

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.008

呼吸道肺炎克雷伯菌耐药性与 CTX-M 型 ESBLs 的研究*

钟如柱¹,许志明¹,喻云梅²,刘军²,赵祖国²

(1. 广东省廉江市人民医院呼吸内科 524400; 2. 广东医学院病原生物学实验室, 广东湛江 524023)

[摘要] **目的** 探讨来源于呼吸道肺炎克雷伯菌(KP)耐药性与 CTX-M 型超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)的关系。**方法** 采用 PCR 扩增和测序分析检测 KP 质粒和染色体上的 CTX-M 型 ESBLs 基因;采用纸片扩散法检测抗菌药物敏感性;使用 χ^2 检验分析相关数据。**结果** 有 CTX-M-1 群酶和 CTX-M-25 群酶检出,CTX-M 型 ESBLs 的总检出率为 39.02%(48 株),其中质粒和染色体上同时携带 CTX-M-1 群酶的检出率为 26.02%(32 株)。β-内酰胺类抗菌药物头孢唑林、氟喹诺酮类抗菌药物左旋氧氟沙星、磺胺类抗菌药物复方磺胺甲恶唑等在 CTX-M 型 ESBLs 阳性组的耐药率明显高于阴性组($P < 0.05$)。**结论** 在来源于呼吸道的 KP 中,在质粒和染色体上同时携带 CTX-M-1 群酶基因最常见,CTX-M 型 ESBLs 与 KP 对某些抗菌药物产生耐药性关系密切。

[关键词] 呼吸道感染;肺炎克雷伯菌;超广谱 β-内酰胺酶**[中图分类号]** R446**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)27-3768-04

Study on the resistance of klebsiella pneumoniae which come from respiratory tract and CTX-M ESBLs*

Zhong Ruzhu¹, Xu Zhiming¹, Yu Yunmei², Liu Jun², Zhao Zuguo²

(1. Department of Respiratory Medicine, the People's Hospital of Lianjiang, Lianjiang, Guangdong 524400, China;

2. Laboratory of Pathogen Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the resistance of klebsiella pneumoniae(KP) which come from respiratory tract and CTX-M extended spectrum β-lactamase(ESBLs). **Methods** Detecting CTX-M ESBLs genes in the plasmid and chromosomes were used by PCR and sequence analysis; Disk diffusion method was used by antibiotics susceptibility test; Chi square test was used by analytic the data. **Results** CTX-M-1 ESBLs and CTX-M-25 ESBLs were detected in the KP and the total detection rate of CTX-M ESBLs was 39.02%(48 strains), the detection rate of CTX-M-1 ESBLs was 26.02%(32 strains) which existence in the plasmid and chromosomes simultaneously. The resistance rate of β-lactam antibiotic cefazolin, fluoroquinolone antibiotic levofloxacin and sulfonamides antibiotic bactrim and so on in positive group of CTX-M ESBLs were significantly higher than negative group of CTX-M ESBLs($P < 0.05$). **Conclusion** CTX-M-1 ESBLs gene which concurrent in the plasmid and chromosomes may be the most common. KP resistance to certain antibiotics closely is relate to the CTX-M ESBLs.

[Key words] respiratory tract infections; klebsiella pneumoniae; extended spectrum β-lactamase

