

荧光免疫分析仪配套 CRP 试剂与美康生物全量程 CRP 胶乳增强免疫比浊法检测试剂的测定值之间具有高度的相关性, 决定系数 $R^2=0.991$ 。试剂具有良好的抗干扰性能, 非结合胆红素 ≤ 20 mg/dL、结合胆红素 ≤ 28.8 mg/dL、血红蛋白 ≤ 500 mg/dL、三酰甘油 $\leq 3\,000$ mg/dL 对检测结果无影响。随着 CRP 项目在国内临床检测中不断的开放, 检测量也会随之增长。美康生物 CRP 试剂配合美康干式荧光免疫分析仪, 操作简单便捷, 检测时间短, 更适合急诊、床旁检测以及基层社区医院检测, 可以广泛应用于临床。

参考文献

[1] Tillet WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a nor protein somatic fraction of the pneumococcus [J]. J Exp Med, 1930, 52(4): 561-571.

[2] Abernethy TJ, Avery OT. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood; I. distribution for the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of pneumococcus [J]. J Exp Med, 1941, 73(2): 173-182.

[3] Jones TD. The diagnosis of rheumatic fever [J]. J Am Med Assoc, 1944, 126(8): 481-484.

[4] Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine [J]. Structure, 1999, 7(2): 169-177.

• 临床研究 •

[5] Agrawal A, Shrive AK, Greenhough TJ, et al. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein [J]. J Immunol, 2001, 166(6): 3998-4004.

[6] Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women [J]. N Engl J Med, 2000, 342(12): 836-843.

[7] 巫一中. C 反应蛋白临床应用研究近况 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2010, 18(10): 1558-1559.

[8] 姜帆, 胡琼, 姜船, 等. C 反应蛋白在临床医学中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 254-255.

[9] Li JJ, Feng CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular disease [J]. Med Hypo These, 2004, 62(4): 499-506.

[10] 王红. 血清 C 反应蛋白与心力衰竭相关性观察与分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(2): 156-157.

[11] 饶富顺, 李熙梁. 血清 C-反应蛋白鉴别诊断细菌性和病毒性感染中的应用 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(11): 1324-1325.

[12] 哈丽君, 杨金翘, 王宝珍, 等. 新生儿感染性疾病超敏 C-反应蛋白检测及其意义 [J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(5): 618-620.

(收稿日期: 2017-02-20 修回日期: 2017-04-19)

肺炎克雷伯菌整合子的分布及耐药基因携带情况*

李春红¹, 孙小轩², 王桂花³, 王林海¹, 姜丽丽⁴, 郭晓英¹

(烟台海港医院: 1. 检验科; 2. 医院感染管理科; 3. 药剂科; 4. 内科, 山东烟台 264000)

摘要:目的 了解该地区临床分离肺炎克雷伯菌 I 类整合子阳性率、产 ESBLs 阳性率及相关耐药基因的携带情况, 探讨整合子、ESBLs 阳性、耐药基因携带与其耐药表型的相关性。方法 收集临床分离的肺炎克雷伯菌 100 株, 使用 VITEK-2 Compact 细菌分析系统鉴定确认并做药敏试验, 采用聚合酶链反应 PCR 检测菌株的 I 类整合子以及常见耐药基因。结果 在 100 株肺炎克雷伯菌中有 54 株细菌检出 I 类整合子, 检出率为 54.0%; 药敏结果显示 I 类整合子阳性菌株对多数抗菌药物的耐药率高于 I 类整合子阴性菌株, ESBL 阳性的菌株耐药基因检出率为 blaTEM 78.6%、blaSHV 92.9%、blaCTX-M-1 42.9%、blaCTX-M-9 71.4%、blaNDM 0.0%、blaKPC 7.1%, 高于 ESBLs 阴性的菌株。结论 肺炎克雷伯菌的主要耐药机制与菌株携带产 ESBLs、I 类整合子及相关耐药基因有关。

关键词:肺炎克雷伯菌; 整合子; 耐药性; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.037 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)18-2602-03

