

· 技术与方法 ·

某院肺炎克雷伯菌产质粒 AmpC 酶基因型及耐药性研究

蔡 俊

(武警重庆总队医院检验科, 重庆 400061)

摘要:目的 调查该院临床分离肺炎克雷伯菌产质粒 AmpC 酶表型和基因型携带情况及其对常用抗生素的耐药性, 为临床合理用药提供参考。方法 采用 Vitek2-compact 全自动细菌鉴定药敏系统对临床分离菌株进行鉴定及药物敏感试验, 采用头孢西丁三维试验检测 AmpC 酶表型, 采用多重 PCR 方法检测 AmpC 基因并经 DNA 测序确定其基因型别。结果 2010 年 7 月至 2011 年 6 月共分离到 116 株肺炎克雷伯菌, 产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌占 18.1%(21/116)。产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌多重耐药情况严重, 对氨基糖甙类、喹诺酮类及大多数头孢菌素类抗菌药物的耐药率在 57.1%~100%, 对加酶抑制剂复合药氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、头孢哌酮/舒巴坦及哌拉西林/他唑巴坦的耐药率分别为 90.5%、85.7%、42.9%、38.1%, 所有菌株对碳青霉烯类抗生素亚安培南和美罗培南仍全部敏感。产 AmpC 酶菌株对头孢西丁、第 3 代头孢菌素及氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸等抗生素的耐药率明显高于不产酶株($P<0.05$)。21 株产酶菌株均携带 DHA-1 型 AmpC 酶基因。结论 该院肺炎克雷伯菌产 AmpC 酶株检出率较高, 产酶菌株多重耐药情况严重。临床应根据药敏结果合理选用抗菌药物, 以减少耐药菌株的产生。

关键词:肺炎克雷伯菌; AmpC 酶; 多重 PCR; 耐药性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.24.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)24-2510-03

Drug resistance and genotype of plasmid AmpC enzyme in *Klebsiella pneumoniae* in a hospital of Chongqing

Cai Jun

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force, Chongqing 400061, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence and genotypes of AmpC beta-lactamase produced by *Klebsiella pneumoniae* in our hospital, and analyze its antibiotic resistance. **Methods** The identification and antibiotics susceptibility of isolates were determined by the Vitek2-compact automatic microbial identification system. AmpC beta-lactamases was detected by three-dimensional extract test. Genotypes of AmpC beta-lactamases were determined by multiplex PCR and DNA sequencing. **Results** A total of 116 isolates were collected from Jul 2010 to Jun 2011. The AmpC beta-lactamase were detected in 21 isolates, accounting for 18.1%. The resistants of AmpC beta-lactamases-producing isolates to third-generation cephalosporins, aminoglycosides, and quinolones antibiotics were 57.1%-100%. The resistances to ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanate, cefoperazone/sulbactam, and piperacillin/tazobactam were 90.5%, 85.7%, 42.9%, 38.1%, respectively. All isolates were sensitive to imipenem and meropenem. The resistances of AmpC beta-lactamase positive strains to drugs such as ceftiofex, third-generation cephalosporins, ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanate were significantly higher than that of AmpC beta-lactamase negative strains. The genotypes of AmpC beta-lactamases in all 21 isolates were DHA-1 type. **Conclusion** The multiple drug resistance of AmpC producing *K. pneumoniae* in our hospital was serious and the ratio of AmpC beta-lactamases producing strains was higher. The antibiotic for the treatment of infection caused by AmpC producing *K. pneumoniae* should be used according to antibiotic susceptibility test results.

