

· 临床论著 ·

# 碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌 $\beta$ -内酰胺酶基因的检测

姜梅杰 秦霞

**【摘要】 目的** 研究碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌  $\beta$ -内酰胺酶耐药基因的存在情况,为临床合理使用抗菌药物提供依据。**方法** 收集本院临床分离的 6 株对碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的 Kp,采用特异性 PCR 扩增和序列分析检测  $\beta$ -内酰胺酶耐药基因在碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的 Kp 中的存在情况,用 E-test 方法测定菌株的药敏情况。**结果** 经 PCR 扩增和 DNA 序列分析证实菌株 Kp1、Kp2、Kp3、Kp4、Kp5 和 Kp6 均含 DHA-1、CTX-M-14 和 KPC-2 基因。Kp1 同时含 SHV-12 基因,Kp2 和 Kp3 同时含 SHV-11 基因,Kp4 同时含 CMY-2 和 SHV-12 基因。Kp5 和 Kp6 同时含 SHV-2 基因。6 株 Kp 对厄他培南、美罗培南、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟和头孢西丁均耐药,仅 1 株 Kp 对亚胺培南中介,其余菌株均耐药;2 株 Kp 对氨曲南敏感,其余菌株均耐药;3 株 Kp 对哌拉西林/他唑巴坦耐药,1 株中介,2 株敏感;4 株 Kp 对左氧氟沙星敏感,2 株耐药;3 株 Kp 对阿米卡星和庆大霉素敏感,3 株耐药。**结论** 碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的 Kp 均携带多种  $\beta$ -内酰胺酶耐药基因,其菌株对临床常用抗菌药物的耐药性有很大差异,临床应根据药敏结果选用抗菌药物,以防治疗失败。

**【关键词】** 肺炎克雷伯菌;碳青霉烯类;敏感性; $\beta$ -内酰胺酶类

**Investigation on  $\beta$ -lactam resistance gene of *Klebsiella pneumoniae* with decreased sensitivity to carbapenem antibiotics** JIANG Mei-jie, QIN Xia. Central Hospital of Tai'an, Tai'an 271000, China  
Corresponding author: JIANG Mei-jie, Email: xtingw@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate  $\beta$ -lactam resistance gene of *Klebsiella pneumoniae* with decreased sensitivity to carbapenem antibiotics which can guide the rational use of antibiotics. **Methods** Total of 6 strains of *Klebsiella pneumoniae* with decreased sensitivity to carbapenem antibiotics were isolated from our hospital, and drug resistance situation was detected by E-test.  $\beta$ -lactam resistance gene of *Klebsiella pneumoniae* with decreased sensitivity of carbapenem antibiotics were detected by specific PCR amplification and sequence analysis. **Results** DHA-1 gene, CTX-M-1 gene and KPC-2 gene were detected in strains Kp1, Kp2, Kp3, Kp4, Kp5 and Kp6 by PCR and DNA sequence analysis. Strain Kp1 contained gene SHV-12. Strains Kp2 and Kp3 contained gene SHV-11. Strain Kp4 contained gene CMY-2 and gene SHV-12. Strains Kp5 and Kp6 contained gene SHV-2. All of the 6 strains were resistant to ertapenem, meropenem, cefotaxime, ceftazidime, cefepime and ceftazidime. Only one of the 6 strains was intermediated to imipenem and the others were resistant to imipenem. Two strains were sensitive to aztreonam while the others were resistant. Three strains were resistant to piperacillin/tazobactam, while one strain was intermediated and 2 strains were sensitive. Four strains were sensitive to levofloxacin and 2 were resistant. Three strains were sensitive to amikacin and gentamicin while 3 strains were resistant. **Conclusions** *Klebsiella pneumoniae* with decreased sensitivity to carbapenem antibiotics isolated from our hospital carried a variety of  $\beta$ -lactam resistance gene. There are many differences between resistances to common antibiotics. Clinical use of antibiotics should be based on susceptibility results, in order to avoid treatment failure.

