

• 论 著 •

产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性分析及 TEM、SHV 基因检测

张长虹¹, 孟存仁^{2△}, 晓 英³

(1. 新疆维吾尔自治区乌苏市妇幼保健院检验科, 新疆乌苏 833000; 2. 新疆医科大学第一附属医院医学检验中心, 新疆乌鲁木齐 830054; 3. 新疆维吾尔自治区乌苏市人民医院检验科, 新疆乌苏 833000)

摘 要:目的 了解乌苏市产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药状况及 TEM、SHV 基因型的流行情况。方法 收集乌苏市两所医院 2011 年 7 月至 2013 年 6 月分离的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌, 采用纸片扩散法(K-B 法)进行药敏试验, 并按照 CLSI 推荐的方法进行 ESBLs 初步筛选和表型确证试验, 同时提取产 ESBLs 菌株的 DNA, 采用 PCR 和电泳方法检测 TEM、SHV 基因。结果 共收集大肠埃希菌 221 株, 肺炎克雷伯 153 株。其中产 ESBLs 菌株分别为 37 株和 43 株, 肺炎克雷伯菌 ESBLs 检出率高于大肠埃希菌($\chi^2=6.942, P<0.01$)。两种菌的耐药情况较为相似, 其中产 ESBLs 菌株对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药率明显高于非产酶株, 大多在 90% 以上; 对青霉素类和一、二代头孢类的耐药率接近 100%; 对庆大霉素和环丙沙星的耐药率也在 50% 以上; 而对碳青霉烯类药物的耐药率较低, 均不到 5%。产 ESBLs 大肠埃希菌 TEM、SHV 基因的检出率分别为 72.9%、54.0%, 肺炎克雷伯菌分别为 81.4%、65.1%, 检出率基本一致($P>0.05$)。结论 乌苏市大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 检出率较高, 耐药形势严峻, TEM、SHV 是 ESBLs 重要的基因型。

关键词:大肠埃希菌; 肺炎克雷伯菌; 超广谱 β -内酰胺酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)05-0583-03

Analysis of drug resistance of ESBLs-producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* and gene detection of TEM and SHV

Zhang Changhong¹, Meng Cunren^{2△}, Xiao Ying³

(1. Department of Clinical Laboratory, Wusu Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Wusu, Xinjiang 833000, China; 2. Medical Laboratory Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Wusu Municipal People's Hospital, Wusu, Xinjiang 833000, China)

Abstract: Objective To understand the drug resistance status of extended-spectrum beta-lactamase(ESBLs)-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Klebsiella pneumonia* (*KPN*), and the prevalence situation of TEM and SHV genotype in Wusu city. **Methods** *E. coli* and *KPN* isolated in two hospitals of Wusu city from July 2011 to June 2013 were collected and the drug sensitivity test was performed by the disk diffusion method (K-B method), the ESBLs preliminary screening and the phenotypic confirmatory test were carried according to the guideline of CLSI, and at the same time DNA of ESBLs producing strains was extracted and the TEM and SHV genes among them were tested by PCR and the electrophoresis method. **Results** Totally 221 strains of *E. coli* and 153 strains of *KPN* were collected, among them ESBLs producing strains were 37 strains and 43 strains respectively, and the detection rate of ESBLs in *KPN* was higher than that in *E. coli* ($\chi^2=6.942, P<0.01$). The drug resistance of two kinds of bacteria were similar, the resistance rate of ESBLs producing strains to beta lactam antibacterial drugs was obviously higher than that in non-enzyme producing strains, which was mostly more than 90%; the resistance rate to penicillin and the first or second generation cephalosporins was almost 100%; which to gentamicin and ciprofloxacin was above 50%; while which to carbapenem was lower, less than 5%. The detection rates of TEM and SHV genes were 72.9% and 54% in ESBLs producing *E. coli* and 81.4% and 65.1% in *KPN* respectively, the detection rates were basically consistent without statistically significant differences between them ($P>0.05$). **Conclusion** The detection rate of ESBLs producing *E. coli* and *KPN* in Wusu city is higher, the drug resistance situation is severe, and TEM, SHV are the important genotypes of ESBLs.

