

· 基础论著 ·

重症监护室产质粒介导 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌的流行病学研究

张永标 符永玫 张扣兴 赵锋 温景芸

【摘要】 目的 探讨产质粒介导 AmpC 酶(PABLs)的肺炎克雷伯菌在重症监护室(ICUs)中的分子流行病学与药敏谱特征。**方法** 从ICUs临床分离8株对头孢西丁不敏感的无重复肺炎克雷伯菌,采用酶提取物三维试验表型确认为产AmpC酶细菌,并通过质粒接合试验筛选产酶临床株接合子;对产酶临床株和接合子采用E-tests法检测常用 β -内酰胺类抗菌药物的最低抑菌浓度(MICs),等电聚焦电泳测定 β -内酰胺酶等电点(pIs),多重PCR扩增质粒ampC基因,并对临床株中PCR阳性产物进行测序以确定基因型。**结果** AmpC酶表型确认试验阳性的肺炎克雷伯菌有5株,其中3株质粒接合试验成功。5株临床株均产生pI为7.8的DHA-1型PABLs,其中5株均对亚胺培南敏感,4株对头孢吡肟敏感,对其他 β -内酰胺类抗菌药物呈明显耐药。3株接合子获得相应临床株的ampC耐药基因与耐药性。**结论** 产DHA-1型PABLs肺炎克雷伯菌在ICUs中普遍流行,部分菌株ampC耐药基因与耐药性可经质粒转移。对产PABLs肺炎克雷伯菌感染首选亚胺培南,其次为头孢吡肟。ICUs中宜合理应用 β -内酰胺类抗菌药物以避免诱导细菌产生PABLs。

【关键词】 质粒;AmpC酶;重症监护室;肺炎克雷伯菌;基因型

Epidemiology of plasmid-mediated AmpC β -lactamases producing *Klebsiella pneumonia* in intensive care units ZHANG Yong-biao, FU Yong-mei, ZHANG Kou-xing, ZHAO Feng, WEN Jing-yun. Department of Emergency Medicine, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: ZHANG Yong-biao, Email: zhangyongbiao@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumonia*) producing plasmid-mediated AmpC β -lactamases (PABLs) in intensive care units (ICUs). **Methods** Eight ceftiofur-nonsusceptible and nonrepetitive *K. pneumonia* isolates collected from ICUs were detected for AmpC β -lactamases by three-dimensional extract tests. The transconjugants of AmpC β -lactamases producing clinical isolates were screened by

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.01.001

基金项目:广东省自然科学基金项目(7001562)

作者单位:510630 广州,中山大学附属第三医院急诊科(张永标、符永玫、赵锋),感染科ICU(张扣兴),肿瘤科(温景芸)

通讯作者:张永标,Email:zhangyongbiao@126.com

plasmids conjugation tests. For AmpC β -lactamases producing clinical isolates and transconjugants, the minimal inhibitory concentrations (MICs) of β -lactams and isoelectric points (pIs) of β -lactamases were determined by E-tests and isoelectric focusing. AmpC genes of plasmids were amplified by multiplex PCR and positive PCR products were sequenced to identify their genotypes. **Results** AmpC β -lactamases phenotypic confirmatory tests were positive in 5 *K. pneumonia* isolates, 3 of which were succeed in plasmids conjugation tests. Five clinical isolates all produced DHA-1 type PABs with pI 7.8. Among these clinical isolates, 5 and 4 strains were sensitive to imipenem and cefepime, respectively, while all resistant to the other β -lactams markedly. Three transconjugants obtained ampC genes and antimicrobial resistance from clinical isolates by transferable plasmids. **Conclusions** The prevalence of DHA-1 type PABs producing *K. pneumonia* occurs in ICUs. AmpC genes and antimicrobial resistance are transferable by plasmids in part of these isolates. Imipenem is the first choice for infections caused by PABs producing *K. pneumonia*, following by cefepime. The rational use of β -lactams is important for avoiding the prevalence of inducible PABs producing *K. pneumonia* in ICUs.

