

论著·临床研究

重症病房耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 KPC 基因检测及同源性分析*

林琳,王晶,肖晓光,刘爽[△]

(大连医科大学附属第一医院检验科,辽宁大连 116011)

摘要:目的 对该院 4 个重症病房(重症监护病房、急诊病房、神经内科重症病房、心脏内科重症病房)分离到的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)进行耐药性检测,并对耐药基因 KPC 基因进行检测和同源性分析。**方法** 收集 2015 年 1—12 月该院重症病房中分离出来的非重复 CRKP 40 株,用最小抑菌浓度(MIC)法进行耐药性检测,采用 Hodge 试验进行 A 类碳青霉烯酶的表型实验,聚合酶链反应技术(PCR)扩增 KPC 基因,产物进行测序分析,并对所有菌株采用 ERIC-Ⅱ 为引物进行同源性分析。**结果** 40 株 CRKP 均呈现了较高的耐药性;Hodge 试验阳性率为 100.0%,耐药基因 KPC 共检出 29 株,阳性检出率为 72.5%,测序结果为 KPC-2 型;同源性分析 40 株 CRKP 可分为 7 种类型:其中 A 型 28 株,占 70.0%;B 型 2 株,占 5.0%;C 型 1 株,占 2.5%;D 型 1 株,占 2.5%;E 型 2 株,占 5.0%;F 型 5 株,占 12.5%;G 型 1 株,占 2.5%。**结论** 该院各个重症病房分离的 CRKP 主要耐药基因型为 KPC-2,共有 7 个型,以 A 型为主,并且在重症监护病房以及急诊病房之间有流行性传播的趋势。

关键词:肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 同源性分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.009

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)07-0798-04

文献标识码:A

**Detection of drug resistant genes KPC and homology analysis of carbapenems-resistant
Klebsiella pneumoniae in intensive care unit***LIN Lin, WANG Jing, XIAO Xiaoguang, LIU Shuang[△](Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical
University, Dalian, Liaoning 116011)

Abstract: Objective The drug resistance detection of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) isolated from 4 intensive care units (intensive care unit, emergency ward, neurology intensive care unit and cardiac intensive care unit) in the hospital was conducted, and the detection and homology analysis of resistance gene KPC was carried out. **Methods** 40 strains of non-repetitive CRKP were isolated from the intensive care units in the hospital from January to December 2015. Drug resistance detection was conducted by using minimal inhibitory concentration(MIC) method, The Hodge test was used for the phenotypic test of A type of carbapenems. Polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify the KPC gene. The products were sequenced and analyzed. Homology analysis was performed on all strains using ERIC-Ⅱ as primers. **Results** 40 strains of CRKP showed high drug resistance rate; the positive rate of Hodge test was 100.0%, the resistance gene KPC were detected in 29 strains, the positive rate was 72.5%, and the sequencing results was type KPC-2; 40 strains of CRKP can be divided into 7 types by homology analysis, including 28 strains of type A, accounting for 70.0%; 2 strains of B type. Accounted for 5.0%; 1 strains of C type, accounting for 2.5%; 1 strains of D type, accounting for 2.5%; 2 strains of E type, accounting for 5%; 5 strains of F type, accounting for 12.5%; 1 strains of G type, accounting for 2.5%. **Conclusion** The main drug-resistant genotype of CRKP isolated from all intensive care units in the hospital was KPC-2, including 7 types, among which is mainly A type, and there is a trend of epidemic transmission between ICU and emergency wards.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenems; homology analysis

* 基金项目:国家青年自然科学基金资助项目(81601733)。

作者简介:林琳,副主任技师,主要从事病原微生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail: liushuang498@163.com。

本文引用格式:林琳,王晶,肖晓光,等.重症病房耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 KPC 基因检测及同源性分析[J].国际检验医学杂志,2018,39(7):798-800.

