

• 论 著 •

产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药特征

李晋华¹, 车昌燕^{2△}

(1. 山西省汾阳医院, 山西汾阳 032200; 2. 山西医科大学汾阳学院, 山西汾阳 032200)

摘要:目的 了解产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯菌的临床分布、基因型及其耐药情况, 为临床合理使用抗菌药物提供参考。方法 采用 ATB 细菌鉴定仪对临床送检标本进行肺炎克雷伯菌鉴定和药敏试验, 双纸片法确证试验检测 ESBLs 表型, 通过聚合酶链反应(PCR)对 ESBLs 阳性菌株进行基因型检测。结果 481 株肺炎克雷伯菌中产 ESBLs 菌 116 株(24.12%), 科室分布主要来源于呼吸科(23.28%), 标本主要来源于痰液(91 株)。PCR 结果显示, 116 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中, CTX 型 61 株(52.59%), TEM 型 17 株(14.66%), SHV 型 16 株(13.79%), 22 株携带两种基因型(18.96%)。药敏结果显示, 116 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对阿莫西林、替卡西林、头孢噻吩和头孢吡肟的耐药率为 100.00%, 对哌拉西林、头孢他啶和头孢吡肟的耐药率在 76.00% 以上, 对美洛培南和亚胺培南全部敏感。结论 临床分离的产 ESBLs 肺炎克雷伯菌主要来源于呼吸科, 基因型主要为 CTX 型。产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对多种抗菌药物呈现多重耐药性。

关键词:肺炎克雷伯菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 临床分布; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.06.017 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)06-0788-03

Clinical distribution and drug resistance characteristics of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae*

LI Jinhua¹, CHE Changyan^{2△}

(1. Fenyang Hospital, Fenyang, Shanxi 032200, China; 2. Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China)

Abstract: Objective To understand the clinical distribution, genotypes and drug resistance of extend spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Klebsiella pneumoniae* to provide reference for clinical rational use of antimicrobial agents. **Methods** The identification and drug susceptibility test of *Klebsiella pneumoniae* in clinically submitted specimens were performed by using ATB bacteria identification instrument. The ESBLs phenotypes were detected by double paper confirmatory test and the ESBLs genotypes of ESBLs positive strains were tested by polymerase chain reaction(PCR). **Results** Among 481 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 116 strains(24.12%) produced ESBLs, which mainly derived from the respiratory department(23.28%), the specimens mainly came from sputum(91 strains). The PCR results showed that among 116 strains of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae*, 61 strains(52.59%) were CTX genotype, 17 strains(14.66%) were TEM genotype, 16 strains(13.79%) were SHV genotype, 22 strain(18.96%) were two genotypes. The drug susceptibility results showed that 116 strains of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* had the resistance rate of 100.00% to amoxicillin, ticarcillin, cefalotin and cefuroxime, and resistance rate of more than 76.00% to piperacillin, ceftazidime and cefepime. All were sensitive to meropenem and imipenem. **Conclusion** Clinically isolated ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* is mainly derived from respiratory department, the main genotype is CTX. ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* shows multiple drug resistance to multiple kinds of antimicrobial agents.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; extend spectrum β -lactamases; clinical distribution; drug resistance

随着广谱抗菌药物在临床抗感染治疗中的广泛应用, 细菌的耐药性越来越严重, 细菌对抗菌药物耐药的机制呈现多样性, 产生超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是细菌产生多重耐药性的机制之一。ESBLs 主要由大肠埃希菌和克雷伯菌属产生^[1], 肺炎克雷伯菌为革兰阴性杆菌, 是临床分离及医院感染常见的致病菌之一^[2], 不同地区由于生活方式、医院治疗方案的差异, 流行的肺炎克雷伯菌所产 ESBLs 具有一定的基因型别^[3-4]。我国常见 ESBLs 的基因型为 TEM、SHV、CTX-M^[5-6]。为了解山西省汾阳医院产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的携带情况、临床分布特点及耐药谱特征, 对 2013 年 1 月至 2015 年 6 月分离鉴定的产 ESBLs 肺炎克雷伯菌进行研究, 确定它们的临床分布、优势基因型及耐药谱特征, 为临床医师合理使用抗菌药物提供依据, 以减少耐药菌株的产生和扩散。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集山西省汾阳医院 2013 年 1 月至 2015 年 6 月从临床送检的血液、痰液、尿液等标本中分离的肺炎克雷伯菌 481 株, 经过初筛和确证试验确定产 ESBLs 肺炎克雷伯菌, 同种产酶株不重复留取。质控菌株 ATCC700603 购于国家临床检验中心。头孢曲松(30 μ g)、头孢噻肟(30 μ g)、氨曲南(30 μ g)、头孢他啶(30 μ g)、头孢他啶(30 μ g)/克拉维酸(10 μ g)、头孢噻肟(30 μ g)/克拉维酸(10 μ g)购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离、鉴定及药敏试验 按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)处理临床标本, 采用 ATB 半自动细菌鉴定和药敏系统进行分析, 严格按照 2014 年美国临床实验室标准化协

