

· 论 著 ·

三亚地区综合性医院 213 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性基因的检测*

黎元莉^{1,2}, 麦 珍², 陈 海², 朱 雄², 李 欢², 黎礼达², 李康生^{1△}

(1. 广东省汕头大学医学院微生物与免疫学教研室, 广东汕头 515041;

2. 海南省三亚市人民医院检验科, 海南三亚 572000)

摘要: 目的 了解三亚市人民医院肺炎克雷伯菌的标本来源及耐药基因情况, 为临床合理用药和控制院内感染提供依据。

方法 从 2013 年 1 月至 2014 年 12 月各临床送检标本中分离肺炎克雷伯菌, 采用 Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏系统进行药敏试验, 按照标准纸片扩散法进行超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)表型的筛选和确证, 依据当年的美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准判读结果, 用 WHONET 5.6 软件对所有数据进行统计分析。用聚合酶链反应(PCR)对 213 株产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌进行常见的几种的耐药基因进行检测。结果 分离并确认 213 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌, 标本来源主要是痰、呼吸道分泌物, 占 78.4%; 其次是分泌物标本和中段尿, 分别占 8.92% 和 5.2%。对头孢噻肟耐药率最高(98.1%); 对亚胺培南的耐药率最低(2.86%)。213 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中有 195 株能检测到 1 个或多个耐药基因, 分别为 CMY, CTX, TEM, SHV, DHA1 和 KPC, 其检出率分别为 6.10%, 76.53%, 59.62%, 76.06%, 12.21% 和 2.82%。**结论** 该院肺炎克雷伯菌主要分离自痰、呼吸道分泌物, 对常用抗菌药物均产生了一定的耐药性, 应进一步了解该院产 ESBLs 菌株的耐药基因的分布, 预防医院感染的发生和多重耐药菌的产生。

关键词: 超广谱 β-内酰胺酶; 肺炎克雷伯菌; 耐药性; 医院感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2389-04

Clinical distribution and drug resistance of 213 strains of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* in general hospitals*

LI Yuanli^{1,2}, MAI Zhen², CHEN Hai², ZHU Xiong², LI Huan², LI Lida², LI Kangsheng^{1△}

(1. Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China;

2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Sanya City, Sanya, Hainan 572000, China)

Abstract: Objective To investigate the specimen source and gene phenotype of ESBLs in ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* of people's hospital of Sanya city, so as to provide basis for clinical use of drugs and nosocomial infection. **Methods** *Klebsiella pneumoniae* was isolated from specimens during January 2013 to December 2014, bacteria identification and susceptibility tests were detected by Phoenix-100 system biochemical, supplementary susceptibility test was confined by K-B method according to 2014 CLSI standards. WHONET 5.6 was used in the statistical analysis of all data. **Results** Totally 213 strains *Klebsiella pneumoniae* were isolated. The detection rates were 78.4% of the respiratory secretions, 8.92% and 5.2% respectively of the secretion and the mid-stream urine. The strains had a certain resistance to commonly used antimicrobial. The highest resistance rate was 98.1% to cefotaxime, and the lowest resistance rate was 2.86% to imipenem. There were 195 in 213 ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* strain were detect one or more drug resistance gene. The detecting rates of 6 p-lactamase gene of CMY, CTX, TEM, SHV, DHA1 and KPC were 6.10%, 76.53%, 59.62%, 76.06%, 12.21% and 2.82%. **Conclusion** *Klebsiella pneumoniae* is mainly isolated from respiratory secretions in the hospital, has a certain resistance to commonly used antimicrobial. We should learn more about the distribution of resistance genes of ESBLs strains, improve the efficiency of the treatment of the infection and to control nosocomial infection and the incidence of multi-drug resistance.

Key words: extended spectrum beta lactamase; *Klebsiella pneumoniae*; drug resistance; nosocomial infection

肺炎克雷伯菌是革兰阴性杆菌, 在自然环境中大量存在, 是临床常见的致病菌, 常引起呼吸道和肠道的感染, 以及全身其他部位的感染^[1]。随着抗菌药物的广泛应用, 近年来肺炎克雷伯菌引起的感染逐年增多, 根据全国细菌耐药监测网的数据, 其检出率已从前几年的第 3 位上升到第 2 位, 且产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)的耐药率也上升到仅次于大肠埃希菌的严峻情形, ESBLs 是肺炎克雷伯菌产生耐药的重要耐药机制之一, 故为了解肺炎克雷伯菌在三亚地区的流行和耐药情况,

