

· 论 著 ·

ICU 老年患者感染产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的整合子耐药基因研究*

刘 唯, 陈 键[△]

(湖南省马王堆医院检验科, 长沙 410016)

摘要:目的 了解重症监护病房(ICU)老年患者感染产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯菌整合子基因的分布及耐药率,为临床合理使用抗菌药物提供依据。**方法** 采用法国生物梅里埃公司生产的 VITEK-2 微生物自动鉴定系统,对 2013 年 1 月至 2015 年 12 月老年 ICU 患者的各类临床标本进行细菌鉴定和药敏试验,产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 167 株用 PCR 分析整合子基因,并通过测序明确基因。**结果** 肺炎克雷伯菌 386 株中产 ESBLs 检出率为 43.26%;整合子检出阳性率 50.89%,检出全为 I 类整合子;整合子可变区扩增出 aadA2、aadA1、aada16、dfra27 和 arr-3 基因;产 ESBLs 整合子基因阳性株耐药率明显高于整合子基因阴性菌株。**结论** 老年 ICU 患者感染产 ESBLs 肺炎克雷伯菌和整合子基因密切相关,在细菌的耐药上整合子起着重要作用。

关键词:肺炎克雷伯杆菌;重症监护病房;产超广谱 β -内酰胺酶;整合子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)16-2214-03

Study on integron drug resistance gene of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in ICU elderly patients*LIU Wei, CHEN Jian[△]

(Department of Clinical Laboratory, Hunan Provincial Mawangdui Hospital, Changsha, Hunan 410016 China)

Abstract: **Objective** To understand the gene distribution and drug resistance rate of integron gene of extended spectrum β -lactamases(ESBLs) producing *Klebsiella pneumoniae* infection in ICU elderly patients in order to provide the basis for rational use of antimicrobial agents. **Methods** The BioMerieux VITEK-2 Automated Microbes Identification System was adopted to conduct the bacteria identification and drug susceptibility test on various clinical specimens of ICU elderly patients in our hospital from January 2013 to December 2015. The integron gene in 167 strains of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* was analyzed by PCR, and the gene was identified by sequencing. **Results** Among 386 strains of *Klebsiella pneumoniae*, the detection rate of ESBLs-producing strains was 43.26%; the positive rate of integron was 50.89%, the detected integron was class I integron; aadA2, aadA1, aada16, dfra27 and arr-3 genes were amplified from integron variable region; the drug resistance rate of ESBLs-producing integron gene positive strains was significantly higher than that of integron gene negative strains. **Conclusion** the ICU elderly patients with ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* infection is closely related to the integron gene and integron plays an important role in bacterial drug resistance.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; ICU; ESBLs producing; integron

重症监护病房(ICU)老年患者由于病情危重、免疫力低,进行气管插管、气管切开、留置导尿管、呼吸机使用等各种侵入性操作比例高、机体保护屏障破坏容易感染肺炎克雷伯菌^[1],加之 ICU 患者广谱抗菌药物使用较多,整合子作为在重组功能上的移动元件,产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯菌通过质粒在体内传播而产生耐药性的改变,使产 ESBLs 菌获得多重耐药性^[2],导致医院感染和其耐药率同时上升,成为了临床上治疗感染的难题^[3]。笔者从本院 2013~2015 年 ICU 老年患者中,比较整合子基因在产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中的分布及表型存在的情况,找出在产 ESBLs 菌耐药性整合子菌株在细菌耐药发挥的特点,指导临床对感染的老年 ICU 患者合理使用抗菌药物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月至 2015 年 12 月本院 ICU 病房患者(年龄 >65 岁)临床标本,分别为痰(包括纤支镜吸痰、吸痰、自咳痰等)、肺泡灌洗液、血液、尿液等标本分离所得肺炎克雷伯菌(剔除重复检出的菌株),同一患者的相同菌株收集标本时间在 1 周内视为同一菌株,不做重复统计,共 386 株。

呼吸道标本经涂片后选取合格标本进行培养采用法国生物梅里埃公司生产的 VITEK-2 细菌鉴定系统对病原菌进行鉴定及药敏试验。质控菌株:肺炎克雷伯菌 ATCC700603,大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2 仪器与试剂 M-H 琼脂和庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、氨曲南、头孢西丁、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、哌拉西林、妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、美洛培南 14 种药敏纸片由英国 Oxoid 公司生产的。试剂为大连宝生物工程有限公司提供的 PCR 扩增试剂盒。美国实时荧光定量 Stepone 基因扩增仪;DNA Thermal cycler, PE 公司;美国海伦娜电泳仪。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定及药敏试验 所有样品均接种血琼脂和中国蓝双色平板。细菌培养采用法国生物梅里埃公司生产的 API 鉴定系统对菌株进行鉴定。用 Kiody-Bauer 纸片扩散法,按美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2012 年版本的标准判读药敏结果^[4]。对产 ESBLs 菌株采用 CLSI 推荐的方法做初筛和确证检测试验。