【Key words】 Plasmid; AmpC β -lactamases; Intensive care unit; *Klebsiella pneumonia*; Genotype

AmpC β -内酰胺酶 (AmpC 酶) 是继超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 后发现的一类可水解新型广谱 β -内酰胺类抗菌药物且不被酶抑制剂所抑制的 β -内酰胺酶。AmpC 酶最初被认为仅由染色体介导, 但近 20 年来质粒介导 AmpC 酶 (PABs) 不断被发现^[1]。由于编码 AmpC 酶的 ampC 基因可随质粒在相同或不同菌属细菌间水平转移而导致耐药性的播散, 因而产 PABs 细菌已引起临床上的高度关注。为了解重症监护室 (intensive care units, ICUs) 医院感染最为常见致病菌之一的肺炎克雷伯菌 (*K. pneumoniae*) 中 AmpC 酶的分子流行病学与药敏谱特征, 本文对 ICUs 分离肺炎克雷伯菌 ampC 基因型和常用 β -内酰胺类抗菌药物的敏感性进行了检测, 现将结果报道如下。

材料与方法

一、菌株来源

临床菌株为 2010 年 1 月至 2010 年 4 月中山大学附属第三医院各专科 ICU 临床标本中对头孢西丁不敏感的无重复肺炎克雷伯菌共 8 株 (自编号 Kp1 ~ 8), 其中呼吸科 ICU 3 株 (Kp1、Kp2、Kp3)、感染科 ICU 2 株 (Kp4、Kp5)、神经内科 ICU 1 株 (Kp6)、心胸外科 ICU 1 株 (Kp7)、神经外科 ICU 1 株 (Kp8), 以上所有菌株经常规生化方法及 MicroScan WalkAway-40 系统 (美国 Dade Behring 公司) 鉴定。大肠埃希菌 (*E. coli*) ATCC 25922 为药敏试验质控与三维试验指示细菌; *E. coli* DH5 α 2919 为高产质粒介导 ACT-1 型 AmpC 酶标准菌株; *E. coli* HB101 Rif^r 为质粒接合试验受体菌株; 已知标准等电点 (pIs) 产酶株 *E. coli* J53R1 (产 TEM-1,

pI 5.4)、*K. pneumoniae* CF104(产 TEM-3, pI 6.3)、*E. coli* J53pMG266(产 SHV-18, pI 7.8)、*E. coli* Rio7(产 CTX-M-9, pI 8.1)为等电聚焦电泳试验参照菌株。

二、试剂与仪器

MH 琼脂、克拉维酸粉剂(CLA)、头孢硝噻吩粉剂、头孢西丁纸片(FOX)(英国 OXOID 公司);LB 肉汤(美国 BD 公司);E-test 药敏纸条(瑞典 AB BIOMERIEUX);头孢西丁粉剂(FOX)、利福平粉剂(RFP)、氯唑西林粉剂(CLO)和溴化乙啶、琼脂糖(美国 SIGMA 公司);Ex Taq 酶、dNTPs、DNA Marker 2000(大连宝生物工程有限公司);QIAquick Gel Extraction Kit、QiaGen Plasmid Mini Kit(德国 QIAGEN 公司);DYY-III37A 型等电聚焦电泳仪(北京六一仪器厂);两性电解质载体、丙烯酰胺(美国 PHARMACIA 公司);PTC-200 型 PCR 仪(美国 MJ RESEARCH 公司);GELDOC-200 型凝胶成像系统(英国 UVP 公司);Power 300 型电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);ABI PRISM 3100-Avant 型遗传分析仪(美国 APPLERA 公司)。

三、AmpC 酶表型筛选与确认试验

表型筛选采用 K-B 纸片扩散法,以 30 μ g FOX 纸片检测受试细菌,抑菌环直径 ≤ 17 mm 提示对 FOX 不敏感,疑为产 AmpC 酶细菌。表型确认采用 Coudron 等^[2]报道的酶提取物 FOX 三维试验法,酶提取物的制备采用反复冻融法。以产 AmpC 酶标准菌株 *E. coli* DH5 α 2919 为阳性对照。

四、质粒接合试验

以 AmpC 酶表型确认试验阳性的肺炎克雷伯菌临床株为供体菌,以 RFP 耐药 *E. coli* HB101 Rif^r 为受体菌。将孵育至对数生长期的供体菌和受体菌在 LB 肉汤中等量混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h 后,接种于含 FOX(25 μ g/ml)和 RFP(300 μ g/ml)的选择性培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取生长的细菌菌落,经 MicroScan Walk-Away-40 系统鉴定其菌种和生化特性,与受体菌一致者即为接合子。对获得的接合子亦采用反复冻融法制备酶提取物,并进行酶提取物 FOX 三维试验以确认 AmpC 酶表型。

五、药敏试验

对 AmpC 酶表型确认试验阳性的临床株和接合子,采用 E-tests 法检测常用 β -内酰胺类抗菌药物的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MICs),操作与结果判读按照 2009 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准,以 *E. coli* ATCC 25922 为质控菌株。

