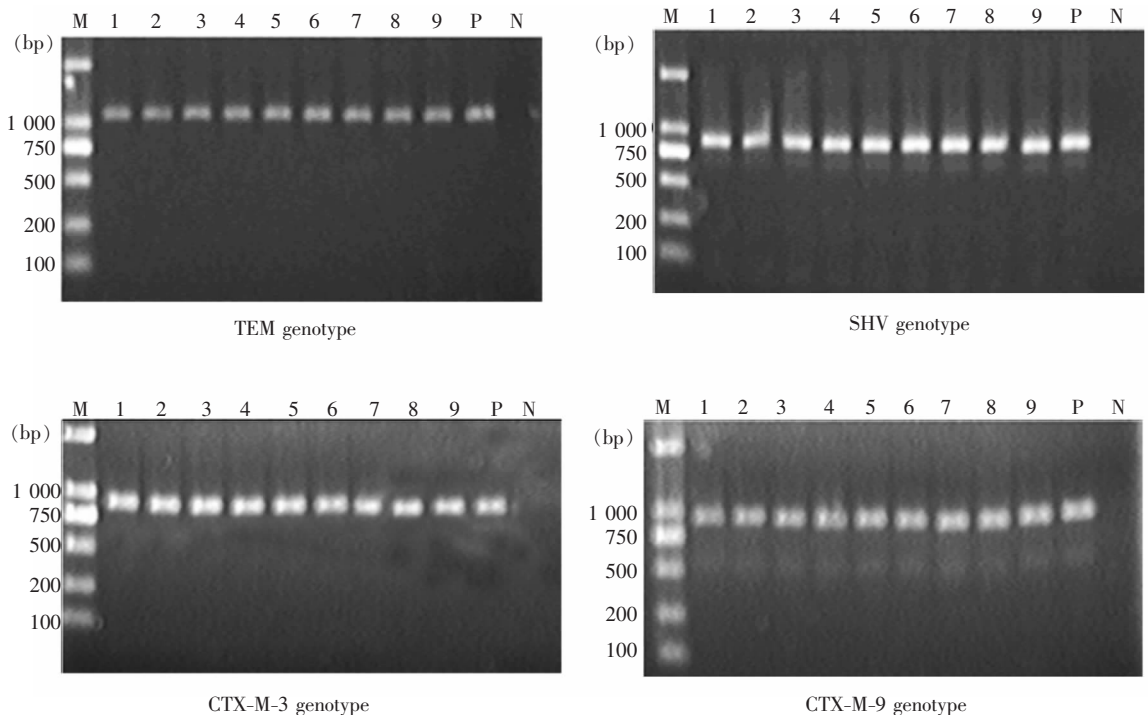
1.3.2 质粒 DNA 的提取 采用 SDS 碱裂解法, 结合硅胶膜技术提取细菌的质粒 DNA, 按试剂盒说明操作 (TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 3.0), 所得质粒 DNA 溶解于 Tris Buffer 中 (提取质粒的浓度约 $320 \mu\text{g}/\text{mL}$), 置于 -70°C 冰箱备用。

1.3.3 PCR 扩增质粒 DNA PCR 扩增体系为 $50 \mu\text{L}$, $10 \times$ buffer (含有 MgCl_2) $5 \mu\text{L}$, 2.5 mmol/L dNTP $4 \mu\text{L}$, Taq 酶 $0.5 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 $2.5 \mu\text{L}$, 稀释成 $1/10$ 的模板 $2 \mu\text{L}$, 加 PCR 专用水补足 $50 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 4 min , 94°C 变性 30 s , 不同引物按表 1 所示温度退火 30 s , 72°C 延伸 45 s , 共 33 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min 。PCR 产物在含有 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 0.5% EB 染色, 于凝胶成像系统上成像。

1.3.4 PCR 产物测序 全部 PCR 阳性产物送北京六合华大基因科技股份有限公司青岛测序部进行双向测序, 测序结果采用 Blastn 和 Blastx 软件在 GenBank 进行网上比对。

2 结果

2.1 PCR 检测结果 60 株产 ESBLs 菌均检测到 β -内酰胺酶阳性基因, 其扩增片段大小与预期相符, 见图 1。经测序, 证实为 TEM、SHV、CTX-M-3 组和 CTX-M-9 组 4 种类型。大肠埃希菌上述 4 种类型基因阳性率分别为 37.50% ($15/40$)、 2.50% ($1/40$)、 62.50% ($25/40$)、 50.00% ($20/40$); 肺炎克雷伯菌阳性率分别为 40.00% ($8/20$)、 90.00% ($18/20$)、 65.00% ($13/20$)、 40.00% ($8/20$)。100.00% 的大肠埃希菌和 80.00% 的肺炎克雷伯菌产生 $\text{bla}_{\text{CTX-M}}$, 12.50% ($5/40$) 大肠埃希菌和 25.00% ($5/20$) 肺炎克雷伯菌携带 2 种 CTX-M 酶基因。见表 2。



