

论著·临床研究

贵阳部分医院产 ESBLs 肺炎克雷伯菌分子流行病学及相关耐药基因研究^{*}

熊现秋^{1,2}, 黄进友², 侯丽^{1,2}, 陈秀英², 应佳佳², 闵少菊^{1,2△}(1. 贵州医科大学附属医院检验组, 贵州贵阳 550001; 2. 贵州医科大学附属医院
检验科, 贵州贵阳 550001)

摘要:目的 分析了解贵阳部分医院分离的产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的肺炎克雷伯杆菌的耐药性及耐药基因分布情况。方法 采用 K-B 法测定病原菌对 22 种抗菌药物的耐药率,采用聚合酶链反应(PCR)检测 TEM、SHV、CTX-M、KPC 等 4 种 β -内酰胺酶基因,并对部分产物进行测序分析。结果 118 株肺炎克雷伯菌里产 ESBLs 的菌株达到了 52 株,占整个研究的菌株之比为 44.1%。产 ESBLs 菌株对常规抗菌药物的耐药率明显高于非产 ESBLs 菌株,但是亚胺培南和美罗培南除外。在抗菌药物耐药性上氨苄西林在 22 种抗菌药物中耐药性最高,达到 95.2%,哌拉西林和头孢唑肟次之,分别达到 64.7%和 63.3%;耐药率最低的是碳青霉烯类抗菌药物,美罗培南和亚胺培南分别为 2.9%和 4.0%。基因型分析显示有 79 株携带 TEM 基因,83 株携带 SHV 基因,87 株携带 CTX-M 基因,20 株携带 KPC 基因;在这些研究有 52.5%的菌株是具有多于两种的 ESBLs 基因型,具有基因分型多于 3 种的多为 TEM 型与 CTX-M 型或与 SHV 基因型共同存在,其比例为 10.1%。结论 成人产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌耐药严重,贵阳地区成人以同时携带多种 ESBLs 基因型为主。

关键词:超广谱 β -内酰胺酶; 肺炎克雷伯菌; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.24.017

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2019)24-3010-04

文献标识码:A

Molecular epidemiology and related drug resistance genes of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* in some hospitals in Guiyang^{*}

XIONG Xianqiu^{1,2}, HUANG Jinyou², HOU Li^{1,2}, CHEN Xiuying², YING Jiajia², MIN Shaoju^{1,2△}(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Guizhou Medical
University, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Baiyun Hospital
Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550001, China)

Abstract: **Objective** To analyze the drug resistance and drug resistance gene distribution of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Ex-rumt β -lactamase (ESBLs) isolated from some hospitals in Guiyang. **Methods** The resistance rate of pathogenic bacteria to 22 antibacterial drugs was determined by K-B method. Four kinds of β -lactamase genes, such as TEM, SHV, CTX-M and KPC, were detected by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing analysis. **Results** Of the 118 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 52 produced ESBLs, accounting for 44.1% of the experimental strains. Except for imipenem and meropenem, the resistance rate of ESBLs-producing strains to the other 20 antibiotics was higher than that of non-ESBLs-producing strains. Resistance to 22 antibiotics was highest in ampicillin, 95.2%, followed by piperacillin and cefazolin, reaching 64.7% and 63.3%, respectively; the lowest resistance was carbapenem antibiotic with meropenem and Imipenem 2.9% and 4.0%, respectively. Genotype analysis showed that 79 strains carried TEM gene, 83 strains carried SHV gene, 87 strains carried CTX-M gene, and 42 strains carried KPC gene; 52.5% of the strains carried more than two ESBLs genotypes simultaneously, and 10.1% of the strains simultaneously Carry more than three genotypes, and most of them are TEM type and CTX-M type or coexist with SHV type gene. **Conclusion** *Klebsiella pneumoniae* with ESBLs in adults is highly resistant. Adults in Guiyang mainly carry multiple ESBLs geno-

^{*} 基金项目:贵州省科技合作计划项目(黔科合 LH 字[2015]7397)。

作者简介:熊现秋,女,主管技师,主要从事临床免疫与微生物的研究。△ 通信作者, E-mail: minshaoju@126.com。

本文引用格式:熊现秋,黄进友,侯丽,等. 贵阳部分医院产 ESBLs 肺炎克雷伯菌分子流行病学及相关耐药基因研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 3010-3013.

types.