本研究收集从 2013 年 1 月至 2014 年 12 月三亚市人民医院临床分离的肺炎克雷伯菌 1241 株, 其中产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 213 株, 对其耐药性及 ESBLs 的基因表型进行研究, 以探讨产 ESBLs 菌及其耐药基因在三亚地区的分布情况, 为预防该菌的院内感染和临床合理应用抗菌药物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 海南省三亚市人民医院 2013 年 1 月至 2014 年 12 月临床分离的产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 213 株。临床标

* 基金项目: 海南省三亚市科技创新项目(YW1325、2015YW38)。

作者简介: 黎元莉, 女, 主管技师, 主要从事微生物细菌及疑难菌鉴定、细菌耐药性监测等工作研究。 △ 通信作者, E-mail: ksli@stu.edu.cn。

本分布情况见表1。阳性质控菌株和阴性质控菌株分别为ESBLs阳性菌株肺炎克雷伯菌 ATCC700603 和 ESBLs 阴性菌株大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2 细菌鉴定 菌种鉴定为Phoenix-100全自动细菌鉴定药敏系统。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603、铜绿假单胞菌 ATCC2_7853,购自卫生部临床检验中心。

1.3 引物 根据 blaCMY、blaCTX、blaTEM、blaSHV、blaDHA1 和 blaKPC 的 ESBLs 基因类型序列设计引物序列,均由上海生工提供,见表2。

1.4 仪器与试剂 抗菌药物头孢西丁、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南和亚胺培南均来自英国 Oxoid 公司;培养基伊红美蓝培养平板、血平板、M. H 药敏平板均购自广州迪景生物有限公司;LB 平板为实验室自行配制,原料来自英国 Oxoid 公司;Bactec 120 血培养仪、

Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏系统均为美国 BD 公司产品。聚合酶链反应(PCR)扩增仪为美国 PE 公司产品,BIORAD 电泳仪由美国 BIO RAD 公司提供;凝胶成像系统由美国 BIO RAD Gel Doc XR 提供。

表 1 临床标本分布

标本类型	n	百分比(%)
呼吸道	167	78.40
尿液	11	5.20
腹腔积液	1	0.47
脓液	4	1.88
血液	7	3.29
分泌物	19	8.92
其他	4	1.88

表 2 耐药基因引物序列

耐药基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度(℃)
CMY	F:TAA AAT TTC ATA CAA AGT ACT R:ACG GTA TCG GAC TTT TTT ATT	1 346	54
CTX	F:GAT TGA CCG TAT TGG GAG TTT R:CGG CTG GGT AAA ATA GGT CA	522	51
TEM	F:AGG AAG AGT ATG ATT CAA CA R:CTC GTC GTT TGG TAT GGC	1 079	48
SHV	F:TGC GCA AGC TGC TGA CCA GC R:TTA GCG TTG CCA GTG CTC GA	898	60
DHA1	F:AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T R:CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	1 141	48
KPC	F:ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT R:TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC	1 010	55

1.5 方法

1.5.1 菌种鉴定 全部菌株及 ESBLs 阳性菌株肺炎克雷伯菌 ATCC700603 和 ESBLs。阴性菌株大肠埃希菌 ATCC25922 质控菌株均采用 Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏系统进行鉴定和药敏。

1.5.2 ESBLs 表型筛选 按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准进行判断,凡头孢泊肟或头孢他啶的抑菌环直径≤22 mm,或头孢曲松≤25 mm,氨曲南或头孢噻肟<27 mm,均应高度怀疑为产 ESBLs 菌株,需进一步做确证试验来加以确证。

1.5.3 ESBLs 表型确证 按照标准纸片扩散法药敏试验,将菌液涂布到 Mueller-Hinton 平板,用头孢他啶和头孢他啶+克拉维酸、头孢噻肟和头孢噻肟+克拉维酸药敏纸片分别对可疑菌株进行试验,测量两种纸片及加克拉维酸后的抑菌环直径。当任何复合抗菌药物药敏纸片的抑菌圈直径比单一抗菌药物药敏纸片的抑菌圈直径≥5 mm,即可确认为 ESBLs 阳性菌株。

1.5.4 药敏测定 药敏试验参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)推荐标准,采用琼脂稀释法进行测定各抗菌药物对各菌株的最低抑菌浓度(MICs)。操作方法参照 CLSI 的法规