近年来医院内肺炎克雷伯菌的检出率呈逐年升高趋势, 对常用抗菌药物的耐药情况也越来越严重, 对肺炎克雷伯菌进行耐药机制的研究, 将会对控制耐药菌的传播和合理使用抗菌药物起到重要的指导作用, 因此本课题组对临床分离的 100 株肺炎克雷伯菌进行实验分析, 以了解本地区肺炎克雷伯菌临床分离株 I 类整合子阳性率、产超广谱酶 (ESBLs) 阳性率及相关耐

药基因的携带情况。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验菌株主要来源于烟台地区 4 所综合性医院的临床分离株, 共计 100 株。所有菌株均通过 VITEK-2 Compact 细菌分析系统进行菌种鉴定, 鉴定板型为 GN 卡, 药敏板型为 GN16 卡, 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜

* 基金项目: 烟台市科技计划项目 (2014WS055)。

绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2 细菌 DNA 提取 增菌,挑单个菌落于 2 mL 肉汤培养基中摇菌;将菌液置于 1.5 mL 离心管中,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清,扣干,加入 180 μ L 组织细胞溶解液,混匀;加入 20 μ L 蛋白酶 K,振荡混匀,56 $^{\circ}$ C 水浴 1~3 h 至细菌被完全裂解;离心至管壁无水珠,加入 4 μ L 核糖核酸酶(100 mg/mL),振荡混匀 15 s,室温放置 2 min;离心至管壁无水珠,加入 200 μ L 缓冲液 AL,振荡混匀 15 s,70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;加入 200 μ L 无水乙醇,振荡混匀 15 s,离心至管壁无水珠;将上述混合液移至 QIAamp S-Tm 柱子,放入 2 mL 收集管,6 000 r/min 离心 1 min,弃滤液;加入 500 μ L 缓冲液 AW1,6 000 r/min 离心 1 min,弃滤液;加入 500 μ L 缓冲液 AW2,20 000 r/min 离心 3 min,弃滤液;将柱子移至一干净 2 mL 收集管,20 000 r/min 离心 1 min;将柱子移至 1.5 mL 收集管,加入 200 μ L 双蒸水,室温放置 1 min,6 000 r/min 离心 1 min,将溶液收集备用。

1.3 PCR 引物的设计与合成 参照文献[1]设计 I 类整合子整合酶编码基因的特异性引物,引物序列及产物大小见表 1。

表 1 I 类整合子基因的引物序列及产物大小		
整合子基因	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)
上游引物	TGC GGG TTA AGG ATC TAG ATT T	491
下游引物	CAG CAC ATG CGT GTA GAT	—

注:—表示无数据。

1.4 PCR 反应及条件优化 配制 PCR 反应混合物,PCR 反应体系 ddH₂O 40.2 μ L,10 $\times$ TaqPCR 缓冲液 5 μ L,dNTP 溶液(10 mmol/ μ L)0.5 μ L,上游引物(10 pmol/ μ L)1 μ L,下游引物(10 pmol/ μ L)1 μ L,rTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.3 μ L,DNA 模板 2 μ L。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,共 33 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,12 $^{\circ}$ C 保持。

1.5 扩增产物的检测 取 5 mL PCR 产物,在含 0.5 g/mL 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,通过凝胶成像系统来观察电泳结果。制备 1%电泳胶 100 mL,电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE(Tris,硼酸,EDTA)。电泳条件:温度 14 $^{\circ}$ C,电泳时间 22 h,相对分子质量标记物选用沙门氏菌 HB9812。电泳结束后,电泳胶以 GELRED 染色 30 min,蒸馏水清洗 15 min 后紫外灯下观察结果,用扫描仪观察、拍照记录结果。

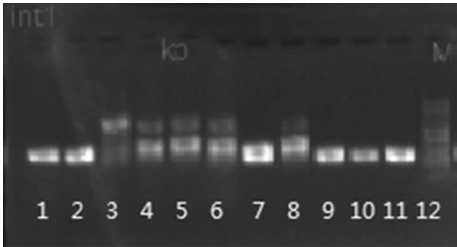
1.6 药敏试验 采用 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定和药敏分析仪配套的革兰阴性杆菌药敏卡 GN16 进行药敏试验,抗菌药物包括阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑啉、头孢西丁、头孢曲松、头孢吡肟、氨曲南、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、头孢哌酮/舒巴坦采用 KB 法,药敏结果按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2014 年标准进行判读。