Key words: hyperspectral β -lactamase; *Klebsiella pneumoniae*; drug resistance gene

肺炎克雷伯菌是医源性感染的常见致病革兰阴性菌^[1]。现在由于 β -内酰胺类的抗菌药物大规模使用,使得耐药菌株的出现越来越多,其中主要的是产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的肺炎克雷伯菌^[2-4]。在全球重要的医源性感染耐药中产 ESBLs 肺炎克雷伯菌引起的耐药成为了当前重要问题,给临床的治疗和预防造成了很大阻力^[5]。为了探讨贵阳地区肺炎克雷伯菌耐药性,指导临床合理用药,本研究收集了贵阳部分医院 2015 年 4 月至 2018 年 7 月样本培养所得的产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 118 株进行分析,将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 4 月至 2018 年 7 月贵州医科大学附属医院、贵州省肿瘤医院、贵州医科大学附属白云医院成年住院患者产 ESBLs 肺炎克雷伯 100 株,产 ESBLs 肺炎克雷伯的诊断标准参照临床实验室标准化(CLSI)M100S 标准执行。阳性对照选择 ATCC700603 肺炎克雷伯菌,阴性对照选择 ATCC

25922 肺炎克雷伯菌。

1.2 仪器与试剂 用法国家生物梅里埃 VITEK2-compact 细菌鉴定仪及配套卡片作细菌鉴定。M-H 琼脂糖培养基购自法国生物梅里埃公司,药敏实验采用经典纸片扩散法(K-B 法)。整个实验过程完全按照操作规程执行。

1.3 耐药基因检测 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μ L:0.25 μ L TaqExDNA 聚合酶、5 μ L 的 10 $\times$ PCR Buffer、4 μ L 的 dNTP 混合物、2 μ L 的质粒 DNA 模板、3 μ L 相应引物见表 1,各 15 pmol/L、32.75 μ L 的无菌去离子水。TaqExDNA 聚合酶、PCR Buffer、dNTP 由购自 TaKaRa 公司。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 解链 25 s。64 $^{\circ}$ C 退火 30 s,75 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 30 个循环扩增。PCR 扩增仪为 Bio-Rad 公司产品。测序法(IlluminaHiSeq 2000,上海宝腾生物技术有限公司完成)对部分阳性产物进行测序,结果与基因库颁布的序列进行比较。

表 1 PCR 扩增引物序列及长度

基因名称	引物	序列(5'~3')	产物长度(bp)
TEM	TEM1	GAA GAC GAA AGG GCC TCG TG	1 074
	TEM2	GGT CTG ACA GTT ACC AAT GC	
SHV	SHV1	ATG GGT TAT ATT CGC CTG TG	780
	SHV2	AGA TAA ATC ACC ACA ATG CGC	
CTX-M	CTX-M- I -1	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC	499
	CTX-M- I -2	AGC CGC CGA CGC TAA TAC A	
	CTX-M- II -1	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C	351
	CTX-M- II -2	CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	
KPC	KPC1	ATC GCC GTC TAG TTC TGC TG	811
	KPC2	TCG CTG TGC TTG TCA TCC TT	

2 结 果

2.1 药敏试验结果 氨苄西林在 22 种抗菌药物中耐药性比例最高,其次为哌拉西林和头孢唑啉,比例分别为 95.2%、64.7%和 63.3%;耐药率最低的是碳青霉烯类抗菌药物,美罗培南和亚胺培南分别为 2.9%和 4.0%。见表 2。