Key words: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumonia*; extended spectrum beta-lactamase

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是肠杆菌科中最主要的细菌, 也是目前引起医院感染重要病原菌。近年来, 由于广谱抗菌药物的广泛使用, 其耐药形势日趋严重, 产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是该类细菌耐药性产生的重要原因^[1], 目前对产 ESBLs 菌株基因型研究较多的是 SHV、TEM 和 CTX-M 型, 不同地区基因型的分布存在差异^[2]。本研究对本地区一年来分离的产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药状况及基因型进行了分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2011 年 7 月至 2013 年 6 月从乌苏市两所医

院的各类标本中分离到的大肠埃希菌 221 株, 肺炎克雷伯菌 153 株, 质控菌株大肠埃希氏菌 ATCC25922, 肺炎克雷伯菌 ATCC700603 购自卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 VITEK32 细菌培养系统为法国生物梅里埃公司产品, 药敏用 M-H 琼脂和药敏纸片购自英国 Oxoid 公司; PCR 仪为美国伯乐公司 iCycler 扩增仪, 电泳仪由北京中西远大科技有限公司生产, 凝胶成像系统为上海天呈科技公司产品, 质粒抽提、核酸扩增试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司, 引物由上海生工合成琼脂糖为 Sigma 公司产品。

1.3 菌株鉴定及药敏试验 菌株鉴定采用 VITEK32 培养仪

及配套革兰氏阴性鉴定卡片,药敏试验采用 K-B 纸片扩散法。操作方法和判断标准严格按 CLSI(2012 版)标准进行。

1.4 ESBLS 的检测 按照 CLSI 推荐的 ESBLS 初步筛选和表型确证试验检测。初筛试验采用 K-B 药敏纸片法,纸片选用头孢噻肟、头孢他啶、氨曲南(均为每片 30 μg)。凡头孢他啶的抑菌圈直径小于或等于 22 mm,头孢噻肟或氨曲南的抑菌圈直径小于或等于 27 mm 即怀疑为产 ESBLS 株。进一步测定菌株对头孢他啶(每片 30 μg)和头孢他啶/克拉维酸(每片 30/10 μg),头孢噻肟(每片 30 μg)和头孢噻肟/克拉维酸(每片 30/10 μg)的抑菌环直径。当两种药物中任意一种加克拉维酸的与不加克拉维酸的抑菌圈直径差大于或等于 5 mm 时,可确认为产 ESBLS 株。

1.5 基因分型 将产 ESBLS 菌的菌落悬浮在 TE 缓冲液中,用煮沸法提取 DNA 进行 PCR 扩增,SHV 基因:正向引物 5'-TCA GCG AAA AAC ACC TTG -3';反向引物 5'-CCC GCA GAT AAA TCA CCA-3',TEM 基因:正向引物 5'-GAG TAT TCA ACA TTT CCG TGT C-3';反向引物 5'-TAA TCA GTG AGG CAC CTA TCT C -3'。SHV、TEM 基因扩增分别产生 471 bp 和 861 bp 的 PCR 产物。每管 PCR 反应混合物 50 μL,包括每个引物 10 pmol,1 μL DNA 样本(3 μg/μL),1.5 mmol/L MgCl₂,每种 dNTP0.2 mmol/L,和 5 U Taq DNA 聚合酶。按下列条件进行 PCR 反应:94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 1 min,52 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,72 ℃ 延伸 5 min,最后将扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.6 统计学处理 药敏分析采用 WHONET5.4 软件;数据统计采用 SPSS17.0 软件。率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 产 ESBLS 菌株的检出情况 221 株大肠埃希菌中共检出产 ESBLS 菌株 37 株,检出率为 16.7%。153 株肺炎克雷伯菌中共检出产 ESBLS 菌株 43 株,检出率为 28.1%,高于大肠埃希菌($\chi^2=6.942, P<0.01$)。

