

• 论 著 •

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒型 AmpC 酶基因型的检测分析^{*}郑港森¹, 刘贊贊², 张加勤¹, 黄朝阳¹, 马晓波¹, 李庆阁², 宋秀宇^{3△}

(1. 厦门大学附属第一医院检验科, 福建厦门 361003; 2. 厦门大学生命科学院生物医学科学系, 福建厦门 361005; 3. 厦门市中心血站, 福建厦门 361004)

摘要:目的 针对该院临床分离大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒型 AmpC 酶基因型进行研究分析。方法 收集 2011 年 7 月至 2012 年 8 月对头孢西丁不敏感无重复临床分离大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌共 176 株, 采用聚合酶链反应(PCR)法和扩增全基因序列分析大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产 AmpC 酶基因型。结果 PCR 结果显示, AmpC 酶基因(*ampC* 基因)阳性率为 18.2% 主要以 DHA 型为主, 阳性率为 59.4%, CIT 型为 37.5%, EBC 为 3.1%; 其中, 大肠埃希菌 *ampC* 基因阳性率为 11.4%, 以 CIT 型为主, 阳性率为 77.8%, DHA 型和 EBC 型阳性率均为 11.1%; 肺炎克雷伯菌 *ampC* 基因阳性率为 23.7%, 以 DHA 型为主, 阳性率为 78.3%, CIT 型为 21.7%。基因序列结果显示, DHA 型有 18 株为 DHA-1 基因型和 1 株摩根摩根菌 *ampC* 基因型, 一致率 97.0%, CIT 型有 10 株为 CMY-2 基因型, 1 株 CMY-42 基因型和 1 株 CMY-4 基因型; EBC 型为阴沟肠杆菌 *ampC* 基因型, 一致率为 99.0%。将 32 株基因序列提交 GenBank, 均被接受, 其登录号为 KJ127248~KJ127279。结论 该院临床分离大肠埃希菌 *ampC* 基因主要以 CMY-2 型为主, 而肺炎克雷伯菌主要以 DHA-1 型为主。

关键词:β-内酰胺酶; 质粒; 大肠埃希菌; 肺炎克雷伯菌**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.011**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2015)11-1505-02

The analysis of the genotyping of plasmid-mediated AmpC β -lactamases produced by clinical strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*^{*}

Zheng Gangsen¹, Liu Zanzan², Zhang Jiaqin¹, Huang Chaoyang¹, Ma Xiaobo¹, Li Qingge², Song Xiuyu^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361003, China; 2. Laboratory of Molecular Diagnostics, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 3. Blood Center of Xiamen, Xiamen, Fujian 361004, China)

Abstract: Objective To investigate the genotype and epidemiology of plasmid-mediated AmpC β -lactamases produced by the clinical strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** A total of 176 clinical nonrepetitive cefoxitin non-sensitivity isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* was collected from July 2011 to August 2012. Polymerase chain reaction (PCR) for AmpC enzyme gene amplification and DNA sequencing were carried out for genotype of AmpC beta-lactamases. **Results**

The results of PCR showed that the positive rate of *ampC* of the 176 strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* AmpC was 18.2%, mainly DHA type, counting for 59.4%, CIT counting for 37.5%, EBC counting for 3.1%. The positive rate of *ampC* of *Escherichia coli* was 11.4%, mainly CIT type, counting for 77.8%, the positive rates of DHA type and EBC type both were 11.1%. The positive rate of *ampC* of *Klebsiella pneumoniae* were 23.7%, mainly DHA type, counting for 78.3%, CIT type counting for 21.7%. The results of DNA sequencing showed that there were 18 strains DHA-1 type and 1 strain *ampC* gene type of *Morganella morganii* in DHA type strains, the concordance rate was 97.0%, 10 CIT type strains was CMY-2 type, 1 strain was CMY-42, one strain was CMY-4 type, EBC type was *ampC* gene type of *Enterobacter cloacae*, the concordance rate was 99.0%. A total of 32 strains of gene sequencing were registered as KJ127248~KJ127279 in GenBank. **Conclusion** The main genotypes of plasmid-mediated *ampC* enzyme produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were CMY-2 and DHA-1 respectively.

