

12 株牛源肺炎克雷伯菌 ESBLs 类抗生素的耐药性与耐药基因检测^①

刀丽梅, 韩冠双, 曹立亭, 程方俊,
黄攀, 郭建华, 方志超, 林雅

西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为了解重庆地区 12 株牛源肺炎克雷伯菌的超广谱 β -内酰胺酶耐药性及 ESBLs 基因型分布情况, 该试验采用纸片扩散法对 12 株肺炎克雷伯菌进行超广谱抗菌药物的敏感性检测, 通过 PCR 方法检测其所产生的耐药基因类型. 结果表明: 12 株菌对阿莫西林、氨苄西林的耐药率均为 100%, 头孢噻吩和先锋霉素 V 的耐药率为 17%, 头孢曲松的耐药率为 0%. 产 ESBLs 菌株 3 种耐药基因 *TEM*, *SHV*, *CTX-M* 的检出率分别为 100%, 42%, 67%, 以 *TEM* 的检出率最高.

关键词: 牛源肺炎克雷伯菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 药物敏感性; 耐药基因

中图分类号: S855.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)05-0049-05

近年来, 肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumonia*, KP 成为仅次于大肠杆菌的人类公共社区及医院感染最重要的条件致病菌^[1-3]. 在动物方面, 邹立扣等^[4]对肺炎克雷伯菌引起猪的肺炎等作了相关报道, Aslan 等^[5]报道了肺炎克雷伯菌在引起牛的上呼吸道细菌性病原中占 20%, 许惠等^[6]也报道了肺炎克雷伯氏菌引起犊牛发病率为 25.0%, 育成牛发病率为 12.3%. 近年来, 肺炎克雷伯菌耐 β -内酰胺类抗生素的报道日益增多, 韦衍莉等^[7]报道了氨苄西林的耐药率高达 100%, 白云等^[8]报道了超广谱 β -内酰胺酶(Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)阳性菌株耐药性明显高于阴性菌株, 氨苄西林耐药率达 100%, 头孢菌素类抗生素有些也高达 99%, 即使是 ESBLs 阴性菌株, 多重耐药的情况也十分严重. Thomson^[9]、唐曙明等^[10]报道了肺炎克雷伯菌超广谱 β -内酰胺酶耐药基因主要与 *SHV*, *TEM*, *CTX-M* 有关.

本试验对分离自重庆荣昌和丰都牛场的 12 株牛源肺炎克雷伯菌进行了超广谱 β -内酰胺环类药物敏感试验, 通过 PCR 方法检测 *TEM*, *SHV*, *CTX-M* 基因, 分析其所产生基因类型, 为重庆市养牛场以超广谱 β -内酰胺类抗生素进行肺炎克雷伯菌病的防治提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 试验菌株

于 2013 年 4 月—9 月在重庆(荣昌和丰都)两地区牛场采集并分离纯化、鉴定的肺炎克雷伯菌 12 株(荣

① 收稿日期: 2016-06-15

基金项目: 重庆市重点科技攻关项目(CSTC2012jcsf-jfzhX0021); 西南大学博士启动基金(2013BSr03).

作者简介: 刀丽梅(1990-), 女, 云南普洱人, 硕士研究生, 主要从事动物微生物学及免疫学研究.

通信作者: 程方俊, 副教授.

昌地区 7 株, R1-R7; 丰都地区 5 株, F1-F5).

1.2 材 料

普通琼脂(LB)培养基, 药敏纸片购于杭州天和微生物试剂公司, 常规质粒提取试剂盒 E. Z. N. A. Plasmid Mini Kit I、Gold-view 核酸染色剂(购于广州飞扬生物工程有限公司), Premix Ex Taq(Loadng dye mix)购于大连宝生物公司(TaKaRa), DNA Marker DL2000、10×Binding Buffer(购于上海生工股份有限公司).

1.3 药敏试验

采用美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的 K-B 法将保存的 12 株菌株接种于 LB 液体培养基中, 复苏菌种后接种到普通平板培养基, 勾取单个菌落接种到 LB 液体培养基过夜培养 12~18 h. 每管菌液与标准比浊管进行比浊, 用灭菌生理盐水稀释成 0.5 个麦氏比浊标准; 用无菌棉拭蘸取菌液均匀涂布整个平板表面; 室温下干燥后用无菌镊子取药敏纸片贴于平板表面, 每张纸片的间距不小于 24 mm, 纸片的中心距平板边缘不小于 15 mm, 每个平板贴 5~6 张纸片, 并将平板置于 37 ℃恒温培养箱中倒置培养 24 h, 用标尺量取抑菌圈直径.