* 基金项目:湖南省科技计划项目(2013FJ3115)。

作者简介:刘唯,女,主管技师,主要从事微生物检验及细菌耐药性研究。 [△] 通讯作者, E-mail: chenjian9240@126.com。

1.3.2 产 ESBLs 的整合子基因的 PCR 扩增及测序 肺炎克雷伯菌用煮沸法提取整合子 DNA, 使用在 PCR 反应体系, 扩增整合子基因, 相关引物见表 1。上海生工生物技术有限公司提供这些引物, 扩增后产物送上海生工生物技术有限公司进行双向测序。对测序结果在 DNA star 软件进行序列校正、结果拼接, 通过在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对, 分析整合子可变区的基因序列的结果。

表 1 用于鉴定整合子类型设计的引物序列 (5'-3')

| 整合子 | 引物 | |
|------|----------------------|----------------------|
| | 上游 | 下游 |
| I类 | CCTCCCGCACGATGA | TCCACGCATCGTCAG |
| II类 | GTGCAACGCATTTTTCAGG | CAACGGAGTCATGCAGATG |
| III类 | CAITTTGTGTTGTGGACGGC | GACAGATACGTGTTTGGCAA |

1.4 统计学处理 所有菌株的药敏结果均采用 Whonet 5.6 软件和 SPSS20.0 软件进行统计学分析。计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

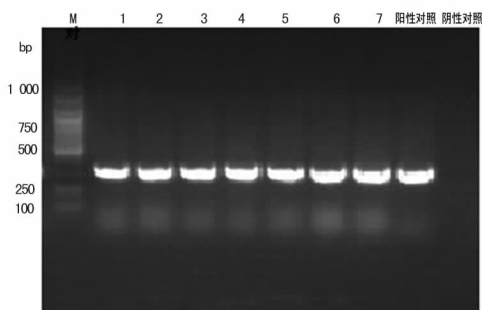
2 结 果

2.1 菌株来源分布 检测出产 ESBLs 为 167 株 (检出率为 43.26%)。肺炎克雷伯菌 386 株的标本来源中痰标本占 51.5%, 从肺泡灌洗液中检出产 ESBL 肺炎克雷伯菌为最高 (55.43%), 见表 2。

表 2 ICU 老年患者检出肺炎克雷伯菌的标本来源分布

| 标本 | 肺炎克雷伯菌 | 产 ESBL | 肺炎克雷伯菌 |
|-------|--------|--------|---------|
| | 株数 | 检出株数 | 检出率 (%) |
| 痰液 | 198 | 80 | 40.40 |
| 肺泡灌洗液 | 92 | 51 | 55.43 |
| 尿液 | 65 | 25 | 38.46 |
| 血液 | 31 | 11 | 35.48 |
| 合计 | 386 | 167 | 43.26 |

2.2 整合子基因的检测结果 在设计引物下扩增 167 株肺炎克雷伯菌的 DNA, 有 85 株整合子阳性菌被检出, 阳性率为 50.89%, 在检出整合子中全都是 I 类, 并未检出含有整合子 II 类或者整合子 III 类。见图 1。



注: 1~7 为检测株; 阳性对照为肺炎克雷伯菌 ATCC700603; 阴性对照为大肠埃希菌 ATCC25922。

图 1 整合子 PCR 的电泳图

2.3 整合子阳性菌株可变区扩增的产物测序结果 由整合子肺炎克雷伯菌扩增产物测序结果表明, I 类整合子扩增的可变区大小约为 285 bp。与 BLAST 比对分析, I 类整合子可变区编码 aadA2、aadA1、aada16 耐药基因 (介导氨基糖苷类抗菌药

耐药), 二氢叶酸还原酶 (dhfr27) 基因 (对磺胺类抗菌药的耐药), 以及对利福平耐药的 ADP-核糖基转移酶 1 类整合子 (arr-3)。

2.4 整合子阳性和整合子阴性肺炎克雷伯菌对抗菌药物耐药率比较 整合子阳性肺炎克雷伯菌对除阿米卡星以外的其他 13 种抗菌药物的耐药率明显高于整合子阴性肺炎克雷伯菌 ($P < 0.05$); 但在整合子阳性肺炎克雷伯菌耐药率统计中, 有阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、美洛培南耐药率小于 3%。见表 3。