会(CLSI)推荐的判读标准进行判断,对可疑产 ESBLs 菌株通过纸片扩散法进行表型确证:头孢噻肟(30 μg)、头孢噻肟(30 μg)/克拉维酸(10 μg)与头孢他啶(30 μg)、头孢他啶(30 μg)/克拉维酸(10 μg),分别测定两对纸片单独与加克拉维酸的抑菌环直径,二者相差≥5 mm 者即确证为产 ESBLs 菌株。

1.2.2 ESBLs 基因型检测 根据 GenBank 中登录的各式 ESBLs 基因序列设计 3 对引物,CTX 型(876 bp):上游引物 5'-ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA-3',下游引物 5'-TTA CAG CCC TTC GGC GAT GA-3'。TEM 型(861 bp):上游引物 5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTT CG-3',下游引物 5'-TTA CCA ATG CTT AAT CAG TG-3'。SHV 型(561 bp):上游引物 5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3',下游引物 5'-GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG-3'。对证实产 ESBLs 的菌株,按照试剂盒说明提取细菌质粒 DNA,以提取的质粒 DNA 为模板进行聚合酶链反应(PCR):94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,51~56 ℃(根据引物有所不同:CTX 型 56 ℃,TEM 型 51 ℃,SHV 型 54 ℃) 30 s,72 ℃ 3 min,共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。取 3 μL 反应产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察结果。

2 结 果

2.1 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌检出结果 从临床标本中共分离出肺炎克雷伯菌 481 株,其中 116 株产 ESBLs,阳性率为 24.12%。

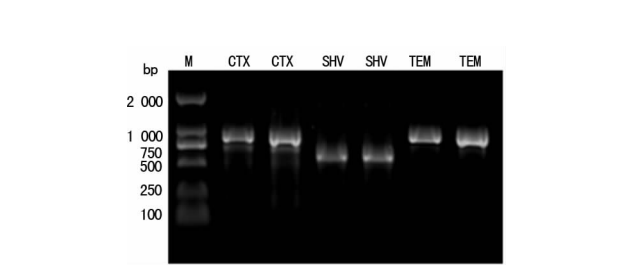
2.2 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的科室分布和标本分布 116 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌分布于临床大部分科室,主要分布于呼吸科(23.28%)和重症监护病房(ICU,18.97%),其次是神经外科(12.93%)和儿科(10.34%)。从标本来源上看,116 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌主要来源于痰液(91 株)和分泌物(14 株),见表 1。

表 1 116 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的临床分布									
科室	株数 (n)	构成比 (%)	标本分布(n)						
			痰液	血液	尿液	脓液	分泌物	穿刺液	其他
呼吸内科	27	23.28	27	0	0	0	0	0	0
ICU	22	18.97	20	0	0	0	0	0	2
神经外科	15	12.93	15	0	0	0	0	0	0
儿科	12	10.34	7	0	0	0	5	0	0
妇产科	7	6.03	0	0	0	0	7	0	0
感染科	6	5.17	6	0	0	0	0	0	0
普外科	5	4.31	0	0	0	3	0	2	0
骨科	5	4.31	5	0	0	0	0	0	0
康复科	5	4.31	5	0	0	0	0	0	0
肿瘤科	2	1.72	0	2	0	0	0	0	0
肾内科	2	1.72	2	0	0	0	0	0	0
心血管科	2	1.72	2	0	0	0	0	0	0
消化内科	2	1.72	0	0	2	0	0	0	0
心胸外科	2	1.72	2	0	0	0	0	0	0
门诊	2	1.72	0	0	0	0	2	0	0
合计	116	100.00	91	2	2	3	14	2	2