Key words:β-内酰胺酶; 质粒; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是医院感染中常见的致病菌, β-内酰胺酶的产生是导致其对 β-内酰胺类抗菌药物耐药最主要的耐药机制。AmpC β-内酰胺(AmpC)酶是继超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)后在临幊上出现的又一个重要的 β-内酰胺酶, 尤其是质粒型 AmpC 酶在不同地区相继报道, 呈现出流行传播趋势, 势必给医院感染的治疗和控制造成极大困难。因此, 本研究对厦门大学附属第一医院临幊分离大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌进行质粒型 AmpC 酶耐药基因的研究, 现将研究结果

报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2011 年 7 月至 2012 年 8 月厦门大学附属第一医院临幊分离的对头孢西丁不敏感大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌共 176 株, 其中 97 株为肺炎克雷伯菌, 79 株为大肠埃希菌。全部菌株经 VITEK2 Compact 鉴定。

1.2 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922 作为药物敏感性试验质控菌株。摩根摩根菌(携带 DHA 型基因)、阴沟肠杆菌

* 基金项目: 福建省自然科学基金项目(2013D002); 福建省卫生厅青年基金项目(2010-2-90)。 作者简介: 郑港森, 男, 主管技师, 主要从事临幊微生物学研究。 △ 通讯作者, E-mail: songxyxm@hotmail.com。

(携带 EBC 型基因)和弗劳地枸橼酸杆菌(携带 CIT 型基因)均来自厦门大学附属第一医院临床分离鉴定菌株;产 CMY-2 型大肠埃希菌由福州总医院提供;蜂房哈夫尼菌(携带 ACC 型基因),由厦门大学附属中山医院检验科提供;大肠埃希菌 DH5 α (pUC57 质粒载体)分别携带基因序列 MOX-1(GenBank NO. D13304)和基因序列 FOX-1(GenBank NO. X77455),由厦门大学生命科学院生物医学科学系提供。

1.3 仪器与试剂 头孢西丁纸片(FOX, 30 微克每片)为英国 Oxiod 公司产品。TaKaRa Ex TaqTM Hot Start 试剂盒及 DNA Ladder Marker 试剂为大连宝生物技术有限公司产品。细菌染色体 DNA 小量提取试剂盒,质粒 DNA 小量提取试剂盒均为 Axygen 公司产品。聚合酶链反应(PCR)仪和凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司产品,法国 BioMerieux VITEK2 Compact 细菌鉴定仪。

1.4 AmpC 酶筛选试验 采用 FOX 纸片琼脂平板法,抑菌圈直径小于或等于 18 mm 提示对 FOX 纸片中介或耐药^[1]。

1.5 AmpC 酶基因(*ampC* 基因)PCR 扩增 6 组 *ampC* 基因引物序列及 PCR 反应体系参考文献[2]。

1.6 *ampC* 基因全序列 PCR 扩增 6 组 *ampC* 基因全序列基因 PCR 扩增用于基因测序,其引物序列和扩增大小见表 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。PCR 反应体系为:25 μ L PCR 反应液中,包括缓冲液(75 mmol Tris-HCl, 20 mmol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% (V/V) 吐温-20, pH9.0), 2.5 mmol MgCl₂, 200 μ mol dNTPs, 0.4 μ mol/L 引物, 1 U TaqHS 和 1.0 μ L DNA 模板。95 °C 3 min 预变性后,95 °C 10 s, 68 °C 10 s(每个循环下降 1 °C)和 72 °C 30 s 共循环 16 次,95 °C 10 s, 53 °C 10 s 和 72 °C 30 s 循环 30 次。其 DNA 扩增产物由上海 Majorbio 公司进行双向测序。

1.7 *ampC* 基因序列分析 *ampC* 基因全序列 PCR 扩增产物经测序得到基因序列与 GenBank 数据库进行局部相似性基本查询工具(BLAST)序列比对分析,并将所得基因序列提交至 GenBank。

