

多重耐药菌中 β -内酰胺酶的基因型研究*

陈定强, 彭玉婷, 罗毓婷, 徐韞健, 林勇平, 杨 玲[△] (广州医学院第一附属医院检验科 510120)

【摘要】 目的 调查 β -内酰胺酶在临床分离的多重耐药大肠杆菌和肺炎克雷伯菌中的流行状况, 并分析不同基因型的分布特征。**方法** 针对 2009~2010 年间收集的 59 株多重耐药大肠杆菌和肺炎克雷伯菌, 采用 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪检测大肠杆菌和肺炎克雷伯菌对抗菌药物的耐药性。用煮沸法提取菌株的总 DNA, 并用多重聚合酶链反应(PCR)对 21 种 β -内酰胺酶基因进行检测。**结果** 59 株多重耐药菌对青霉素类、头孢菌素类和喹诺酮类抗菌药物耐药性非常严重, 耐药率均达 90% 以上。多重 PCR 共检出含 TEM 基因菌株 32 株, CTX-M-G9 基因 31 株, SHV 基因 27 株, CTX-M-G1 基因 19 株, CTX-M-G2 基因 14 株, DHA 基因 4 株, MOX 基因 2 株, CMY 基因、OXA-1 基因和 ACT 基因各 1 株。未检测到含 GES、VEB、IMP、VIM、KPC、CTX-M-G8/25、ACC、FOX、PER、OXA-48 等基因的菌株, 多个菌株发现携带两种以上耐药基因。**结论** 多重耐药菌中 β -内酰胺酶种类分布非常广泛, 其中以 TEM、CTX-M 和 SHV 基因最为常见, 某些菌株同时携带多种 β -内酰胺酶基因, 临床进行抗菌治疗时应引起重点关注。

【关键词】 多重耐药菌; β -内酰胺酶; 基因型

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 01. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)01-0001-03

Study on β -lactamase genotypes in multi-drug resistant bacterial isolates* CHEN Ding-qiang, PENG Yu-ting, LUO Yu-ting, XU Yun-jian, Lin Yong-ping, YANG Ling[△] (Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangdong 510120, China)

【Abstract】 Objective To investigate the prevalence and genotype distribution of β -lactamases in multi-drug resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates. **Methods** Fifty-nine multi-drug resistant E. coli and K. pneumoniae strains were isolated between 2009 and 2010. Antimicrobial susceptibility was detected by VITEK-2 automated bacterial analyzer. The total DNA was extracted by boiling methods and 21 β -lactamase genotypes were detected by polymerase chain reaction(PCR). **Results** Resistance to penicillins, cephalosporins and quinolones were detected in more than 90% of the strains. No Imipenem resistant strains were detected. TEM, CTX-M-G9, SHV, CTX-M-G1, CTX-M-G2, DHA, MOX, CMY, OXA and ACT genes were detected in 32, 31, 27, 19, 14, 4, 2, 1, 1, 1 of the 59 multi-drug resistant isolates, respectively. Strains positive for GES, VEB, IMP, VIM, KPC, CTX-M-G8/25, ACC, FOX, PER and OXA-48 were not detected. **Conclusion** β -lactamase genes were commonly identified among multi-drug resistant bacteria, and TEM, CTX-M and SHV genes were found with the highest frequency. Some of these bacteria carried several β -lactamase genes in one strain, and attentions should be highly paid in antimicrobial therapy against these bacteria.