六、等电聚焦电泳和抑制试验

将 AmpC 酶表型确认试验阳性临床株和接合子的酶提取物进行 β -内酰胺酶等电聚焦电泳,电泳后凝胶分别与 0.5 mmol/L CLA 和 0.5 mmol/L CLO 作用,再用 0.5 mmol/L 头孢硝噻吩染色,确定所测 β -内酰胺酶位置。以标准 β -内酰胺酶 TEM-1、TEM-3、SHV-18、CTX-M-9(pI 分别为 5.4、6.3、7.8、8.1)做参照,采用 Curve Expert 1.3 软件绘制标准曲线并求得所测 β -内酰胺酶 pI 值。

七、引物设计和合成

引物设计参照文献^[3],共设计多重 PCR 引物 6 组,分别为 MOX 组(包括 MOX-1、2,CMY-1、8~11),CIT 组(包括 LAT-1~4,CMY-2~7、12~15、17、18,BIL-1,CFE-1),DHA 组(DHA-1、2),ACC 组(ACC-1),EBC 组(MIR-1、ACT-1),FOX 组(FOX-1~6)。引物委托上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 ampC 基因多重 PCR 引物序列

扩增基因型	引物碱基序列(5'→3')	预扩增片段长度(bp)
MOX	MF: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520
	MR: CACATTGACATAGGTGTGGTCC	
CIT	MF: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462
	MR: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
DHA	MF: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
	MR: CGTACGCATACTGGCTTTGC	
ACC	MF: ACCAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346
	MR: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
EBC	MF: TCGGTAAAGCCGATGTTGCCG	302
	MR: CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
FOX	MF: AACATCGGCTATCAGGGAGATG	190
	MR: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	

八、多重 PCR 扩增质粒 ampC 基因

采用 QIAGEN Plasmid Mini Kit 提取 AmpC 酶表型确认试验阳性的临床株和接合子的质粒作为 PCR 模板,操作按说明书进行。多重 PCR 反应体系:Ex Taq 酶 1.25 U,20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂,dNTPs 各 0.2 mmol,0.6 μmol/L 引物 MOX MF、MOX MR、CIT MF、CIT MR、DHA MF 和 DHA MR,0.5 μmol/L 引物 ACC MF、ACC MR、EBC MF、EBC MR,0.4 μmol/L 引物 FOX MF 和 FOX MR,质粒 DNA 模板 2 μl,其余为双蒸水,反应终体积 50 μl。PCR 反应条件:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,64℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 25 次;最后 72℃延伸 7 min。以产 ACT-1 型 AmpC 酶标准菌株 *E. coli* DH5α 2919 为阳性对照。

九、PCR 产物分析和测序

PCR 产物在含 0.5 μg/ml 溴化乙啶的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,以凝胶成像系统观察结果并照相记录。QIAquick Gel Extraction Kit 回收纯化临床株 PCR 阳性产物,在 ABI PRISM 3100-Avant 型遗传分析仪上采用双脱氧链末端终止法进行双向测序。测序结果在 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中采用 BLAST 程序进行检索,与 GenBank 提供的 ampC 基因核苷酸序列进行同源性比对,确定其基因型。

结 果

一、AmpC 酶表型确认试验结果

8 株疑产 AmpC 酶临床株中,表型确认试验阳性有 5 株,分别为 Kp1、Kp2、Kp5、Kp6 和 Kp7。

二、质粒接合试验结果

5 株 AmpC 酶表型确认试验阳性临床株中,有 3 株质粒接合试验成功,分别为 Kp2、Kp6、Kp7,并分别获得相应接合子 KpT2、KpT6、KpT7。3 株接合子 AmpC 酶表型确认试验亦为阳性。

三、药敏试验结果

5 株 AmpC 酶表型确认试验阳性的临床株对头孢呋辛、头孢他啶、头孢西丁、氨曲南均耐药,4 株对头孢曲松和头孢噻肟耐药;对阿莫西林/克拉维酸、头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦耐药的分别为 5 株、4 株、3 株;仅 1 株对头孢吡肟耐药;均对亚胺培南敏感。与相应供体菌比较,3 株接合子仅对少数抗菌药物的 MICs 值稍有下降,但未改变其耐药性,见表 2。

表 2 AmpC 酶表型确认试验阳性临床株和接合子的最低抑菌浓度($\mu\text{g/ml}$)