1.7 统计学处理 数据采用 WHONET5.6 软件分析系统对细菌的耐药性进行统计分析,I 类整合子阳性菌株和阴性菌株的耐药差异组间比较采用 χ^2 检验,以检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 整合子检测结果 在 100 株肺炎克雷伯菌中有 54 株细

菌扩增出 491 bp 左右的扩增产物,与文献报道 int I 片段大小相符^[2],检出率为 54.0%,未检出 II、III 类整合子。部分肺炎克雷伯菌 I 类整合子 PCR 扩增电泳结果见图 1。



注:3、4、5、6、8 为 I 类整合子阴性标本;1、2、7、9、10 为 I 类整合子阳性标本;11 为 I 类整合子阳性对照,12 为 Marker。

图 1 I 类整合子 PCR 电泳图

2.2 I 类整合子阳性与阴性菌株药敏结果比较 I 类整合子阳性菌株和阴性菌株对抗菌药物哌拉西林/他唑巴坦、厄他培南、亚胺培南和美罗培南的耐药性差异均无统计学意义($P>0.05$);对其他抗菌药物 I 类整合子阳性菌株的耐药率明显高于 I 类整合子阴性菌株,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 I 类整合子阳性菌株与阴性菌株的药敏结果					
抗菌药物	I 类整合子阴性菌株($n=46$)		I 类整合子阳性菌株($n=54$)		P
	n	耐药率(%)	n	耐药率(%)	
阿莫西林/克拉维酸	2	4.3	14	25.9	<0.05
哌拉西林/他唑巴坦	1	2.2	2	3.7	>0.05
头孢唑啉	6	13.0	53	98.1	<0.05
头孢西丁	2	4.3	10	18.5	<0.05
头孢曲松	1	2.2	53	98.1	<0.05
头孢吡肟	0	0.0	14	25.9	<0.05
氨曲南	0	0.0	28	51.8	<0.05
厄他培南	0	0.0	2	3.7	>0.05
亚胺培南	0	0.0	2	3.7	>0.05
美罗培南	0	0.0	2	3.7	>0.05
阿米卡星	0	0.0	5	9.3	<0.05
庆大霉素	2	4.3	29	53.7	<0.05
妥布霉素	1	2.2	13	24.1	<0.05
环丙沙星	2	4.3	21	38.9	<0.05
左氧氟沙星	2	4.3	17	31.5	<0.05
复方磺胺甲噁唑	6	13.0	35	64.8	<0.05
头孢哌酮/舒巴坦	1	2.2	7	13.0	<0.05

表 3 耐药基因的检出结果(%)					
ESBLs	blaTEM	blaSHV	blaCTX-M-1	blaCTX-M-9	blaKPC
阳性	78.6	92.9	42.9	71.4	7.1
阴性	7.0	10.0	5.0	7.0	2.0

2.3 相关耐药基因的检出情况 ESBLs 阳性的肺炎克雷伯菌

blaTEM 78.6%、blaSHV 92.9%、blaCTX-M-1 42.9%、blaCTX-M-9 71.4%、blaNDM 0%、blaKPC 7.1%，见表 3 及图 2、3。



图 2 SHV 基因型 PCR 检测结果

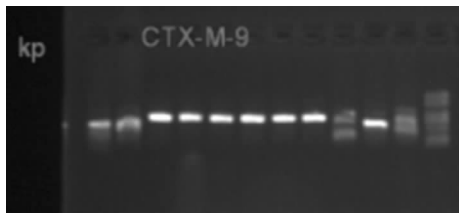


图 3 CTX-M-9 基因型 PCR 检测结果

3 讨 论

肺炎克雷伯菌是临床检出率较高的肠杆菌科致病菌，通常存在于人体的体表、鼻咽部及肠道等处，当机体免疫力降低或长期大量使用广谱抗菌药物导致菌群失调时可引起感染，常见感染有肺炎、泌尿道和创伤感染，有时引起严重的脓毒症、脑膜炎及腹膜炎等。肺炎克雷伯菌的主要耐药机制包括产生抗菌药物灭活酶、抗菌药物渗透障碍（生物被膜和外膜孔蛋白缺失）、药物作用靶位的改变、主动外排泵系统的亢进作用、整合子等。