2.3 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 PCR 扩增结果 对表型确证试验阳性的 116 株肺炎克雷伯菌进行 PCR 扩增,检测结果显示

CTX 型 61 株,检出率为 52.59%;TEM 型 17 株,检出率为 14.66%;SHV 型 16 株,检出率为 13.79%。22 株携带两种基因型,检出率为 18.96%,各基因型分布见表 2,琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

表 2 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌基因型分布		
基因型	株数(n)	构成比(%)
CTX	61	52.59
TEM	17	14.66
SHV	16	13.79
CTX+TEM	11	9.48
CTX+SHV	5	4.31
TEM+SHV	6	5.17



注:M 为 DNA 标志物。
图 1 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 PCR 扩增结果

2.4 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌药敏结果分析 药敏结果显示,116 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对青霉素类的阿莫西林和替卡西林,以及第 1,2 代头孢菌素类的头孢噻吩和头孢呋辛的耐药率为 100.00%,对青霉素类的哌拉西林和第 3,4 代头孢菌素类的头孢他啶和头孢吡肟的耐药率在 76.00% 以上,最敏感的药物是美洛培南和亚胺培南,敏感率为 100.00%,见表 3。

表 3 116 株产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的药敏结果[n(%)]			
抗菌药物	耐药	中介	敏感
左氧氟沙星	32(27.59)	5(4.31)	79(68.10)
阿莫西林	116(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
哌拉西林	104(89.66)	12(10.34)	0(0.00)
替卡西林	116(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢噻吩	116(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
头孢西丁	34(29.31)	0(0.00)	82(70.69)
头孢噻肟	66(56.90)	48(41.38)	2(1.72)
头孢他啶	114(98.28)	0(0.00)	2(1.72)
头孢吡肟	89(76.72)	0(0.00)	27(23.28)
头孢呋辛	116(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
美洛培南	0(0.00)	0(0.00)	116(100.00)
亚胺培南	0(0.00)	0(0.00)	116(100.00)
复方磺胺甲噁唑	51(43.97)	0(0.00)	65(56.03)
妥布霉素	31(26.72)	0(0.00)	85(73.27)
阿米卡星	10(8.62)	0(0.00)	106(91.38)
庆大霉素	77(66.38)	0(0.00)	39(33.62)
替奈米星	14(12.07)	0(0.00)	102(87.93)
环丙沙星	31(26.72)	5(4.31)	80(68.97)

3 讨 论
ESBLs 是由细菌质粒介导的能水解 β-内酰胺类和单酰胺

类抗菌药物的一类酶,产 ESBLs 是肠杆菌科细菌对第 3 代头孢菌素耐药的重要机制。抗菌药物在临床的广泛使用导致细菌对抗菌药物产生耐药性的发生率逐年升高,产 ESBLs 菌耐药性较强,往往呈现多重耐药^[7]。肺炎克雷伯菌存在于人体的呼吸道和肠道,当机体抵抗力降低时经呼吸道进入肺内而引起大叶或小叶融合性实变,是引起医院感染的重要病原菌^[8]。近年来产 ESBLs 肺炎克雷伯菌引起的医院感染多有报道,本研究显示从临床标本分离的 481 株肺炎克雷伯菌中有 116 株产 ESBLs,阳性率为 24.12%。在临床科室中,呼吸科的分离率最高(23.28%),其次是 ICU(18.97%),可能与这些科室患者呼吸道抵抗力的降低有关。临床送检的痰液、血液、尿液、脓液、分泌物、穿刺液等标本中,从痰液标本中分离的产 ESBLs 肺炎克雷伯菌最多(91 株),占 78.4%,表明产 ESBLs 肺炎克雷伯菌引起的感染以呼吸道为主,提示医院应加强对患者呼吸道的监测。

