

• 论 著 •

碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学和耐药基因分析*

赵晓杰¹, 邓丽华², 施德仕², 康海全², 姜 飞¹, 马 萍^{1,2△}

(1. 徐州医学院医学技术学院, 江苏徐州 221004; 2. 徐州医学院附属医院检验科, 江苏徐州 221002)

摘要:目的 探究徐州医学院附属医院临床分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的分子流行病学特征及耐药基因。方法 收集并鉴定该院 2013 年 2~12 月临床分离非重复碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌株 55 株。肠杆菌基因间重复性共有序列 (ERIC)-聚合酶链反应 (PCR) 分析菌株的分子流行病学特征。药敏试验采用琼脂稀释法, 改良 Hodge 方法检测碳青霉烯酶, 亚胺培南+乙二胺四乙酸双纸片协同法检测金属 β -内酰胺酶, PCR 方法检测细菌携带的耐药基因。结果 ERIC-PCR 将 55 株肺炎克雷伯菌分为 4 型, 以 I 型为主, 共 41 株。55 株肺炎克雷伯菌对除多黏菌素和替加环素外的其他抗菌药物显示了较高的耐药性。改良 Hodge 试验阳性 43 株, 金属酶检测试验结果均为阴性。PCR 结果显示, KPC-2 型 44 株, CTX-M-9 型 27 株, SHV 型 22 株, TEM 型 23 株, 其中有 25 株同时携带 3 种或 3 种以上的耐药基因。结论 该院分离的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌对临床大多数常用抗菌药物显示较高水平的耐药性; 其耐药机制主要是 KPC-2 碳青霉烯酶, CTX-M-9、SHV 和 TEM 型 β -内酰胺酶同时参与其多重耐药机制。

关键词:肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 耐药性; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)11-1530-03

Analysis of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* molecular epidemiology and antibiotic resistance gene*Zhao Xiaojie¹, Deng Lihua², Shi Deshi², Kang Haiquan², Jiang Fei¹, Ma Ping^{1,2△}

(1. Department of Medical Technology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular epidemiology characteristics and drug resistance genes of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College. **Methods** A total of 55 strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* were collected and identified from February to December in 2013. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC) polymerase chain reaction (PCR) analysis molecular epidemiology. Susceptibility testing for antibiotics was performed by the disc diffusion method carbapenemase production was confirmed by modified Hodge test and MBL production by IPM/IPM-EDTA combined disc test. The resistant genes were detected by PCR. **Results** ERIC-PCR results showed that 55 strains of *Klebsiella pneumoniae* were divided into 4 types, the main type was type I, 41 strains belonged to type I. A total of 55 strains of bacteria showed a high level resistance to routine antibiotics except for colistin and tigecycline. A total of 43 strains were positive in modified Hodge test and all the 55 strains were negative to enzyme detection test. PCR results showed that 44 strains were of KPC-2 type, 27 strains of CTX-M-9 type, 22 strains of SHV type, 23 strains of TEM type, 25 of them were carrying three or more drug resistant genes at the same time. **Conclusion** *Klebsiella pneumoniae* that resistant to carbapenem showed high levels of resistance to routine antibiotic in our hospital. Strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* appeared, KPC-2 was the main reason to cause the bacterial resistance to carbapenems, CTX-M-9 type, SHV and TEM type β -lactamases were also involved in the mechanism of multidrug resistance.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemases; drug resistance; gene

肺炎克雷伯菌是临床分离及医院感染的重要致病菌之一, 随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用, 细菌对常用的青霉素、头孢菌素和碳青霉烯类抗菌药物等呈现严重的多重耐药性, 且多重耐药性菌株的不断增多导致临床抗菌药物治疗的失败和病程迁延, 其耐药机制主要是产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 和碳青霉烯酶。在医院的高危患者和长期的护理措施中携带 KPC-2 基因肺炎克雷伯菌的快速出现和国际传播成为主要的临床挑战^[1], 抗菌药物耐药基因水平播散是多重耐药菌株临床加剧的重要原因。本研究通过对本院 55 株碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的耐药基因研究, 获得碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯

菌碳青霉烯酶产生情况及分子流行病学信息, 为制定防控此类细菌传播提供系统的实验数据和参考依据。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 分离 2013 年 2~12 月徐州医学院附属医院患者痰液、中段尿、脑脊液、血液等不重复标本中的 55 株耐亚胺培南肺炎克雷伯菌。菌株经美国 BD 公司 Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏分析系统检测, 结果判定按美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 2013 年版标准执行^[2]。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922, 购自卫生部临床检验中心。接合试验受体

