

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.004.html>

## 碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌 $\beta$ -内酰胺类耐药基因研究

黄中海<sup>1</sup>, 王中新<sup>2</sup>, 周强<sup>3</sup>, 刘周<sup>3</sup>, 黄升海<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌  $\beta$ -内酰胺类耐药基因携带情况。方法 收集 242 株临床分离的粘质沙雷菌, 采用 Vitek-2 Compact 全自动微生物系统对其鉴定并进行药敏试验, 筛选出对亚胺培南耐药 18 株、中介 1 株; 再用 K-B 法检测 19 株细菌对厄他培南和美罗培南的药物敏感性, 确认均为耐药; 采用改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验检测碳青霉烯酶; PCR 检测碳青霉烯酶基因 *blaKPC*、*blaNMC*、*blaIMP*、*blaGIM*、*blaVIM*、*blaOXA-23* 及超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因 *blaVEB*、*blaPER*、*blaTEM*、*blaSHV*、*blaCTX-M-1*、*blaCTX-M-2*、*blaCTX-M-9*, 阳性结果进行 DNA 测序, BLAST 比对确定基因型。结果 药敏结果显示, 19 株细菌对美罗培南、厄他培南、氨曲南、环丙沙星、头孢唑林、头孢曲松、头孢噻肟全部耐药, 对亚胺培南 18 株耐药、1 株中介; 对阿米卡星全部敏感; 对庆大霉素敏感率为 57.9%; 妥布霉素敏感率不到 30%; 对头孢替坦、头孢他啶、头孢吡肟敏感率均不足 20%; 左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦敏感率均不足 10%; 改良 Hodge 试验阳性

18 株, 阴性 1 株; EDTA 协同试验全部阴性; PCR 扩增和 DNA 测序显示, 7 株含 *blaKPC-2*、6 株含 *blaCTX-M-14*、3 株含 *blaSHV-11*、2 株含 *blaSHV-12*、1 株含 *blaOXA-23* 基因; 19 株细菌均未检出 *blaNMC*、*blaIMP*、*blaGIM*、*blaVIM* 碳青霉烯酶基因及 *blaVEB*、*blaPER*、*blaTEM*、*blaCTX-M-1*、*blaCTX-M-2* 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因。结论 分离的碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌, 耐药现象较为严重, 主要携带 *blaKPC-2* 型、*blaCTX-M-14* 型耐药基因。

**关键词** 粘质沙雷菌; 耐药基因; 聚合酶链反应

**中图分类号** R 446.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0313-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.002

粘质沙雷菌系沙雷菌属肠杆菌科革兰阴性杆菌, 常存于健康人的皮肤、肠道和呼吸道, 曾被认为是无害的环境污染菌。现研究<sup>[1]</sup>表明, 该菌在机体抵抗力低下时, 可引起呼吸道、伤口、泌尿道感染及败血症等多种疾病, 重症者常能危及生命, 并可引起院内感染的爆发流行。近年来, 随着碳青霉烯类抗生素的广泛使用, 碳青霉烯类耐药的粘质沙雷菌检出率逐年提高<sup>[2]</sup>, 给临床治疗带来很大困难。粘质沙雷菌耐药机制比较复杂(如产生  $\beta$ -内酰胺酶、外膜通透性下降及主动外排机制的过度表达等<sup>[3]</sup>)。该研究针对碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌  $\beta$ -内酰胺类耐药基因携带情况进行调查, 初步探讨其耐药机

2016-12-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371797)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院微生物学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

<sup>3</sup>安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601

作者简介: 黄中海, 男, 副主任技师, 硕士研究生;

黄升海, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huang-shh68@aliyun.com

accommodated by glabridin through the pathway of p38/MAPK on atherosclerosis(AS) model rabbit. **Methods** The AS model rabbit was set up and New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: normal group, high fat model group, glabridin group. The changes of serum lipid components was analyzed in model rabbit. The ultrastructural changes of rabbit arterial wall was observed through by hematoxylin-eosin staining(HE). The distribution and expression of MLCK in rabbit arterial intima was measured by immunohistochemistry. The changes of MLCK and p38 phosphorylation in endothelial cells was surveyed by Western blot. **Results** The establishment of AS rabbit model was successful. After being fed up with the high fat diet for 12 weeks, the atherosclerotic plaques were observed clearly. And compared with the normal control, HE staining showed that the gap between the endothelial cells was gradually increased, and a large number of foam cells were formatted. The expression of MLCK and the expression of p38 phosphorylation was enhanced in the rabbit artery tissue. After glabridin was added into the high fat food, the expression of the MLCK and the p38 phosphorylation in the artery tissue were decreased. The level of aortic intimal lesion was certainly lessend. **Conclusion** Glabridin may regulate the expression of MLCK in endothelial cell of AS model of rabbit artery by the pathway of p38/MAPK.

