

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2016.10.010

· 论 著 ·

## 住院患者产 CTX-M 型 ESBLs 和 KPC 的大肠埃希菌感染分布与耐药基因分析

蒋 伟, 王思淼, 金 鑫, 李佳佳

(解放军总医院第一附属医院, 北京 100048)

**【摘要】** 目的 了解住院患者产 CTX-M 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)和碳青霉烯酶(KPC)大肠埃希菌感染的临床分布与耐药情况。方法 收集某院 2011—2012 年临床送检标本分离的多重耐药大肠埃希菌,采用微量肉汤稀释法检测抗菌药物最低抑菌浓度(MIC);聚合酶链反应(PCR)扩增 ESBLs 和 KPC 基因,确定 CTX-M 和 KPC 基因型别及 MLST 分型。结果 48 株多重耐药大肠埃希菌中单产 ESBLs 45 株(93.75%),携带  $bla_{CTX-M}$  基因者 44 株(91.67%),其中  $bla_{CTX-M-1}$  组基因 20 株(41.67%)、 $bla_{CTX-M-9}$  组基因 32 株(66.67%),同时携带两组基因者 8 株(16.67%)。经基因测序确定的基因亚型有 CTX-M-14(65.91%,29/44)、CTX-M-55(31.82%,14/44)、CTX-M-15(11.36%,5/44)、CTX-M-3(2.27%,1/44)、CTX-M-24(2.27%,1/44)和 CTX-M-65(2.27%,1/44),其中 CTX-M-14 + CTX-M-55(11.36%,5/44)、CTX-M-14 + CTX-M-15(4.55%,2/44)和 CTX-M-55 + CTX-M-65(2.27%,1/44)。产 ESBLs + KPC 菌株中 2 株(4.17%)经 PCR 扩增均携带  $bla_{KPC}$  和  $bla_{CTX-M}$  基因,经测序分析 1 株为 CTX-M-14 + KPC-2,1 株为 CTX-M-3 + KPC-2。ST131(53.66%)是主要的 MLST 型别,检测到 ST648、ST405、ST167、ST1193 等 ST 型。结论 该院大肠埃希菌产 ESBLs 基因型中 CTX-M-14、CTX-M-55 和 CTX-M-15 亚型最常见,存在多种不同亚型;ST131 是主要的 MLST 型别,检测到产 KPC-2 型碳青霉烯酶菌。

**【关键词】** 大肠埃希菌;超广谱  $\beta$ -内酰胺酶;KPC 酶;CTX-M;多位点序列分析

**【中图分类号】** R181.3<sup>+</sup>2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9638(2016)10-0760-04

## Distribution and antimicrobial resistance genes of CTX-M extended-spectrum $\beta$ -lactamase- and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases-producing *Escherichia coli* isolated from patients with infection

JIANG Wei, WANG Si-miao, JIN Xin, LI Jia-jia (First Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate clinical distribution and antimicrobial resistance genes of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs)- and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs)-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from patients with infection. **Methods** Multidrug-resistant *E. coli* (MDR-*E. coli*) isolated from clinical specimens in a hospital in 2011-2012 were collected, minimal inhibitory concentrations (MICs) were detected by micro-broth dilution method; ESBLs and KPC genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR), CTX-M and KPC genotypes, as well as multilocus sequence types (MLST) were identified. **Results** Of 48 MDR-*E. coli*, 45(93.75%) only produced ESBLs, 44(91.67%) carried  $bla_{CTX-M}$  gene, 20(41.67%) of which were  $bla_{CTX-M-1}$  gene and 32(66.67%) were  $bla_{CTX-M-9}$  gene, 8(16.67%) carried both genes. The following subtypes were identified through gene sequencing: CTX-M-14(65.91%,29/44), CTX-M-55(31.82%,14/44), CTX-M-15(11.36%,5/44), CTX-M-3(2.27%,1/44), CTX-M-24(2.27%,1/44), and CTX-M-65(2.27%,1/44). The detection rates of CTX-M-14 + CTX-M-55, CTX-M-14 + CTX-M-15, and CTX-M-55 + CTX-M-65 were 11.36% (5/44), 4.55% (2/44),

**【收稿日期】** 2016-01-28

**【作者简介】** 蒋伟(1968-),女(汉族),江苏省南京市人,副主任技师,主要从事感染性疾病防控与细菌耐药研究。

**【通信作者】** 蒋伟 E-mail:jiangwei680808@163.com

and 2.27% (1/44) respectively. PCR showed that 2 (4.17%) ESBLs + KPC-producing strains carried *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, sequencing analysis showed that 1 was CTX-M-14 + KPC-2, and the other was CTX-M-3 + KPC-2. ST 131 (53.66%) was the main type of MLST, ST648, ST405, ST167, and ST1193 were also detected.

