

产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌耐药性及其基因分型分析谭文涛¹ 笪欣² 王娟¹ 李军¹ 王维云¹ 李红¹

(1 独山子石化医院检验科 新疆 独山子 833600 2 克拉玛依中心医院感染科 新疆 克拉玛依 834000)

摘要 目的:了解新疆独山子地区肺炎克雷伯菌超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的发生率、作为指示剂的五种抗生素的检出情况及ESBLs主要基因型。方法:收集临床分离的148株肺炎克雷伯菌,采用双纸片协同筛选法、NCCLS推荐的表型筛选和确证试验对细菌进行ESBLs产酶株的识别,耐药基因的质粒重组、转化聚合酶链反应(PCR)扩增阳性产物测序,通过GenBank对序确定基因型。结果:本地区肺炎克雷伯菌ESBLs的分离率达31.1%,头孢曲松(CRO)安曲南(ATM)和头孢噻肟(CTX)头孢泊肟(CPD)、头孢他定(CAZ)作为指示剂检出率分别为97.8%、95.6%、93.4%、76.0%、65.2%。本地区产ESBLs菌株耐药基因型CTX-M-22占54.3%,CTX-M-18占41.3%,TEM61.8%,52.1%的产ESBLs肺炎克雷伯菌SHV耐药基因阳性。结论:CRO、ATM和CTX对检测ESBLs阳性率较高,CTX-M-22、CTX-M-18是本地区产ESBLs菌株的主要基因型。

关键词 β -内酰胺酶 肺炎克雷伯菌 耐药性 基因型

中图分类号 R378, R969 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)17-3293-04

The Research on Drug Resistance of Klebsiella Pneumonia
Extended-Spectrum β -Lactamase and the Analysis
of GenotypeTAN Wen-tao¹, DA Xin², WANG Juan¹, LI Jun¹, WANG Wei-yun¹, LI Hong¹

(1 Department of Clinical Laboratory, Dushanzi Shihua Hospital, Dushanzi Xinjiang, 833600, China;

2 Department of Infection, Kelamayi Center Hospital, Kelamayi Xinjiang, 834000, China)

ABSTRACT Objective: To make sure of the percentage for the occurrence rate of Klebsiella pneumonia extended-spectrum β -lactamases in dushanzi district in Xinjiang. In order to check conditions in the five types of antibiotic instrict and the main genotype of ESBLs. **Method:** Collected 148 escherichia coli, klebsiella from clinical separation, we used double paper sheet screen, diagram recommended by NCCLS method and conclusive evidence trial to identify the bacteria from ESBLs; Reshuffle, conveyance and reaction of polymerase chain reaction (PCR) of medical gene resistant and enlarged the positive reaction of the order examination to pass homologue assurance of genotype by GenBank. **Result:** The percentage of the separation rate for escherichia coli, klebsiella cefpodoxime (CPD) and ceftazidime (CAZ) are following: 97.8%, 95.6%, 93.4%, 76.0%, 65.2%. Medical gene resistant CTX-M-22 of ESBLs generated in this area covers 54.3%. CTX-M-18 is 41.3%. TEM 61.8%, 52.1% is klebsiella pneumonia SHV the positive of medical gene resistant. **Conclusion:** The positive rate of CRO, ATM, and CTX are relatively high for checking ESBLs. CTX-M-22, CTX-M-18 are the main genotype of ESBLs bacteria produced in the area.