**Key words** atherosclerosis; myosin light chain kinase; glabridin

制,为临床治疗和院内感染的防控提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集筛选 2013 年~2015 年安徽医科大学第一附属医院和安徽医科大学第二附属医院对亚胺培南耐药或中介的 19 株粘质沙雷菌(剔除同一患者相同部位的重复菌株,18 株耐药,1 株中介)。质控菌为大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705(国家菌种保藏中心)。

**1.2 试剂与仪器** Vitek-2 Compact (法国梅里埃公司);MH 琼脂平板(合肥天达生物公司);厄他培南(10 μg/片)、美罗培南药敏纸片(10 μg/片)(英国 Oxoid 公司);PCR 试剂盒、DL2000DNA/Marker(日本 TaKaRa 公司);50 × TAE、引物、乙二胺四乙酸(上海生工生物公司);琼脂糖(法国 BLOWEST 公司);PCR 扩增仪(德国 Biome 公司);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);电泳仪(北京六一仪器厂);超速低温离心机(美国 Sigma 公司)。

**1.3 引物合成** 引物由上海生工生物有限公司合成。见表 1。

**1.4 改良 Hodge 试验(MHT)** 参照 CLSI 法,调 0.5 麦氏单位大肠埃希菌 ATCC25922,再用生理盐水 1:10 稀释,用棉签涂布于 M-H 平板。平板中央贴美罗培南纸片,用接种环以纸片为中心向平板边缘划线。待平板干燥后放 35 °C 孵箱,培养 16~20 h。肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 为阳性对照,抗菌药物抑菌圈内出现矢状生长为阳性。

**1.5 EDTA 协同试验** 用 0.5 麦氏单位的待测菌液涂布 M-H 平板,贴厄他培南纸片,距其 1 cm 处贴一空纸片,滴加 0.5 mol/L EDTA 4 μl。35 °C 过夜培养,厄他培南抑菌圈靠近 EDTA 纸片侧出现“匙孔”现象,抑菌圈明显扩大者为产金属酶阳性菌株。

**1.6 细菌 DNA 提取** 取平板数个菌落研磨于装有 150 μl 灭菌去离子水的 EP 管中,100 °C 煮沸 10 min,用低温超速离心机 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液于 EP 管,-20 °C 保存备用。

**1.7 药敏试验** K-B 法检测 19 株细菌对厄他培南、美罗培南敏感性;仪器法检测对阿米卡星、氨曲南、头孢曲松、头孢他啶、头孢噻肟、头孢唑林、头孢替坦、环丙沙星、头孢吡肟、庆大霉素、亚胺培南、左氧氟沙星、妥布霉素、哌拉西林-他唑巴坦(特治星)敏感性。药敏结果判读按照 2015 年 CLISM100-