**Conclusion** CTX-M-14, CTX-M-55 and CTX-M-15 are the most common genotypes of ESBLs-producing *E. coli* isolates, different subtypes exist, ST131 is the predominant MLST, KPC-2-producing isolate of *E. coli* has been detected.

**[Key words]** *Escherichia coli*; extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; KPC; CTX-M; multilocus sequence typing

[Chin J Infect Control, 2016, 15(10): 760-763]

产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBLs) 和碳青霉烯酶 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC) 等是引起大肠埃希菌多重耐药的主要原因, 给临床治疗带来严峻挑战, 已引起社会各界广泛关注<sup>[1-4]</sup>。不同地区、医院抗菌药物使用不同, 产生的 ESBLs 和 KPC 基因型别亦不同<sup>[1-4]</sup>。本研究分析某院住院患者分离的产 ESBLs 和 KPC 大肠埃希菌引起的感染分布和耐药基因携带情况。现报告如下。

## 1 资料与方法

1.1 菌株来源与鉴定 收集该院 2011—2012 年临床送检标本分离的多重耐药大肠埃希菌, 标本来源于尿、血、引流液、脓液、穿刺液、脑脊液及胸腔积液, 经 Vitek Compact 鉴定和药敏试验。

1.2 药敏试验 采用琼脂稀释法检测研究菌株的最低抑菌浓度 (MIC), 根据美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 2013 年标准, 应用 WHONET 5.6 软件判断敏感、中介和耐药。对三类及三类以上抗菌药物耐药判断为多重耐药菌。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922, 阳性对照菌为大肠埃希菌 ATCC 35218 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.3 产 KPC 酶表型检测 根据 CLSI 标准进行改良 Hodge 试验 (MHT) 及结果判读, 筛选产 KPC 酶表型, 阳性质控菌为产 KPC-2 型肺炎克雷伯菌 (北京协和医院检验科, 菌株编号 K1)。

1.4 产 ESBLs 和 KPC 基因型检测 DNA 提取采用煮沸法。PCR 扩增 CTX-M 型 ESBLs 引物序列和反应条件参考文献 [1], KPC 酶扩增引物序列和反应条件参考文献 [3]。引物合成委托上海生物工程公司。

1.5 DNA 测序 DNA 测序委托上海生物工程公司, 所得序列阅读和分析应用 Chromas 2 软件, 结果比对通过 Genbank 中 Blast, 基因亚型确定参考 Lahey 系统 ([www.lahey.org/studies/](http://www.lahey.org/studies/))。

1.6 MLST 分型 根据文献<sup>[1]</sup>合成 7 种管家基因 (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*), 与数据库对比并分析 ST 型别。MLST 网址: <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>。

## 2 结果

2.1 菌株分布 共分离 48 株多重耐药大肠埃希菌。来源科室: 重症监护病房 (ICU) 10 株 (20.83%), 外科病房 18 株 (37.50%), 内科病房 19 株 (39.58%), 急诊科 1 株; 标本来源: 尿 21 株 (43.75%), 血 18 株 (37.50%), 胆汁、腹腔积液和脓液各 2 株 (各占 4.17%), 引流液、脑脊液、穿刺液各 1 株 (各占 2.08%); 年龄 17~91 岁, 平均年龄 (61.6 ± 14.0) 岁, 60 岁以上占 58.33%; 感染患者基础疾病包括: 恶性肿瘤 (胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、血液病等)、心脑血管疾病 (心肌梗死、脑梗死等)、肾脏疾病 (肾积水、泌尿系统感染, 包括膀胱炎等) 和外科手术 (骨折切开内固定术、肾切除术后、胆囊切除术后等)。