Key words: β -lactamases; Klebsiella pneumonia; Medical resistant; Genotype

Chinese Library Classification(CLC): R378, R969 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)17-3293-04

随着抗菌药物在临床治疗中的广泛使用,高选择性压力迫使细菌不断产生新的耐药机制。肺炎克雷伯菌是临床较为常见的条件致病菌,且其ESBLs的产生和播散已日趋严重,给临床治疗带来很大困难。为了解近两年本地区肺炎克雷伯菌ESBLs的流行情况,我们对临床分离的148株肺炎克雷伯菌进行了研究,对其进行了药敏、ESBLs表型筛选和确证及ESBLs基因型的流行概况分析。

1 材料和方法

作者简介: 谭文涛(1972-),男,主管检验技师,检验科主任,主要研究方向:临床微生物检验技术、细菌耐药机制。
电话:0992-3687161 E-mail: dsztwt@163.com
(收稿日期:2012-02-10 接受日期:2012-03-06)

1.1 菌株来源

收集2008年5月-2009年5月独山子医院临床分离的肺炎克雷伯菌148株。

1.2 试剂和仪器

使用英国Oxoid公司MH琼脂和抗生素药敏纸片。克拉维酸粉剂购自中国药品生物制品检定所,引物、TaqDNA聚合酶等PCR反应系统购自TaKaRa工程(大连)有限公司产品;PCR产物纯化、质粒抽提试剂盒购于上海博亚生物技术有限公司;pGEM-Teasy载体、T4连接酶、ECOR酶购于Promega公司。生物梅里埃公司VITEK-32, BIO-RAD PCR扩增仪。质控标准菌株大肠埃希菌ATCC25922,肺炎克雷伯菌ATCC700603购自卫生部临检中心。

1.3 引物设计与合成

1.3.1 根据CTX-M-1编码基因序列设计CTX-M-1组引物序列为

5'-GGCCCATGGTTAAAAAATCACTGC-3'(60~84),

5'-CCGTTTCCGCTATTACAAACCGTTG-3'(926~950),

1.3.2 根据 CTX-M-18 编码基因序列设计 CTX-M-9 组引物序列为

5'-GCGCATGGTGACAAAGAGAGTGCAA-3'(1~21, 5' 加 GCGC),

5'-GTTACAGCCCTTCGCGCATGATTC-3'(854~876, 5' 加 G),

1.3.3 根据 TEM-1 编码基因序列设计 TEM 引物序列为

5'-TTAGACGTCAGGTGGCACTT-3'(76~95),

5'-GGACCGGAGTTACCAATGCT-3'(1065~1077),

1.3.4 根据 SHV-1 编码基因序列设计的 SHV 引物序列为

5'-TCGGCCTTCACTCAAGGATG-3'(44~63)

5'-ATGCCGCGCCAGTCATATC-3'(991~1010)。

1.4 ESBLs 的检测

采用双纸片协同法^[4](见图 1)、单纸片扩散法(见图 2)筛选和纸片扩散增效法确认以 CLSI-M100-S17-(M2-A9)文件推荐的标准解释。

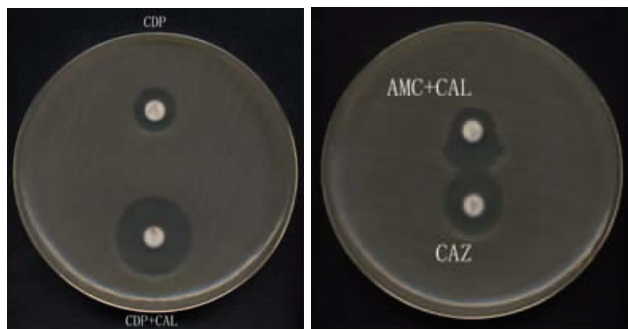


图 1 双纸片协同法

Fig.1 Double disk synergy Test



图 2 单纸片扩散法

Fig.2 Single disk diffusion Test

1.5 菌株 DNA 模板的制备

采用英国 OMEGABIO TEK 公司提供的 DNA 提取试剂盒,操作按说明书进行。

1.6 PCR 检测 ESBLs 耐药基因

1.6.1 反应体系 50μL 10× PCR Buffer 25mM Mg²⁺ 20mM dNTP, 500 μmol/L 引物, 5U/μl Taq 酶, 2.5 μl DNA 模板。

1.6.2 反应参数 CTX-M 基因型: 94℃ 预变性 5min→94℃ 变性 45s, 58℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min, 循环 35 次→72℃ 延伸 10min; TEM 和 SHV 基因型只将退火温度变更为 54℃。