【Key words】 multi-drug resistant bacteria; β -lactamase; genotype

细菌产生 β -内酰胺酶是革兰阴性杆菌耐 β -内酰胺类抗菌药物最普遍的机制, β -内酰胺酶相关基因赋予细菌编码对应酶的能力^[1]。由于 β -内酰胺类抗菌药物在临床上的广泛使用, 产 β -内酰胺酶的菌株也变得越来越常见, 并在选择和进化压力中产生多种不同的酶基因型^[2]。这些基因还往往与其他耐药相关基因(如喹诺酮类耐药基因和磺胺类耐药基因等)共同存在, 导致细菌产生多重耐药性^[3]。本研究收集 59 株临床分离的多重耐药菌, 通过多重聚合酶链反应(PCR)法检测其携带的 β -内酰胺酶基因类型, 分析 β -内酰胺酶基因在多重耐药菌中的分布特征, 为进一步研究和控制细菌耐药性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 研究菌株为 2009~2010 年广州医学院第一附属医院临床分离的 59 株多重耐药菌, 包括 29 株大肠杆菌和 30 株肺炎克雷伯菌。其中分离自尿液标本的 32 株, 痰液标本 19 株, 血液标本 7 株, 脓液标本 1 株。细菌鉴定与药敏试验的

质控菌株为大肠杆菌 ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.2 仪器与试剂 VITEK2 全自动微生物分析仪、细菌鉴定卡与药敏卡为 BioMerieux 公司产品, PCR 仪为 Eppendorf 公司产品, 核酸电泳仪与凝胶成像仪为 BioRad 公司产品。MH 培养基和药敏纸片由 Oxoid 公司提供。PCR 扩增反应混合体系为 Takara 公司产品, DNA 分子标记物购自 Tiangen 公司, 琼脂糖购自 Biowest 公司。

1.3 细菌总 DNA 的提取 采用煮沸法提取细菌总 DNA。挑取平板上的一个单菌落, 重悬于 300 μ L 双蒸水中。置沸水浴中孵育 10 min 后, 13 500 r/min 离心 5 min, 吸取上清液至新的微量离心管中, 作为 PCR 反应的 DNA 模板。

1.4 PCR 引物 PCR 引物序列见表 1, 所有引物由上海英潍捷基公司合成。

1.5 β -内酰胺酶基因的检测 按照文献[4]报道的方法, 用单

* 基金项目: 广州医学院青年基金项目(2010A13 和 2010A14)。[△] 通讯作者, E-mail: jykresearch@126.com。

重和多重 PCR 法对 21 种 β -内酰胺酶基因进行检测。PCR 反应在 20 μ L 体系中进行,包括 2 $\times$ PCR 扩增反应混合体系 10 μ L,细菌总 DNA 模板 1 μ L,PCR 引物各 1 μ L,并用双蒸水补至 20 μ L。PCR 反应的条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火温度见表 1,时间为 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 35 个循环,最后延伸 7 min。PCR 产物在 2%的琼脂糖凝胶中电泳 40 min,溴化乙锭溶液染色后用凝胶成像系统观察结果。

2 结 果

2.1 59 株多重耐药菌的药敏结果 59 株多重耐药菌包括 29 株大肠埃希菌与 30 株肺炎克雷伯菌,对氨基苄西林的耐药率为 100%,对头孢他啶的耐药率为 91.5%,对庆大霉素的耐药率为 66.1%,对环丙沙星的耐药率为 72.9%,值得注意的是

3.4%及 1.7%的菌株分别对厄他培南和亚胺培南耐药,显示耐碳青霉烯类药物菌株的出现。对其他抗菌药物的耐药情况见表 2。

2.2 β -内酰胺酶基因型分布 在 21 种 β -内酰胺酶基因型中,有 10 种在多重耐药菌株中被检出(表 3)。阳性率最高的是 TEM,为 54.2%(32/59);SHV 的阳性率为 45.8%(27/59);CTX-M-G1、G2 和 G9 的检出率分别为 32.2%(19/59)、23.7%(14/59)和 52.5%(31/59),说明 CTX-M 型 β -内酰胺酶分布非常广泛;另外,分别有 4 株和 2 株肺炎克雷伯菌检出 DHA 和 MOX 基因,CMY、OXA-1 和 ACT 基因则各有 1 株检出。未检测到含 GES、VEB、IMP、VIM、KPC、CTX-M-G8/25、ACC、FOX、PER、OXA-48 等基因的菌株。