表 1 PCR 引物序列及扩增片段长度

引物名称	序列	预计长度 (bp)
KPC-gp	F: 5'-GCGGAACCATTCGCTAAACTC-3' R: 5'-CGCCCAACTCCTTCAGCAACA-3'	340
KPC-qc	F: 5'-ATGTCACTGTATCGCCGTCT-3' R: 5'-TTACTGCCCCGTTGACGC-3'	882
NMC	F: 5'-ATTTTTTTCATGATGAAGTTAAGCC-3' R: 5'-TGCAGCTTAATTTTTCAGATTAG-3'	2 122
IMP	F: 5'-AACCAAGTTTTGCCTTACCAT-3' R: 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	587
GIM	F: 5'-AGAACCTTGACCGAACGCGAG-3' R: 5'-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3'	753
VIM	F: 5'-TCTACATGACCGCGTCTGTG-3' R: 5'-TGTGCTTTGACAACGTTCCG-3'	748
OXA-23gp	F: 5'-CCCCGAGTCAGATTGTTC-3' R: 5'-GCTTCATGGCTTCTCCTAG-3'	291
VEB	F: 5'-GCGGTAATTTAACAG-3' R: 5'-GCCTATGAGGCAGTGT-3'	961
PER	F: 5'-AGTCAGCGGCTTAGATA-3' R: 5'-CGTATGAAAAGGACAATC-3'	978
TEM	F: 5'-ATAAAATTCCTGAAGAC-3' R: 5'-TTACCAATGCTTAATCA-3'	1 075
SHV	F: 5'-GGTTATGCGTTATATTCCGC-3' R: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'	867
CTX-M-1gp	F: 5'-AAAAATCACTGCGCCAGTTC-3' R: 5'-AGCTTATTCATCGCCAGTT-3'	415
CTX-M-2gp	F: 5'-CGACGCTACCCCTGCTATT-3' R: 5'-CCAGCGTCAGATTTTTCAGG-3'	552
CTX-M-9gp	F: 5'-CAAAGAGAGTGCAACGGATG-3' R: 5'-ATTGGAAGCGTTTCATCACC-3'	205

S25 文件。

**1.8 PCR 扩增** 反应体系为 50 μl,含 TaKaRa Taq (5 U/μl) 0.25 μl,10 × PCR Buffer 5 μl,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 4 μl,待测菌 DNA 模板 2 μl,引物 F(20 μmol/L) 1 μl,引物 R(20 μmol/L) 1 μl,双蒸水补足至 50 μl。经反复试验优化,确定 PCR 反应条件为预变性 94 °C 15 min,变性 94 °C 1 min,退火 68 °C 2 min,72 °C 延伸 3 min,35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,扩增产物在凝胶成像系统中扫描记录结果。PCR 产物经过切胶回收后,送上海生工生物公司测序,序列用 NCBI 网站(www.ncbi.nlm.nih.gov/) 的 BLAST 程序进行比对,确定基因型。

### 2 结果

**2.1 菌株分布** 19 株细菌,来自 ICU 8 株、干部病区 ICU 4 株,占 63.2%;急诊外科 2 株,神经内科、妇科、创伤骨科、心胸外科、呼吸内科各 1 株。标本以

痰液为主,共 12 份,占 63.2%; 2 份脑脊液,2 份留置针,阴道分泌物、腹水、切口分泌物各 1 份。患者平均年龄为 55 岁,见表 2。

表 2 19 株碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌基本资料

菌株号	性别	年龄	科室	标本类型
S1	男	61	ICU	痰
S2	男	27	ICU	痰
S3	男	68	ICU	脑脊液
S4	男	42	ICU	痰
S5	男	48	干二 ICU	痰
S6	男	90	干二神经内科	痰
S7	男	29	ICU	留置针
S8	男	83	干二 ICU	痰
S9	男	28	ICU	痰
S10	女	60	ICU	脑脊液
S11	男	69	干二 ICU	痰
S12	男	28	干二 ICU	痰
S13	男	79	ICU	留置针
S14	女	39	妇科	阴道分泌物
S15	男	44	急诊外科	腹水
S16	男	75	呼吸内科	痰
S17	女	59	创伤骨科	切口分泌物
S18	男	21	急诊外科	痰
S19	女	63	心胸外科	痰

2.2 MHT 结果 19 株细菌中有 18 株 MHT 阳性,阳性率为 94.7%,见表 3,部分阳性结果见图 1。

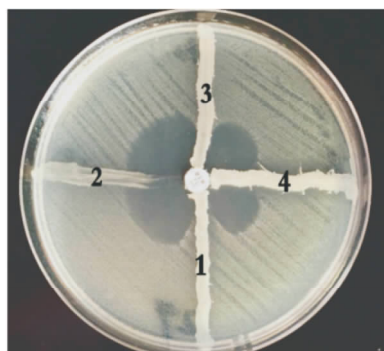


图 1 部分 MHT 试验结果

1: 阳性对照:肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705; 2: 阴性对照:大肠埃希菌 ATCC25922; 3,4: 待测菌株阳性结果