2.2 细菌耐药情况 48 株多重耐药大肠埃希菌中有 45 株单产 ESBLs 菌株, 对亚胺培南、美罗培南、厄他培南、替加环素和多粘菌素 100.00% 敏感; 对阿米卡星敏感率为 91.11%, 对哌拉西林/他唑巴坦的敏感率较高, 为 82.22%。45 株单产 ESBLs 菌株对头孢曲松和头孢噻肟耐药率为 100.00%, 对环丙沙星、头孢吡肟、复方磺胺甲噁唑的耐药率分别为 91.11%、86.67%、86.67%。3 株同时产 ESBLs 和 KPC 菌株除对阿米卡星、替加环素、多粘菌素敏感外, 对其他所有检测抗菌药物均表现为耐药。见表 1。

**表 1** 45 株单产 ESBLs 大肠埃希菌对常用抗菌药物的药敏结果(%,株)

**Table 1** Antimicrobial susceptibility testing result of 45 ESBLs-producing *E. coli* isolates (% , No. of isolates)

| 抗菌药物      | 敏感         | 中介       | 耐药         |
|-----------|------------|----------|------------|
| 哌拉西林/他唑巴坦 | 82.22(37)  | 2.22(1)  | 15.56(7)   |
| 头孢他啶      | 28.89(13)  | 17.78(8) | 53.33(24)  |
| 头孢曲松      | 0.00(0)    | 0.00(0)  | 100.00(45) |
| 头孢噻肟      | 0.00(0)    | 0.00(0)  | 100.00(45) |
| 头孢吡肟      | 6.67(3)    | 6.67(3)  | 86.66(39)  |
| 头孢哌酮/舒巴坦  | 57.78(26)  | 17.78(8) | 24.44(11)  |
| 氨曲南       | 15.56(7)   | 17.78(8) | 66.67(30)  |
| 亚胺培南      | 100.00(45) | 0.00(0)  | 0.00(0)    |
| 美罗培南      | 100.00(45) | 0.00(0)  | 0.00(0)    |
| 厄他培南      | 100.00(45) | 0.00(0)  | 0.00(0)    |
| 阿米卡星      | 91.11(41)  | 4.44(2)  | 4.44(2)    |
| 替加环素      | 100.00(45) | 0.00(0)  | 0.00(0)    |
| 米诺环素      | 62.22(28)  | 15.56(7) | 22.22(10)  |
| 左氧氟沙星     | 15.56(7)   | 6.67(3)  | 77.78(35)  |
| 环丙沙星      | 6.67(3)    | 2.22(1)  | 91.11(41)  |
| 复方磺胺甲噁唑   | 13.33(6)   | 0.00(0)  | 86.67(39)  |
| 多粘菌素      | 100.00(45) | 0.00(0)  | 0.00(0)    |

**2.3 基因型别检测结果** PCR 扩增结果显示, 48 株多重耐药大肠埃希菌携带 *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因者占 91.67%(44 株), 携带 *bla*<sub>CTX-M-1</sub> 组基因者 41.67%(20 株)、*bla*<sub>CTX-M-9</sub> 组基因者 66.67%(32 株), 同时携带两组基因者占 16.67%(8 株)。44 株携带 *bla*<sub>CTX-M</sub>

**表 2** 44 株产 CTX-M 型 ESBLs 大肠埃希菌基因型、MLST 型别及标本来源分布(株)

**Table 2** Distribution of CTX-M genotypes, MLST types, and sources of specimens of 44 ESBLs-producing *E. coli* isolates (No. of isolates)