肺炎克雷伯菌(klebsiella pneumoniae, KP)是引起呼吸道感染常见的革兰阴性杆菌,根据全国细菌耐药监测网统计, KP 的检出率在肠杆菌科细菌中排列第 2,仅次于大肠埃希菌,其对多种抗菌药物表现耐药^[1]。非透射电镜(TEM)型超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)和非 SHV 型 ESBLs 起源的 CTX-M 型 ESBLs,是我国目前最常见、最主要的 ESBLs,常见的亚群有 CTX-M-1 群、CTX-M-2 群、CTX-M-8 群、CTX-M-9 群和 CTX-M-25 群,是造成 KP 对 β-内酰胺类抗菌药物产生耐药的重要原因^[2-3]。值得注意的是,CTX-M 型 ESBLs 在各地的携带率、种类、位置等均不一致,为了解本地区引起呼吸道感染的 KP 的耐药性与 CTX-M 型 ESBLs 的关系,本研究通过检测 CTX-M 型 ESBLs 在来源于呼吸道 KP 质粒和染色体上的流行现状和 KP 的耐药性,探讨 CTX-M 型 ESBLs 与 KP 耐药性的关系,为治疗 KP 引起的呼吸道感染提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 123 株非重复 KP 来源于 2013 年 10 月至 2014 年 10 月广东省廉江市人民医院和广东医学院第二附属医院临床送检的痰标本,其中肺源性 KP 54 株;抗菌药物敏感性试验的质控株大肠埃希菌 ATCC25922 和各类 CTX-M 型 ESBLs 阳性株均由广东医学院病原生物学实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 染色体和质粒 DNA 的制备 采用 ESBLs 检测试剂盒检测 KP 的产 ESBLs 情况,试剂盒购自杭州天和微生物试剂公司。参考文献[4],采用变温十二烷基硫酸钠(SDS)消除法消除产 ESBLs 株的质粒后(确认消除效果:质粒抽提,电泳检测消除结果),采用基因组提取试剂盒提取细菌染色体 DNA,质粒 DNA 直接采用质粒提取试剂盒提取,试剂盒均购自大连宝生物有限公司,并用核酸蛋白检测仪(BECHMA, DU730)检

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81301473);湛江市财政资金科技专项(2013A01007);湛江市科技攻关项目(2014BO1184);湛江市科技攻关计划(2012C3106022);广东医学院面上项目(M2012005)。 作者简介:钟如柱(1981-),本科,主治医师,主要从事呼吸道病原菌的耐药机制研究。

表 1 用于扩增 CTX-M 型 ESBLs 基因的引物

基因	引物	GenBank 登陆号	退火温度(°C)	产物大小(bp)
CTX-M-1	ATC ACT GCG TCA GTT CAC GC	FJ235693.1	59	773
	GAA TCA GCG GCG CAC GAT CT			
CTX-M-2	AAA GTT CGG GAG GTC GGC TTG	KC770994.1	5	577
	ACT ACC CAT GAT TTC GGC AGA			
CTX-M-8	GGT TGG GAG TGG CGC TGA TT	AB543595.1	56	359
	ATC GAG CCG GAA GGT GTT AT			
CTX-M-9	ATA CCC GAG GCG CGA CAG A	AJ416345.1	61	467
	CCA GCG TCA TTG TGC CGT TGA			
CTX-M-25	TTG TTG AGT CAG CGG GTT GA	AF518567.2	57	497
	GCG CGA CCT TCC GGC CAA AT			

测 DNA 的浓度及纯度,合格后于-20 °C 保存。

1.2.2 CTX-M 基因的检测 根据 GenBank 中的所提供的序列,运用 oligo 及 premier5.0 软件设计各类 CTX-M 型 ESBLs 的特异引物,并由上海生工合成。分别以质粒 DNA 和染色体 DNA 为模板,PCR 检测质粒和染色体上的各类 CTX-M 型 ESBLs 基因,PCR 试剂盒购自大连宝生物有限公司。引物序列等情况见表 1。

1.2.3 TA 克隆、转化及 DNA 系列分析 挑选目的 PCR 产物,采用 PCR 产物快速回收试剂盒(大连宝生物有限公司)纯化 PCR 产物,随后采用超级感受态细菌制备试剂盒(碧云天生物技术研究所)进行制备感受态细菌(DH5 α 大肠埃希菌)。载体为 PMDTM18-T 载体(大连宝生物有限公司),严格按照相关试剂盒说明书操作,并把菌液送上海生工测序。利用 Chromas 软件,把所测的结果与 GeneBank 数据库进行比对分析,以确定耐药基因类型。

1.2.4 抗菌药物敏感性试验 采用纸片扩散法测定 123 株 KP 对 14 种临床常用抗菌药物的敏感性。试验结果判断参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)的标准^[5],各种抗菌药物纸片等购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件分析数据,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验分析相关数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CTX-M 型 ESBLs 基因的检测结果 产 ESBLs 株共 57 株(46.34%),CTX-M 型 ESBLs 基因的检出率为 39.02%(48 株),占 ESBLs 阳性的 84.21%(48/57),其中 CTX-M-1 型 ESBLs 的检出率为 38.21%(47 株),CTX-M-25 型 ESBLs 的检出率为 3.25%(4 株),CTX-M-2 型 ESBLs 基因、CTX-M-8 型 ESBLs 基因、CTX-M-9 型 ESBLs 基因的检出率均为 0。基因存在的位置分别为仅在质粒上、仅在染色体上、同时在质粒和染色体上。通过 χ^2 分析可知,肺源性 KP 与非肺源性 KP 之间的基因检出率、基因类型、基因位置、耐药性的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、图 1、图 2。