2.3 EDTA 协同试验结果 19 株细菌均为阴性,见表 3,部分结果如图 2 所示。

2.4 耐药基因携带情况 检出含 *blaKPC-2* 基因 7 株(S6、S8、S11、S12、S16、S17、S18)、含 *blaCTX-m-14* 基因 6 株(S2、S4、S6、S7、S8、S11)、含 *blaSHV-11* 基因 3 株(S1、S2、S4)、含 *blaSHV-12* 基因 2 株(S3、S5),含 *blaOXA-23* 基因 1 株(S8); 19 株细菌中均未检出

*blaNMC*、*blaIMP*、*blaGIM*、*blaVIM* 碳青霉烯酶基因及 *blaVEB*、*blaPER*、*blaTEM*、*blaCTX-m-1*、*blaCTX-m-2* 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因,见表 3,PCR 扩增阳性结果见图 3~7。

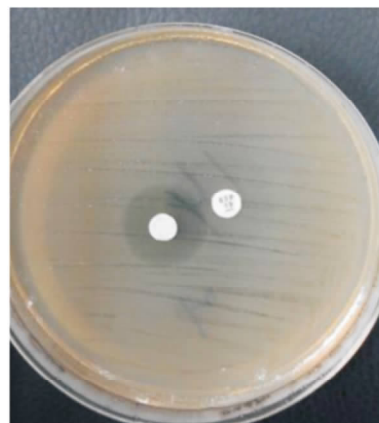


图 2 部分 EDTA 协同试验结果

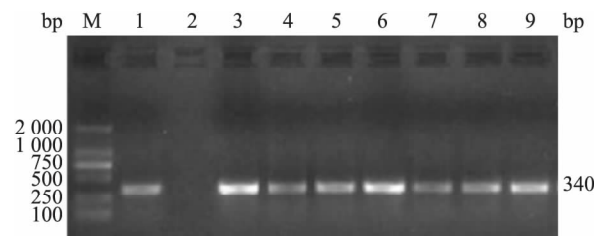


图 3 *blaKPC-gp* 基因阳性结果电泳图

M: DL2000 DNA Marke; 1: 阳性对照:肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705; 2: 阴性对照:大肠埃希菌 ATCC25922; 3~9: *blaKPC-gp* 基因阳性标本,在 340 bp 处出现阳性条带

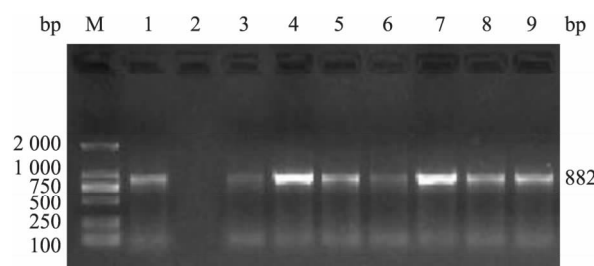


图 4 *blaKPC-gc* 基因阳性结果电泳图

M: DL2000DNA Marker; 1: 阳性对照:肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705; 2: 阴性对照:大肠埃希菌 ATCC25922; 3~9: *blaKPC-gc* 基因阳性标本,在 882 bp 处出现阳性条带

2.5 药敏试验结果 药敏结果显示,19 株细菌对美罗培南、厄他培南、氨基曲南、环丙沙星、头孢唑林、头孢曲松、头孢噻肟全部耐药,对亚胺培南 18 株耐药、1 株中介;对阿米卡星全部敏感;对庆大霉素敏