* 基金项目: 徐州市科技基金项目 (XZZD1326)。 作者简介: 赵晓杰, 女, 检验技师, 主要从事临床免疫与微生物的研究。 △ 通讯作者, E-mail: pingma62@aliyun.com。

菌为叠氮钠耐药的大肠杆菌(J53),由北京武警总医院提供。

1.2 仪器与试剂 全自动微生物鉴定仪由美国 BD 公司提供,聚合酶链反应(PCR)扩增仪由美国 ABI 公司提供,电泳仪由北京六一仪器厂提供,GelX1520 凝胶成像仪由 Bioshine 公司提供,PCR 试剂由北京百泰克提供,质粒提取试剂盒由天根生化科技(北京)有限公司提供,药敏纸片由英国 Oxoid 公司提供。

1.3 染色体 DNA 同源性分析 肠杆菌基因间重复共有序列(ERIC)-PCR 分析耐药菌株同源性,扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 45 s,40 ℃ 1 min,65 ℃ 8 min,30 个循环,最后延伸 65 ℃ 16 min,产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 药物敏感试验 用琼脂稀释法测定最小抑菌浓度(MIC),用于 MIC 试验的药物包括:氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦(珠海联邦公司)、头孢他啶(海南海灵公司)、环丙沙星(广州南新公司)、亚胺培南(默沙东公司)、美罗培南(深圳海滨公司)、庆大霉素(辰欣药业公司)、阿米卡星(齐鲁制药公司)、头孢吡肟(深圳立健公司)、头孢曲松(台湾泛生公司)。结果参照 CLSI 2013 标准判读^[2]。

1.5 碳青霉烯酶初步检测 参照 CLSI M100-S23 介绍的改良 Hodge 试验进行检测^[2]。

1.6 金属 β-内酰胺酶检测 采用亚胺培南和亚胺培南+乙二胺四乙酸(EDTA)复合纸片的双纸片协同法。在涂布待测菌的水解酪蛋白(MH)平板上,贴上 2 张亚胺培南纸片(30 μg),纸片间距为 30 mm,在其中一张亚胺培南纸片上滴加 10 μL 0.5 mol/L EDTA 溶液,35 ℃ 过夜培养后阅读结果。若含 EDTA 抑制剂的亚胺培南抑菌圈直径与单药相比大于或等于 5 mm,提示该菌产生金属 β-内酰胺酶。

1.7 耐药基因检测 煮沸法提取细菌 DNA,PCR 方法扩增 *KPC-2* 及其他常见的碳青霉烯耐药基因如 *NDM-1*、*VIM*、*IMP*、*SIM*、*GES*、*SME*、*OXA-48* 等,PCR 扩增引物设计及条件参考文献^[3-5],引物序列见表 1。PCR 反应体系共 50 μL,25 μL PCR MIX 试剂,10 μmol/L 上、下游引物各 5 μL,DNA 模板 5 μL,双蒸水 15 μL。反应参数:95 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 2 min,共 30 个循环,72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,经凝胶成像系统显像观察结果,并送上海捷瑞生物公司测序,所得序列与 GenBank 数据库进行比对。

表 1 目的基因引物序列及长度		
基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
IMP	CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	587
	AA CCA GTT TTG CCT TAC CAT	
KPC-2	TGT CAC TGT ATC GCC GTC	1 010
	CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC	
OXA-48	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG	744
	GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC	
SME	AAC GGC TTC ATT TTT GTT TAG	830
	GCT TCC GCA ATA GTT TTA TCA	
GES	ATG CGC TTC ATT CAC GCA C	864
	CTA TTT GTC CGT GCT CAG G	
NDM-1	GAA GCT GAG CAC CGC ATT AG	982
	GGG CCG TAT GAG TGA TTG C	

续表 1 目的基因引物序列及长度		
基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
TEM	TCG GGG AAA TGT GCG	972
	TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC	
CTX-M-8	ACT TCA GCC ACA CGG ATT CA	1 024
	CGA GTA CGT CAC GAC GAC TT	
CTX-M-9	GTT ACA GCC CTT CGG CGA TGA TTC	88
	GCG CAT GGT GAC AAA GAG AGT GCA	
VIM	AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	261
	ATG AAA GTG CGT GGA GAC	
SIM	ACA AGG GAT TCG GCA TCG	355
	TTA TCT TGA GTG TGT CCT GG	

