

# 肺炎克雷伯菌 AmpC 酶检测及抗生素选择

刘永瑞, 张妍, 李秀英

(济宁市第一人民医院呼吸科, 山东 济宁 272100)

**摘要:**目的 调查济宁市第一人民医院肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶表型及其对常用抗生素的耐药性, 为临床用药提供依据。方法 收集 2017 年 1 月~7 月济宁市第一人民医院临床分离的非重复肺炎克雷伯菌 97 株, 应用头孢西丁纸片扩散法进行肺炎克雷伯菌 AmpC 酶表型初筛, 对初筛阳性菌用多重 PCR 方法检测质粒介导 AmpC 酶基因, 分析其耐药情况。结果 97 株肺炎克雷伯菌中共筛选出 40 株对头孢西丁不敏感菌株, 经多重 PCR 扩增, 有 7 株 AmpC 酶阳性, 检出率为 7.22% (7/97), 均为 DHA 型。产质粒介导 AmpC 酶菌株仅对亚胺培南敏感 (100.00%)。结论 济宁市第一人民医院产质粒介导 AmpC 酶肺炎克雷伯菌发生率相对较低, 以 DHA 型基因为主, 治疗应首选碳青霉烯类抗菌药物。

**关键词:**肺炎克雷伯菌; 质粒; AmpC 酶; 药敏结果

中图分类号: R378.99

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2019.19.039

文章编号: 1006-1959(2019)19-0122-03

## Klebsiella Pneumoniae AmpC Enzyme Detection and Antibiotic Selection

LIU Yong-rui, Zhang Yan, LI Xiu-ying

(Department of Respiratory, the First People's Hospital of Jining, Jining 272100, Shandong, China)

**Abstract:** Objective To investigate the AmpC phenotype of Klebsiella pneumoniae mediated by Klebsiella pneumoniae in Jining First People's Hospital and its resistance to common antibiotics, and provide evidence for clinical use. Methods A total of 97 strains of non-repetitive Klebsiella pneumoniae isolated from the First People's Hospital of Jining City from January to July 2017 were collected. The phenylcepitin diffusion method was used to screen the AmpC enzyme phenotype of Klebsiella pneumoniae. The primary screening positive bacteria were detected by multiplex PCR method for plasmid-mediated AmpC enzyme gene, and the drug resistance was analyzed. Results A total of 40 strains of cefoxitin-insensitive strains were screened from 97 strains of Klebsiella pneumoniae. Seven strains of AmpC enzyme were positive by multiplex PCR, and the detection rate was 7.22% (7/97), all of which were DHA type. The plasmid-mediated AmpC enzyme strain was only sensitive to imipenem (100.00%). Conclusion The incidence of plasmid-mediated AmpC enzyme Klebsiella pneumoniae in the First People's Hospital of Jining City is relatively low. The DHA type gene is the main treatment. The carbapenem antibiotics should be the first choice for treatment.

**Key words:** Klebsiella pneumoniae; Plasmid; AmpC enzyme; Drug susceptibility results

根据中国细菌耐药监测显示, 目前我国临床分离菌株以革兰氏阴性杆菌为主, 其中肠杆菌属中以大肠杆菌及肺炎克雷伯菌为主<sup>[1]</sup>。随着  $\beta$ -内酰胺类抗生素在临床的广泛应用, 细菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的现象也日益严重。其中细菌产生各种水解酶是革兰氏阴性杆菌耐药的主要机制<sup>[2]</sup>, 目前临床上研究比较多、且对广谱  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的重要机制是细菌产生 AmpC  $\beta$ -内酰胺酶 (AmpC 酶), AmpC 酶是由革兰氏阴性杆菌的染色体或质粒介导产生的一类  $\beta$ -内酰胺酶。革兰氏阴性杆菌产 AmpC 酶菌株呈现广泛的耐药。因此及时检测质粒介导的 AmpC 酶对指导临床抗生素的选择具有一定意义。本研究对我院肺炎克雷伯菌产质粒介导 AmpC 酶基因型及耐药性进行研究, 旨在为临床合理应用抗生素提供参考依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** ①菌株来源: 收集 2017 年 1 月~7 月济宁市第一人民医院全院住院患者临床标本中 (包括呼

吸道、血液、分泌物等) 分离的无重复肺炎克雷伯菌 97 株。②质控菌株: 大肠埃希菌 ATCC 25922 为阴性质控菌株, 阴沟肠杆菌 029M 为阳性质控菌株。