表3 19株细菌碳青霉烯类药物敏感试验、MHT、EDTA 协同试验及携带耐药基因结果

菌株号	MIC 法(μg/ml)			K-B 法(mm)			MHT	携带基因	EDTA 协同试验
	亚胺培南	厄他培南	美罗培南	厄他培南	美罗培南	美罗培南			
S1	≥16	6	6	6	6	6	+	<i>shv-11</i>	-
S2	2	8	7	8	7	7	+	<i>shv-11</i> 、 <i>ctx-m-14</i>	-
S3	≥16	6	6	6	6	6	+	<i>shv-12</i>	-
S4	≥16	6	6	6	6	6	+	<i>shv-11</i> 、 <i>ctx-m-14</i>	-
S5	≥16	6	6	6	6	6	-	<i>shv-12</i>	-
S6	>8	11	15	11	15	15	+	<i>kpc-2</i> 、 <i>ctx-m-14</i>	-
S7	≥16	9	8	9	8	8	+	<i>ctx-m-14</i>	-
S8	≥16	6	6	6	6	6	+	<i>kpc-2</i> 、 <i>oxa-23</i> 、 <i>ctx-m-14</i>	-
S9	≥16	11	15	11	15	15	+	-	-
S10	≥16	5	6	5	6	6	+	-	-
S11	≥16	6	11	6	11	11	+	<i>kpc-2</i> 、 <i>ctx-m-14</i>	-
S12	≥16	6	6	6	6	6	+	<i>kpc-2</i>	-
S13	>8	7	8	7	8	8	+	-	-
S14	>8	6	6	6	6	6	+	-	-
S15	>8	8	8	8	8	8	+	-	-
S16	≥16	7	6	7	6	6	+	<i>kpc-2</i>	-
S17	≥16	11	15	11	15	15	+	<i>kpc-2</i>	-
S18	>8	10	9	10	9	9	+	<i>kpc-2</i>	-
S19	>8	8	7	8	7	7	+	-	-

表4 19株细菌常用药物敏感试验结果

抗菌药物	MIC 法(μg/ml)																		
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19
阿米卡星	8	4	8	8	4	16	≤8	16	4	16	8	16	≤8	≤8	32	≤8	4	≤8	≤8
氨曲南	≥64	≥64	≥64	≥8	≥64	≥64	>16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	>16	>16	>16	32	≥64	>16	>16
头孢曲松	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	>32	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	>32	>32	>32	≥64	≥64	>32	>32
头孢噻肟	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	>32	≥64	≥64	≥64	≥64	>32	>32	>32	>32	≥64	≥64	>32	>32
头孢他啶	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	>16	≥64	4	≥64	32	4	>16	4	>16	≥32	8	16	16
头孢唑啉	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	>16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	>16	>16	>16	>16	≥64	>16	>16
头孢替坦	≥64	≤4	≥64	≥64	≥64	≥64	>16	≥64	≥64	≥64	≥64	16	>16	>16	>16	>16	16	>16	>16
环丙沙星	≥4	≥4	≥4	≥4	≥4	≥4	>2	≥4	≥4	≥4	≥4	≥4	>2	>2	>2	2	≥4	>2	>2
头孢吡肟	≥64	4	≥64	≥64	≥64	≥64	>16	32	8	≥64	≥64	8	>16	16	>16	≤8	4	>16	>16
庆大霉素	≥16	≥16	≥16	≥16	≥16	4	≤4	4	≥16	≥16	4	4	≤4	≤4	≤4	≤4	≥16	≤4	≤4
左氧氟沙星	≥8	4	≥8	≥8	≥8	≥8	>4	≥8	4	4	≥8	≥8	>4	>4	>4	≤2	≥8	>4	>4
妥布霉素	≥16	8	≥16	≥16	≥16	≥16	≤4	≥16	≥16	≥16	≥16	≥16	8	≤4	≤4	>8	8	≤4	≤4
特治星	≥128	≤4	≥128	≥128	≥128	≥128	>64	≥128	64	≥128	≥128	64	>64	>64	>64	≥64	≥128	>64	>64

感率为 57.9%;妥布霉素敏感率不到 30%;对头孢替坦、头孢他啶、头孢吡肟敏感率均不足 20%;左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦敏感率均不足 10%。碳青霉烯类药物敏感结果,见表 3,其余药敏结果,见表 4。

### 3 讨论

粘质沙雷菌占临床分离沙雷菌的 90%,是引起院内感染和肠道外感染的重要条件致病菌<sup>[4]</sup>。近来随着碳青霉烯类抗生素的广泛使用,对其耐药粘质沙雷菌不断被检出。2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测数据显示,沙雷菌对亚胺培南、美罗培南