碳青霉烯类抗菌药物是 20 世纪 70 年代后期在沙纳霉素(又称硫霉素)基础上研发出来的一类新型 β -内酰胺类抗菌药物^[1-2],是有效治疗革兰阴性杆菌特别是产超广谱 β -内酰胺酶和持续高产 C 类头孢菌素酶(Ampc 酶)的革兰阴性杆菌感染的重要药物^[3],但随着临床该类药物应用的增加,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌检出率逐年增加,对临床感染治疗造成极大的威胁。我国现今出现的碳青霉烯类药物耐药的肠杆菌科细菌大多以肺炎克雷伯杆菌为主,因此,本研究以大连医科大学附属第一医院 4 个重症病房(重症监护病房、急诊病房、神经内科重症病房、心脏内科重症病房)分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌(CRKP)为研究目标,并对耐药基因 KPC 进行检测和同源性分析,报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集 2015 年 1—12 月大连医科大学附属第一医院 4 个重症病房(重症监护病房、急诊病房、神经内科重症病房、心脏内科重症病房)临床标本中分离的 40 株 CRKP。

1.2 仪器与试剂 WalkAway MicroScan 96 全自动微生物鉴定及药敏分析仪;基因扩增仪(PCR system 970);电泳仪(DYCZ-240);药敏纸片购自 OXOID,引物及 PCR 试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 方法 应用最小抑菌浓度(MIC)方法对临床分离的 40 株 CRKP 对 17 种抗菌药物进行耐药性检测;应用改良 Hodge 试验对 40 株 CRKP 进行碳青霉烯酶的表型试验;应用 PCR 方法扩增耐药基因 KPC^[4](KPC-F: 5'-TGT AAG TTA CCG CGC TGA GG-3', KPC-R: 5'-CCA GAC GAC GGC ATA GTC AT-3', 457 bp)。反应体系为: Taq 聚合酶 0.125 μ L, 10 $\times$ 扩增缓冲液(Mg²⁺ plus) 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, 上、下游引物各 0.1 μ L, DNA 2 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火温度 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳。KPC 基因扩增产物送到大连宝生物有限公司进行测序分析。

1.4 同源性分析 对所有菌株进行同源性分析^[5], 引物序列 ERIC-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3')。PCR 反应体系为: 反应体系共 50 μ L, 其中 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 $\times$ 扩增缓冲液 5 μ L, Mg²⁺ 3 μ L, dNTP 4 μ L, 引物 2.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 加入无菌去离子水至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 26 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 4 个循环。94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 40 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环。72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳。

2 结 果

2.1 40 株 CRKP 耐药性检测 40 株 CRKP 对临床常用的 17 种抗菌药物均呈现高耐药率: 哌拉西林

99.1%, 阿莫西林/克拉维酸 98.6%, 哌拉西林/他唑巴坦 97.7%, 头孢唑啉 100%, 头孢呋辛钠 98.6%, 头孢他啶 98.2%, 头孢曲松 100%, 头孢吡肟 99.1%, 头孢西丁 98.6%, 氨曲南 99.5%, 阿米卡星 80.8%, 庆大霉素 91.3%, 妥布霉素 91.3%, 环丙沙星 97.3%, 左氧氟沙星 95.4%, 复方磺胺甲恶唑 80.8%, 四环素 81.70%。

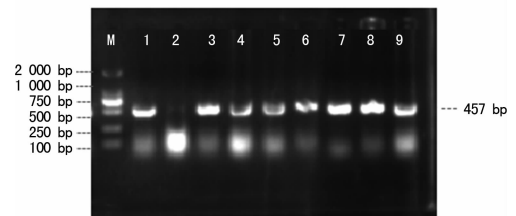
2.2 40 株 CRKP 改良 Hodge 试验 40 株 CRKP 改良 Hodge 试验均为阳性, 阳性率 100.0%, 见图 1。



注: 1 号为阳性菌株, 2 号为阴性菌株

图 1 Hodge 试验结果

2.3 KPC 耐药基因检测 40 株 CRKP 共检出 KPC 耐药基因 29 株, 阳性检出率为 72.5%, 部分结果见图 2。把 KPC 阳性菌种进行测序, 用 Gene bank 进行比对, 结果显示 29 株 KPC 耐药基因菌均是 KPC-2 型。见图 3。