**1.2 试剂及仪器** 主要试剂与仪器包括 Vitek 2 Compact 全自动微生物检测仪 (法国生物梅里埃公司)、PCR 扩增仪 (美国 Perkin Elmer 公司)、头孢西丁 (FOX, 30  $\mu$ g) 药敏纸片 (英国 Osoid 公司)、凝胶电泳仪 (上海天能公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 细菌分离培养与鉴定** 对临床分离非重复菌株接种血琼脂培养基, 试验菌株应用全自动微生物检测仪进行鉴定。

**1.3.2 产 AmpC 酶菌株初筛** 采用 K-B 纸片扩散法初筛, 以 FOX (30  $\mu$ g) 药敏纸片检测分离菌株, 按照美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 标准, 抑菌圈直径  $\leq 18$  mm 者可疑为产 AmpC 酶菌株。

**1.3.3 质粒 AmpC 酶基因检测** 应用细菌 DNA 提取试剂盒提取初筛试验阳性菌为 PCR 模板, 操作按说明书进行。用多重 PCR 引物序列 (上海生工合成)<sup>[3]</sup>, 引物序列见表 1。反应体系 50  $\mu$ l。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 35 s, 56℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72℃ 延伸 8 min。最后所得 PCR 产物加入 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 通过凝胶电泳仪观察结果并拍照记录。

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (编号: 2016WSA08005)

作者简介: 刘永瑞 (1987.10-), 女, 山东济宁人, 硕士, 主治医师, 主要从事细菌耐药研究

通讯作者: 李秀英 (1969.1-), 女, 山东济宁人, 硕士, 副主任医师, 主要从事肺部感染研究

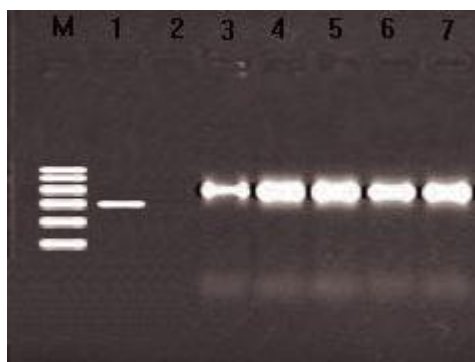
表 1 AmpC 酶 PCR 引物序列

引物	引物序列(5'→3')	预计片段长度(bp)
FOX	P1:ACC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G P2:CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190
EBC	P1:TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG P2:CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302
ACC	P1:AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA P2:TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346
DHA	P1:AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T P2:CCG TAC GCT TAC TGG CTT TGC	405
CIT	P1:TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA P2:TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462
MOX	P1:GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT P2:CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520

## 2 结果

2.1 初步筛选结果 97 株肺炎克雷伯菌中有 40 株对头孢西丁中介或耐药,为初筛产 AmpC 酶阳性菌,检出率为 41.24%(40/97)。

2.2 多重 PCR 结果 多重 PCR 显示 7 株肺炎克雷伯菌株扩增阳性条带(405 bp),判定均为 DHA 型,检出率为 7.22%(7/97),见图 1。



注:M:DNA Marker (从上至下依次为 600、500、400、300、200、100 bp);1:阳性对照;2:阴性对照;3-7:携带 DHA 基因的不同临床分离肺炎克雷伯菌

图 1 多重 PCR 检测质粒介导 AmpC 酶基因扩增产物电泳图

2.3 药敏结果 产 DHA 型质粒 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌对三、四代头孢菌素耐药,仅对亚胺培南较敏感(100.00%),见表 2。

## 3 讨论

肺炎克雷伯菌是临床常见的条件致病菌<sup>[4]</sup>,自从 1988 年美国发现第一个质粒介导的 AmpC 酶,新质粒以每年 1~2 个的数目被发现,近几年质粒介导的 AmpC 酶相继被发现<sup>[5]</sup>,质粒介导的 AmpC 呈持续高表达,且可以通过转化、接合等方式转移给其他细菌,从而造成耐药菌株的广泛产生。质粒介导的 AmpC 酶在大肠杆菌、克雷伯菌、产气肠杆菌及奇异变形杆菌中持续高表达,因此产质粒介导 AmpC 酶肺炎克雷伯菌所致的感染病死率更高<sup>[6]</sup>,从而增加

表 2 7 株产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌药敏结果[n(%)]