1.4 PCR 检测 ESBLs 菌株基因

SHV, *TEM*, *CTX-M* 基因引物设计参照文献[11], *TEM* 基因: 上游: 5'-CAGCGGTAAGATCCTT-GAGA-3', 下游: 5'-ACTCCCCGTCGTGTAGATAA-3'; *SHV* 基因: 上游: 5'-GGCCGCGTAGGCAT-GATAGA-3', 下游: 5'-CCCGGCGATTTGCTGATTTC-3'; *CTX-M* 基因: 上游: 5'-AACCGTCACGCT-GTTGTTAG-3', 下游: 5'-TTGAGGCGTGGTGAAGTAAG-3'.

模版 DNA 制备及反应条件: 按照试剂盒 E. Z. N. A. Plasmid Mini Kit I 操作步骤提取质粒 DNA. PCR 反应: PCR 扩增采用 25 μL 体系. *TEM* 基因反应参数为: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 循环 30 次; 72 ℃ 7 min; *SHV* 基因反应参数为: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 45 s, 循环 30 次; 72 ℃ 7 min; *CTX-M* 基因反应参数为: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 57 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 循环 30 次; 72 ℃ 7 min. 1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶 DNA 成像仪分析结果.

2 结 果

2.1 药敏试验结果

12 株肺炎克雷伯菌超广谱 β-内酰胺酶类药物的耐药情况(表 1: 耐药 R、中介 I、敏感 S). 从表 1 中得知, 阿莫西林和氨苄西林的耐药率为 100%, 头孢噻吩和先锋霉素 V 的耐药率为 17%, 头孢曲松的耐药率为 0.

表 1 肺炎克雷伯菌药敏试验结果

抗生素	菌 株/mm												合计	
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	F1	F2	F3	F4	F5	耐药菌株	耐药率/%
氨苄西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	100
阿莫西林	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	100
头孢噻吩	S	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	2	17
头孢曲松	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0
先锋霉素 V	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	2	17

2.2 产 ESBLs 菌株基因 PCR 扩增结果

2.2.1 产 ESBLs 菌株基因 PCR 扩增凝胶电泳结果

产 ESBLs 菌株 3 种耐药基因 *TEM*, *SHV*, *CTX-M* 的 PCR 扩增凝胶电泳结果如图 1、图 2、图 3、图 4、图 5、图 6 所示.