2.2 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的耐药性 产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌在 118 株中有 52 株,比例为 44.1%。除亚胺培南与美罗培南外,产 ESBLs 株对其余 20 种抗菌药物的耐药率均大于 95%。

2.3 耐药基因检测结果 118 株菌中有 6 株未扩增

出 ESBLs 基因型,其余均扩增出了相应的基因。仅携带 1 种基因型的分别为 TEM 型 3 株(2.5%),SHV 型 5 株(4.2%),CTX-M 型 33 株(28.0%),KPC 型 6 株(5.1%)。其中 52.5%的菌株同时携带两种以上 ESBLs 基因型,10.1%的菌株同时携带 3 种以上基因型,且多为 TEM 型与 CTX-M 型或与 SHV 型基因共同存在。扩增基因产物见表 3。对 118 株检出菌株检出基因型进行统计分析,两种基因同时检出的比例前三位分别为:TEM+CTX-M(9.3%);TEM+SHV(8.5%);TEM+KPC(7.6%)。同时检出 3 种基因为:TEM+SHV+CTX-M(3.4%);TEM+SHV+

KPC(2.5%);SHV+CTX-M+KPC(1.7%)。4 种基因都检测出的有 3 株,检出率为 2.5%。

表 2 118 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对 22 种抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	耐药率	中敏率	敏感率
氨苄西林	95.2	2.3	3.2
哌拉西林	64.7	4.3	35.1
阿莫西林/克拉维酸	52.2	6.5	42.5
头孢哌酮/舒巴坦	38.7	8.3	50.7
哌拉西林/他唑巴坦	41.9	7.6	52.2
头孢唑啉	63.3	0.2	39.1
头孢呋辛钠	57.8	3.3	40.4
头孢他啶	43.9	4.2	52.1
头孢噻肟	51.4	8.1	40.2
头孢吡肟	44.1	5.2	52.1
头孢替坦	36.9	1.6	60.2
头孢西丁	43.4	3.2	53.2
亚胺培南	4.0	3.7	91.7
氨曲南	50.1	9.3	45.3
阿米卡星	23.4	1.1	76.9
美罗培南	2.9	1.4	96.2
庆大霉素	37.3	1.2	63.3
左旋氧氟沙星	42.7	7.3	53.2
环丙沙星	52.5	7.6	42.4
复方磺胺甲噁唑	37.9	2.8	62.8
呋喃妥因	52.1	29.9	24.3
四环素	33.5	4.7	62.5

表 3 耐药基因各基因型阳性菌株检出比

耐药基因	检出阳性菌株数(<i>n</i>)	检出阴性菌株数(<i>n</i>)	阳性菌株检出比(%)
TEM	79	39	66.9
SHV	83	35	70.3
CTX-M	87	31	73.7
KPC	20	98	16.9
合计	269	203	56.9

2.4 耐药基因测序结果 本研究取 12 株 TEM 亚组阳性菌株进行测序,基因型均为 TEM-1;取 18 株 CTX-M 亚组阳性菌株进行测序,结果基因型为 9 株 CTX-M-15,5 株 CTX-M-14,4 株为 CTX-M-24;15 株 SHV 阳性菌株的基因型分别为 SHV-1、2、11、12、27、61、99;取 11 株 KPC 亚组阳性菌株进行测序,结果 8 株基因型为 KPC1,3 株基因型为 KPC2。

3 讨 论

细菌的耐药早已成为全球性问题,并在世界范围

内流行。碳青霉烯类抗菌药物可以有效治疗肺炎克雷伯菌感染,但临床不合理应用抗菌药物使耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌数量逐年增加^[6-9]。ESBLs 水解 β-内酰胺环,尤其是头孢他啶、头孢噻肟和氨曲南等广谱抗菌药物,产 ESBLs 目前是革兰阴性菌耐药的主要原因之一^[10-13]。