整合子可捕获耐药基因并且通过整合酶将其整合后表达，使细菌产生耐药性，又能介导耐药基因转移，为深入研究细菌耐药及传播机制提供了新方向^[3]。大多数耐药基因盒由 I 类整合子携带，包括 β -内酰胺类（青霉素类、头孢菌素类）、喹诺酮类大环内酯类及磺胺类耐药有关基因^[3-4]。

整合子是存在于细菌质粒和（或）染色体上的一种遗传结构，它具有捕获、重排和表达耐药基因的能力，细菌多重耐药迅速发展的重要原因^[5]。整合子在整合酶的催化下，能通过位点专一重组系统整合外来的耐药基因，使耐药基因不断地积累，从而使细菌具有耐药性和多重耐药性，并通过整合机制使得耐药基因快速传播^[6]。整合子分成两大群：可移动整合子和超级整合子^[4]。可移动 I 类整合子广泛地分布于寄生性和腐生性菌株中，在革兰阴性临床菌株中，I 类整合子更为常见且有较高的耐药基因携带率^[7-8]。整合子在参与细菌耐药性的传播和扩散方面受整合子整合酶、整合子基因盒以及 I 型整合子样结构和插入序列共同区（ISCR1）等物质的作用和影响。有文献报道，ISCR1 的广泛存在可能会造成多种耐药基因的流行和跨种属传播^[9]。

ESBLs 是肺炎克雷伯菌产生耐药的主要机制。自 1994 年第 1 例 SHV 型 ESBLs 在中国被报道以来，我国 ESBLs 发生率一直上升，主要是 SHV、TEM 和 CTX-M 型。其耐药特点

是对青霉素、头孢菌素类抗菌药物均耐药，但可以被克拉维酸等 β -内酰胺酶抑制剂所抑制。

综上所述，本研究通过对 100 株肺炎克雷伯菌整合子的携带情况与其耐药表型比较分析，结果发现在 100 株肺炎克雷伯菌中有 54 株细菌检出 I 类整合子，检出率为 54.0%，与文献报道的肺炎克雷伯菌 I 类整合子的检出率 57.91% 相近^[10]；产 ESBLs 阳性率 31.0%；药敏结果显示，I 类整合子阳性菌株对氨曲南、氨基糖苷类、头孢类以及喹诺酮类药物的耐药率高于 I 类整合子阴性菌株；ESBL 阳性的肺炎克雷伯菌耐药基因情况为 blaTEM 78.6%、blaSHV 92.9%、blaCTX-M-1 42.9%、blaCTX-M-9 71.4%、blaNDM 0%、blaKPC 7.1%。故肺炎克雷伯菌的主要耐药机制与菌株携带产 ESBLs、I 类整合子及相关耐药基因有关。

参考文献

- [1] Essack SY, Hall LM, Pillay DG, et al. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(1): 88-95.
- [2] 沈定霞, 罗燕萍, 曹敬荣, 等. 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌 AmpC β 内酰胺酶的表型检测[J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(1): 4-6.
- [3] Sabaté M, Prats G. Structure and function of integrons [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2002, 20(7): 341-345.
- [4] Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(4): 272-288.
- [5] Rech GD, Hall RM. Gene cassettes a new class of mobile element[J]. *Microbiology*, 1995, 141(12): 3015.
- [6] 李彦媚, 赵喜红, 徐泽智, 等. 新型细菌耐药元件——整合子系统[J]. *中国抗生素杂志*, 2012, 37(1): 1-7.
- [7] Roe MT, Vega E, Pillai SD. Antimicrobial resistance, ark-ers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(7): 822-826.
- [8] Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, et al. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(18): 7118-7122.
- [9] 陈霞, 袁敏, 李桂喜, 等. 基因捕获元件 int1 和 ISCR1 在临床菌株中的分布及与细菌耐药性的关系研究[J]. *中国人兽共患学报*, 2013, 29(7): 646-652.
- [10] 毛璞, 傅威, 邱桂霞, 等. 肺炎克雷伯菌 I 型整合子的检测与鉴定[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(3): 235-238.