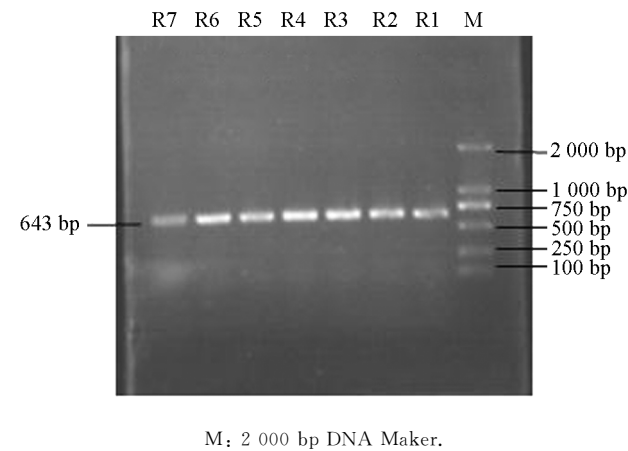


图 1 荣昌 KP 分离株 *TEM* 基因凝胶电泳图

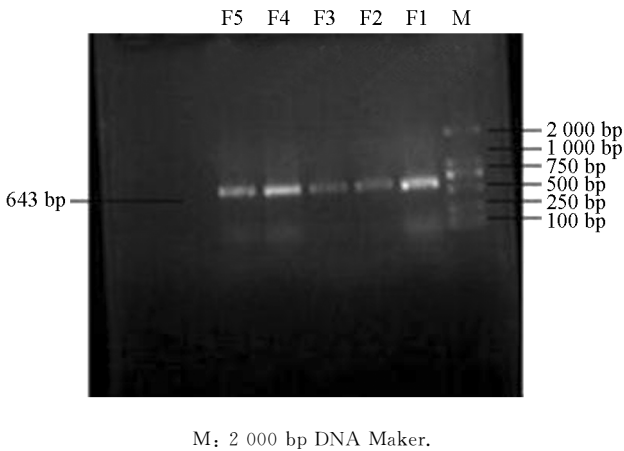


图 2 丰都 KP 分离株 *TEM* 基因凝胶电泳图

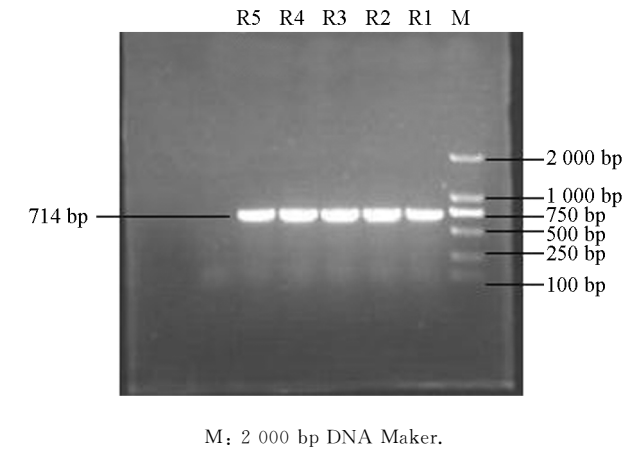


图 3 荣昌 KP 分离株 *SHV* 基因凝胶电泳图

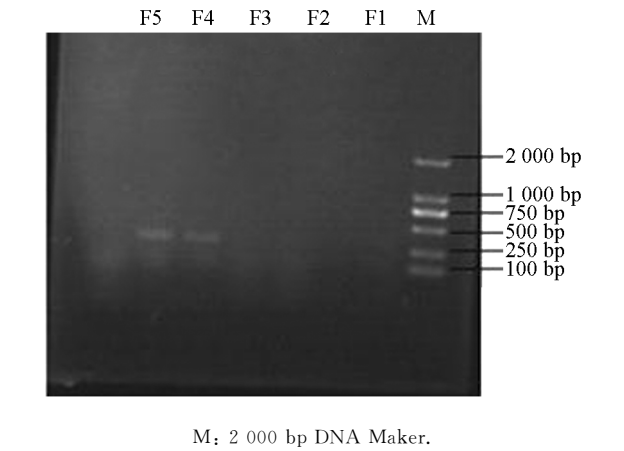


图 4 丰都 KP 分离株 *SHV* 基因凝胶电泳图

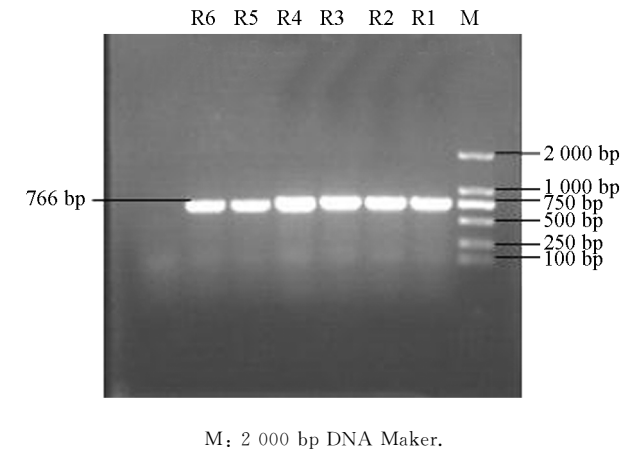


图 5 荣昌 KP 分离株 *CTX-M* 基因凝胶电泳图

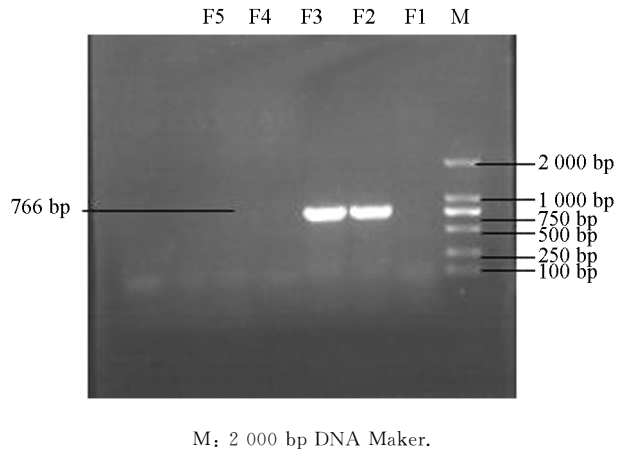


图 6 丰都 KP 分离株 *CTX-M* 基因凝胶电泳图

2.2.2 产 ESBLs 菌株基因检测结果

从表 2 可知, 12 株肺炎克雷伯菌均能检测出 *TEM* 基因, 占 100%; *SHV* 基因共检测出 5 株(均来源于荣昌), 占 42%; *CTX-M* 基因检测出 8 株(荣昌有 6 株, 丰都有 2 株), 占 67%; 携带有 *TEM* 和 *SHV* 两种耐药基因的共 5 株, 占 42%; *TEM* 和 *CTX-M* 的共 8 株, 占 67%; *SHV* 和 *CTX-M* 的共 5 株, 占 42%; 3 种基因均携带的共有 5 株, 占 42%.

表 2 肺炎克雷伯菌 ESBLs 基因型鉴定

基 因 型	阳 性 菌 数		
	荣昌地区	丰都地区	合计
TEM	7(100%)	5(100%)	12(100%)
SHV	5(71%)	0(0%)	5(42%)
CTX-M	6(86%)	2(40%)	8(67%)
TEM; SHV	5(71%)	0(0%)	5(42%)
TEM; CTX-M	6(86%)	2(40%)	8(67%)
SHV; CTX-M	5(71%)	0(0%)	5(42%)
SHV; CTX-M; TEM	5(71%)	0(0%)	5(42%)

3 讨 论

由于β-内酰胺类抗菌药物的广泛使用,使肺炎克雷伯菌产生超广谱β-内酰胺酶(ESBLs),因此对β-内酰胺类抗生素的耐药性日益严重.因编码β-内酰胺酶的基因多为质粒介导,使得耐药基因在菌株之间传播,致使耐药基因扩散蔓延^[12].对肺炎克雷伯菌中ESBLs基因的检测,可了解ESBLs基因的分布特点.