**【Key words】** *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenems; Sensitivity;  $\beta$ -lactamases

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.04.016

作者单位:271000 泰安市,山东省泰安市中心医院检验科(姜梅杰);莱钢集团莱芜矿业有限公司医院检验科(秦霞)

通讯作者:姜梅杰,Email:xtingw@163.com

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)是院内感染最常见的病原菌之一,常表现为多重耐药性,其主要原因是产生了质粒介导的 $\beta$ -内酰胺酶。由于本地区同时产ESBLs、AmpC酶的肺炎克雷伯菌阳性率较高,碳青霉烯类抗菌药物治疗多药耐药Kp引起的感染临床较为常见。因此,对碳青霉烯类抗菌药物耐药的Kp受到高度重视。国外已有报道KPC-2型碳青霉烯酶对碳青霉烯类抗菌药物的作用,产酶菌株对亚胺培南低水平敏感<sup>[1]</sup>,KPC酶属A类碳青霉烯酶,其耐药基因可在不同菌种间传播,存在暴发流行的危险<sup>[2-4]</sup>。本文对临床分离的6株碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的Kp进行 $\beta$ -内酰胺类相关耐药基因分析,以提高因Kp引起严重感染的治愈率,预防治疗失败,进而预防耐药菌株感染的暴发流行。

## 资料与方法

### 一、菌株来源

Kp1为2006年6月从新生儿病房患儿的气管插管吸取的痰标本中分离到的1株对亚胺培南高水平耐药的肺炎克雷伯菌。患者为新生儿,临床诊断为新生儿肺炎、湿肺和呼吸衰竭。临床首先用头孢曲松经验治疗4d,改用亚胺培南治疗5d后从痰中分离出Kp1。

Kp2为2009年1月在手术切口分泌物中检出的1株对亚胺培南高水平耐药的肺炎克雷伯菌。患者,男,年龄28岁,遇车祸股骨、肋骨、骨盆等多处骨折,骨外科行3次手术治疗后,手术切口愈合不佳,表面出现分泌物,在分泌物中检出1株对亚胺培南高水平耐药的肺炎克雷伯菌为Kp2。

Kp3为2009年5月在脑外伤患者的痰标本中检出的1株对美罗培南高水平耐药的肺炎克雷伯菌。患者,男,74岁,脑外伤后在某医院住院治疗1月余,因病情加重于2009年5月转入本院,临床诊断为脑外伤和肺炎。临床中选用亚胺培南治疗11d后(2009年,CLSI抗菌药物判读标准亚胺培南MIC值4 $\mu$ g/ml为敏感),患者的感染未得到有效控制。

Kp4为2009年7月在保健科老年患者的痰标本中检出的1株对亚胺培南高水平耐药的肺炎克雷伯菌。患者,男,79岁,临床诊断为急性心肌梗塞和肺炎。给予头孢曲松和左氧氟沙星治疗3d后,自痰液中分离出Kp4。

Kp5为2009年7月从新生儿病房患儿的气管插管吸取的痰标本中分离到的1株对美罗培南高水平耐药的肺炎克雷伯菌。患者为新生儿,临床诊断为新生儿肺炎、湿肺。临床采用帕尼培南经验治疗

7d后从痰培养中分离出Kp5。

Kp6为2009年7月在1例新生儿患者血培养中检出碳青霉烯类抗生素敏感性降低的肺炎克雷伯菌。患儿,男,为早产儿,临床诊断为新生儿肺炎,坏死性小肠结肠炎和腹膜炎。首先选用帕尼培南经验治疗,后改用美洛西林钠/舒巴坦治疗4d后,从血培养中分离出Kp6。

标准菌株为大肠埃希菌ATCC25922。KPC阳性标准菌株由沈继录博士惠赠。SHV-12、CTX-M-14、DHA-1、CTX-M-3、阳性标准菌株由杨启文惠赠。

### 二、主要试剂

PCR检测试剂Taq酶、Buffer、dNTP及相关材料均为中国大连宝生物工程有限公司产品。引物由大连宝生物工程有限公司合成。E-test条为瑞典AB Biodisk公司产品。