本文 124 株肺炎克雷伯菌药敏结果显示,耐药性较高的 5 种抗菌药物依次为氨苄西林、哌拉西林、头孢唑林和头孢呋辛钠。敏感率较高的 5 种抗菌药物依次为亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素和复方磺胺甲噁唑。本文中多重耐药菌占实验菌株的 52.5%,可见肺炎克雷伯菌耐药非常严重。本研究表明,118 株肺炎克雷伯菌有 87 株带有 CTX-M 型 ESBLs,说明本地区成人肺炎克雷伯菌中 ESBLs 基因大多数携带有 CTX-M 型。CTX-M 系列酶其主要特征是对头孢噻肟水解能力较强,而对头孢他啶的水解能力很弱。CTX-M-15 型和 CTX-M-14 型、CTX-M-24 型是本地区成人肺炎克雷伯菌产 ESBLs 的流行型,与其他国内报道有所不同。同时本文结果可以看出本院产 ESBLs 肺炎克雷伯菌多基因携带情况较常见,多为 CTX-M 型与 TEM 型或 SHV 型基因同时存在,由此推断,产 ESBLs 肺炎克雷伯菌携带多种耐药基因,是造成本院肺炎克雷伯菌多重耐药的主要原因。ESBLs 的产生很大程度上是由于 β-内酰胺类抗菌药物的滥用引起的^[14-15],ESBLs 会使医院感染变得复杂化,正确使用抗菌药物有助于控制其播散与爆发流行,要控制产 ESBLs 细菌的流行,不能光靠治疗,首先要做到正确合理的使用抗菌药物。根据目前所有研究报道碳青霉烯类抗菌药物(亚胺培南、美罗培南)ESBLs 最有效,可作为首选药物,本研究结果也证实了这一结论,因此可以指导产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的精准用药。作为医护人员尤其是检验人员,应加强防范意识,严格执行消毒隔离制度,加强对细菌及耐药的检测,并随时将耐药动态通报临床,指导临床合理使用抗菌药物,控制产 ESBLs 菌株的播散,以延缓细菌耐药的产生,从而达到减少发病、降低发病率、减少耐药菌传播的目的^[16]。

4 结 论

成人产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌耐药严重,本地区成人肺炎克雷伯菌中 ESBLs 基因大多数携带有 CTX-M 型,其中 CTX-M-15 型、CTX-M-14 型、CTX-M-24 型是本地区成人肺炎克雷伯菌产 ESBLs 的流行型。同时产 ESBLs 肺炎克雷伯菌多基因携带情况较常见,多为 CTX-M 型与 TEM 型或 SHV 型基因同时存在。

参考文献

[1] 李永芬,孙成春,公衍文,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌

- 院内感染患者耐药情况及危险因素[J]. 医药导报, 2018, 37(1):59-62.
- [2] 吴华,周晓君,李天娇,等. 2016 年海南省高毒力肺炎克雷伯菌的临床分布、毒力基因和分子流行病学特点[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(1):10-15.
- [3] 王晓丽,葛亮,李兴华. 产超广谱 β -内酰胺酶和头孢菌素酶肺炎克雷伯菌的分布及耐药特征分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(1):5-9.
- [4] 李继红,时东彦,李媛媛,等. 2015—2017 年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药变迁及流行调查[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(5):572-576.
- [5] 徐艳霞,梁璐,陈建丽,等. 三种常用检测肺炎克雷伯菌超广谱 β -内酰胺酶方法的分析与研究[J]. 贵州医药, 2018, 20(1):18-21.
- [6] 洪宇,冯福英,郑宗富,等. 17 株耐亚胺培南肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌相关耐药基因及分子流行病学分析[J]. 检验医学与临床, 2016, 22(5):610-615.
- [7] 贾海霞,宗义强,过健俐,等. 产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的分子流行病学研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2005, 34(5):625-627.
- [8] 韩玲芳,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(4):398-400.
- [9] 倪桂莲,王冬国. 神经内科住院患者感染肺炎克雷伯菌耐药性分析与产 ESBLs 酶耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(16):3326-3328.
- [10] 冯福英,洪宇,杨湘越,等. 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌耐药基因检测与分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(12):2650-2653.
- [11] 张丽,朱元祺,张小兵,等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 20(23):5734-5736.
- [12] 唐韵,潘丽萍,章蓓蕾. 产超广谱 β -内酰胺酶菌的耐药性与基因型分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(18):3938-3941.
- [13] 余倩,胡志东,田彬,等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及毒力因子研究[J]. 中华临床感染病杂志, 2016, 32(1):52-58.
- [14] 吴连根,刘旗明. ICU 产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌感染的分布及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 22(11):1658-1660.
- [15] 张致平. β -内酰胺类抗生素研究的进展[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1):61-67.
- [16] 丁百兴,王明贵. 非碳青霉烯类 β -内酰胺类抗生素治疗产超广谱 β -内酰胺酶细菌感染[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(1):96.