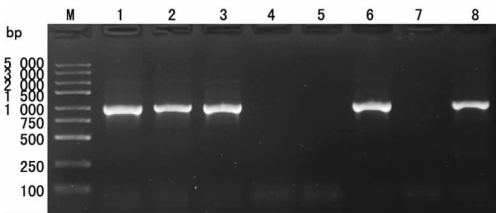
2 结 果

2.1 同源性分析结果 使用肠杆菌基因间重复共有序列(ERIC)-PCR 对 40 株菌株进行指纹图谱分析,总共分为 4 个亚型,其中以 I 型为主,共有 41 株,占 74.5%;Ⅱ型 8 株占 14.5%;Ⅲ型 5 株,占 9.1%;Ⅳ型仅 1 株为 *KPN30* 阳性菌株。

2.2 药物敏感试验 55 株肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物呈现不同程度的耐药,耐药浓度范围为 4~64 μg/mL。对头孢菌素类、单环内酯类、氨基糖苷类抗菌药物表现出较高水平的耐药,对环丙沙星和阿米卡星 2 种抗菌药物却显示了不同程度的耐药,MIC 值分别在 32~256 μg/mL 和 32~128 μg/mL 范围内变化。但是,这 40 株碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌对多黏菌素和替加环素则均显示了较好的敏感性,MIC 值范围小于或等于 2 μg/mL。

2.3 改良 Hodge 试验与金属酶检测试验结果 55 株肺炎克雷伯菌中改良 Hodge 试验阳性 43 株,阳性率 78.2%(43/55),金属酶检测试验结果均为阴性。

2.4 耐药基因检测结果 PCR 结果显示,*KPC-2* 阳性检出率最高(44 株),见图 1,其次为 *CTX-M-9*,未检出 *NDM-1*、*SME*、*OXA-48*、*GES*、*VIM*、*IMP* 阳性菌株。见表 2。



M:DNA 标记物;1,2,3,6,8:*KPC-2* 基因阳性菌株;4,5,7:*KPC-2* 基因阴性菌株。

图 1 部分分离肺炎克雷伯菌株 *KPC-2* 基因琼脂糖凝胶电泳结果

表 2 55 株肺炎克雷伯菌耐药基因检测结果[n(%)]	
基因	阳性
<i>KPC-2</i>	44(80.0)
<i>CTX-M-9</i>	27(49.1)
<i>SHV</i>	22(40.0)
<i>TEM</i>	23(41.8)

续表 2 55 株肺炎克雷伯菌耐药基因检测结果[n(%)]

基因	阳性
CTX-M-1	4(7.3)
CTX-M-2	9(16.4)
CTX-M-8	2(3.6)
联产 KPC-2,TEM,SHV,CTX-M-9,CTX-M-2	1(1.8)
联产 KPC-2,TEM,SHV,CTX-M-8,SME	1(1.8)
联产 KPC-2,TEM,SHV,CTX-M-9	6(10.9)
联产 KPC-2,SHV,CTX-M-1,CTX-M-2	1(1.8)
联产 KPC-2,TEM,CTX-M-1,CTX-M-9	1(1.8)
联产 KPC-2,SHV,CTX-M-9	9(16.4)
联产 KPC-2,TEM,CTX-M-9	6(10.9)
联产 KPC-2,TEM,CTX-M-9	6(10.9)

3 讨 论

肺炎克雷伯菌是引起临床感染常见的革兰阴性菌,碳青霉烯类抗菌药物是治疗肺炎克雷伯菌感染的有效药物,然而随着碳青霉烯类抗菌药物广泛使用,肺炎克雷伯菌对其耐药率逐年增高,产碳青霉烯酶菌株的出现,造成了患者病程迁延和临床抗菌药物治疗的失败,从而增加了患者的医疗费用和病死率。本研究中 55 株肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物呈现不同程度的耐药,耐药浓度范围为 4~64 μg/mL,除了对碳青霉烯类药物不同水平耐药外,对青霉素类、头孢菌素、氨基糖苷等其他 β 内酰胺类抗菌药物均表现耐药,对头孢唑林、头孢西丁、头孢他啶等一代、二代、三代头孢菌素的 MIC 值都很高,均大于 256 μg/mL;对氨基糖苷类抗菌药物中阿米卡星表现为耐药,但 MIC 值稍低于头孢菌素类,可能与水解阿米卡星的 APH(3)-IV 型修饰酶主要见于不动杆菌,而其他菌属比较少见有关^[6],对喹诺酮类抗菌药物也表现为耐药, MIC 值均大于 128 μg/mL。以上数据表明本院分离的耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌多为高水平耐药的多重耐药菌。