| 基因型                   | 菌株数 | 标本来源 |    |    |      |    |     |     | MLST 分型           |
|-----------------------|-----|------|----|----|------|----|-----|-----|-------------------|
|                       |     | 尿    | 血  | 胆汁 | 腹腔积液 | 脓液 | 脑脊液 | 穿刺液 |                   |
| CTX-M-1 群             |     |      |    |    |      |    |     |     |                   |
| CTX-M-55              | 8   | 2    | 5  | 0  | 0    | 0  | 1   | 0   | ST1193,ST131      |
| CTX-M-15              | 3   | 1    | 2  | 0  | 0    | 0  | 0   | 0   | ST405,ST167,ST131 |
| CTX-M-3               | 1   | 1    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0   | 0   | 未分型               |
| CTX-M-9 群             |     |      |    |    |      |    |     |     |                   |
| CTX-M-14              | 22  | 10   | 7  | 2  | 1    | 1  | 0   | 1   | ST131,ST648       |
| CTX-M-65              | 1   | 1    | 0  | 0  | 0    | 0  | 0   | 0   | 未分型               |
| CTX-M-24              | 1   | 0    | 0  | 0  | 0    | 1  | 0   | 0   | 未分型               |
| CTX-M-1 群 + CTX-M-9 群 |     |      |    |    |      |    |     |     |                   |
| CTX-M-55 + CTX-M-14   | 5   | 4    | 1  | 0  | 0    | 0  | 0   | 0   | ST131,ST1193      |
| CTX-M-15 + CTX-M-14   | 2   | 0    | 1  | 0  | 1    | 0  | 0   | 0   | ST131             |
| CTX-M-55 + CTX-M-65   | 1   | 0    | 1  | 0  | 0    | 0  | 0   | 0   | ST1193            |
| 合计                    | 44  | 19   | 17 | 2  | 2    | 2  | 1   | 1   |                   |

**3 讨论**

CTX-M 即头孢噻肟酶, 呈全球性分布, 世界各

基因的大肠埃希菌中, 确定的基因亚型有 CTX-M-14(65.91%, 29 株)、CTX-M-55(31.82%, 14 株)、CTX-M-15(11.36%, 5 株)、CTX-M-3(2.27%, 1 株)、CTX-M-24(2.27%, 1 株) 和 CTX-M-65(2.27%, 1 株), 其中检测到 CTX-M-14 + CTX-M-55(11.36%, 5 株)、CTX-M-14 + CTX-M-15(4.55%, 2 株) 和 CTX-M-55 + CTX-M-65(2.27%, 1 株)。见表 2。ESBLs + KPC 菌株中 2 株(4.17%) 经 PCR 扩增均携带 *bla*<sub>KPC</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因, 经测序分析 1 株为 CTX-M-14 + KPC-2, 1 株为 CTX-M-3 + KPC-2。

**2.4 MLST 分型结果** 48 株菌均进行了 MLST 分型, 其中能明确分型者 41 株, 主要包括 CTX-M-15 型、CTX-M-55 型和 CTX-M-14 型。其中 ST131(53.66%, 22 株) 为最主要 ST 型, 其次为 ST1193(21.95%, 9 株) 和 ST648(19.51%, 8 株), ST405(2.44%, 1 株) 和 ST167(2.44%, 1 株)。CTX-M-14 基因型中以 ST131(58.33%, 14/24) 为主, 其次为 ST648(33.33%, 8/24); CTX-M-55 基因型以 ST1193(64.29%, 9/14) 和 ST131(35.71%, 5/14) 为主, 而 CTX-M-15 基因型检测到 ST405(20%, 1/5)、ST167(20%, 1/5) 和 ST131(60%, 3/5)。各 ST 型别分布于不同时期的不同病房, 均为散发分布, 未发现暴发流行趋势。见表 2。

地均有报道<sup>[1-2, 5-10]</sup>。我国 CTX-M 检出率居高不下<sup>[1, 5, 8-10]</sup>。本研究显示, 该院 CTX-M 基因的总检出率为 91.67%, 主要携带 CTX-M-1 基因(占 41.67%) 和 CTX-M-9 组基因(占 66.67%), 且携带

的 CTX-M-9 组基因检出率更高,而同时携带两组基因者占 16.67%,高于我国以往的报道<sup>[8]</sup>。其中主要流行基因亚型为 CTX-M-14、CTX-M-55 和 CTX-M-15,与国内报道<sup>[1]</sup>一致。CTX-M-55 和 CTX-M-15 的检出率呈上升趋势,CTX-M-14 目前仍是该院主要的 ESBLs 亚型。CTX-M-55 被认为是动物源性亚型,是由 CTX-M-15 在第 77 位发生 Ala-Val 氨基酸改变而来。同样,CTX-M-65 和 CTX-M-24 也被称为食品动物源性,在该院临床标本中亦有少量检出。