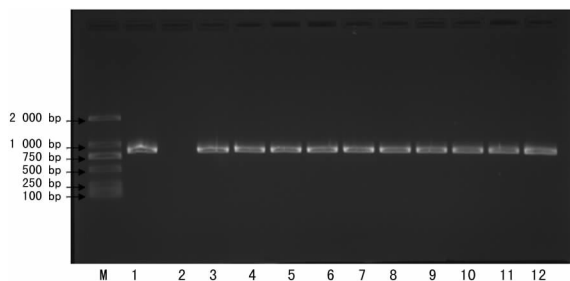
2.2 抗菌药物敏感性试验 根据 CTX-M 型 ESBLs 的检出情况和是否是肺源性 KP 进行分组,第 1 组为 CTX-M 型 ESBLs 阳性组($n=48$),第 2 组为 CTX-M 型 ESBLs 阴性组($n=75$),第 3 组为肺源性 KP 组($n=54$),第 4 组为非肺源性 KP 组($n=$

69)。耐药结果见表 3。

表 2 肺源性 KP 与非肺源性 KP 的 CTX-M 型 ESBLs 基因检测情况[n(%)]

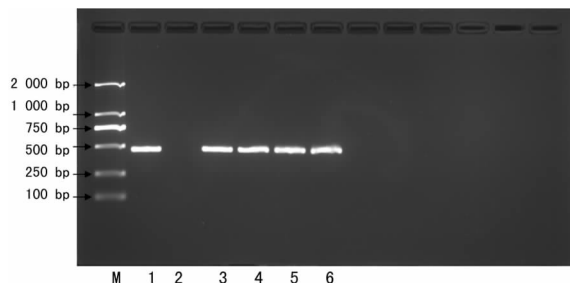
基因	位置	肺源性 KP	非肺源性 KP
		($n=54$)	($n=69$)
CTX-M-1	仅在质粒上	3(5.56)	5(7.25)
CTX-M-1	仅在染色体上	2(3.70)	2(2.90)
CTX-M-1	同时在质粒和染色体上	18(33.33)	14(20.29)
CTX-M-25	仅在质粒上	0	1(1.45)
CTX-M-1 + CTX-M-25	同时在质粒和染色体上 + 染色体	1(3.89)	2(2.90)

M:Marker(100~2 000 bp);1:阳性对照;2:阴性对照;3~12:实验菌株。



M:Marker(100~2 000 bp);1:阳性对照;2:阴性对照;3~12:实验菌株。

图 1 CTX-1 型 ESBLs 基因的 PCR 产物电泳图



M:Marker(100~2 000 bp);1:阳性对照;2:阴性对照;3~12:实验菌株。

图 2 CTX-25 型 ESBLs 基因的 PCR 产物电泳图

表 3 123 株 KP 对 14 种常用抗菌药物的耐药结果[n(%)]

抗菌药物	第 1 组(n=48)	第 2 组(n=75)	第 3 组(n=54)	第 4 组(n=69)
氨苄青霉素	48(100.00)	75(100.00)	54(100.00)	69(100.00)
头孢唑啉	40(83.33) ^a	43(57.33)	33(61.11)	50(72.46)
头孢西丁	34(70.83)	45(60.00)	35(64.81)	44(63.77)
头孢呋辛	35(72.92) ^a	33(44.00)	28(51.85)	40(57.97)
头孢他啶	26(54.17) ^a	26(34.67)	28(51.85)	24(34.78)
头孢噻肟	37(77.08) ^a	39(52.00)	31(57.41)	45(76.27)
头孢吡肟	23(47.92)	40(53.33)	25(46.30)	38(55.07)
氨基南	29(60.42) ^a	30(40.00)	29(53.70)	30(43.48)
哌拉西林/他唑巴坦	14(29.17)	12(16.00)	11(20.37)	15(21.74)
头孢哌酮/舒巴坦	6(12.50)	5(6.67)	4(7.41)	7(10.14)
亚胺培南	1(2.08)	0	0	1(1.45)
左旋氧氟沙星	20(41.67) ^a	17(22.67)	14(25.93)	23(33.33)
丁胺卡那	4(8.33)	3(4.00)	5(9.26)	2(2.90)
复方磺胺甲恶唑	38(79.17) ^a	40(53.33)	31(57.41)	47(68.12)