细菌	CXM	CAZ	CRO	CTX	FEP	AMC	CPS	PTZ	FOX	ATM	IMP
Kp1	>256	256	256	8	4	64	8	128	256	256	1
Kp2	256	256	8	128	4	64	128	8	256	64	0.5
Kp5	>256	>256	128	256	8	>256	64	16	>256	128	1
Kp6	>256	128	64	256	32	128	256	256	>256	64	1
Kp7	128	>256	>256	>256	2	128	>256	128	>256	128	1
KpT2	256	128	8	128	4	64	128	8	256	64	0.5
KpT6	>256	128	64	128	32	128	128	256	>256	64	1
KpT7	128	256	>256	256	2	128	256	128	>256	128	1

注:CXM:头孢呋辛;CAZ:头孢他啶;CRO:头孢曲松;CTX:头孢噻肟;FEP:头孢吡肟;AMC:阿莫西林/克拉维酸;CPS:头孢哌酮/舒巴坦;PTZ:哌拉西林/他唑巴坦;FOX:头孢西丁;ATM:氨曲南;IMP:亚胺培南

四、等电聚焦电泳和抑制试验结果

5 株 AmpC 酶表型确认试验阳性的临床株和 3 株接合子,均产生一种不被 CLA 抑制但可被 CLO 抑制的 β -内酰胺酶,其 pI 为 7.8。另外,临床株 Kp2、Kp7 和接合子 KpT7 产生一种可被 CLA 抑制而不被 CLO 抑制、pI 为 5.4 的 β -内酰胺酶。

五、PCR 产物电泳结果

5 株 AmpC 酶表型确认试验阳性的临床株和 3 株接合子,多重 PCR 产物电泳后均在 405 bp 左右出现预期大小的扩增片段,电泳结果见图 1。

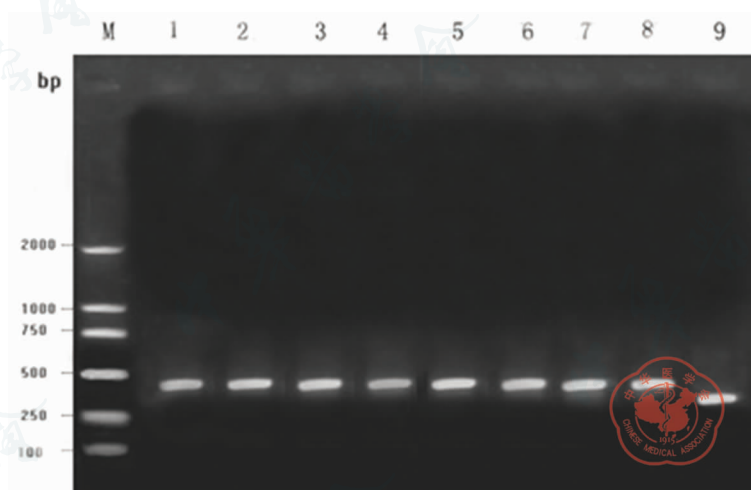


图1 AmpC 基因多重 PCR 产物电泳图谱

注:M:DNA Marker;1:Kp1;2:Kp2;3:Kp5;4:Kp6;5:Kp7;6:KpT2;7:KpT6;8:KpT7;9:*E. coli* DH5 α 2919

六、PCR 产物测序结果

5 株临床株的 PCR 阳性产物经纯化后测序,并与 GenBank 数据库提供的 AmpC 基因核苷酸序列进行比对,证实均为 DHA-1 基因型(与 GenBank 中注册号为 AY887126 的同源性为 100%)。

讨 论

产生 AmpC 酶是革兰阴性杆菌对新型广谱 β -内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制之一。AmpC 酶由染色体介导者仅在细菌中发生垂直克隆传播,而由质粒介导者则因质粒的可转移性可在细菌间水平传播,甚至引起产酶细菌所致医院感染的暴发流行。ICUs 患者因基础疾病严重、免疫力低下和侵袭性诊疗操作频繁,使 ICUs 成为医院感染最常见亦为最严重的科室^[4]。由于肺炎克雷伯菌是引起医院感染最为常见的革兰阴性杆菌之一,故监测 ICUs 肺炎克雷伯菌中 PABLs 的分子流行病学及其耐药性特征,对预防和治疗 ICUs 中该细菌所致医院感染的发生与流行均有重要意义。