Key words: *klebsiella pneumoniae*; AmpC beta-lactamase; multiplex PCR; resistance

肺炎克雷伯菌是引起临床细菌感染最常见的革兰阴性杆菌之一。近年来的研究显示, 该菌对头孢曲松等第 3 代头孢菌素高度耐药, 对头霉素类及阿莫西林/克拉维酸等 β 内酰胺酶抑制剂复合药的耐药率也日益增高^[1-3], 其原因可能与这些耐药菌株不仅产生 ESBLs, 同时还产生对广谱 β 内酰胺类抗菌药物具有较强灭活作用的质粒型 AmpC 酶有关^[2-5]。及时、准确地检测临床产 AmpC 酶菌株, 对于指导临床合理应用抗菌药物, 减少耐药菌株的产生和播散具有重要的临床意义。现对本院临床分离的 116 株肺炎克雷伯菌的耐药性、AmpC 酶表型及基因型分布情况进行检测和分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2010 年 7 月至 2011 年 6 月重庆武警总队医院临床分离的无重复肺炎克雷伯菌 116 株, 其中呼吸道标本 85 株, 血液标本 11 株, 中段尿 10 株, 创面分泌物 6 株, 其他标本来源 4 株。以肺炎克雷伯菌 T015 作为 AmpC 酶检测阳性对照株, 以临床分离的对头孢菌素全部敏感的肺炎克雷伯菌株作为 AmpC 酶阴性对照株, 大肠埃希菌 ATCC25922 为药敏质控株。

1.2 病原菌的分离培养、鉴定及药敏试验 细菌的分离培养按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)进行, 采用常规生化试验及法国生物梅里埃 Vitek2-compact 细菌自动鉴定仪进行细菌的鉴定。药物敏感试验采用 Vitek2 革兰阴性杆菌药敏卡片 AST-GN13 检测, 头孢西丁、美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦采用纸片扩散法, 根据 CLSI2010、CLSI2011 标准判定药敏结果。MH 培养基及药敏纸片均为英国 Oxoid 公司产品。

1.3 AmpC 酶表型的检测 采用头孢西丁三维试验法。将头孢西丁耐药或中介的菌株加入 2 mL 胰蛋白胍水中于 37℃振荡培养过夜, 离心获取沉淀后加入 0.2 mL 蒸馏水, 混匀, -80℃及 37℃反复冻融 5 次, $15\,000\times g$ 4℃离心 10 min 提取上清液即为酶粗提物。试验时将大肠杆菌 ATCC25922 制成 0.5 麦氏单位浓度, 均匀涂布在 M-H 平板上, 平板中央贴上头孢西丁纸片, 距其 5 mm 处用无菌刀片分 4 个方向挖四条放射状沟槽, 分别加入 40 μ L 的试验株、阳性及阴性对照株的 AmpC 酶粗提取物, 35℃过夜培养后观察结果, 若狭缝与抑菌环交接处出现扩大生长区域, 则测试菌株产 AmpC 酶阳性。

1.4 AmpC 基因的 PCR 检测 采用质粒小量抽提试剂盒提

表 1 116 株肺炎克雷伯菌中产酶株与非产酶株的耐药率比较

抗菌药物	产 AmpC 酶株(n=21)		不产 AmpC 酶株(n=95)		χ^2	P
	耐药株数	耐药率(%)	耐药株数	耐药率(%)		
氨曲南	21	100	83	87.4	1.753	>0.05
氨苄西林	21	100	95	100	—	—
氨苄西林/舒巴坦	19	90.5	28	29.5	26.555	<0.01
阿莫西林/克拉维酸	18	85.7	26	27.4	24.868	<0.01
头孢替坦	21	100	13	13.7	61.843	<0.01
头孢西丁	21	100	13	13.7	61.843	<0.01
头孢他啶	16	76.2	26	27.4	17.748	<0.01
头孢曲松	18	85.7	53	55.8	6.486	<0.05
头孢噻肟	18	85.7	53	55.8	6.486	<0.05
头孢吡肟	9	42.9	29	30.5	1.187	>0.05
头孢唑啉	19	90.5	58	61.1	6.672	<0.05
哌拉西林	20	95.2	87	91.6	0.014	>0.05
哌拉西林/他唑巴坦	8	38.1	30	31.6	0.332	>0.05
头孢哌酮/舒巴坦	9	42.9	29	30.5	1.187	>0.05
复方新诺明	14	66.7	39	41.1	4.547	<0.05
妥布霉素	11	52.4	48	50.5	0.024	>0.05
左旋氧氟沙星	12	57.1	51	53.7	0.083	>0.05
环丙沙星	13	61.9	52	54.7	0.359	>0.05
庆大霉素	13	61.9	51	53.7	0.470	>0.05
阿米卡星	12	57.1	46	48.4	0.523	>0.05
美罗培南	0	0	0	0	—	—
亚安培南	0	0	0	0	—	—