1.6.3 反应结果 PCR 扩增产物经 1.2% 含 EB 琼脂糖电泳, 同

时做 DL2000 DNA Marker 对照,紫外灯下观察结果、照相。

1.6.4 PCR 产物处理 PCR 产物纯化、连接载体试验均按照说明书操作。然后将重组质粒转化至感受态 *E.coli* DH5α, 经含氨苄西林的麦康凯培养基筛选出重组菌^[2]、PCR 或抽提质粒并进行 *ECOR* 酶切(使目的 DNA 片段与 pGEM-Teasy 载体分离)鉴定, 见图 3。重组菌由上海博亚生物技术有限公司用 ABI 377 测序仪(美国 AB 公司)进行正反方向测序, 测序结果应用 DNAssist 软件或在 GenBank 经 BLAST 系统确定其基因型。

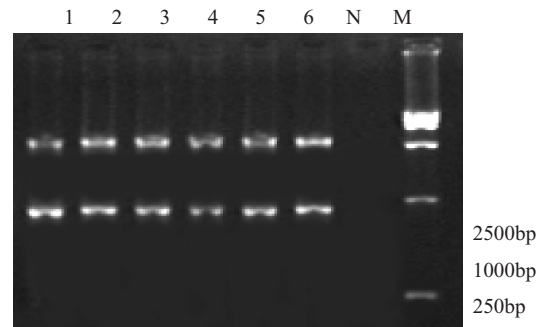


图 3 重组质粒 DNA *ECOR*I 酶切电泳图

Fig.3 Recombinant plasmid DNA *ECOR*I Enzyme Cutting Gel Electrophoresis

1~6 标本的重组质粒酶切产物;

N 阴性对照 M:DL15000 DNA Marker.

1~6:Recombinant plasmid Enzyme cutting products;

N: Negative Control; M:DL15000 DNA Marker

2 结果

2.1 药敏结果

148 株肺炎克雷伯菌对亚胺培南全部敏感; 对头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星耐药相对低, 分别为 5.3%、15.4%、16.0%; 对哌拉西林、头孢唑林、环丙沙星、复方新诺明耐药率 >70%; 对三代耐药率将近在 40% 左右。除亚胺培南, 产 ESBLs 菌株对各种抗生素耐药率均较非产 ESBLs 菌株增高, 见表 1。

2.2 经双纸片法表型确证 ESBLs 检测结果

148 株肺炎克雷伯菌通过确认试验 46 株产生 ESBLs, 阳性率 31.1%。检测 ESBLs 的五种抗生素指示剂中, 检出率分别是 CRO 97.8%(45/46)、ATM 95.6%(44/46)、CTX 93.4%(43/46)、CPD 76.0%(35/46)、CAZ 65.2%(30/46)。

2.3 46 株肺炎克雷伯菌四组引物扩增产物结果

有 6 株均呈阴性, 其他菌株至少一种扩增呈阳性, 其扩增片段大小与预期相符(见图 4)。CTX-M-1 组引物扩增阳性有 25 株, 测序结果均为 CTX-M-22 型, 占 54.3%(25/46); CTX-M-9 组引物扩增阳性有 19 株, 测序结果均为 CTX-M-18 型, 占 41.3%(19/46); 24 株 SHV 型引物扩增阳性, 占 52.1%(24/46), 测序结果 15 株 SHV-1 型、6 株 SHV-1a 型、1 株 SHV-40 型、2 株 SHV-43 型; TEM 引物扩增阳性 29 株, 占 61.8%, 均为 TEM-1 型。46 株中有 8 株菌同时携带 3 种耐药基因, 有 10 株肺炎克雷伯菌同时携带 CTX-M-18、CTX-M-22、SHV、TEM 四种耐药基因。

表 1 肺炎克雷伯菌对 13 种抗菌药物耐药性(菌株数量 :146 株)

Table 1 Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumonia in 13 Type of Antibacterial drugs(quantity:146)