表 1 PCR 引物序列和反应条件

PCR 反应	基因	引物序列(5'~3')	片段大小(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)
1	TEM	CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C	800	60
	SHV	AGC CGC TTG AGC AAA TTA AAC ATC CCG CAG ATA AAT CAC CAC	713	
	OXA-1	GGC ACC AGA TTC AAC TTT CAA G GAC CCC AAG TTT CCT GTA AGT G	564	
2	CTX-M-G1	TTA GGA ART GTG CCG CTG YA CGA TAT CGT TGG TGG TRC CAT	688	60
	CTX-M-G2	CGT TAA CGG CAC GAT GAC CGA TAT CGT TGG TGG TRC CAT	404	
	CTX-M-G9	TCA AGC CTG CCG ATC TGG T TGA TTC TCG CCG CTG AAG	561	
3	CTX-M-G8/25	AAC RCR CAG ACG CTC TAC TCG AGC CGG AAS GTG TYA T	326	60
4	ACC	CAC CTC CAG CGA CTT GTT AC GTT AGC CAG CAT CAC GAT CC	346	60
	FOX	CTA CAG TGC GGG TGG TTT CTA TTT GCG GCC AGG TGA	162	
	MOX	GCA ACA ACG ACA ATC CAT CCT GGG ATA GGC GTA ACT CTC CCA A	895	
	DHA	TGA TGG CAC AGC AGG ATA TTC GCT TTG ACT CTT TCG GTA TTC G	997	
	CMY	CGA AGA GGC AAT GAC CAG AC ACG GAC AGG GTT AGG ATA GY	538	
	ACT	CGG TAA AGC CGA TGT TGC G AGC CTA ACC CCT GAT ACA	683	
5	GES	AGT CGG CTA GAC CGG AAA G TTT GTC CGT GCT CAG GAT	399	60
	PER	GCT CCG ATA ATG AAA GCG T TTC GGC TTG ACT CGG CTG A	520	
	VEB	CAT TTC CCG ATG CAA AGC GT CGA AGT TTC TTT GGA CTC TG	648	
6	OXA-48	GCT TGA TCG CCC TCG ATT GAT TTG CTC CGT GGC CGA AA	281	57
7	IMP	TTG ACA CTC CAT TTA CDG GAT YGA GAA TTA AGC CAC YCT	139	55
	VIM	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	390	
	KPC	CAT TCA AGG GCT TTC TTG CTG C ACG ACG GCA TAG TCA TTT GC	538	

2.3 多种 β -内酰胺酶基因型共存情况分析 见表 4。59 株多重耐药菌中有 67.8%(40/59)的菌株携带两种以上的 β -内酰

胺酶基因型,其中肺炎克雷伯菌携带两种以上基因型菌株更为常见,达 76.7%(23/30),值得注意的是,有 2 株肺炎克雷伯菌

携带 5 种 β -内酰胺酶基因型。

表 2 59 株多重耐药菌株的药敏结果 (%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
氨苄西林	100.0	0.0	0.0
氨苄西林/舒巴坦	84.7	8.5	6.8
氨曲南	91.5	1.7	6.8
头孢唑啉	96.6	0.0	3.4
头孢吡肟	86.4	3.4	10.2
头孢他啶	91.5	1.7	6.8
头孢曲松	94.9	1.7	3.4
头孢哌酮/舒巴坦	18.6	39.0	42.4
厄它培南	3.4	1.7	94.9
亚胺培南	1.7	0.0	98.3
环丙沙星	72.9	5.1	22.0
左氧氟沙星	66.1	8.5	25.4
丁胺卡那霉素	13.6	1.7	84.7
庆大霉素	66.1	5.1	28.8
妥布霉素	27.2	18.6	54.2
复方新诺明	62.7	0.0	37.3

表 3 59 株多重耐药菌中 β -内酰胺酶基因型分布情况 (n)