—:表示无数据。

取细菌质粒 DNA,于-20℃保存备用。参照文献[6]合成 6 对 AmpC 基因通用引物,多重 PCR 扩增产 AmpC 酶菌株的 AmpC 基因。PCR 反应体系:Mg²⁺ 浓度 1.5 μmol/L,dNTP 200 μmol/L,TaqE 1.5 U,0.6 μmol/L 的引物 MOXMF、MOXMR、CITMF、CITMR、DHAMF 和 DHAMR;0.5 μmol/L 的 ACCMF、ACCMR、EBCMF、EBCMR;0.4 μmol/L 的 FOXMF 和 FOXMR,模板 200 ng,10×buffer 2.5 μL,加去离子水至 25 μL。反应条件:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,25 个循环;然后 72℃延伸 5 min。对 PCR 反应出现扩增条带的菌株,再用 6 对单一引物分别对该模板进行 PCR 反应。以肺炎克雷伯菌 T015 作为阳性对照株。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察分析结果。质粒小量抽提试剂盒、DNA Marker、TaqDNA 聚合酶等 PCR 试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.5 AmpC 基因基因分型 PCR 产物纯化和测序由上海生工生物工程有限公司进行,测序结果在 GenBank 上经 BLAST 系统与已知的 AmpC 基因序列进行对比,确定基因型别。

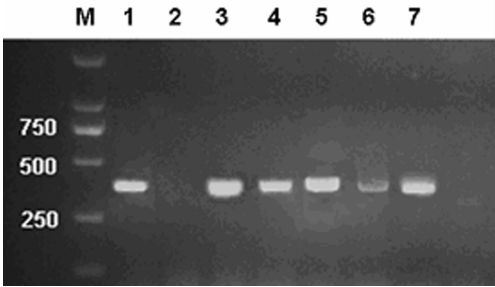
2 结 果

2.1 质粒型 AmpC 酶检出率 在分离到的 116 株肺炎克雷伯菌中,酶提取物头孢西丁三维试验检测,21 株 AmpC 酶阳性,产酶阳性率为 18.1%。21 株产酶菌株,其中 16 株分离自痰液,3 株来源于尿液,创面分泌物 1 株,血液标本 1 株。

2.2 质粒型 AmpC 基因分型 对 21 株产酶菌株,进行 AmpC 基因多重 PCR 扩增及 DHA 型单一引物 PCR 扩增,均扩增出一条约 405 bp 大小阳性条带。电泳结果见图 1。对 21 株菌 AmpC 基因 PCR 扩增产物进行测序,测序结果在 GenBank 中经 BLAST 软件分析,结果均与 GenBank 注册号为 HM193083.1 的 blaDHA-1 基因序列完全相一致。

2.3 肺炎克雷伯菌分离株的耐药情况 116 株肺炎克雷伯菌对抗生素的耐药情况见表 1。21 株产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌多重耐药情况较严重,对头孢菌素类、氨基糖甙类和喹诺酮类