Klebsiella pneumonia (Q:148)		Klebsiella pneumoni(Q:46)		Klebsiella pneumonia(Q:102)	
Antibacterial drugs	Drug resistance rate(%)	Drug resistance rate of ESBLs(%)		Drug resistance rate of Non-ESBLs(%)	
Imipenem	0	0		0	
Cotrimoxazole	74.5	76.1		73.2	
Ciprofloxacin	77.1	84.6		3.0	
Piperacillin	90.8	100		87.5	
Cefazolin	75.1	100		60.8	
Cefotaxime	39.15	95.9		14.1	
Ceftriaxone	38.8	90.0		14.1	
Ceftazidime	39.5	93.2		15.2	
cefepime	26.8	70.5		7.0	
Amikacin	16.0	17.1		16.0	
Gentamicin	50.0	58.2		46.9	
Cefoperazone / Shu TAZ	5.3	13.1		2.2	
Piperacillin / tazobactam	15.4	23.9		11.7	

注 :Q 代表数量。

Note: Q: Identified quantity.

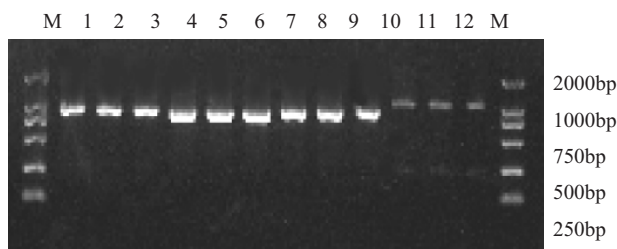


图 4 ESBL 基因的 PCR 电泳

Fig.4 PCR Gel Electrophoresis of ESBL Gene

M :DL2000 DNA Marker ;1~3 :CTX-M-1 组 ;4~6 :CTX-M-9 组 ;7~9 :
SHV ;10~12 :TEM
M :DL2000 DNA Marker; 1~3: CTX-M-1 Group; 4~6: CTX-M-9 Group;
7~9: SHV; 10~12: TEM

3 讨论

本研究中,产 ESBLs 菌对第三代头孢菌素有较高的耐药率,头孢噻肟最高,可能与本地区头孢噻肟的使用量较大有关,尽管部分菌株对头孢吡肟和头孢曲松敏感,但根据 CLSI 的推荐意见,如确认了产 ESBLs 菌株,不管体外药敏试验结果如何,均视为对所有青霉素类、头孢菌素类(包括三代、四代)和氨基糖苷类耐药,产 ESBLs 株对环丙沙星呈现较高的耐药率,达 84.6%,提示喹诺酮类抗菌药物已不适宜用于产 ESBLs 菌引起感染的治疗。头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦对产 ESBLs 株均有较好的抑制作用。我们调查的 2008 年 5 月-2009 年 5 月新疆独山子地区临床分离的克雷伯菌 ESBLs 总阳性率达 31.1%。酶抑制剂增强的双纸片扩散法,是目前检测克雷伯菌和大肠埃希菌 ESBLs 的标准方法,但是不同头孢菌素纸片

