

• 论 著 •

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药分子机制研究

徐 静,阴 晴[△],陶 真

(江苏大学附属医院检验科,江苏镇江 212001)

摘 要:**目的** 了解该院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制。**方法** 选择对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌(KP)7 株,采用 K-B 法对其进行药敏实验。PCR 检测 18 种耐药基因,分析耐亚胺培南 KP 的耐药表型及其基因型。**结果** 7 株 KP 对阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑较为敏感,对其他常用抗菌药物均耐药。耐药基因 KPC、ant(3'')-I、SHV、CTX-M、ant(2'')-I 的阳性检出率较高。**结论** 分离的对亚胺培南耐药的 KP 携带多种耐药基因,其耐药机制主要与 KPC 有关,在此基础上可能存在其他耐药机制。

关键词:肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 耐药机制

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 16. 025 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)16-2351-02

Investigation of the resistant mechanism of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae

Xu Jing, Yin Qing, Tao Zhen

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract:**Objective** To investigate the molecular mechanism of Klebsiella pneumoniae resistant to imipenem. **Methods** Anti-microbial susceptibility was evaluated by disk diffusion test. Seven imipenem-resistant strains of Klebsiella pneumoniae were selected. And PCR was used to amplify so as to detect eighteen resistant genes. **Results** Seven imipenem-resistant strains of Klebsiella pneumoniae were more sensitive to aminoglycosides and sulfamethoxazole/trimethoprim. The positive rates of KPC, ant(3'')-I, SHV, CTX-M and ant(2'')-I in these imipenem-resistant strains were high. **Conclusion** Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolated from our hospital carries several kinds of resistant genes. Carrying KPC may be the main resistant mechanism of Klebsiella pneumoniae resistant to carbapenem, but other mechanisms also exist at the same time.

Key words:klebsiella Pneumoniae; carbapenemases; resistant mechanisms

随着抗菌药物的大量使用,人们陆续发现了耐碳青霉烯类药物的肠杆菌^[1-5],临床主要使用碳青霉烯类抗菌药物治疗肺炎克雷伯菌(KP)等肠杆菌科的感染,这给治疗带来了极大困难,其耐药基因位于可接合质粒上,通过水平传播可以使其他细菌获得耐药性,对于引起严重医院感染存在很大的潜在危险。因而研究肠杆菌对碳青霉烯类药物耐药的机制研究,对控制感染、开发新药都具有重要意义,本文初步探讨了本院分离的对碳青霉烯类耐药的 KP 的耐药机制。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株来源 分离 2011 年 7 月至 2013 年 9 月本院 ICU、呼吸科患者的痰标本,得到对亚胺培南耐药的 KP7 株。对其进行鉴定及药敏试验。

1.2 仪器与试剂 法国生物梅里埃公司的 VITEK-32 型全自动微生物仪,质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。CO2 培养箱、VITEK-32 全自动微生物仪、PCR 仪等。抗菌药物纸片包括头孢呋辛(CXM)、环丙沙星(CIP)、头孢哌酮(CFP)、氨曲南(AZT)、氨苄西林(AM)、妥布霉素(TM)、头孢西丁(FOX)、哌拉西林/他唑巴坦(P/T)、亚胺培南(IPM)、头孢他啶(CAZ)、美罗培南(MPN)、庆大霉素(GM)、头孢哌酮/舒巴坦(C/S)、头孢唑林(CZ)、阿米卡星(AN)、头孢吡肟(FEP)、左氧氟沙星(LVF)、复方磺胺甲噁唑(SXT)等。