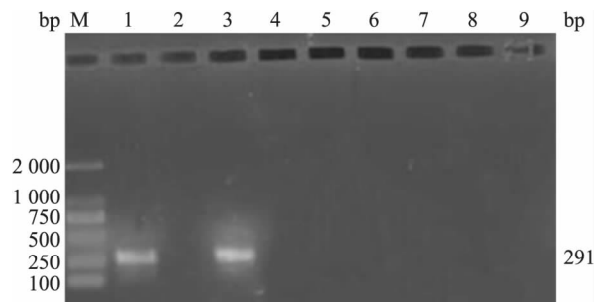


图5 *blaOXA-23gp* 基因阳性结果电泳图

M: DL2000DNA Marker; 1: 阳性对照: *blaOXA-23* 阳性菌株; 2: 阴性对照: 大肠埃希菌 ATCC25922; 3: *blaOXA-23* 基因阳性标本,在 291 bp 处出现阳性条带; 4~9: *blaOXA-23* 基因阴性标本

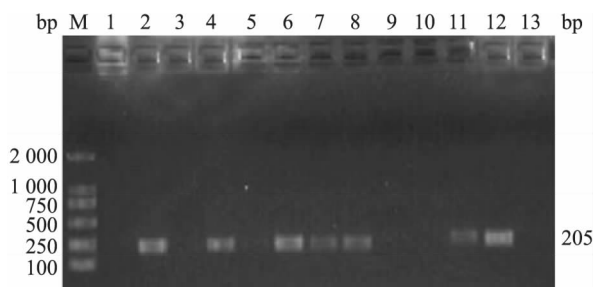


图6 *bla*<sub>CTX-M-9</sub> 基因阳性结果电泳图

M: DL2000DNA Marker; 1、3、5、9、10: *bla*<sub>CTX-M-9</sub> 基因阴性标本; 2、4、6、7、8、11: *bla*<sub>CTX-M-9</sub> 基因阳性标本, 在 205 bp 处出现阳性条带; 12: 阳性对照为 *bla*<sub>CTX-M-9</sub> 阳性菌株; 13: 阴性对照为大肠埃希菌 ATCC25922。

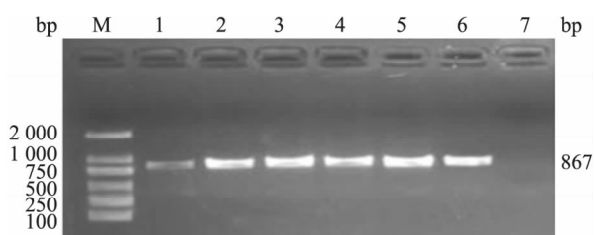


图7 *bla*<sub>SHV</sub> 基因阳性结果电泳图

M: DL2000DNA Marker; 1~5: *bla*<sub>SHV</sub> 基因阳性标本, 在 867 bp 处出现阳性条带; 6: 阳性对照( *bla*<sub>SHV</sub> 阳性菌株); 7: 阴性对照( 大肠埃希菌 ATCC25922)

和厄他培南的耐药率分别为 6.0%、4.7% 和 6.0%<sup>[5]</sup>, 且有逐年上升趋势。

本研究 19 株细菌, 多来自 ICU 病房, 患者常年龄偏大、住院时间长、有严重的基础疾病, 多带有呼吸机、留置管或引流管、使用免疫抑制药物等情况, 这都是引起粘质沙雷菌感染的危险因素。标本以痰液居多, 说明该菌在机体免疫力低下时, 主要引起呼吸道感染及少量的败血症、局部器官的感染。药敏试验显示, 此类菌耐药严重, 其引起的感染可用药物很有限, 阿米卡星可首选使用, 其余药物应根据药敏结果选择使用。

MHT 是 CLSI 推荐用于检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶表型的常规方法<sup>[6]</sup>。本研究 19 株细菌中 18 例阳性, 其中 7 例检出碳青霉烯酶基因, 凡含 *kpc-2* 菌株均为阳性, 表明 MHT 检测 *kpc* 型碳青霉烯酶很敏感。这与 Doyle et al<sup>[7]</sup> 的报道相符, 其报道 MHT 检测 *kpc* 型碳青霉烯酶具有良好的效果, 但对金属酶检测尚不足。本研究中有 5 例 MHT 假阳性, 可能是产 *shv* 型、*ctx-m* 型 ESBLs 酶和(或) *ampc* 酶过多合并膜孔蛋白缺失所致。Girlich et al<sup>[8]</sup> 报道, 细菌