注: M 为标志物; 1 号、3~9 号为阳性菌株; 2 号为阴性菌株

图 2 KPC 部分电泳结果

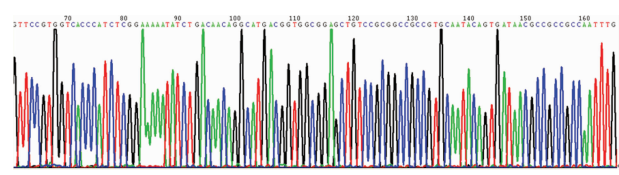


图 3 KPC 阳性株部分测序图

2.3 同源性分析 对临床标本中分离出来的 40 株 CRKP 进行同源性分析, 本院分离的 40 株 CRKP 可分为 7 种类型, 其中 A 型(1~8, 11~12, 14~18, 20~22, 25~27, 29~30, 33, 35~37, 39 号) 28 株, 占 70.0%, B 型(9, 10 号) 2 株, 占 5.0%, C 型(13 号) 1 株, 占 2.5%, D 型(19 号) 1 株, 占 2.5%, E 型(23, 38 号) 2 株, 占 5.0%, F 型(24, 28, 31, 32, 40 号) 5 株, 占

12.5%,G 型(34 号)1 株,占 2.5%。见图 4。

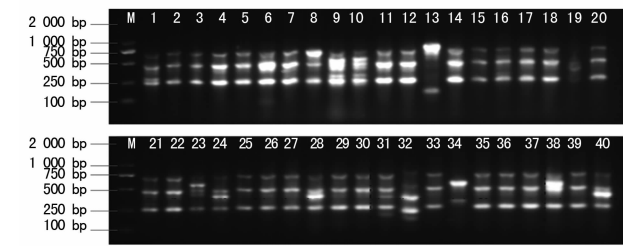


图 4 40 株临床标本的同源性分析结果

2.4 CRKP 临床分布情况 对 40 株临床分离的 CRKP 临床来源进行分析,重症病房是主要来源,且以 A 型为主。见表 1。

表 1 40 株 CRKP 临床基因分型分布情况(n)

科室	基因分型							合计
	A 型	B 型	C 型	D 型	E 型	F 型	G 型	
重症监护病房	16	0	0	0	0	2	0	18
急诊病房	10	2	0	0	0	0	0	12
神内重症病房	2	0	1	0	1	2	0	6
心脏重症病房	0	0	0	1	1	1	1	4
合计	28	2	1	1	2	5	1	40

3 讨 论

近年来,细菌所产生的耐药问题已经成为全球性的问题,在肠杆菌科细菌感染方面,碳青霉烯类药物一直是其抗感染的“特效药”,因为碳青霉烯类抗菌药物可以与青霉素结合蛋白(PBPs)结合使细菌溶解,同时有效地渗透细菌外膜进入周质间隙,产生抗菌药物后效应。此类抗菌药物具有抗菌谱广,抗菌活性强,杀菌作用快的特点,尤其是在治疗产超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)所引起的感染中起到了重要的作用^[6-7]。但是近年来,由于碳青霉烯类药物的广泛应用,出现了大量具有多重耐药性的细菌。本试验中应用 MIC 法对分离的 40 株 CRKP 进行耐药性检测。结果表明,这些细菌均呈现了很高的耐药性。临床可选择的抗菌药物已经十分有限。

KPC 酶属于 A 类碳青霉烯酶,属于丝氨酸酶,为 Bush 分类中的 2f 亚组,赋予水解超广谱β-内酰胺酶的能力,可以定位于整合子、质粒等一些可以转移的基因元件上,从而在菌株之间进行传播^[8-9]。自从 2001 年在美国北卡罗来纳报道了第 1 例携带 KPC-2 型 CRKP 以来^[10],世界各地不断有产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的报道,现已有 5 个 KPC 亚型被国内外研究发现^[11]。如今产 KPC 肺炎克雷伯菌在我国广泛存在,并且主要以 KPC-2 型为主。本实验首先对 A 类碳青霉烯酶进行表型实验,40 株菌株的阳性率为 100.0%。然后进行了常见的耐药基因 KPC 的检测,40 株 CRKP 共检出 29 株耐药基因 KPC 阳性,阳性检出率 72.5%,测序的结果显示在本院分离的菌株均