1.3 药敏试验 用 VITEK GNS-448 卡及 KB 法对 KP 进行药敏试验,药敏判读标准参照 CLSI2010 版。

1.4 引物设计 耐药基因 KPC 等的引物(上海生工公司)和 PCR 扩增产物长度见表 1。

表 1 耐药基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	扩增长度 (bp)
IMP	P2:AAC CAG TTT TGC(C/T)TTA C(C/T)AT	587
	P1:CGG CC(G/T)C AGG AG(A/C)G (G/T)CTT T	
VIM	P1:ATT CCG GTC GG(A/G)G AGG TCC G	633
	P2:GAG CAA GTC TAG ACC GCC CG	
SPM	P1:CTG CTT GGA TTC ATG GGC GCG	784
	P2:CCT TTT CCC GAC CTT GCT CG	
TEM	P1:AGG AAG AGT ATG ATT CAA CA	535
	P2:CTC GTC GTT TGG TAT GGC	
SHV	P1:GGT TAT GCG TTA TAT TCG CC	865
	P2:TTA GCG TTG CCA GTG CTC	
VEB	P1:GCG GTA ATT TAA CCA GA	961
	P2:GCC TAT GAG CCA GTG TT	
GES	P1:ATG CGC TTC ATT CAC GCA C	846
	P2:CTA TTT GTC CGT GCT CAG G	
CARB	P1:AAA GCA GAT CTT GTG ACC TAT TC	588
	P2:TCA GCG CGA CTG TGA TGT ATA AAC	
DHA	P1:AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405
	P2:CCG TAC GCA TAC TGG CTT AGC	

作者简介:徐静,女,主管检验技师,主要从事微生物学检验工作。 △ 通讯作者,E-mail: yinqingyinqing@ahyun. com。

续表 1 耐药基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	扩增长度 (bp)
CTX-M	P1:ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGC	833
	P2:TCC CGA CGG CTT TCC GCC TT	
intⅠ	P1:CCG AGG ATG CGA ACC ACT TC	373
	P2:CCG CCA CTG CGC CGT TAC CA	
aac(6')-Ⅰ	P1:TAT GAG TGG CTA AAT CGA T	394
	P2:CCC GCT TTC TCG TAG CA	
aac(6')-Ⅱ	P1:TTC ATG TCC GCG AGC ACC CC	178
	P2:GAC TCT TCC GCC ATC GCT CT	
ant(3'')-Ⅰ	P1:TGA TTT GCT GGT TAC GGT GAC	284
	P2:CGC TAT GTT CTC TTG CTT TTG	
ant(2'')-Ⅰ	P1:GAG CGA AAT CTG CCG CTC TGG	320
	P2:CTG TTA CAA CGG ACT GGC CGC	
aac(3)-Ⅱ	P1:ACT GTG ATG GGA TAC GCG TC	237
	P2:CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA	
KPC	P1:GCT ACA CCT AGC TCC ACC TTC	920
	P2:GCA TGG ATT ACC AAC CAC TGT	
NDM-1	P1:CAG CAC ACT TCC TAT CTC	292
	P2:CCG CAA CCA TCC CCT CTT	

1.5 模板提取 在 50 μL 灭菌水中加入纯培养细菌菌落,100℃水浴 10 min,8 000 r/min 离心 30 s,吸取上清液作为模板备用。

1.6 PCR 扩增 反应体系为 10×buffer2.5 μL、cDNA 模板 0.5 μL、dNTPs 2 μL、上下游引物各 0.5 μL、Taq 聚合酶 0.2 μL、用 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 循环参数为:94℃预变性 5 min,一个循环,94℃30 s,55℃30 s,72℃30 s,35 个循环扩增,最后 72℃10 min 结束反应。阴性对照为存水。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色观察结果。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 7 株 KP 对 FEP、CAZ、FOX、MPN、CXM、CFP、AZT、AM、P/T、CZ、CIP、LVF、IPM、C/S 的耐药率为 100%;对 SXT 的敏感率为 85.71%;对 AN、GM、TM 的敏感率分别为 100%、71.43%、71.43%。

2.2 耐药基因检测结果 7 株 KP 的耐药基因检测结果显示 CARB、SPM、GES、int Ⅰ、IMP、VEB、aac(6')-Ⅱ、NDM-1 为阴性,TEM 的阳性率为 28.57%,ant(2'')-Ⅰ 的阳性率为 57.14%,VIM、aac(6')-Ⅰ、DHA、acc(3')-Ⅱ 的阳性率为 14.29%,KPC、ant(3'')-Ⅰ 的阳性率为 85.71%,CTX-M 的阳性率为 71.43%,SHV 的阳性率为 100%。KPC(920 bp)电泳结果见图 1。