进行^[2],结果解释标准参照 CLSI 的临界值判定敏感、耐药、中介。

1.5.5 质粒 DNA 的提取 Luria-Bertani 琼脂培养基上挑取单个菌落,将其加入装有 180 μL Buffer GTL 的 1.5 mL EP 管中严格按基因抽提试剂盒说明进行操作,将所得模板 DNA 分装-20 ℃保存。

1.5.6 PCR 扩增 ESBLs 基因 根据表2所列的 6 对引物对 ESBLs 阳性菌株肺炎克雷伯菌提取的质粒 DNA 模板进行扩增。总反应体系体积为 25 μL,含 12.5 μL MIX,正向、反向引物各 1 μL,水 9.5 μL,模板 1 μL。PCR 反应条件 94 ℃ 30 s 变性,50 ℃ 45 s 退火,72 ℃ 1 min 延伸,循环 35 次,最后 72 ℃ 延伸 1 min。退火温度可根据引物不同稍做调整。PCR 扩增产物用加入 5 μL GEL RED 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在 1×TAE 缓冲液中电泳,电压为 20 V/cm,20 min。电泳完毕后,用凝胶图像分析系统在紫外线下进行分析。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 213 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中有 195 株菌能检测出 CMY、CTX、TEM、SHV、DHA1 和 KPC 这几个耐药基因中的 1 个或多个,阳性率为 91.55%。其中 53 株肺炎克雷伯菌对青霉素类、头孢菌素类抗菌药物的耐药性很强。

氨苄西林、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢噻肟、头孢他啶、氨曲南的 MIC₅₀ 均大于 64 μg/mL, 亚胺培南对肺炎克雷伯菌仍有极强的抗菌活性, MIC₅₀ 仅为 0.0625 μg/mL。见表 3。

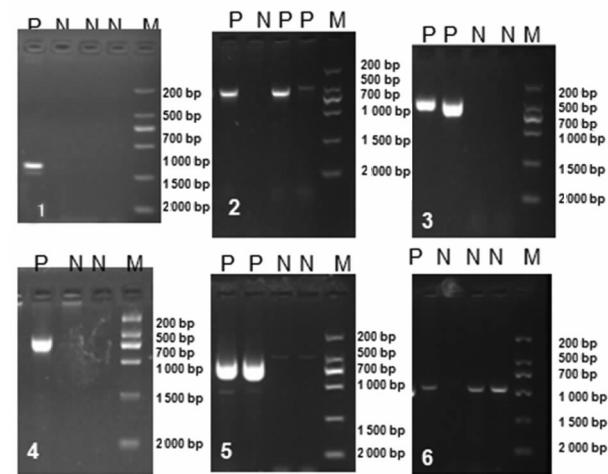
表 3 213 株产 ESBLS 肺炎克雷伯菌株的药敏试验结果(%)

抗菌药物	敏感	中介	耐药
头孢西丁	71.43	4.76	23.81
环丙沙星	25.71	1.05	65.24
头孢吡肟	29.05	11.9	66.43
庆大霉素	40.48	1.90	57.62
头孢哌酮/舒巴坦	50.95	19.52	29.53
哌拉西林/他唑巴坦	74.76	6.19	19.05
氨曲南	11.43	9.05	29.52
头孢噻肟	1.42	0.48	98.10
阿米卡星	90.61	0.94	8.45
哌拉西林	3.81	0.48	94.71
头孢他啶	18.57	16.19	65.24
米诺环素	55.71	11.90	32.38
亚胺培南	96.19	0.95	2.86

2.2 β-内酰胺酶基因检测结果 213 株肺炎克雷伯菌检出 CMY, CTX, TEM, SHV, DHA1 和 KPC6 种 β-内酰胺酶基因, 阳性率分别为 6.10%、76.53%、59.62%、76.06%、12.21% 和 2.82%。213 株肺炎克雷伯菌中有 195 株至少检出 1 种 β-内酰胺酶基因, 128 株同时检出 2 种以上 β-内酰胺酶基因, 3 株菌最多同时检出 5 种 β-内酰胺酶基因, 有 18 株菌没有检出 β-内酰胺酶基因, 见表 4。CMY, CTX, TEM, SHV, DHA1 和 KPC 基因 PCR 电泳图, 见图 1。