是 KPC-2 型,与国内的相关报道相符^[12]。

由于重症病房一直是院内感染控制的重点,所以本研究收集了本院 4 个重症病房的 CRKP 标本,参照临床实验室标准化协会(CLSI)标准^[13],美罗培南或者亚胺培南 MIC>8 mg/L 或者厄他培南 MIC>4 mg/L 者为碳青霉烯耐药菌株,通过对肺炎克雷伯菌进行同源性分析,从而提示医院内环境中是否存在克隆菌株流行趋势。ERIC-PCR 技术是在原有的随机短引物 PCR(RAPD)^[14]的基础上经过不断改革从而兴起的一种对细菌的 DNA 进行指纹图谱分析的一种方法^[15],它是一段长度大约为 126 bp 的 ERIC 片段,遗传性稳定,以 ERIC 片段作为目的基因来设计引物进行 PCR 的扩增,因为它独特的保守位置使得这种 PCR 能产生多种独特的扩增产物,基本上都在 50~3 000 bp 之间,然后就可以根据扩增产物的电泳条带来区分细菌的株型。本研究发现共有 7 个类型,其中 A 型 28 株,占 70.0%,B 型 2 株,占 5.0%,C 型 1 株,占 2.5%,D 型 1 株,占 2.5%,E 型 2 株,占 5.0%,F 型 5 株,占 12.5%,G 型 1 株,占 2.59%。分型以 A 型为主,并且主要在重症监护病房和急诊病房中分布。由此可见 A 型是本院的流行株,并有流行趋势。

综上所述,本院 CRKP 已经呈现了高度耐药性并且有流行的趋势,因此院内感染应重点关注多重耐药菌株的传播,规范化使用抗菌药物,减少耐药菌株的产生。A 类碳青霉烯酶的耐药基因还包括 GES、IMI 等,后续研究还应进行其他耐药基因型的扩增,防止新的耐药菌株在本院的流行传播。

参考文献

[1] LO TS, WELCH JM, ALONTO AM, et al. A review of the carbapenems in clinical use and clinical trials[J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2008, 3(2): 123-131.

[2] BASSETTI M, NICOLINI L, ESPOSITO S, et al. Current status of newer carbapenems[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(5): 564-575.

[3] 衣美英, 李杰, 王靖, 等. 耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌的耐药机制和同源性研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(4): 297-301.

[4] 汤瑾, 蒋燕群. 碳青霉烯类抗生素耐药肠杆菌科细菌中 KPC 酶的研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(6): 446-449.

[5] 张伟伟, 何慧婵, 许振杰, 等. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的基因型及同源性分析[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(5): 391-394.

[6] 白永凤, 祝进, 陆军, 等. 耐碳青霉烯酶肠杆菌科耐药基因及同源性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(10): 2176-2178.

[7] NORDMANN P, DORTET L, POIREL L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm[J]. Trends Mol Med, 2012, 18(5): 263-272.

[8] CORNAGLIA G, GIAMARELLOU (下转第 804 页)