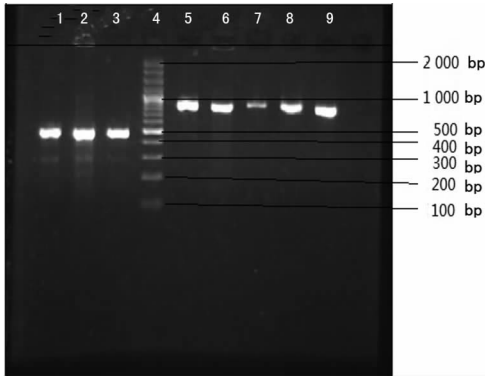
表 1 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	大肠埃希菌(n=221)		肺炎克雷伯菌(n=153)	
	产 ESBLS	非产 ESBLS	产 ESBLS	非产 ESBLS
	(n=37)	(n=184)	(n=43)	(n=110)
氨苄西林	100.0	92.4	100.0	90.0
哌拉西林	97.3	68.5	100.0	50.0
头孢唑啉	100.0	51.1	100.0	45.4
头孢呋辛钠	100.0	36.4	100.0	40.9
头孢唑啉/舒巴坦	5.4	11.9	14.0	13.6
氨苄西林/舒巴坦	91.9	58.1	90.7	40.9
哌拉西林/他唑巴坦	5.4	0.5	11.6	6.4
头孢他啶	86.5	5.4	79.1	33.6
头孢曲松	94.6	23.9	93.0	30.0
头孢噻肟	94.6	7.6	93.0	46.4
头孢吡肟	78.4	6.0	83.7	36.4
亚胺培南	2.7	0.5	2.3	1.8
美罗培南	0.0	0.5	4.7	2.7
阿米卡星	16.2	6.5	44.2	10.9
庆大霉素	59.4	50.0	72.1	30.0
环丙沙星	59.4	48.9	51.2	28.2
左氧氟沙星	56.8	38.6	34.9	13.6

2.2 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药率 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药情况较为相似,其中产 ESBLS 菌株对 β -内

酰胺类抗菌药物的耐药率明显高于非产酶株,大多在 90%以上,对青霉素类和一、二代头孢类的耐药率接近 100%,对庆大霉素和环丙沙星的耐药率也在 50%以上,而对碳青霉烯类药物的耐药率较低,均不到 5%。见表 1。

2.3 TEM、SHV 基因的检出率 TEM 基因扩增产物在电泳图上在 900 bp 左右、SHV 基因扩增片段在 480 bp 左右,见图 1。37 株产 ESBLS 大肠埃希菌中检出 TEM 基因型 27 株、SHV 基因型 20 株、TEM 和 SHV 复合型 12 株,43 株产 ESBLS 肺炎克雷伯菌中相应的检出株数分别为 35 株、28 株和 11 株,与大肠埃希菌中型的检出率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。



泳道 1~3:SHV 基因 471 bp 扩增产物;泳道 5~9:TEM 基因 861 bp 扩增产物;泳道 4:DNA 标记物。

图 1 TEM 型和 SHV 型阳性 PCR 产物电泳图

表 2 产 ESBLS 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌株中 TEM、SHV 基因的检出率[n(%)]

基因型	产 ESBLS 大肠埃希菌(n=37)	产 ESBLS 肺炎克雷伯菌(n=43)	χ^2	P
TEM	27(72.9)	35(81.4)	0.809	>0.05
SHV	20(54.0)	28(65.1)	1.014	>0.05
TEM+SHV	12(32.4)	11(25.6)	0.000	>0.05