PABLs 基因型在不同国家和地区的流行状况不同,这是由于 PABLs 是细菌在抗菌药物选择性压力下产生的,因此与不同区域抗菌药物的使用密切相关,但目前已出现明显的跨区域传播趋势。国内报道的 PABLs 基因型主要是 DHA-1,其他如 ACT-1、MIR-3、CMY-2、CMY-8、CMY-22 等亦有发现^[5-7]。本研究从短期内自 ICUs 分离的 8 株疑产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌中,有 5 株被证实产 pI 为 7.8 的 DHA-1 型 PABLs,分布于呼吸科、感染科、神经内科和心胸外科 ICUs。从质粒接合试验、药敏试验和 PCR 产物分析结果来看,这 5 株临床分离的细菌中有 3 株 ampC 基因可随质粒发生耐药性转移,尽管未发生产酶细菌所致医院感染的暴发流行,但应引起 ICUs 医护人员的足够重视,因为国外已有产 DHA-1 型 PABLs 细

菌引起医院感染暴发的报道^[8]。此外,从等电聚焦电泳和抑制试验结果来看,5株临床分离株中有2株产生另外一种可被克拉维酸抑制的pI为5.4的 β -内酰胺酶,推测应为广谱酶TEM-1而非ESBLs,其中1株编码该种 β -内酰胺酶的基因亦位于可转移性质粒上。由于所研究的临床菌株仅在较短时间内从ICUs标本中分离得到,因而尚未能否认其他基因型PABLs的流行,但以上结果至少表明产DHA-1型PABLs肺炎克雷伯菌已在本院ICUs中普遍流行,而且部分菌株的耐药基因与耐药性可经质粒发生转移。

PABLs的生化特性与染色体介导者基本相同,最适水解底物均为头孢菌素,而目前临床上所应用的酶抑制剂克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦对AmpC酶抑制作用较差。本研究药敏结果显示,产PABLs细菌对第2代、第3代头孢菌素、头霉素类和单环 β -内酰胺类均高度耐药。对含酶抑制剂的复合制剂亦呈较高的耐药性。但对碳青霉烯类亚胺培南高度敏感,对第4代头孢菌素头孢吡肟耐药性亦较低。虽然亚胺培南为AmpC酶的强诱导剂,但其在治疗浓度时于诱导细菌产酶之前即可将细菌迅速杀死;头孢吡肟则因可迅速通过细菌外膜且与AmpC酶亲和力低而表现较强的抗菌活性。因此,对产AmpC酶细菌导致的医院感染宜首选亚胺培南,其次是头孢吡肟。值得警惕的是,若产AmpC酶细菌同时存在外膜孔道蛋白OprD2缺失或同时产ESBLs,则可分别导致对亚胺培南和头孢吡肟耐药。国内外均有研究发现在产DHA-1型PABLs肺炎克雷伯菌中,由于存在调控基因AmpR而使细菌可被诱导表达AmpC酶^[9,10],提示在ICUs中应合理应用 β -内酰胺类抗菌药物以避免诱导细菌产生PABLs。

参 考 文 献

- 1 Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(1):161-182.
- 2 Coudron PE, Moland ES, Thomason KS. Occurrence and detection of AmpC β -lactamase *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. J Clin Microbiol, 2000, 38(5):1791-1796.
- 3 Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol, 2002, 40(6):2153-2162.
- 4 Barsanti MC, Woeltje KF. Infection prevention in the intensive care unit. Infect Dis Clin North Am, 2009, 23(3):703-725.
- 5 冯福英, 兰小鹏, 杨湘越, 等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒AmpC酶基因型及流行病学分析. 中华检验医学杂志, 2007, 30(3):314-318.
- 6 多丽波, 李君, 陈祥平, 等. 革兰阴性杆菌质粒介导AmpC酶耐药基因型研究. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(6):1281-1282.
- 7 高帆, 张晓妮, 朱玉林, 等. 安徽省产质粒介导AmpC酶大肠埃希菌的耐药性及基因型分析. 中国抗生素杂志, 2010, 35(2):143-147.
- 8 Roh KH, Uh Y, Kim JS, et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing both SHV-12-type extended-spectrum beta-lactamase and DHA-1-type AmpC beta-lactamase at a Korean hospital. Yonsei Med J, 2008, 49(1):53-57.
- 9 多丽波, 栾英, 张联博, 等. DHA-1型质粒AmpC酶调控因子AmpR基因检测. 中国实验诊断学, 2007, 11(9):1146-1148.
- 10 Verdet C, Benzerara Y, Gautier V, et al. Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella spp.* in the Parisian region: genetic organization of the ampC and ampR genes originating from *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(2):607-617.

(收稿日期:2010-05-26)

(本文编辑:孙荣华)

张永标, 符永孜, 张扣兴, 等. 重症监护室产质粒介导AmpC酶的肺炎克雷伯菌的流行病学研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2011, 5(1):1-7.