在本研究中,两地区的肺炎克雷伯菌对β-内酰胺类抗生素均有比较严重的耐药性,对青霉素类抗生素耐药尤为严重,且表现为普遍多重耐药现象.药敏试验结果表明12株牛源肺炎克雷伯菌的阿莫西林和氨苄西林耐药率均为100%,与管中斌等^[13]报道的基本一致,但头孢类药物有些菌株耐药,头孢噻吩和先锋霉素V的耐药率为17%,头孢曲松的耐药率为0,与其报道的有些差异.这可能与不同地区抗生素使用的种类和数量不同有关,也有可能青霉素类抗生素价格相对低廉,临床生产中大量使用,而头孢类药物较昂贵,使用较少有关.

不同地区由于抗生素使用的种类和数量不同,所造成的抗生素选择性压力不同,相对应的ESBLs流行类型也有所不同^[10, 14].本研究结果显示,12株来源不同的牛肺炎克雷伯菌中可检测出产生ESBLs耐药基因型有TEM,SHV,CTX-M3种,以TEM为主,其检出率高达100%,SHV的检出率为42%,CTX-M的检出率为67%;同一菌株携带多个基因的现象较为普遍,同时携带有TEM和SHV两种耐药基因的占42%;TEM和CTX-M的占67%;SHV和CTX-M的占42%;3种基因均携带的占42%,这与邹立扣等^[4]报道的基本一致,与卢月梅等^[14]报道的稍有差异.TEM是革兰阴性杆菌中最常见的β-内酰胺酶,主要介导细菌对各种青霉素和部分第1代头孢菌素耐药,而对第3代头孢菌素和酶抑制剂较敏感^[15-16].本试验中分离的12株ESBLs肺炎克雷伯菌对氨苄西林和阿莫西林的耐药率为100%,而头孢曲松的耐药率为0,其原因可能是本地区以TEM流行为主.SHV,CTX-M两种基因型的检出率也很高,与TEM一起引起耐药.

肺炎克雷伯病原菌耐药性的产生与抗菌药物的使用不当有关,近年来随着抗生素的滥用,耐药菌通过质粒介导等方式,将耐药基因传递给牛体内的肺炎克雷伯菌群,或者直接感染,再将易感染的肺炎克雷伯菌排泄入环境中,如此恶性循环带来含耐药基因的菌株,给养殖业造成了巨大损失.

肺炎克雷伯菌主要经呼吸道及泌尿道感染,其药敏谱表现为多重耐药,尤其对青霉素类、头孢菌素类高度耐药.目前亚胺培南是治疗该菌最有效的药物^[7-8],但主要用于人医方面.因此,在临床中要避免使用青霉素类,部分头孢菌素类(尤其是一、二代),可选用氨基糖苷类抗生素,如庆大霉素、卡那霉素、链霉素等药物,同时控制耐药菌株的散播和流行,做好饲养管理工作,监控细菌耐药性,合理使用抗生素.