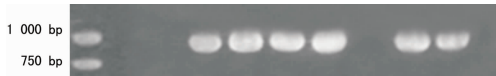


图 1 KPC(920 bp)电泳结果

3 讨 论

KP 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的机制可能与外膜蛋白缺失合并 ESBLs 或 AmpC 酶的产生、碳青霉烯酶的产生、外排

机制和青霉素结合蛋白的亲合力改变等机制有关^[6]。产生碳青霉烯酶是 KP 等肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药最主要的机制,此酶可水解青霉素类、头孢菌素类、单酰胺类和碳青霉烯类抗菌药物,这种活性可被克拉维酸和他唑巴坦所抑制,但对 EDTA 不敏感^[7]。本研究的检测结果显示,7 株 KP 中,有 6 株 KPC 酶阳性。此外,耐药基因 TEM 的阳性率为 28.57%(2 株),DHA 的阳性率为 14.29%(1 株),CTX-M 的阳性率为 71.43%(5 株),SHV 的阳性率为 100%(7 株)。产金属酶也是肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制^[1],本实验仅检出 1 株 VIM 阳性。可见本院 KP 耐碳青霉烯类抗菌药物主要原因是产 KPC 酶,同时合并 ESBLs 或 AmpC 酶的产生等多种耐药机制。

由 KP 的体外药敏结果可以看出,本院 KP 分离株对氨基糖苷类药物较为敏感,对 AN、CM、TM 的敏感率为 100%、71.43%、71.43%。但氨基糖苷类修饰酶的检测结果却显示,除未检出 aac(6')-Ⅱ 外,aac(6')-Ⅰ、acc(3')-Ⅱ、ant(3'')-Ⅰ 和 ant(2'')-Ⅰ 均有不同程度的阳性检出率。由此可以推测,携带部分氨基糖苷类修饰酶基因能减低细菌对氨基糖苷类抗菌药物的敏感性,但其表型不一定呈现耐药结果。

7 株 KP 的体外药敏结果显示,其对复方磺胺甲噁唑的敏感率为 85.71%。这可能与目前临床不常使用复方磺胺甲噁唑有关。这也提示临床医务工作者,应合理使用抗菌药物,根据药敏结果,首先选择低档、敏感的抗菌药物。

KP 是院内感染最常见的细菌之一,耐碳青霉烯类抗菌药物 KP 感染是导致治疗失败和患者死亡的重要原因。由于新型抗革兰阴性菌的抗菌药物无法在短时间内研制上市,合理的抗菌药物治疗联合有效的感染控制措施是非常必要的。

参考文献

[1] Dwivedi M, Mishra1a, Azim A, singh R, baronia a K, prasad K N, dhole T N, DwivediU N. ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant enterobacteriaceae carrying multiple metallo-beta-lactamase genes[J]. Indian J Path and Micro, 2009, 52 (3):339-342.

[2] Saidel-Odes L, Borer A. Limiting and controlling carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae[J]. Infect Drug Resist, 2013, 10 (7):9-14.

[3] Lou Z1, Qi Y2, Qian X1, yang W1, Wei Z3. emergence of klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing escherichia coli sequence type 131 in Hangzhou, China[J]. Engl, 2014, 127(3):528-531.

[4] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India[J]. Anti Agents Chem, 2009, 53(12):5046-5054.

[5] 叶智颖, 吕火祥, 胡庆丰, 等. 耐碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯菌 KPC 酶检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2):454-455.

[6] 汤瑾, 李卿, 蒋燕群. 对肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶的研究进展[J]. 检验医学, 2010, 25(1):63-66.

[7] 吴丹丹, 蔡加昌, 刘进. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的感染现状[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(1):1-6.