通过 ERIC-PCR 分型,55 株肺炎克雷伯菌根据 ERIC-PCR 产物电泳分为 4 个亚型:Ⅰ型 41 株,Ⅱ型 8 株,Ⅲ型 5 株,Ⅳ型 1 株,其中Ⅰ型 41 株中有 27 株菌来自 ICU 病区,Ⅱ型 8 株中有 5 株来自 ICU 病区,说明本院 ICU 病区存在耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的 2 种克隆株流行。因为入住 ICU 的患者主要为病情严重和免疫水平低下者,由于反复感染致使长期使用多种抗菌药物治疗,使 ICU 病区成为多重耐药菌容易爆发流行的地方,也是造成克隆株流行的原因。因此,使用抗菌药物治疗前,必须进行体外药敏试验,同时需要做好环境的清洁与消毒、患者的隔离等,阻断此类耐药菌的传播。

产碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯酶类抗菌药物耐药的主要机制之一,肺炎克雷伯菌几乎可以产生所有类型的 β-内酰胺酶,其中近年来出现的 KPC-2、NDM 型碳青霉烯酶最为临床所关注。在中国,Wei 等^[7]最早报道了浙江产 KPC-2 的肺炎克雷伯菌,由于基因的水平转移和克隆传播,KPC-2 基因已经出现跨物种跨区域的传播,随后在中国多个地区报道了产 KPC-2 肺炎克雷伯菌的爆发流行^[8]。本研究中 KPC-2 型碳青霉烯酶的检出率为 80.0%,结果说明在本院产 KPC-2

肺炎克雷伯菌已广为流行。结合本实验 PCR 结果,45.5%(25/55)同时携带 3 种以上的耐药基因,分析认为,β-内酰胺类抗菌药物的强选择压力对 ESBLs 基因的编码区、启动子、拷贝数及其他基因均起诱导作用,当可转座因子插入启动子区域附近,可能会导致一种菌株产多种不同的 β-内酰胺酶^[9]。耐药细菌通过产生多种 β-内酰胺酶基因增强对抗菌药物耐药及拓宽耐药谱,可能是导致菌株耐药性更强、耐药谱更广的原因。β-内酰胺酶的高携带率是此次所研究的 55 株肺炎克雷伯菌呈多重耐药的重要原因之一,同时携带多重耐药基因耐药菌株的出现给临床治疗带来严峻挑战。

55 株临床分离耐碳青霉烯类抗菌药物肺炎克雷伯菌,改良 Hodge 试验阳性 43 株,阳性检出率为 78.1%,其中强阳性 38 株,弱阳性 5 株。而碳青霉烯酶基因检测共检测出 44 株基因阳性菌株,检出率为 80.0%,基因检测的阳性率高于改良 Hodge 试验。因此改良 Hodge 试验可以作为碳青霉烯酶的初筛试验,若要确认还要进一步做基因检测。

临床分离株多种耐药基因的积聚共存现象导致耐药多重性提示,必须加强对该类临床致病菌的监测和流行病学研究,并及时采取有效措施预防该类细菌导致医院感染的流行。

参考文献

[1] Munoz-Price LS,Poirel L,Bonomo RA,et al. Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases [J]. Lancet Infect Dis,2013,13(9):785-796.

[2] Clinical Laboratory Standards Institute. MS23-M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne,PA, USA:CLSI,2013.

[3] Chen ZH,Liu WE,Zhang YL,et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Acinetobacter spp. from XiangYa Hospital, in Hunan Province,China[J]. J Basic Microbiol,2013,53(2):121-127.

[4] Nahid F,Khan AA,Rehman S,et al. Prevalence of metallo-β-lactamase NDM-1-producing multi-drug resistant bacteria at two Pakistani hospitals and implications for public health[J]. J Infect Public Health,2013,6(6):487-493.

[5] Queenan AM,Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev,2007,20(3):440-458.

[6] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century:Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat[J]. Clin Microbiol Rev,2001,14(4):933-951.

[7] Wei ZQ,Du XX,Yu YS,et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China[J]. Antimicrob Agents Chemother,2007,51(2):763-765.

[8] Moland ES,Hanson ND,Herrera VL,et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in Klebsiella pneumoniae isolates[J]. J Anti Chem,2003,51(3):711-714.

[9] Memariani M, Najar PS, Zahraei ST,et al. Occurrence of SHV, TEM and CTX-M β-lactamase genes among enteropathogenic Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea[J]. Jundishapur J Microbiol, 2015 ,8(4):15620.