抗生素	敏感	中介	耐药
头孢西丁	0	2(28.57)	5(71.43)
头孢曲松	2(28.57)	0	5(71.43)
头孢他啶	1(14.29)	1(14.29)	5(71.43)
头孢吡肟	2(28.57)	0	5(71.43)
氨曲南	2(28.57)	0	5(71.43)
哌拉西林他唑巴坦	5(71.43)	0	2(28.57)
阿米卡星	3(42.86)	0	4(57.14)
环丙沙星	1(14.29)	1(14.29)	5(71.43)
左氧氟沙星	1(14.29)	2(28.57)	4(57.14)
亚胺培南	7(100.00)	0	0
复方新诺明	1(14.29)	0	6(85.71)

了临床抗感染治疗的难度,通过检测肺炎克雷伯菌中 AmpC 酶在本院的分布以及其药敏情况,对于指导临床合理应用抗生素提供一定的依据。

本试验采用头孢西丁药敏纸片法对临床分离的 97 株肺炎克雷伯菌进行初筛,其中可疑产 AmpC 酶菌株 40 株。对初筛阳性肺炎克雷伯菌采用多重 PCR 技术检测其基因型,结果显示 7 株肺炎克雷伯菌扩增出目的片段大小约 405 bp 的条带,根据片段大小确定为 DHA 型 AmpC 酶,产质粒介导 AmpC 酶肺炎克雷伯菌的总检出率 7.22%,低于张戡等<sup>[7]</sup>的报道,考虑可能与收集菌株时间范围较小有关,下一步可通过研究更多菌株来减少误差。世界范围 AmpC 耐药基因以 CMY 型多见,国内以 DHA-1 型和 ACT 型多见,本研究对产质粒介导 AmpC 酶肺炎克雷伯菌进行 AmpC 酶基因检测,确定均为 DHA 型,与文献报道一致<sup>[8,9]</sup>,结合本研究结果推测,DHA 型可能是国内质粒介导 AmpC 酶的主要基因型。

本研究药敏结果显示,产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌表现为多重耐药,对头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟等三、四代头孢菌素均耐药。四代头孢菌素因能快速通过外膜屏障,一般推荐治疗产 AmpC 酶菌株感染,本试验中产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌对四代头孢菌素头孢吡肟也呈现高度耐药(71.43%),考虑可能同时合并其他耐药机制,因此本院对于产质粒介导 AmpC 酶肺炎克雷伯菌感染应避免使用四代头孢菌素;产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌对环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星等喹诺酮及氨基糖甙类抗生素也高度耐药,提示产酶肺炎克雷伯菌可能存在多种耐药机制;产酶菌株仅对碳青霉烯类抗生素亚胺培南敏感,因碳青霉烯类抗生素对  $\beta$ -内酰胺酶高度稳定,与青霉素结合蛋白亲和力强,因此临床治疗产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌感染首选碳青霉烯类抗生素。同时,为了控制耐药菌的流行,应加强 AmpC 的检测,以指导临床合理应用抗菌药物。

(下转第 126 页)

(上接第 123 页)

### 参考文献:

- [1]胡付品,郭燕,朱德妹,等.2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(5):481-491.
- [2]赵虎,孔宪涛.AmpC  $\beta$  内酰胺酶的检测[J].中华检验医学杂志,2003,26(6): 390-392.
- [3]王新慧,许可欣.产 AmpC 酶大肠埃希菌的检测及耐药分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(8):1112-1114.
- [4]Younas S,Ejaz H,Zafar A,et al.AmpC beta -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*:An emerging threat to the paediatric patients[J].Park Med Assoc,2018,68(6):893-897.
- [5]Markovska R,Schneider I,Marteva-Proevsk Y,et al.First detection of the AmpC beta-lactamase ACC-1 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate in Bulgaria[J].Chemother,2012,24(5):307-308.
- [6]王晓丽,葛亮,李兴华.产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶和头孢菌素酶

肺炎克雷伯菌的分布及耐药特征分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(1):5-9.

[7]张戡,邓敏,谢新,等.产 AmpC 肺炎克雷伯菌质粒介导的多药耐药性与基因型研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(1):7-9.

[8]Liu XQ,Liu YR.Detection and genotype analysis of AmpC  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from tertiary hospitals[J].Exp Ther Med,2016,12(1):480-484.

[9]郑港森,刘赞赞,张加勤,等.大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒型 AmpC 酶基因型的检测分析[J].国际检验医学杂志,2015,36(11):1505-1506.

收稿日期:2019-5-23;修回日期:2019-5-30

编辑/王朵梅