对不同地区产 ESBLs 菌株的筛选效果有所不同,本试验表明以 CRO、ATM 和 CTX 作为指示剂检出率较高,而 CAZ、CPD 则不够理想。

从 80 年代初发现产 ESBLs 菌株以后,产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的流行日益严重,呈世界范围分布,且有不断增加的趋势^[3-6]。随着产 ESBLs 菌株的检出率不断增加以及相关研究不断深入,ESBLs 基因型种类越来越多,新基因型不断被发现,耐药机制越来越复杂,本研究中,在现有四种引物进行 PCR 扩增,46 株菌中有 8 株菌同时携带 3 种耐药基因,同时携带 CTX-M-18、CTX-M-22、SHV、TEM 四种耐药基因。世界各地发现的由质粒介导的 ESBLs 多达 200 余种,ESBLs 分为 TEM 型、SHV 型、CTX-M 型、OXA 型和其他型五类,大多数 ESBLs 菌由 TEM-1 或 SHV-1 变异产生^[7-10],不同国家、地区和医院产 ESBLs 耐药菌的检出率及基因型不同,本试验以 CTX-M 型为主,CTX-M-9 组均是 CTX-M-18,CTX-M-1 组测序结果均为 CTX-M-22,而国内报道的多以 CTX-M-3 为主有所区别^[11-14]与浙江省、江苏常州的报道相近^[15-18]。TEM 型酶在国内报道基本上是 TEM-1 型 β -内酰胺酶,与 SHV-1 一样,不属于 ESBLs,是一种广谱 β -内酰胺酶。6 株产 ESBLs 菌株四组引物扩增均呈阴性,可能存在其他的 ESBLs 基因型或其他因素。

随着各种抗生素广泛应用,细菌的耐药问题也更为严重,尤其是质粒介导的超广谱 β -内酰胺酶,可在肠杆菌科之间传播,极易发展为地区流行,且这种质粒往往形成多重耐药质粒,有着相当高的稳定性,因此,及时准确的对本地区 ESBLs 耐药基因进行检测分析及耐药分析,是指导临床合理使用抗生素、控制耐药菌株蔓延的重要方法和途径^[19-20]。

参考文献(References)

- [1] Moland ES, Hanson ND, Black JA, et al. Prevalence of new β -lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(9): 3318-3324
- [2] Yu WL, Chuang YC, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum β -lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2006, 39(4): 264-277
- [3] Kader AA, Angamuthu KK, Kamath KA, et al. Modified double-disk test for detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. Br J Biomed Sci, 2006, 63(2): 51-54
- [4] Bagattin iM, Crivaro V, Di Popolo A, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit [J]. J Antimicrob Chem other, 2006, 57(5): 979-982
- [5] Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control[J]. J Infect, 2003, 47(4): 273-295
- [6] Arpin C, Dubois V, Coulange L, et al. Extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers[J]. Anti-microb Agents Chem other, 2003, 47(11): 3506-3514
- [7] Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea[J]. J Antimicrob Chem other, 2005, 56(4): 698-702
- [8] Queenan AM, Foleno B, Gownley C, et al. Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 269-275
- [9] Rice L. Evolution and clinical importance of extended-spectrum β -lactamases[J]. Chest, 2001, 119(1): 119
- [10] Tzelepici Magana CH, Platsouka E, et al. Extended spectrum β -lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 3(1): 285
- [11] Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, et al. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 4320-4325
- [12] Bell M, Turnidge JD, Gales AC, et al. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1998-99)[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2000, 2(1): 293-298
- [13] Coque TM, Oliver A, PerezDiaz JC, et al. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -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
- [14] Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, et al. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the Peoples Republic of China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(2): 630-637
- [15] Xiong Z, Zhu D, Wang F, et al. Investigation of extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from China[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002, 44(1): 95-200
- [16] Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, et al. A preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 184(4): 53-56
- [17] 史伟峰, 王玉月, 李美忠, 等. 超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌相关耐药基因研究[J]. 检验医学, 2009, 24(3): 217
- Shi Wei-feng, Wang Yu-yue, Li Mei-zhong, et al. Study on the drug-resistant genes associated with extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Laboratory Medicine, 2009, 24(3): 217
- [18] Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, et al. Countrywide Spread of CTX-M-3 Extended-Spectrum β -lactamase-Producing Micro-organisms of the Family Enterobacteriaceae in Poland [J]. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2002, 46(4): 151-159
- [19] 季淑娟, 陈亚岗, 余云松, 等. 浙江省产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的基因分型[J]. 中国传染病杂志, 2005, 23(2): 75-78
- Ji Shu-juan, Chen Ya-gang, Yu Yun-song, et al. Study on genotype distribution of extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Zhejiang province [J]. Chin J Infect Dis, 2005, 23(2): 75-78
- [20] National Committee for Clinical Laboratory Standard. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twelfth informational supplement[S]. NCCL, 2003, M100-S13