表 4 同时具有 2 种以上 ESBLS 表型的检测结果

基因型	n	检出率(%)
CMY-SHV	1	0.47
CTX-SHV	31	14.55
CTX-DHA1	2	0.94
CTX-TEM	11	5.16
TEM-SHV	9	4.23
TEM-SHA1	1	0.47
TEM-SHV-KPC	1	0.47
TEM-SHV-DHA1	1	0.47
CTX-TEM-SHV	73	34.27
CTX-TEM-DHA1	1	0.47
CTX-SHV-DHA1	4	1.88
CMY-CTX-SHV	3	1.41
CTX-TEM-SHV-KPC	4	1.88
CTX-TEM-SHV-SHA1	14	6.57
CMY-CTX-TEM-SHV	6	2.82
CMY-CTX-TEM-SHV-DHA1	3	1.41
合计	165	77.47



注:1 为 CMY PCR 扩增产物;2 为 CTX PCR 扩增产物;3 为 TEM PCR 扩增产物;4 为 SHV PCR 扩增产物;5 为 DHA PCR 扩增产物;6 为 KPC PCR 扩增产物;P 为阳性标本,N 为阴性标本,M 为标准条带。

图 1 耐药基因 PCR 产物电泳

3 讨 论

肺炎克雷伯菌是一种革兰阴性杆菌, 在泥土和水中大量存在, 常引起呼吸道和肠道的疾病, 甚至全身其他部位的感染, 在大量使用抗菌药物、机体抵抗力降低或创伤性医疗操作时也可能会引起内源性感染^[3]。院内感染中以泌尿道感染、呼吸道感染和菌血症最为常见, 且常危及患者生命。因此肺炎克雷伯菌是肠杆菌科中致病性较强的条件致病菌和医源性感染菌, 是临床常见的分离菌, 是社区获得性感染和院内感染常见的革兰阴性杆菌^[4-5]。三亚市人民医院以呼吸道标本检出率最高, 尿液和其他分泌物也有较高的检出率, 说明肺炎克雷伯菌能引起全身多部位多器官的感染, 这一数据与全国耐药监测网数据一致, 说明该地区的肺炎克雷伯菌的分布和其他地区一样。

近年来肺炎克雷伯菌引起的医院感染率逐年增高, 再加上抗菌药物滥用问题的日益严重, 特别是我国情况更加严重。据统计我国住院患者中使用抗菌药物的比例高达 60%~70%, 远高于国外, 在美国仅为 20%^[6-9]。抗菌药物的滥用直接导致了耐药菌逐年增多, 使患者感染发生率不断上升, 导致患者产生严重的并发症甚至死亡。据报道, 美国因医院感染每年死亡达 9 万人。医院感染患者医疗费用较同病无医院感染的高出 1.5 倍至数倍, 大大加重了患者经济压力和社会负担。本研究的 213 株肺炎克雷伯菌对哌拉西林、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、等三代头孢菌素和氨基糖苷类的耐药率均>65%^[10], 这么强的耐药性可能与其产生超广谱 β-内酰胺酶、头孢菌素酶(AmpC 酶)及氨基糖苷类修饰酶(AME)等水解酶有关, 但对阿米卡星、亚胺培南的敏感度却很高, 因此这两个药可作为头孢类等抗菌药物无效时的首选治疗^[11-12]。

根据全国细菌耐药监测网的数据, 肺炎克雷伯菌的检出率已从前几年的第 3 位上升到第 2 位, 中国 2005—2015 年全国耐药监测网数据显示多重耐药的肺炎克雷伯菌检出率呈逐年上升趋势。三亚市人民医院的多重耐药性肺炎克雷伯菌的检出率也是居高不下, 已经成为院内获得性肺炎的主要致病菌, 多重耐药性菌株的不断增加常导致病程迁延甚至临床抗菌药物治疗的失败, 患者预后较差, 病死率增加。肺炎克雷伯菌的耐药性非常复杂, 由于不同的国家、地区、医院使用抗菌药物的