疾病加重表达随之升高,同时也利于评估疾病疗效,临床应用价值较高。

参考文献

- [1] 刘雪涛,李庆.类风湿性关节炎治疗药物进展[J].现代生物医学进展,2015,15(6):1171-1173.
- [2] 周静,张弦,钱海兵.类风湿性关节炎发病机制的研究进展[J].贵阳中医学院学报,2014,36(5):44-47.
- [3] KRAJEWSKA-WIODARCZYK M, STOMPÖR T. Osteoporosis and vascular calcification in rheumatoid arthritis - the role of osteoprotegerin and sclerostin[J]. Pol Merkuriusz Lekarski, 2017, 43(253):41-47.
- [4] 姚血明,曹跃朋,马武开,等.类风湿性关节炎患者外周血 Th17 细胞/调节性 T 细胞比例增加并与疾病活动相关[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(1):81-84.
- [5] ARAB H H, SALAMA S A, ABDELGHANY T M, et al. Camel milk attenuates rheumatoid arthritis via inhibition of mitogen activated protein kinase pathway[J]. cell physiol biochem, 2017, 43(2):540-552.
- [6] 李旭光,上官改珍,徐燕,等. IL-18 和 IL-8 在类风湿性关节炎患者血清中的表达及其与抗 CCP 相关性的研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2014,30(8):865-867.
- [7] TENG F, FELIX K M, BRADLEY C P, et al. The impact of age and gut microbiota on Th17 and Tfh cells in K/BxN autoimmune arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1):188.
- [8] 洪琼,徐建华,徐胜前,等.类风湿关节炎患者血清 IL-17 和 IL-23 水平变化及其临床意义[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2013,7(02):621-625.
- [9] ARNETT F C, EDWORTHY S M, BLOCH D A, et al. The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 1988, 31(3):315-324.
- [10] ZHAO M, LI Y, XIAO W. Anti-apoptotic effect of interleukin-22 on fibroblast-like synoviocytes in patients with

rheumatoid arthritis is mediated via the signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway[J]. Int J Rheum Dis, 2017, 20(2):214-224.

- [11] 曾小威.类风湿性关节炎治疗及免疫分子机制研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(11):1044-1046.
- [12] SWART J F, DE ROOCK S, PRAKKEN B J. Understanding inflammation in juvenile idiopathic arthritis: How immune biomarkers guide clinical strategies in the systemic onset subtype[J]. Eur J Immunol, 2016, 46(9):2068-2077.
- [13] 朱振标,张寿,刘亦恒,等.膝关节炎关节液和滑膜中 IL-18 与 MMP-13 的表达及临床意义[J].海南医学,2015,26(15):2227-2230.
- [14] YANG Z W, CAO J, YU C C, et al. Caspase-1 mediated interleukin-18 activation in neutrophils promotes the activity of rheumatoid arthritis in a NLRP3 inflammasome Independent manner[J]. Joint Bone Spine, 2016, 83(3):282-289.
- [15] MITRA A, RAYCHAUDHURI S K, RAYCHAUDHURI S P. IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade[J]. Cytokine, 2012, 60(1):38-42.
- [16] 刘志华,黄石,齐青松,等.类风湿性关节炎患者血清 IL-17 和 IL-22 的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2014,35(1):14-16.
- [17] PFEIFLE R, ROTHE T, IPSEIZ N, et al. Regulation of autoantibody activity by the IL-23-TH17 axis determines the onset of autoimmune disease[J]. Nat Immunol, 2017, 18(1):104-113.
- [18] 郭明,安高,封桂英,等. CD4⁺ T 细胞亚群在类风湿性关节炎中的研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2014,30(9):1004-1007.

(收稿日期:2017-09-10 修回日期:2017-11-16)

(上接第 800 页)

- H, ROSSOLINI G M. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? [J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(5):381-393.
- [9] MATHERS A J, PEIRANO G, PITOUT J D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(3):565-591.
- [10] WALSH T R, WEEKS J, LIVERMORE D M, et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study[J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(5):355-362.
- [11] LEE H H, MOLLA M N, CANTOR C R, et al. Bacterial charity work leads to population-wide resistance[J]. Nature, 2010, 467(7311):82-85.
- [12] 杨丽君,陈坚,杨燕,等.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌基

因型检测和同源性分析[J].中华检验医学杂志,2013,36(4):318-323.

- [13] DOERN G V, BRUEGGEMANN A, JR H H, et al. Antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae recovered from outpatients in the United States during the winter months of 1994 to 1995: results of a 30-center national surveillance study [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(5):1208-1213.
- [14] PRABHU V, ISLOOR S, BALU M, et al. Genotyping by ERIC-P CR of Escherichia coli isolated from bovine mastitis cases [J]. Indian J Biotechnol, 2010, 65(2):81-85.
- [15] MORSINK M C, DEKTER H E, DIRKS-MULDER A, et al. Molecular diagnostic analysis of outbreak scenarios [J]. Biochem Mol Biol Educ, 2012, 40(2):112-120.

(收稿日期:2017-11-12 修回日期:2018-01-02)