2 结 果

2.1 *ampC* 基因 PCR 扩增结果 176 株对头孢西丁不敏感临床分离菌株中,检测出 32 株 *ampC* 耐药基因阳性,阳性率为 18.2% (32/176),其中包括 19 株 DHA 型,占 59.4% (19/32);12 株 CIT 型,占 37.5% (12/32),1 株 EBC 型,占 3.1% (1/32);9 株为大肠埃希菌,阳性率为 11.4% (9/79),包括 7 株 CIT 型,占 77.8%,1 株 DHA 型和 1 株 EBC 型,分别占 11.1% (1/9);23 株为肺炎克雷伯菌,阳性率 23.7%,包括 18 株 DHA 型,占 78.3% (18/23),5 株 CIT 型,占 21.7% (5/23)。见表 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1~3(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.2 基因序列分析 全序列 DNA 扩增产物经测序后,其序列进行 BLAST 对比显示:19 株 DHA 型中有 18 株(94.7%)为 DHA-1 基因亚型和 1 株(5.3%)为摩根摩根菌 *ampC* 基因型,与 AmpC 酶基因 PCR 扩增结果一致率为 97.0%;12 株 CIT 型中有 10 株(83.4%)为 CMY-2 基因亚型,1 株(8.3%)为 CMY-42 基因亚型,1 株(8.3%)为 CMY-4 基因亚型;1 株 EBC 型为阴沟肠杆菌 *ampC* 基因型,与 *ampC* 基因 PCR 扩增结果一致率为 99.0%。将 32 株基因序列提交 GenBank,均被接

受,其登录号为 KJ127248~KJ127279。见表 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。全序列 DNA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 4~6(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

3 讨 论

目前,AmPc 酶是除 ESBLs 之外,又一个非常重要的 β -内酰胺酶,随着在肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌等临床革兰阴性菌中的出现,AmPc 酶在临床革兰阴性菌中逐渐呈流行传播趋势。由于这种在肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中发现的 *ampC* 基因,不存在于细菌染色体上,而是存在于细菌质粒上,使 *ampC* 基因更具有传播性^[3]。目前,质粒介导 AmPc 酶主要分成 6 组,包括 DHA、EBC、CIT、ACC、MOX 和 FOX,已有约 180 种基因型,10 余个家族被发现^[4]。其中 CMY 型和 DHA 型是目前临幊上流行的主要 AmPc 酶基因型,尤其是 CMY-2 和 DHA-1 亚型在国内外均有报道^[4~8]。本次对临幊分离大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒型 AmPc 酶基因型的研究发现,本院临幊分离大肠埃希菌质粒型 AmPc 酶基因型主要以 CMY-2 亚型为主,而肺炎克雷伯菌质粒型 AmPc 酶基因型主要以 DHA-1 亚型为主,其流行情况与国内外报道一致^[4~8]。

由于美国临幊和实验室标准化协会(CLSI)尚未有 AmPc 酶检测的推荐方法,临幊实验室对 AmPc 酶的检测比较困难。因此,及时对本地区临幊分离常见病原菌质粒型 AmPc 酶基因型进行研究,掌握其流行基因型,有利于医院感染的治疗和监测。

参考文献

- [1] Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S21 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing(twenty-first informational supplement)[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2011.
- [2] Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6): 2153~2162.
- [3] 沈定霞,罗燕萍,张秀菊,等.肺炎克雷伯菌质粒携带 DHA-1 型 *ampC* 基因的克隆和序列分析[J].中华检验医学杂志,2005,28(3):318.
- [4] Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(1): 1~11.
- [5] 张阮章,卢月梅,吴劲松,等.产 ESBLs 大肠埃希菌的 AmPc 基因型分析[J].中国微生态学杂志,2013,25(4):425~426.
- [6] 冯福英,兰小鹏,杨湘越,等.大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒 AmPc 酶基因型及流行病学分析[J].福州总医院学报,2007,30(3):156~159.
- [7] 宁永忠,王辉,孙宏莉,等.大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产生的超广谱 β -内酰胺酶和质粒 AmPc 型 β -内酰胺酶的分子流行病学研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(10):944~949.
- [8] 吴多荣,黄会,张应爱,等.海南地区产质粒介导 AmPc 酶和 ESBLs 大肠埃希菌的耐药性分析[J].临床检验杂志,2011,296(1):74~75.

(收稿日期:2015-02-08)