不同,产ESBLs肺炎克雷伯菌的检出率、耐药性及基因型也有所不同。三亚市人民医院的耐药基因以CTX和SHV为主,其阳性的比率都超过一半,达7%以上,这与国内报道的ESBLs主要为SHV型和CTX-M型相符合,但与各地不同的是该院以两种基因型为主而不是以其中一种基因型常见^[13-14]。其中这些阳性的菌株中有128株(65.64%)可同时产生两种或两种以上的ESBLs,这与临床广泛使用广谱β-内酰胺类尤其是三代头孢菌素有关^[15]。由于产ESBLs菌往往同时带有氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、甲氧苄啶及磺胺药等其他抗菌药的耐药基因;因此产ESBLs菌株不但对β-内酰胺类耐药,同时大多对氨基糖苷类和喹诺酮类耐药,且最重要的是产ESBLs耐药菌株,它能够携带耐药质粒并整合到其他细菌上进行广泛的传播^[16],从而造成严重的医院交叉感染和院外耐药菌的扩散。因此,对产ESBLs肺炎克雷伯菌进行研究,并且掌握它的临床分布特点和耐药性变化,才能有助于采取有效措施预防该菌的感染和指导临床用药。

参考文献

- [1] Ndiba PM. Phenotypic detection and susceptibility pattern for the detection of extended spectrum 13-lactamase-producing Klebsiella pneumonia isolates in Nairobi, Kenya [J]. Open J Med Microb, 2013, 3(2): 91-94.
- [2] CLSI. M100-L24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA, U S A: CLSI, 2014.
- [3] Holt KE, Werthe MH, Zadols RN, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(27): 3574-3581.
- [4] Duin D, Cober ED, Richter SS, et al. Tigecycline therapy for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae (CRKP) bacteriuria leads to tigecycline resistance[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(12): 1117-1120.
- [5] Brust K, Evans A, Plemmons R. Tigecycline in treatment of multidrug-resistant Gram-negative bacillus urinary tract infections: a systematic review [J]. J Antimicrob Chemother 2014, 69(10): 2606-2610.
- [6] Kuo SC, Chang SC, Wang HY, et al. Emergence of extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii complex over 10 years: nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSRA) program[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12(1): 200-208.
- [7] Rathaur VK, Pathania M, Jayara A, et al. Clinical study of acute childhood diarrhoea caused by bacterial enteropathogens[J]. Clin Diagn Res, 2014, 8(5): 1-5.
- [8] 曹雅红,钟磊,孙美兰,等.腹泻患儿的病原菌构成及药敏结果分析[J].中华医院感染学杂志,2013,23(23):5880-5882.
- [9] Lin YT, Siu LK, Lin JC, et al. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries [J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 12.
- [10] Metan G, Palan C, Kaynar L, et al. A nightmare for haematology clinics; extensively drug-resistant (XDR) *Acinetobacter baumannii* [J]. Infect Med, 2014, 22 (4): 277-282.
- [11] 王玉红,邓敏,闵晓春.产ESBLs肺炎克雷伯菌临床分布特征及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(21):5213-5214.
- [12] 马红映,汪丽,虞亦鸣,等.泛耐药肺炎克雷伯菌耐药基因检测及聚类分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(22):5050-5052.
- [13] 阮章,卢月梅,胡玉华,等.血流感染大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的ESBLs基因分型[J].中国微生态学杂志,2013,25(7):832-833.
- [14] 玲芳,李医,陈利涛,等.124株肺炎克雷伯菌耐药性分析和产ESBLs株耐药基因分型研究[J].现代实用医学,2013,25(1):398.
- [15] 李倩妮,王文军,周麒,等.2007-2011年3种常见肠杆菌科细菌的耐药性变迁[J].山东医药,2014,54(16):78-80.
- [16] Cai JC, Zhou HW, Zhang R, et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(6): 2014-2018.

(收稿日期:2017-05-03 修回日期:2017-07-02)

(上接第2388页)

- [12] 何媛,于德民,周赛君,等.糖尿病视网膜病变的相关危险因素分析[J].中华糖尿病杂志,2012,4(10):601-606.
- [13] 武昌,陈斌.糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变患者血清RBP4、HbA1c水平变化及意义[J].山东医药,2017,60(12):53-55.
- [14] 殷俏,郭淑芹,张云良,等.视黄醇结合蛋白4、中性粒细胞淋巴细胞比值与2型糖尿病视网膜病变的关系[J].中

国现代医学杂志,2016,27(6):54-58.

- [15] 赵亮,武昌,赵军.糖尿病视网膜病变合并亚临床甲状腺功能减退患者血清视黄醇结合蛋白4的水平变化及其对糖尿病视网膜病变的影响[J].中国全科医学,2016,18(8):903-907.

(收稿日期:2017-04-02 修回日期:2017-06-06)