表 3 整合子阳性和整合子阴性肺炎克雷伯菌对抗菌药物耐药率比较

| 抗菌药物 | 整合子阴性肺炎克雷伯菌 (n=82) | | | | 整合子阳性肺炎克雷伯菌 (n=85) | | | |
|-----------|--------------------|---------|---------|---------|--------------------|---------|---------|---------|
| | 株数 | | 耐药率 (%) | | 株数 | | 耐药率 (%) | |
| | 株数 | 耐药率 (%) | 株数 | 耐药率 (%) | 株数 | 耐药率 (%) | 株数 | 耐药率 (%) |
| 哌拉西林 | 30 | 36.58 | 57 | 67.06* | | | | |
| 庆大霉素 | 21 | 25.60 | 55 | 64.71* | | | | |
| 阿米卡星 | 12 | 14.63 | 14 | 16.47 | | | | |
| 环丙沙星 | 24 | 29.27 | 33 | 38.82* | | | | |
| 左氧氟沙星 | 20 | 24.39 | 38 | 44.71* | | | | |
| 氨基糖 | 35 | 42.68 | 85 | 100.00* | | | | |
| 头孢西丁 | 5 | 6.09 | 46 | 54.12 | | | | |
| 头孢吡肟 | 17 | 20.73 | 85 | 100.00* | | | | |
| 头孢噻肟 | 38 | 46.34 | 85 | 100.00* | | | | |
| 头孢他啶 | 18 | 21.95 | 85 | 100.00* | | | | |
| 哌拉西林/他唑巴坦 | 14 | 17.07 | 22 | 25.88 | | | | |
| 妥布霉素 | 29 | 35.37 | 47 | 55.29* | | | | |
| 氨基糖/舒巴坦 | 11 | 13.41 | 36 | 42.35* | | | | |
| 美洛培南 | 0 | 0.00 | 4 | 4.71 | | | | |

注: 与整合子阴性肺炎克雷伯菌耐药率比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

肺炎克雷伯菌在老年 ICU 患者感染的病原菌中排在第 2 位, 且由于其质粒作用产生 ESBLs, 利用产物在细菌不同种之间进行传播扩散, 加重老年 ICU 患者感染细菌的耐药性^[5]。

对本院老年 ICU 患者感染肺炎克雷伯菌标本来源分布的情况进行分析, 分离肺炎克雷伯菌最多的分别是痰、肺泡灌洗液和尿液, 表明肺炎克雷伯菌通过老年人呼吸道和泌尿道更容易感染, 这与文献^[6]报道相似。其原因是肺炎克雷伯菌作为上呼吸道的定植菌, 在各种因素如气管插管破坏口咽部正常定植的菌群后侵入造成逆向移行和易位感染, 在患者未出现明显的感染征象时, 做好肺炎克雷伯菌感染监测的同时加强医务人员手卫生依从性的教育, 才能减少医院交叉感染的产生。

由于老年 ICU 患者因病情重, 大剂量、长时间使用广谱及超广谱抗菌药物, 引起宿主体内菌群的生态平衡失调, 使得体内该菌产 ESBLs 不断增加。本院老年 ICU 患者感染肺炎克雷伯菌中有 43.26% 产 ESBLs, 尤其从肺泡灌洗液中分离出产 ESBLs 最高为 55.31%, 与有关报道不同^[7], 这样对于感染的控制和有效治疗造成较大困难, 只有及时开展病原学检查, 参照药敏结果选用抗菌药物, 才能减少医院感染的产生。

在不断深入的细菌耐药研究中, 越来越多重视整合子介导的耐药性, 整合子有特异性的识别位点捕获游离的耐药基盒, 在自身染色体或者质粒上同一方向整合^[8], 整合子再通过转座子或接合性质粒介导耐药基因水平传播和转移而导致耐药。肺炎克雷伯菌存在 I、II、III 类整合子, 本研究中 85 株肺炎克雷伯菌整合子阳性菌来自于 167 株产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌, 检出结果均为 I 类整合子, 并未发现 II、III 类整合子, 这结果与文献^[9]报道的肺炎克雷伯菌中 I 类整合子的多重耐药基

因的结果基本一致。说明老年 ICU 患者感染产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌中有 I 类整合子, 这样容易形成多重耐药菌株, 导致老年 ICU 患者感染的整合子阳性菌对 13 种药物耐药率与整合子阴性菌的耐药率相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。通过本研究整合子阳性菌株可变区扩增的产物测序结果与 BLAST 比对发现, I 类整合子可变区编码 aadA2、aadA1、aadA16、dfra27 和 arr-3 耐药基因, 说明这些整合子阳性的菌株不仅对三代头孢在内的 β -内酰胺类抗菌药物出现耐药, 对氨基糖苷类和喹诺酮类抗菌药物也会出现耐药, 其原因是在播散过程中整合子的产 ESBLs 菌株存在有 β -内酰胺类抗菌药物所起到的筛选效应^[10], 其他耐药基因黏附在其整合子上形成接合性质粒在筛选 ESBLs 基因中发生作用, 促进某些 ESBLs 编码基因位于整合子内部, 形成高耐药基因, 促进 ESBLs 的传播。