参考文献:

[1] RONALD A. The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and em erging Pathogens [J]. Dis Mon, 2003, 49(2): 71—82.

[2] CRAVEN D E. What is Healthcare Associated Pneumonia, and How Should it be Treated? [J]. Curr Opin Infect Dis, 2006, 19(2): 153—160.

[3] GUPTA A. Hospital a Cquired Infections in the Neonatal Intensive Care Unit-Klebsiella Pneumoniae [J]. Semin Perinatol, 2002, 26(5): 340—345.

[4] 邹立扣, 王红宁, 曾 博, 等. 用 PCR 及 ERIC-PCR 检测猪肺炎克雷伯氏菌耐药基因 [C]. 南宁: 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第七届全国会员代表大会暨第十三次学术研讨会, 2009.

[5] ASLAN V, MADEN M, ERGANIS O, et al. Clinical Efficacy of Florfenicol in the Treatment of Calf Respiratory Tract Infections [J]. Vet Q, 2002, 24(1): 35—39.

[6] 许 惠. 肉牛肺炎克雷伯氏菌病的诊治报告 [J]. 中国奶牛, 2012, 14(7): 42—43.

[7] 韦衍莉, 陈如寿, 范志刚. 373 株肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析 [J]. 检验医学与临床, 2013, 10(17): 2211—2212.

[8] 白 云, 轩海华. 肺炎克雷伯菌 562 株临床分布及耐药性分析 [J]. 中国社区医师, 2013, 15(19): 8.

[9] KENNETH S. Thomson. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1019—1025.

[10] 唐曙明, 方红辉, 杨自华. 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的耐药型与基因分型 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(11): 1653—1657.

[11] NEWIRE E A, AHMED S F, HOUSE B, et al. Detection of New SHV-12, SHV-5 and SHV-2a Variants of Extended Spectrum Beta-Lactamase in *Klebsiella pneumonia* in Egypt [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2013, 12(1): 16.

[12] CARATTOLI A. Plasmids in Gram Negatives: Molecular Typing of Resistance Plasmids [J]. Int J Med Microbiol, 2011, 301(8): 654—658.

[13] 管中斌, 王红宁, 曾 博, 等. 规模化猪场感染肺炎克雷伯菌的分离鉴定及耐药性调查 [C]. 长春: 第十二次人畜共患病学术研讨会暨第六届第十四次教学专业委员会论文集, 2012.

[14] 卢月梅, 何 林, 陈升汶, 等. 呼吸道产超广谱 β -内酰胺酶分离株耐药基因初步分型 [J]. 中国微生态学杂志, 2004, 16(6): 340—344.

[15] DU BOIS S K, MARRIOTT M S, AMYES S G. TEM-and-SHV-Derived Extended-Spectrum Beta-Lactamases: Relationship Between Selection, Structure and Function [J]. J Antimicrob Chemother, 1995, 35(1): 7—22.

[16] KNOX J R. Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant TEM-Type-Lactamases: Mutations, Specificity and Three-Dimensional Structure [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(12): 2593—2601.

ESBLs Antibiotic Resistance Analysis and Resistance Gene Detection of 12 Strains of *Klebsiella pneumonia* from Bovine

DAO Li-mei, HAN Guan-shuang, CAO Li-ting, CHENG Fang-jun,
HUANG Pan, GUO Jian-hua, FANG Zhi-chao, LIN Ya
Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: The purpose of this study was to detect the drug resistance and the genotypes of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) of 12 strains of *Klebsiella pneumonia*, which were isolated from bovine in Chongqing. The Kirby-Bauer (K-B) method was employed to determine the ultra-broad spectrum antimicrobial sensitivity of these *K. pneumonia* strains, and PCR was performed to detect the type of resistance genes in them. The results indicated that all the *K. pneumonia* strains showed resistance to amoxicillin and ampicillin, and 17% of them were resistant to cefalotin and cephalothin V, while no strains could endure ceftriaxone. The positive rate of the three resistance genes, *TEM*, *SHV* and *CTX-M* of ESBLs, in the strains were 100%, 42% and 67%, respectively.

Key words: *Klebsiella pneumonia* from bovine; extended-spectrum β -lactamases (ESBLs); drug sensitivity; drug-resistance gene