^a: $P < 0.05$, 与第 2 组同指标比较。

3 讨 论

ESBLs 在 KP 的检出率(46.34%)较伊朗报道的 59.20% 低,较北京等报道的 32.21% 高,但 CTX-M 型 ESBLs 基因占 ESBLs 的比率(84.21%)却高于伊朗的 23.90%,而与北京等地的 84.80% 相近^[6-7]。流行的 CTX-M 型 ESBLs 以 CTX-M-1 群酶为主(38.21%),这与我国湖北、印度南部相同^[8-9],而不同于巴西累西腓市是以 CTX-M-2 群酶为主^[10]。本地区只有 CTX-M-1 群酶和 CTX-M-25 群酶,但在巴西却可检测出 CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8 和 CTX-M-9 群酶^[11],提示在呼吸道来源的 KP 中,其产 ESBLs、携带 CTX-M 型 ESBLs 基因的情况均有地区差异性,这可能与各地区使用抗菌药物习惯或检测方法等不同有关。鉴于各类型 CTX-M 型 ESBLs 在 KP 中造成耐药程度等不同^[12],为了更好掌握来源于呼吸道 KP 的耐药形势,应加强 CTX-M 型 ESBLs 的检测和研究。

CTX-M 型 ESBLs 基因既可以位于质粒上又可以位于染色体上^[13]。表 2 显示,KP 上 CTX-M 型 ESBLs 基因的位置有 3 处:一处位于染色体上,二处位于质粒上,三处在染色体和质粒同时存在,并且以同时存在于质粒和染色体上最为常见,其中 CTX-M-1 同时存在于质粒和染色体上的菌株占 CTX-M 型 ESBLs 阳性株的 72.92%[(14+18+2+1)/48],这为 CTX-M-1 型 ESBLs 的播散提供便利的条件。突尼斯曾经出现位于质粒或染色体上的 CTX-M 型 ESBLs 在可移动遗传因子 ISEcpI 的作用下,使 CTX-M 型 ESBLs 基因在质粒与质粒中、质粒与染色体中、染色体与质粒中播散开来^[14]。CTX-M-25 群酶基因则主要存在染色体上,这与以色列存在于质粒上不同^[15]。值得注意的是,CTX-M-1 群酶和 CTX-M-25 群酶同时存在于一株 KP 的菌株已出现。提示随着抗菌药物在临床上的广泛使用,以及抗菌药物在畜牧业上应用日益频繁,细菌携带的耐药基因种类将会越来越多。临床应加强检测,防止耐药菌传播。

多种 β -内酰胺类抗菌药物(如头孢唑啉、头孢他啶等)在 CTX-M 型 ESBLs 阳性组的耐药率明显高于 CTX-M 型 ESBLs

阴性组($P < 0.05$),提示 KP 对某些 β -内酰胺类抗菌药物产生的耐药性与 CTX-M 型 ESBLs 关系密切,但头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦等在 CTX-M 型 ESBLs 阳性组与阴性组间的耐药率差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能与第 4 代头孢菌素类抗菌药物对 β -内酰胺酶比较稳定、CTX-M 型 ESBLs 可以被 β -内酰胺酶抑制剂抑制有关^[16]。目前 KP 往往同时携带多种耐药基因,其耐药表型是几种耐药机制共同作用的结果,这可能也是原因之一^[11-17]。CTX-M 型 ESBLs 最主要的特征就是大部分 CTX-M 型 ESBLs(除 CTX-M-6、CTX-M-15 和 CTX-M-19 外)对头孢噻肟的水解力高于头孢他啶,但在西班牙发现,一些 CTX-M 型 ESBLs 突变体水解头孢他啶的能力和水解头孢噻肟的能力一样强,CTX-M-1 型酶突变体的这种变化最明显^[18]。表 3 显示,头孢他啶和头孢噻肟的耐药率相差明显,提示本地区的 CTX-M-1 并未突变,但也应注意这方面的动向。