ESBLs 由质粒介导,不同区域由于抗菌药物的使用差异及菌株流行的原始地域性,流行的基因型不同,耐药特征也有所不同^[9],本研究中所分离的产 ESBLs 肺炎克雷伯菌基因型主要是 CTX 型(52.59%),可能是由于第 3 代头孢菌素类抗菌药物长期大量使用,导致细菌耐药基因突变或选择性耐药菌株产生。产 ESBLs 菌株由于质粒上同时整合有多种耐药基因导致其对氨基糖苷类、喹诺酮类和磺胺类药物等表现不同程度的耐药性^[10]。药敏分析结果显示,产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对阿莫西林、替卡西林、头孢噻吩和头孢呋辛的耐药率为 100.00%,表明这些药物用于产 ESBLs 肺炎克雷伯菌引起的感染完全无效,对哌拉西林和头孢他啶的耐药率在 89.00% 以上,几乎无效。未检出对美洛培南和亚胺培南耐药的菌株,表明产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对青霉素类和头孢菌素类高度耐药,对碳青霉烯类高度敏感,临床对于该菌引起的感染,治疗应避免使用青霉素类和头孢菌素抗菌药物,首选碳青霉烯类抗菌药物。

本研究显示,产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的阳性率为 24.12%,容易在呼吸科和 ICU 的患者引起感染,且呈现多重耐药,临床实验室应及时、准确地对其耐药性变迁和耐药基因进行监测,合理使用抗菌药物,严格消毒,减少耐药菌产生,防

止并控制由其引起的医院感染暴发流行。

参考文献

[1] 郭红阳,朱光泽,连树林. 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌多重耐药性与 I 类整合子的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2010,14(7):1097-1099.

[2] 张桔红,张凌玲,祖英秋. 泌尿系感染病原菌及其耐药性分析[J]. 中国病原生物学杂志,2012,7(5):384-386.

[3] 邓芳,张秀芳,柴杰. 医院产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的检测及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2011,8(14):1747-1748.

[4] 黄声旗,张青锋. 浙南山区产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(8):1669-1671.

[5] 王晓梅,白玉兰,楮云卓. 产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的耐药基因序列分析[J]. 中国热带医学,2009,9(3):430-431.

[6] 吴劲松,卢月梅,吴伟元,等. 痰液中产 ESBL 肺炎克雷伯菌 I、II 类整合子检测及基因分型研究[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(12):1121-1123.

[7] 王继东,糜祖煌,钱小毛. 套式 PCR 法检测肺炎克雷伯菌染色体介导 β -内酰胺酶基因[J]. 中华医院感染学杂志, 2007,17(1):8-10.

[8] 刘晓莺,马靖华. 新生儿科分离的产 ESBL 肺炎克雷伯菌基因分型研究[J]. 临床肺科杂志,2013,18(7):1266-1267.

[9] 黄烈,韦洁宏,张银辉,等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产 ESBL 表型与基因型分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009,19(1):17-20.

[10] 蔡木发,李静,罗红烈,等. 大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶的检测及多重耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2014, 24(10):1496-1499.

(收稿日期:2016-08-11 修回日期:2016-12-13)

(上接第 787 页)

receiving radiation therapy[J]. Clin J Oncol Nurs,2013, 17(3):319-324.

[8] Dropkin MA, Coping S. And coping behaviors in patients undergoing head and neck cancer surgery [J]. Cancer Nurs,2001,24(2):143-148.

[9] 苏茜,刘玉萍,程幼夫,等. 医院焦虑抑郁量表在健康体检中心应用的信度和效度研究[J]. 四川医学,2012,33(1): 174-176.

[10] Singer S, Danker H, Dietz A, et al. Screening for mental disorders in laryngeal cancer patients: a comparison of 6 methods[J]. Psychooncology,2008,17(3):280-286.

[11] Quintana JM, Padierna A, Esteban C, et al. Evaluation of the psychometric characteristics of the Spanish version of

the Hospital Anxiety and Depression Scale[J]. Acta Psychiatr Scand,2003,107(3):216-221.

[12] 高小芬,于卫华. 采用 Barthel 指数评定表对医养结合老年患者护理级别再分度研究[J]. 护理学杂志,2014,29(4):1-4.

[13] López AL, Guerrero S. Perspectiva internacional del uso de la teoría general de Orem[J]. Invest Educ Enferm, 2006,24(2):90-100.

[14] Santos R, Varez P, Abril S, et al. Reflexiones acerca del uso y utilidad de los modelos y teorías de enfermería en la práctica asistencia [J]. Enferm Clin, 2006, 16(4): 218-221.

(收稿日期:2016-09-25 修回日期:2016-12-02)