3 讨 论

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌广泛分布于自然界和人体许多部位,极易引起医院感染,是目前临床上革兰阴性杆菌中分离率最高的两种菌^[3]。长期大量使用广谱抗菌药物,接受化疗或免疫抑制剂治疗的患者,以及接受机械通气、导尿等侵入性操作的患者,易导致体表或医院环境中的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌感染。本研究中的菌株主要分离自 ICU、呼吸科、肾内科等部门的危重患者,其中大肠埃希菌主要来自痰液和尿液,肺炎克雷伯菌主要来自痰液,多数患者都接受了导尿或机械勇通气,且住院时间较长,这是造成医院内感染的重要原因。

近年来产 ESBLS 的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌检出率越来越高,这与全球范围内 β -内酰胺类抗菌药物的不合理使用有关,本研究中产 ESBLS 的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌检出率分别为 16.7%和 28.1%,虽低于文献^[4]报道,但仍是一个相当高的水平。产 ESBLS 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药情况基本一致,对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药率明显高于非产酶株,对三代头孢类的耐药率在 90%以上,对庆大霉素和环丙沙星的耐药率也在 50%以上。主要是由于近几年来本院 β -内酰胺类抗菌药物使用较多,特别是三代头孢类药物应用较为普遍,诱导细菌产生 ESBLS,给临床治疗带来困难。两种细菌对含酶抑制剂的复合剂及碳青霉烯类药物的耐药率相对较低,说

明该类药物仍是目前治疗产 ESBLs 菌株的最有效药物。

ESBLs 为质粒介导的 β -内酰胺酶,可以水解青霉素类和头孢类抗菌药物的 β -内酰胺环,使其失去抗菌活性。一旦确定细菌产 ESBLs,即使实验室报告为敏感的第三代头孢菌素和单环酰胺类抗菌药物,在临床也不主张使用。

不同国家和地区报道的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 的基因型有所不同。TEM 型 ESBLs 是在 TEM-1 型基因序列的基础上由一至数十个氨基酸密码子突变而成,目前已命名到 TEM-119,SHV 是巯基变量的缩写,SHV 基因目前已命名至 SHV-45 型,CTX 型 ESBLs 主要对头孢噻肟有高度的水解活性,其他型还包括 OXA 型、BES 型等^[5]。欧洲的一些国家 TEM 和 SHV 型报道较多^[6],但也有报道认为以 CTX 型为主^[7],国内有报道显示 TEM、SHV 和 CTX 三种基因型都存在^[8]。张志坚等^[9]研究显示河南地区大肠埃希菌 ESBLs 基因主要为 TEM 型(检出率 80.4%),其次为 SHV 型(60.9%),CTX 型为 58.7%,低于罗飞等^[10]的报道。本研究只检测了 TEM、SHV 两种基因型在大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中的分布,结果显示大肠埃希菌中 TEM、SHV 的检出率分别为 72.9%和 54.0%,和张志坚等^[9]的报道接近。肺炎克雷伯菌中其检出率分别为 81.4%和 65.1%,与大肠埃希菌的检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中均有部分菌株同时具有 TEM、SHV 两种基因型,与罗飞等^[10]报道相似。

总之,加强对医院感染病原菌的监测,特别是对产 ESBLs 菌株耐药表型监测和基因型的研究,对于耐药机制的研究具有重要意义,同时有助于临床合理选择抗菌药物,减少耐药菌的产生。

参考文献

- [1] Lee JC, Lee NY, Lee HC, et al. Clinical characteristics of urosepsis caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumonia* and their emergence in the community[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2012, 45(2): 127-133.
- [2] Zaniani FR, Meshkat Z, Naderi NM, et al. The Prevalence of TEM

and SHV Genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*[J]. Iran J Basic Med Sci, 2012, 15(1): 654-660.