值得注意的是,喹诺酮类抗菌药物左旋氧氟沙星和磺胺类抗菌药物复方磺胺甲恶唑在 CTX-M 型 ESBLs 阳性组的耐药率也明显高于阴性组($P < 0.05$),这可能与携带 CTX-M 型 ESBLs 阳性株经常同时携带抗喹诺酮类抗菌药物基因和抗磺胺类抗菌药物基因有关^[17]。值得一提的是,通过 χ^2 分析可知,肺源性 KP 与非肺源性 KP 之间的基因检出率、基因类型、基因位置、耐药性的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

综上所述,在呼吸道来源的 KP 中,其携带 CTX-M 型 ESBLs 基因常见,而且位置多样化,并以 KP 耐药性关系密切。为了更好地治疗 KP 引起的呼吸道感染,应重视 CTX-M 型 ESBLs 的研究和检测。

参考文献

- [1] 肖永红,沈萍,魏泽庆,等. Mohnarin 2011 年度全国细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(22):4946-4952.

- [2] Liu L, Wang X, An S, et al. Genetic environment of β -lactamase genes of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with lower respiratory tract infection in China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(13):2445-2450.
- [3] Lahlaoui H, Benhajhalifa A, Benmoussa M. epidemiology of enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase(ESBL)[J]. *Med Mal Infect*, 2014, 44(9):400-404.
- [4] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[J]. *Clin and Laboratory Stand Inst*, 2013, 129(1):M100-S22.
- [5] 张卓然, 夏梦岩, 倪语星, 等. 微生物耐药的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:240-241.
- [6] Ghafourian S, Bin Sekawi Z, Sadeghifard N, et al. The prevalence of ESBLs producing *klebsiella pneumoniae* isolates in Some major hospitals, Iran[J]. *Open Microbiol J*, 2011, 5:91-95.
- [7] An S, Chen J, Wang Z, et al. Predominant characteristics of CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with lower respiratory tract infection in multiple medical centers in China[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 332(2):137-145.
- [8] Li B, Li M, Qu L, et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric inpatients with respiratory tract infections at a teaching hospital in China[J]. *Scand J Infect Dis*, 2014, 46(3):200-203.
- [9] Mohamudha Parveen R, Manivannan S, Harish BN, et al. Study of CTX-M type of extended spectrum β -Lactamase among nosocomial isolates of *escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* in South India[J]. *Indian J Microbiol*, 2012, 52(1):35-40.
- [10] Cabral AB, Melo Rde C, Maciel MA, et al. Multidrug resistance genes, including bla(KPC) and bla(CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2012, 45(5):572-578.
- [11] Chagas TP, Alves RM, Vallim DC, et al. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil[J]. *Braz J Infect Dis*, 2012, 15(5):420-425.
- [12] Shin J, Kim DH, Ko KS. Comparison of CTX-M-14-and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with bacteremia[J]. *J Infect*, 2011, 63(1):39-47.
- [13] Coelho A, González-López JJ, Miró E, et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(1):73-78.
- [14] Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, et al. Occurrence of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* harboring chromosomally mediated and plasmid-mediated CTX-M-15 β -lactamase in a Tunisian hospital[J]. *Can J Microbiol*, 2012, 58(9):1099-1103.
- [15] Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, et al. Dissemination of the CTX-M-25 family beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and identification of the novel enzyme CTX-M-41 in *Proteus mirabilis* in Israel[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62(2):289-295.
- [16] Perez F, Endimiani A, Hujer KM, et al. The continuing challenge of ESBLs[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7(5):459-469.
- [17] Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, et al. Emergence of *klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2014, 44(3):260-262.
- [18] Novais A, Cantón R, Coque TM, et al. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(7):2377-2382.

(收稿日期:2015-03-08 修回日期:2015-05-10)

(上接第 3767 页)

- papillomavirus 16 E5 modulates the expression of host microRNAs[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e21646.
- [13] Yu Y, Zhang Y, Zhang S. MicroRNA-92 regulates cervical tumorigenesis and its expression is upregulated by human papillomavirus-16 E6 in cervical cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2):468-474.
- [14] Zheng ZM, Wang XH. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses[J]. *Biochim et Biophys Acta*, 2011, 1809(11/12):668-677.
- [15] Gocze K, Gombos K, Juhasz K, et al. Unique microRNA expression profiles in cervical cancer[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(6):2561-2567.

(收稿日期:2015-03-010 修回日期:2015-05-16)