抗生素均高度耐药,耐药率在 50%以上(第 4 代头孢菌素头孢吡肟除外,耐药率为 33.3%),对加酶抑制剂复合药氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸的耐药率也高于 85%,对头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦耐药率稍低,分别为 42.9%、38.1%,但对碳青霉烯类抗生素亚安培南和美罗培南仍全部敏感。产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌对氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、头孢替坦、头孢西丁和头孢他啶 5 种抗生素的耐药率远高于不产酶菌株(P<0.01),对头孢曲松、头孢噻肟、头孢唑啉和复方新诺明 4 种抗生素的耐药率也高于不产酶菌株(P<0.05),而对其余 13 种抗生素两组耐药率比较,差异无统计学意义(P>0.05)。



M:DNA Marker;1:阳性对照;2:阴性对照;3~7:临床分离产酶株。

图 1 部分菌株 AmpC 基因 PCR 产物电泳图

3 讨 论

AmpC 类 β 内酰胺酶是近年来继 ESBLs 之后出现的革兰阴性杆菌对新型 β 内酰胺酶类抗生素产生耐药的另—重要机制[7]。该酶不仅能水解第 1~3 代头孢菌素及头霉素,且不被临床上现有的 β 内酰胺酶抑制剂所抑制,同时,由质粒介导的 AmpC 酶基因能在同种或不同种属细菌间传播,极易造成耐药性的播散,从而给临床抗感染带来了巨大的困难[8-9]。

本研究对临床分离的 116 株肺炎克雷伯菌进行 AmpC 酶

检测,其中 21 株确证产 AmpC 酶,产酶阳性率为 18.1%,与张运丽^[9]和美国 Rajni 等^[10]的报道结果相近,高于泰国 Singtohin 等^[11]报道的 0.8%、日本 Yamasaki 等^[12]报道的 0.13%以及崔雪萍等^[3]2.8%的报道,但低于韩国 Yoo 等^[13]39.3%和董方等^[8]38.9%的报道。质粒介导的 AmpC 酶自 1989 年发现至今已报道有 30 余种基因型,且其数目还在不断增加。不同国家、不同地区 AmpC 酶的流行情况及其基因型别也有所差异。目前,全球流行最多的 AmpC 酶基因型是 CMY-2,主要分布在法国、德国、西班牙等国^[14],在美国以 ACT-1 基因型为主,其次为 FOX-5 型,法国、德国等欧洲国家以 CMY-2 型为主,在韩国及日本以 DHA-1 型为主^[4,15]。在国内文献报道肺炎克雷伯菌产 AmpC 酶以 DHA-1 基因型为主^[7-8],其他基因型如 CMY-2、ACT-1 等亦有发现^[16-17]。本研究 21 株产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌均为 DHA-1 基因型,与董方等^[8]、张运丽等^[9]、Yoo 等^[13]的报道相一致。

近年来的研究报道^[7-9]显示,肺炎克雷伯菌不仅对第 3 代头孢菌素高度耐药,而且对 β 内酰胺酶抑制剂复合药以及头霉素等抗菌药物的耐药情况也日益严重,其原因可能与质粒介导的 AmpC 酶有关,产酶菌株对常用抗菌药物的耐药性通常高于非产酶菌株。本研究结果显示,21 株产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌多重耐药情况较严重,对第 3 代头孢菌素、头孢西丁、氨曲南以及哌拉西林的耐药率在 76%~100%,对氨基糖甙类和喹诺酮类抗菌药物的耐药率也在 50%以上,对酶抑制剂复合药氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸的耐药率高于 85%,但对头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦以及第 4 代头孢菌素头孢吡肟的耐药率稍低,分别为 42.9%、38.1%、33.3%,对碳青霉烯类抗菌药物亚安培南和美罗培南仍全部敏感。经统计学分析,产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌对氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、头孢替坦、头孢西丁和头孢他啶的耐药率远高于不产 AmpC 酶菌株($P<0.01$),对头孢曲松、头孢噻肟、头孢唑啉和复方新诺明的耐药率也高于不产酶株($P<0.05$),而对氨基糖甙类、喹诺酮类以及碳青霉烯类等 13 种抗菌药物耐药率差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究结果表明,肺炎克雷伯菌中 AmpC 酶的携带,是导致该菌对 β 内酰胺酶类抗菌药物高度耐药的重要机制之一,对产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌感染的治疗,应首选碳青霉烯类抗菌药物。