基因型	总阳性菌株	ECO 阳性菌株	KPN 阳性菌株
TEM	32	19	13
CTX-M-G9	31	15	16
SHV	27	0	27
CTX-M-G1	19	11	8
CTX-M-G2	14	5	9
DHA	4	0	4
MOX	2	0	2
CMY	1	0	1
OXA-1	1	0	1
ACT	1	0	1

注:ECO 表示大肠杆菌;KPN 表示肺炎克雷伯菌。

表 4 多种 β -内酰胺酶基因型共存的菌株数目 (n)

基因型数目	总阳性菌株	ECO 阳性菌株	KPN 阳性菌株
1	19	12	7
2	20	14	6
3	15	2	13
4	3	1	2
5	2	0	2

注:ECO 表示大肠杆菌;KPN 表示肺炎克雷伯菌。

3 讨 论

大肠杆菌和肺炎克雷伯菌是临床感染常见的革兰阴性菌,近年来由于抗菌药物的广泛应用,多重耐药菌株的出现越来越普遍^[5]。 β -内酰胺类抗菌药物是临床治疗细菌感染的最常用抗菌药物,但 β -内酰胺酶的产生和传播令细菌对这类抗菌药物的耐药性不断增强^[6]。本研究对 59 株多重耐药的大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的药敏试验结果分析显示,这些菌株对多种青霉素类和头孢菌素类药物的耐药性非常严重,而且出现了耐碳青

霉烯类药物的菌株。有文献报道,产 β -内酰胺酶的细菌往往可同时携带对其他种类抗菌药物耐药的基因,这些菌株易发展成多重耐药菌,给临床感染治疗带来很大的困难^[7]。本研究中收集的 59 株多重耐药菌对喹诺酮类和磺胺类药物的耐药率均较高,也证实了这一点。

对 21 种 β -内酰胺酶基因的检测结果显示,本研究收集的多重耐药菌株携带其中 10 种。对大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的检出率分析显示,大肠杆菌仅检出 4 种 β -内酰胺酶基因,而肺炎克雷伯菌则检出 10 种,由此显示后者的 β -内酰胺酶基因型更具多样性。多重耐药的肺炎克雷伯菌可携带多种耐药基因,且往往是定位在可转移的质粒上,可通过在肠杆菌科细菌间的接合作用引起这些基因的扩散,进一步加大了预防控制的难度^[8]。虽然研究菌株中包含了耐碳青霉烯类药物的菌株,但并未检出 VIM、IMP 和 KPC 等碳青霉烯酶,说明这些菌株中碳青霉烯类药物耐药性可能与其他因素有关,需要进一步的研究以阐明其耐药机制。

本研究还发现多重耐药菌中同时携带多种 β -内酰胺酶基因的情况十分普遍。不同的 β -内酰胺酶有不同的水解底物,对仅产一种 β -内酰胺酶基因的菌株来说,可以选择其不能水解的 β -内酰胺类抗菌药物进行治疗。但多种基因型共存于同一菌株时,细菌往往对所有青霉素类和头孢菌素类药物都耐药,大大增加了治疗的难度。如何控制和治疗这些菌株引起的感染,已经成为临床抗菌治疗和医院感染控制迫切需要解决的大问题。

参考文献

[1] Bush K. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae[J]. Curr Opin Microbiol, 2010, 13(5): 558-564.

[2] 谭文彬. 细菌耐药的基因机制研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(7): 543-544.

[3] Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria[J]. Annu Rev Biochem, 2009, 78: 119-146.

[4] Dallenne C, Da Costa A, Decre D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 490-495.

[5] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa[J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(Suppl 2): 49-56.

[6] 刘云红. 临床常见耐药性细菌的耐药机制[J]. 中国现代医药杂志, 2009, 11(6): 129-130.

[7] Ogbolu DO, Daini OA, Ogunledun A, et al. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(1): 62-66.

[8] Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance[J]. FEMS Microbiol Rev, 2011, 35(5): 736-755.