

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, 王思森, 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 β -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 β -内酰胺酶;KPC 酶;CTX-M;多位点序列分析

[中图分类号] R181.3⁺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 β -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 β -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*_{KPC} and *bla*_{CTX-M} 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 β -lactamase; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; KPC; CTX-M; multilocus sequence typing

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

产超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum β -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^[1-4]。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^[1-4]。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/)。

1.6 MLST 分型 根据文献^[1]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 ES-BLs-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*_{CTX-M} 基因者占 91.67%(44 株), 携带 *bla*_{CTX-M-1} 组基因者 41.67%(20 株)、*bla*_{CTX-M-9} 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*_{CTX-M}

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*_{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。

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^[1-2, 5-10]。我国 CTX-M 检出率居高不下^[1, 5, 8-10]。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^[8]。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^[1]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^[11]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^[12]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^[13-14]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(≥ 7 d)、留置各种导管、严重基础疾病、机械通气、年龄 ≥ 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^[13-14],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 β -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 β -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*_{KPC-2}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 Tainan, China [J]. Front Microbiol, 2015, 6(3): 239-242.
- [7] Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -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 β -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 β -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 β -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 β -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.