产 ESBLs 酶(尤其 *ctx-m* 型酶)同时伴有外膜孔蛋白缺失可导致对碳青霉烯类抗生素敏感性降低甚至耐药。本研究尚有 6 例 MHT 阳性, 但 PCR 结果阴性, 推测可能是产生了别的碳青霉烯酶, 本研究未检测到。MHT 检测肠杆菌科细菌金属酶, 结果常难以判读, EDTA 协同试验可特异性筛查金属酶<sup>[9]</sup>, 本研究此试验结果均为阴性, PCR 也未检出金属酶基因。本研究发现 1 种细菌同时携带 2 种 ESBLs 酶基因的现象, 尤其 1 例菌株同时携带 *kpc-2*、*oxa-23*、*ctx-m-14* 基因, 这 2 种碳青霉烯酶基因和 1 种 ESBLs 酶基因同时存在于同一菌株的现象值得关注, 说明此类细菌耐药现象已相当严重、耐药基因的传播也很广泛和复杂。本研究未对细菌 *ampc* 基因、外膜孔蛋白缺失、主动外排泵等耐药机制进行研究, 这也是下一步研究的方向。

综上所述, 安徽医科大学第一、第二附属医院临床分离的碳青霉烯类耐药的粘质沙雷菌耐药现象严重、耐药机制复杂, 其携带既有碳青霉烯酶基因 *kpc-2* 型和 *oxa-23* 型, 以 *kpc-2* 型为主; 亦有 ESBLs 酶基因 *ctx-m-14* 型、*shv-12* 型及广谱酶基因 *shv-11* 型<sup>[10]</sup>, 以 *ctx-m-14* 为主。 *kpc-2* 基因最初在肺炎克雷伯菌中检测到, 由质粒介导, 具有在不同种属细菌之间转播的特性<sup>[11]</sup>, 国内于 2007 年报道<sup>[12]</sup> 首次在粘质沙雷菌中检出 *kpc-2* 基因。 *ctx-m* 型 ESBLs 为世界范围内广泛流行, 国内主要为 *ctx-m-14* 型和 *ctx-m-15* 型<sup>[13]</sup>, 本研究检测到的均为 *ctx-m-14* 型 ESBLs。当前, 细菌耐药形势日趋严峻, 耐药基因变异演进从未停止, 给临床诊治疾病带来严重威胁, 临床应严格执行医务人员的洗手制度、医疗器械消毒制度, 严密监控耐药基因传播流行, 根据药敏结果使用抗生素, 防止院内交叉感染及耐药菌株的爆发流行。

#### 参考文献

- [1] Ktari S, Mahjoubi F, Mnif B. Investigation of three nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* in an intensive care unit in Sfax-Tunisia [J]. Tunis Med, 2010, 88(7): 501-6.
- [2] Zhang R, Cai J C, Zhou H W, et al. Genotypic characterization and *in vitro* activities of tigecycline and polymyxin B for members of the Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems [J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 12): 1813-9.
- [3] Dalvi S D, Worobec E A. Gene expression analysis of the SdeAB multidrug efflux pump in antibiotic-resistant clinical isolates of *Serratia marcescens* [J]. Indian J Med Microbiol, 2012, 30(3): 302

- 7.
- [4] 冯胜春,徐浩,陈建飞. 肺结核患者感染产内酰胺酶粘滞沙雷菌及其耐药性[J]. 中国消毒学杂志,2015,32(5):455-7.
- [5] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2011年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(5):321-9.
- [6] Amjad A, Mirza Ia, Abbasi S, et al. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production [J]. Iran J Microbiol,2011, 3(4):189-93.
- [7] Doyle D, Peirano G, Lascols C, et al. Laboratory detection of enterobacteriaceae that produce carbapenemases [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(12):3877-80.
- [8] Girlich D, Poirel L, Nordmann P, Do CTX-M  $\beta$ -lactamases hydrolyse ertapenem? [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(5):1155-6.
- [9] 陆文香,许倩,钟桥,等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌临床感染现状分析[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(13):1861-3.
- [10] 陈聪,叶英,江洋,等. 安徽地区 PMQR 基因阳性大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中 ESBLs 流行特征的研究[J]. 中国抗菌药物杂志,2013,38(3):239-40.
- [11] 王暖,陈晋,孙立山,等. 改良 Hodge 试验用于筛查产 KPC 肺炎克雷伯菌的临床评价[J]. 临床肺科杂志,2014, 19(9):1563-5.
- [12] 张嵘,蔡加冒,周宏伟,等. 对亚胺培南耐药粘质沙雷菌中质粒介导 kpc-2 型碳青霉烯酶的研究分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(8):734-8.
- [13] 张传领,楚旭,沈利蒙,等. 三代头孢菌素耐药志贺菌产超广谱内酰胺酶基因型研究[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(3):267-70.