综上所述, 应加强对产 ESBLs 的细菌整合子基因检测和耐碳青霉烯类抗菌药物细菌的专项监测, 微生物室及时把监测结果反馈至临床, 这样有利于临床加强医务人员的手卫生管理, 做好环境卫生及物品消毒, 采取消毒隔离措施, 避免耐药菌的交叉传播, 延缓细菌耐药性的出现。

参考文献

- [1] 王惠姣, 徐娇君, 陈小平, 等. ICU 患者感染多药耐药肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(6):1235-1237.
- [2] 王元元, 张昭勇, 吕军. 下呼吸道感染肺炎克雷伯菌耐药性及产 ESBLs 株危险因素分析[J]. 湖北医药学院学报, 2014, 33(3):248-252.

- [3] 郝家砚, 程邦宁. 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的整合子介导耐药的研究[J]. 国外医药抗生素分册, 2014, 35(1):16-18.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement: M100-S22[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.
- [5] 卢赛飞, 张建礼. 415 株肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22):3076-3077.
- [6] 张爱勤, 孙红艳. 住院患者肺炎克雷伯菌感染及其耐药性监测[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(6):642-643.
- [7] 胡志军, 潘晓龙, 周东升, 等. 肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(12):2865-2867.
- [8] Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons[J]. Annu Rev Genet, 2010, 44:141-166.
- [9] Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in Klebsiella pneumoniae isolates from four countries: a comparative study[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(7):3140-3149.
- [10] 王玉红, 邓敏, 闵晓春. 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌临床分布特征及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(21):5213-5214.

(收稿日期:2016-04-03 修回日期:2016-06-07)

(上接第 2213 页)

究结果显示, SNP 位点 rs2300587、rs2971672 形成 LD 域, 表达显著关联 ($P < 0.05$), 表明在这 2 个 SNP 位点中有基因-基因相互作用。

总之, 本研究初步验证了在汉族人群中, GCK 基因区域的 rs2971672 位点与糖尿病遗传易感性密切相关, 而 rs2268573、rs2300587 位点与糖尿病遗传易感性无明确相关性。rs2300587 和 rs2971672 的 LD 域有基因-基因相互作用。rs2971672 和 rs2300587 LD 域单体型 TA 和 CA 均降低了个体患 2 型糖尿病的风险。这些突变基因的作用机制值得深入研究。

参考文献

- [1] 刘子杰, 晋臻, 段勇. HbA1c 常规工作中引入测量不确定度的意义和存在的困难[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(12):884-886.
- [2] 朱啸林, 宁光. 2 型糖尿病的全基因组关联研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(12):1094-1096.
- [3] Hardy J, Singleton A. Genomewide association studies and human disease[J]. N Engl J Med, 2009, 360:1759-1768.
- [4] Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes[J]. Nature, 2007, 445(7130):881-885.
- [5] Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1212:59-77.
- [6] Bao XY, Peng B, Yang MS. Replication study of novel risk variants in six genes with type 2 diabetes and related

quantitative traits in the Han Chinese lean individuals[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(3):2447-2454.

- [7] Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, et al. Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene[J]. J Clin Invest, 1993, 92(5):2092-2098.
- [8] Iynedjian PB. Mammalian glucokinase its gene[J]. Biochem J, 1993, 293(1):1-13.
- [9] WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus[S]. Geneva: WHO, 1999:1-59.
- [10] 张秀明, 黄宪章, 曾方银, 等. 临床生化检验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012:866.
- [11] Leak TS, Langefeld CD, Keene KL, et al. Chromosome 7p linkage and association study for diabetes related traits and type 2 diabetes in an African-American population enriched for nephropathy[J]. BMC Med Genet, 2010, 11(2):11-22.
- [12] Echouffo-Tcheugui JB, Dieffenbach SD, Kengne AP. Added value of novel circulating and genetic biomarkers in type 2 diabetes prediction: A systematic review[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2013, 101(3):255-269.
- [13] Jansen RJ, Robinson DP, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Polymorphisms in metabolism/antioxidant genes May mediate the effect of dietary intake on pancreatic cancer risk[J]. Pancreas, 2013, 42(7):1043-1053.

(收稿日期:2016-03-13 修回日期:2016-06-21)