M: DNA Marker; Lane 1 to lane 9: clinical isolates; P: positive control; N: negative control

图 1 4 种基因型 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of four genotypes of β -lactamases

2.2 基因测序结果

2.2.1 TEM 型 β -内酰胺酶基因型 23 份 TEM

型阳性扩增产物, 测序结果经网上 Blastn 比对, 皆为 TEM-1 型。

表 2 60 株细菌 β-内酰胺酶基因扩增结果(%,株数)

Table 2 PCR results of β-lactamase genes in 60 strains(%, No. of isolates)

β-lactamase genotype	<i>E. coli</i> (n = 40)	<i>K. pneumoniae</i> (n = 20)
TEM	0.00(0)	0.00(0)
SHV	0.00(0)	20.00(4)
CTX-M-3	32.50(13)	5.00(1)
CTX-M-9	25.00(10)	0.00(0)
TEM+CTX-M-3	15.00(6)	5.00(1)
TEM+CTX-M-9	12.50(5)	0.00(0)
TEM+CTX-M-3+CTX-M-9	7.50(3)	0.00(0)
CTX-M-3+CTX-M-9	5.00(2)	0.00(0)
SHV+TEM+CTX-M-3	2.50(1)	15.00(3)
SHV+TEM+CTX-M-9	0.00(0)	5.00(1)
SHV+TEM+CTX-M-9+CTX-M-3	0.00(0)	15.00(3)
SHV+CTX-M-3	0.00(0)	15.00(3)
SHV+CTX-M-9	0.00(0)	10.00(2)
SHV+CTX-M-9+CTX-M-3	0.00(0)	10.00(2)

2.2.2 SHV 型 β-内酰胺酶基因型 19 份 SHV 型阳性扩增产物经测序后比对,包括 SHV-1 型 6 株、SHV-11 型 6 株、SHV-12 型 5 株(4 株单独存在,1 株同时存在 CTX-M-55)、SHV-25 型 2 株。仅 1 株 SHV-25 来自大肠埃希菌,其余均来源于肺炎克雷伯菌。仅 SHV-12 为 ESBLs 基因,占肺炎克雷伯菌的 25.00%(5/20)。

2.2.3 CTX-M 型 β-内酰胺酶基因型 66 份 CTX-M 型阳性扩增产物全部测序,结果见表 3。CTX-M-3 组中,CTX-M-55 是主要基因型,在大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的检出率均为 35.00%;其次为 CTX-M-15 基因型,检出率分别为 20.00% 和 15.00%;检出少量的 CTX-M-3、CTX-M-101 及 CTX-M-123 基因型。CTX-M-9 组中,CTX-M-14 是主要基因型,在大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的检出率分别为 45.00% 和 35.00%;检出少量的 CTX-M-65 基因型。未检测到 CTX-M-2 组基因。

表 3 60 株细菌产生的 CTX-M 型 ESBLs 基因分布(株数,%)

Table 3 Distribution of CTX-M genotypes in 60 ESBLs-producing isolates(No. of isolates,%)

Genotype	<i>E. coli</i> (n = 40)	<i>K. pneumoniae</i> (n = 20)
CTX-M-3 group	25(62.50)	13(65.00)
CTX-M-3	0(0.00)	2(10.00)
CTX-M-15	8(20.00)	3(15.00)
CTX-M-55	14(35.00)	7(35.00)
CTX-M-101	1(2.50)	0(0.00)
CTX-M-123	2(5.00)	1(5.00)
CTX-M-9 group	20(50.00)	8(40.00)
CTX-M-14	18(45.00)	7(35.00)
CTX-M-65	2(5.00)	1(5.00)
CTX-M-2 group	0(0.00)	0(0.00)

3 讨论

本院分离到的 SHV 型 ESBLs 皆为 SHV-12 型,在肺炎克雷伯菌中检出率为 25.00%(5/20),目前在很多国家和地区发现了该基因型的流行,也是亚洲地区 ESBLs 主要流行亚型之一^[3]。SHV 系列各亚型存在 1~4 个氨基酸的差异,用一对引物即可扩增出 SHV 起源的所有 ESBLs。SHV-12 型与 SHV-1 型相比,在 35(L→Q)、238(G→S)、240(E→K)3 个氨基酸位点发生了突变,其中 238 位点的突变主要提高了酶对头孢噻肟的水解,而 240 位的突变主要提高了酶对头孢他啶的水解,因此 SHV-12 对头孢噻肟和头孢他啶都有很强的水解能力。本研究检出 SHV-25 基因型,国内报道较少。SHV-25 型与 SHV-1 型相比,发生了第 18 位氨基酸 T→A、第 35 位氨基酸 L→E、129 位氨基酸 M→V 突变,SHV-25 不水解超广谱头孢菌素,为广谱酶^[4]。