## Study on $\beta$ -lactam resistance gene in *Serratia marcescens* carbapenems-resistant

Huang Zhonghai<sup>1</sup>, Wang Zhongxin<sup>2</sup>, Zhou Qiang<sup>3</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Microbiology of Basic Medical College, Anhui Medical University, Heifei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Heifei 230022;

<sup>3</sup>Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Heifei 230601)

**Abstract Objective** To investigate  $\beta$ -lactam resistance gene carrying cases of *Serratia marcescens* carbapenems-resistant. **Methods** From 2013 to 2015, 242 clinical isolates of *Serratia marcescens* were collected, using Vitek-2 Compact automatic microbial system and the drug sensitivity test was performed on the identification, screening 18 strains of imipenem-resistant, 1 strain of intermedated resistance to imipenem. All 19 strains were confirmed resistant to carbapenems by ertapenem and meropenem susceptibility disk test (K-B method). Modified Hodge test and EDTA synergy test were used for detecting carbapenemase and qPCR was used for detecting *bla<sub>kpc</sub>*, *bla<sub>nmc</sub>*, *bla<sub>imp</sub>*, *bla<sub>gim</sub>*, *bla<sub>vim</sub>*, *bla<sub>oxa-23</sub>* carbapenemase genes and *bla<sub>veb</sub>*, *bla<sub>per</sub>*, *bla<sub>tem</sub>*, *bla<sub>shv</sub>*, *bla<sub>ctx-m-1</sub>*, *bla<sub>ctx-m-2</sub>*, *bla<sub>ctx-m-9</sub>* extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes and then positive results were sequenced and blasted to determine genotype. **Results** The results of drug susceptibility test showed that 19 strains to meropenem and ertapenem, aztreonam, ciprofloxacin, cefazolin, ceftriaxone and cefotaxime were resistant; to imipenem, 18 strains were resistant and 1 strain was intermedated resistant. All 19 strains were sensitive to Amikacin; Gentamicin sensitivity rate was 57.9%; the sensitivity rate of tobramycin was less than 30%; the sensitivity rate of cefotetan, ceftazidime, cefepime were less than 20%; the sensitivity rate of levofloxacin, piperacillin / tazobactam were less than 10%. Results of modified Hodge test were positive in 18 strains, and negative in 1 strain. EDTA synergy tests were all negative. PCR amplification and DNA sequencing showed that 7 strains were carrying *bla<sub>kpc-2</sub>* gene, 6 strains were carrying *bla<sub>ctx-m-14</sub>* gene, 3 strains were carrying *bla<sub>shv-11</sub>* gene, 2 strains were carrying *bla<sub>shv-12</sub>* gene, 1 strain was carrying *bla<sub>oxa-23</sub>* gene. Neither *bla<sub>nmc</sub>*, *bla<sub>imp</sub>*, *bla<sub>gim</sub>*, *bla<sub>vim</sub>* carbapenemase genes nor *bla<sub>veb</sub>*, *bla<sub>per</sub>*, *bla<sub>tem</sub>*, *bla<sub>ctx-m-1</sub>*, *bla<sub>ctx-m-2</sub>* extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes were detected in all 19 strains. **Conclusion** The clinical isolates of *Serratia marcescens* carbapenems-resistant are serious in drug resistance, mainly carrying *bla<sub>kpc-2</sub>*, *bla<sub>ctx-m-14</sub>* resistance gene.

**Key words** *Serratia marcescens*; resistance gene; PCR