- [3] Barnett AG, Page K, Campbell M, et al. The increased risks of death and extra lengths of hospital and ICU stay from hospital-acquired bloodstream infections: a case-control study [J]. BMJ Open, 2013, 31(10): 003587.
- [4] Kaftandzieva A, Trajkovska-Dokic E, Panovski N. Prevalence and molecular characterization of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. Prilozi, 2011, 32(2): 129-141.
- [5] Kaur M, Aggarwal A. Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM Genes Among the Extended Spectrum β -Lactamase Producing Isolates of Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital of North India[J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7(4): 642-645.
- [6] Patrick DJ, Sturm ET, Bochum M, et al. Prevalence, molecular characterization, and phenotypic confirmation of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, and *Klebsiella oxytoca* at the Radboud University Nijmegen Medical Centre in the Netherlands[J]. Microb Drug Resist, 2010, 16(1): 55-60.
- [7] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M changing the face of ESBLs in Europe[J]. Antimicrob Chemother, 2007, 59(2): 165-174.
- [8] 王细宏, 罗飞, 陈靖. 池州地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产超广谱 β -内酰胺酶的基因型分布[J]. 安徽医学, 2011, 32(9): 1313-1315.
- [9] 张志坚, 张傅山, 张钦宪, 等. 大肠埃希菌产超广谱 β -内酰胺酶基因型与其耐药性[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 45(5): 738-740.
- [10] 罗飞, 王细宏, 罗庆礼. 2010~2012 年安徽池州地区 TEM、SHV、CTX-M 型产超广谱 β -内酰胺酶分布特征[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(4): 395-397.

(收稿日期: 2014-09-15)

(上接第 582 页)

荣等^[11]、张慧莲等^[12]的研究结果相符合。

本研究对 1 805 例次侧配血不合的红细胞输血进行输血后效果评价,输血有效率为 87.4%,与同期主、次侧配血均相合的红细胞输血有效率(85.4%)相比,差异无统计学意义($P>0.05$);对输血效果不佳病例进行分析,均发现明确的导致输血效果不佳的原因,未见免疫性溶血相关证据,提示经本流程分析判定可输注次侧配血不合的悬浮红细胞的 DAT 阳性患者,其输血有效性并未降低。

综上所述,对于 DAT 阳性所致次侧配血不合的非 AIHA 患者,输注悬浮红细胞并不降低输血的安全性和有效性,应用本研究预定的处理流程可快速、安全地解决非 AIHA 患者次侧配血不合的临床输血问题,适用于采用微柱凝集技术交叉配血的实验室。

参考文献

- [1] 王跃华, 毛伟, 王芳, 等. 微柱凝集技术在临床输血中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(7): 930-931.
- [2] 陈文静, 郑宇浩. 微柱凝集法在不规则抗体检测中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(22): 3050.
- [3] 武建. 柱凝集技术的临床应用及其实验研究现状[J]. 中国输血杂

志, 2003, 15(3): 369-370.

- [4] 赵国华, 赵维齐, 柴庆波, 等. 柱凝集技术在交叉配血中的应用[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(12): 1057-1058.
- [5] 刘景汉, 汪德清. 临床输血学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 442.
- [6] 何子毅, 刘赴平, 车嘉琳. 电子交叉配血的现状和展望[J]. 临床输血与检验, 2009, 11(4): 380-381.
- [7] 陈小伍, 于新发, 田兆嵩. 输血治疗学[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 43.
- [8] 李勇, 马学严. 实用血液免疫学: 血型理论和实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 568-569.
- [9] 兰炯采, 贡中桥, 陈静娴. 输血免疫血液学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 123.
- [10] 王爱梅, 梁文华, 王群. 不同保存期全血制备洗涤红细胞的超微结构变化[J]. 临床输血与检验, 2004, 6(3): 173.
- [11] 王显荣, 储松炜, 许立, 等. 非 AIHA 直接抗球蛋白试验阳性患者输注洗涤红细胞的临床实验观察[J]. 临床医学, 2006, 26(2): 27-28.
- [12] 张慧莲, 杨婷, 于洋. 680 例交叉配血次侧凝集的结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(9): 1015.

(收稿日期: 2014-10-08)