研究<sup>[11]</sup>证实,高产 ESBLs 可导致碳青霉烯类抗菌药物耐药性上升。该院大肠埃希菌碳青霉烯类耐药的原因可能与产 KPC 酶菌同时携带 ESBLs 相关,而非单一因素所致。

药敏结果显示,所有产 ESBLs 大肠埃希菌对亚胺培南、美罗培南、厄他培南、替加环素、多粘菌素、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦的敏感性较高,与国内报道<sup>[12]</sup>一致,可作为治疗该类感染的首选药物。但碳青霉烯类抗生素不敏感菌株的出现是临床抗感染治疗的难题,临床应注意监测。本组结果显示,产 KPC 菌株对阿米卡星、替加环素、多粘菌素敏感性高,可作为严重感染者的用药选择。

MLST 分型结果显示,ST131 是该院多重耐药大肠埃希菌的主要型别(占 53.66%),在 CTX-M-15、CTX-M-55 和 CTX-M-14 基因型中均有检出,分布于不同时期的不同病房,未出现暴发流行趋势。而 ST1193 主要在 CTX-M-55 型大肠埃希菌中检出,ST648 在 CTX-M-14 型大肠埃希菌中检出,同时检出 ST405 和 ST167,也说明该院存在多种 ST 型别的散在分布。本组未进行质粒接合实验和 PFGE 分型,是否存在质粒的传播播散需进一步证实。

研究<sup>[13-14]</sup>显示,临床上产 ESBLs 和 KPC 酶的肠杆菌科细菌感染病例日益增多,入住 ICU、住院时间长( $\geq 7$  d)、留置各种导管、严重基础疾病、机械通气、年龄 $\geq 60$ 岁等均是导致患者发生感染的危险因素。本组产 CTX-M 型 ESBLs 和 KPC 的大肠埃希菌来源于多种临床标本和多个科室,感染患者年龄分布广泛(17~92 岁), $>60$ 岁者占 58.33%,提示住院患者中高危人群应引起临床和微生物室的重点监测和关注。从患者、菌株、各种酶基因型等不同方面加强产酶菌的检测和监测,采取有效的抗菌药物管理和控制,严格遵守无菌操作规范,阻断产 ESBLs 和 KPC 细菌的传播途径等综合干预措施<sup>[13-14]</sup>,以有效防止和减少产 ESBLs 和 KPC 细菌在医院内的产生和传播。

## [参 考 文 献]

- [1] Xia S, Fan X, Huang Z, et al. Dominance of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e100707.
- [2] Al-Agamy MH, Shibl AM, Hafez MM, et al. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Riyadh; emergence of CTX-M-15-producing *E. coli* ST131 [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2014, 13(1): 4-10.
- [3] 黄支密,夏守慧,沈娟,等.携带 *bla*<sub>KPC-2</sub>型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌对喹诺酮类耐药机制研究[J].中华医院感染学杂志,2015,25(8):1684-1686,1692.
- [4] 黄勋,邓子德,倪语星,等.多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J].中国感染控制杂志,2015,14(1):1-9.
- [5] Zhang J, Zheng B, Zhao L, et al. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(7): 659-668.
- [6] Zhang H, Zhou Y, Guo S, et al. High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from healthy rural residents of Taidian, China [J]. Front Microbiol, 2015, 6(3): 239-242.
- [7] Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria [J]. Crit Rev Microbiol, 2013, 39(1): 79-101.
- [8] Zheng H, Zeng Z, Chen S, et al. Prevalence and characterisation of CTX-M  $\beta$ -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(4): 305-310.
- [9] 王喜仁,王笑峰,赵淑堂.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[J].中国感染控制杂志,2013,12(5):339-343.
- [10] 张秀玲.201 例产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶细菌感染病例分析[J].中国感染控制杂志,2015,14(4):270-271.
- [11] Yang J, Ye L, Guo L, et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395 [J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(11): e509-e515.
- [12] 何卫平,崔恩博,王钱,等.235 株血流感染大肠埃希菌耐药性分析[J].中国感染控制杂志,2015,14(3):170-173.
- [13] 周建芳,杜斌.产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌科细菌的感染与控制[J].临床药物治疗杂志,2012,10(6):5-8,15.
- [14] 周华,李光辉,陈佰仪,等.中国产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌科细菌感染应对策略专家共识[J].中华医学杂志,2014,94(24):1847-1856.