(收稿日期:2019-04-12 修回日期:2019-08-12)

(上接第 3009 页)
值,联合生化指标检测对糖尿病正确的分型及治疗具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes care, 2011, 34 (Suppl 1): S62-S69.
- [2] 胡晖,陆伟成. 糖尿病自身抗体检测在成人隐匿型糖尿病诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(16):2329-2330.
- [3] MIAO D, GUYER K M, DONG F, et al. GAD65 autoantibodies detected by electrochemiluminescence assay identify high risk for type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2013, 62(12):4174-4178.
- [4] 周培刚. 自身免疫性糖尿病相关抗体检测的研究进展[J]. 临床医药文献杂志, 2018, 5(11):185-187.
- [5] 王庆淑. 糖尿病自身抗体阳性与胰岛细胞功能关系的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(22):2757-2758.
- [6] 钱鹏. 2 型糖尿病患者胰岛自身抗体阳性分布及 C 肽和相关生化指标的变化[J]. 检验医学杂志, 2016, 31(1):9-12.
- [7] 蒙桂文. 胰岛自身抗体联合生化指标检测在成人隐匿性糖尿病诊断中的临床意义[J]. 检验医学与临床杂志, 2012, 9(12):1430-1431.
- [8] 韩静,苏胜偶,李亚伟,等. 老年 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝血清 nesfatin-1 变化及其影响因素[J]. 临床输血与检验杂志, 2017, 19(2):158-161.
- [9] ZAMPETTI S, CAMPAGNA G, TIBERTI C, et al. High GADA titer increases the risk of insulin requirement in LADA patients: a 7-year follow up (NIRAD study 7) [J]. Eur J Endocrinol, 2014, 171(6):697-704.
- [10] 王竞,孙静,谢云,等. LADA 与 2 型糖尿病患者临床特点的比较[J]. 天津医科大学学报, 2011, 17(3):335-337.
- [11] 卢建强. 胰岛自身抗体及生化指标在成人隐匿性自身免疫性糖尿病诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2):238-240.
- [12] 徐新波. 糖化白蛋白检测在妊娠期血糖监测中的应用[J]. 临床输血与检验, 2014, 16(2):168-170.
- [13] 徐丽珍,王晓燕,朱丽萍. 胰岛 β 细胞自身抗体及 C 肽检测对成人迟发型糖尿病诊断的意义[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(3):293-294.
- [14] 李翠. 胰岛自身抗体测定对糖尿病分型的临床意义[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(1):85-86.
- [15] PIPI E, MARKETOU M, TSIROGIANNI A. Distinct clinical and laboratory characteristics of latent autoimmune diabetes in adults in relation to type 1 and type 2 diabetes mellitus[J]. World J Diabetes, 2014, 5(4):505-510.

(收稿日期:2019-03-18 修回日期:2019-07-26)