近年来,新 CTX-M 基因型不断被发现,从 1990 年德国 Bauernfeind 首次报道 CTX-M-1 以来,迄今为止,共发现了 134 种 CTX-M 型 β-内酰胺酶^[5]。我国 CTX-M 系列的酶主要是 CTX-M-3 组和 CTX-M-9 组,其他亚组极少发现。国内主要多见 CTX-M-14、3,亦有 CTX-M-9、13、15、12、24、1、22 等型别的散发报道^[6-8]。近年来,可水解头孢他啶的 CTX-M-15 已成为全球最常见的 ESBLs 型;国内近 5 年,报道 CTX-M-15 也逐渐增多^[9-10]。CTX-M-15 与 CTX-M-3 相比,仅有 1 个氨基酸的差别(240 位 D→G),但是对头孢他啶的最低抑菌浓度(MIC)比 CTX-M-3 高出约 8 个对倍稀释浓度^[11]。我院 CTX-M-55 型 ESBLs 在大肠埃希菌和肺炎克雷伯

菌的检出比率较高(35.00%),除 2011 年深圳兰全学等^[12]报道较高的 CTX-M-55 比例,国内其他报道 CTX-M-55 占比例很少^[7],可能与近年来对 ESBLs 基因分布的研究较少有关。CTX-M-55 于 2007 年在泰国首先发现^[13],能够同时水解头孢他啶和头孢噻肟,其与 CTX-M-15 相比,77 位氨基酸由 A→V。而我国许多地区流行的 CTX-M-3,在本院分离的菌株中分布较少,可能与研究的标本较少有关,也可能与地域分布有关。另外,CTX-M-3 组还检测到 1 株 CTX-M-101 型,3 株 CTX-M-123 型,均为我国华南农业大学学者于 2010、2011 年首次报道猪来源的 ESBLs(基因登录号 JN790864.1 和 HQ398214),目前国内外尚未检索到有关这两个基因的其他报道,山东省为首次报道。

本研究组对我院临床分离的革兰阴性杆菌产 CTX-M、SHV 和 TEM 型 ESBLs 基因分布进行研究,是否还存在其他基因型,有待于大量样本的调查及本地区多个医院的合作。值得关注的是,CTX-M-101 及 CTX-M-123 基因型在山东省为首次报道,这两个基因型在 GenBank 首次登录菌株来源是猪,而且近年来国内外也有许多文献^[14-15]报道在食源性动物的粪便分离细菌中检测到多种基因型 ESBLs,因此,还应该警惕食源性动物来源的细菌污染食物,防止产酶菌在社区内的播散。

[参 考 文 献]

- [1] 穆雪鹂,陈升汶,王沙燕,等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产 ESBLs 株的耐药性与基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006,6(5):301-305.
- [2] 蔡琰,范昕建,吕小菊,等. 肠杆菌科产 CTX-M 酶细菌耐药性与 β -内酰胺酶基因型的关系[J]. 中国感染与化疗杂志, 2005,5(1):21-24.
- [3] Hawkey P M. Prevalence and clonality of extended-spectrum beta-lactamases in Asia[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(S1):159-165.
- [4] Chang F Y, Siu L K, Fung C P, et al. Diversity of SHV and TEM β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: gene evolution in Northern Taiwan and two novel β -lactamases, SHV-25 and SHV-26[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(9):2407-2413.
- [5] Jacoby G, Bush K. β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibit or resistant enzymes[EB/OL](2013-09-03)[2013-02-02]. <http://www.lahey.org/studies/>
- [6] 杨启文,徐英春,王辉,等. CTX-M 酶在北京协和医院临床分离大肠埃希菌中的流行[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006,6(1):1-6.
- [7] 苏丹虹,卢鉴财,卓超,等. 广州地区大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌 CTX-M 型产超广谱 β -内酰胺酶基因分型的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009,19(22):3004-3006.
- [8] Yu Y S, Ji S J, Chen Y G, et al. Resistance of strains producing extended-spectrum beta-lactamases and genotype distribution in China[J]. J Infect, 2007, 54(1):53-57.
- [9] Liu W, Chen L, Li H, et al. Novel CTX-M beta-lactamase genotype distribution and spread into multiple species of Enterobacteriaceae in Changsha, Southern China[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(5):895-900.
- [10] 卓超,李洪玉,苏丹虹,等. 广州地区 CTX-M-15 型超广谱 β -内酰胺酶的分布和基因环境研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(10):1114-1119.
- [11] Poirer L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50(6):1031-1034.
- [12] 兰全学,张韶华,朱子犁,等. 深圳市大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶的基因分型[J]. 热带医学杂志, 2011, 11(10):1283-1284.
- [13] Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Saifon P, et al. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 58(3):349-355.
- [14] 苑丽,刘建华,胡功政,等. 鸡大肠杆菌 TEM 和 CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶基因分型研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(20):193-199.
- [15] Tamang M D, Nam H M, Kim S R, et al. Prevalence and molecular characterization of CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy swine and cattle[J]. Foodborne Pathog Dis, 2013, 10(1):13-20.