总之,本院临床分离肺炎克雷伯菌产 AmpC 酶株检出率较高,产酶菌株多重耐药情况严重,临床应根据药敏结果合理选用抗菌药物,以减少耐药菌株的产生。亚安培南和美罗培南可经验用于产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌感染的治疗。及时了解本地区肺炎克雷伯菌 AmpC 酶携带情况及耐药特征,加强产酶菌株的监测,对于指导临床合理使用抗菌药物和有效地控制耐药菌株的播散和流行具有十分重要的临床意义。

参考文献:

- [1] 杨启文,王辉,徐英春,等.中国教学医院细菌耐药监测研究及现状介绍[J].中国临床药理学杂志,2008,24(6):570-573.
- [2] 周庆,吕火祥,许玲英.同产 ESBLs 及 AmpC 酶肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(1):11-13.
- [3] 崔雪萍,李连青,戎建荣,等.肺炎克雷伯菌产 ESBL 和 AmpC 酶菌株基因分型[J].中华检验医学杂志,2010,33(3):262-264.
- [4] Yoon YK,Cheong HW,Pai H,et al. Molecular analysis of

a prolonged spread of *Klebsiella pneumoniae* co-producing DHA-1 and SHV-12 β -lactamases[J]. J Microbiol,2011,49(3):363-368.

- [5] Lee CH,Su LH,Li CC,et al. Microbiologic and clinical implications of bacteremia due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with or without plasmid-mediated AmpC beta-lactamase DHA-1[J]. Antimicrob Agents Chemother,2010,54(12):5395-5398.
- [6] Perez-Perez FJ,Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol,2002,40(6):2153-2162.
- [7] Jacoby GA. AmpC beta-lactamases[J]. Clin Microbiol,2002,40(1):161-182.
- [8] 董方,徐桦巍,宋文琪.临床分离大肠埃希菌和克雷伯菌质粒介导 AmpC β 内酰胺酶的研究[J].中华医学杂志,2010,90(38):2723-2725.
- [9] 张运丽,陈振华,刘文恩.产质粒介导 AmpC 酶肺炎克雷伯菌的基因型分析与耐药性检测[J].中华医院感染学杂志,2010,20(23):3641-3644.
- [10] Rajni E,Rawat U,Malhotra VL,et al. Occurrence and detection of AmpC beta lactamases among clinical isolate of *E. coli* and *K. pneumoniae* causing UTI[J]. J Commun Dis,2008,40(1):21-25.
- [11] Singtohin S,Chanawong A,Lulitanond A,et al. CMY-2, CMY-8b, and DHA-1 plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a university hospital, Thailand[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2010,68(3):271-277.
- [12] Yamasaki K,Komatu M,Abe N,et al. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan[J]. J Clin Microbiol,2010,48(9):3267-3273.
- [13] Yoo JS,Byeon J,Yang J,et al. High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from long-term care facilities in Korea[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2010,67(3):261-265.
- [14] Rodríguez-Baño J,Miró E,Villar M,et al. Colonisation and infection due to Enterobacteriaceae producing plasmid-mediated AmpC β -lactamases[J]. J Infect,2012,64(2):176-183.
- [15] Muratani T,Kobayashi T,Matsumoto T. Emergence and prevalence of beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to cepheims in Japan[J]. Int J Antimicrob Agents,2006,27(6):491-499.
- [16] 姚丽英,李国保,李沛,等.呼吸重症监护室产质粒介导 AmpC 酶和 ESBLs 细菌的耐药性及基因型[J].中国感染控制杂志,2011,10(2):92-96.
- [17] 卢月梅,张阮章,李红林,等.头孢西丁耐药肺炎克雷伯菌 AmpC 基因和 ESBLs 检测及耐药性分析[J].中国微生态学杂志,2010,22(7):61-63.