### 三、方法

1. 药物敏感试验:采用E-test法测定菌株对亚胺培南、美罗培南、厄他培南、哌拉西林/他唑巴坦、氨曲南、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁、左氧氟沙星、阿米卡星和庆大霉素的耐药性。药物敏感性根据2011年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)的标准进行抗菌药物判读<sup>[5]</sup>。

2. 总DNA的制备:采用煮沸法,吸取100 $\mu$ l双蒸水,挑取过夜培养的肺炎克雷伯菌菌落2~3个,加入双蒸水中。混匀加热煮沸10min,以15000r/min的速度在低温高速离心机中离心15min,将上清液转置另一个无菌微量离心管中,即为细菌总DNA溶液,-20℃保存备用。

3. 耐药基因检测:采用PCR技术,引物设计参照文献<sup>[6-7]</sup>。NDM-1基因PCR扩增引物序列参照中国疾病预防控制中心传染病预防控制所公布的引物序列。KPC、ESBLs、AmpC、NDM-1基因PCR扩增引物序列见表1。

PCR扩增操作参照文献<sup>[6]</sup>方法进行,PCR产物在2%的含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中进行电泳,采用凝胶成像系统观察结果。

4. DNA测序:blaKPC、blaSHV、blaCTX-M、blaDHA、blaCTT和阳性基因PCR产物由大连宝生物工程有限公司和上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果在GenBank网上进行比对。

## 结 果

### 一、药敏试验结果

6株肺炎克雷伯菌中仅1株Kp对亚胺培南中介,其余菌株对亚胺培南均耐药;有2株Kp对氨曲南敏感,其余菌株均耐药;3株Kp对哌拉西林/他唑

巴坦耐药,1 株中介,2 株敏感;4 株 Kp 对左氧氟沙星敏感,2 株耐药;3 株 Kp 对阿米卡星和庆大霉素敏感,3 株耐药;6 株 Kp 对美罗培南、厄他培南、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟和头孢西丁均耐药。采用 E-test 法检测 6 株产 KPC 酶肺炎克雷伯菌对 12 种抗菌药物的 MIC 值,见表 2。

## 二、耐药基因检测结果

菌株 Kp1、Kp2、Kp3、Kp4、Kp5 和 Kp6 KPC、DHA、SHV 和 CTX-M1 群基因均为阳性,见图 1。菌株 Kp4 CTT 基因阳性,未检出 CTX-M2 群、CTX-M3

群基因。对 KPC、DHA、SHV、CTX-M1 群、CTT 阳性耐药基因 PCR 扩增产物进行测序,结果 6 株 KPC 基因均编码 KPC-2 型碳青霉烯酶,DHA 基因均编码 DHA-1 型头孢菌素酶,CTX-M1 群基因均编码 CTX-M-14 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶。Kp1 和 Kp4 SHV 基因编码 SHV-12 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(图 2)。Kp2 和 Kp3 SHV 基因编码 SHV-11 非超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(图 3)。Kp5 和 Kp6 SHV 基因编码 SHV-2 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(图 4)。CTT 基因编码 CMY-2 型头孢菌素酶。

表 1 KPC、ESBLs、AmpC 和 NDM-1 基因 PCR 扩增引物序列

引物	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度(℃)
SHV-F	GGTTATGCCGTTATATTCGCC	867	55
SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
CTX-M1-F	AGTGCAAACGGATGATGT	792	55
CTX-M1-R	GGCTGGGTAAAAATAGGTC		
CTX-M2-F	ACGCTACCCCTGCTATT	830	55
CTX-M2-R	CAGAAACCGTGGGTACGA		
CTX-M3-F	ACGCTGTTGTTAGGAAGTG	759	55
CTX-M3-R	TTGAGGCTGGGTGAAGT		
DHA-M-F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	55
DHA-M-R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
CTT-M-F	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA	462	55
CTT-M-R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
ACC-M-F	AACAGCCTCAGCAGCCGTTA	346	55
ACC-M-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
KPC-gp-F	GCGGAACCATTCGCTAAACTC	340	55
KPC-gp-R	CGCCCAACTCCTTCAGCAACA		
NDM-1-F	GCGGAATGGCTCATCACGA	286	60
NDM-1-R	CGCAACACAGCCTGACTTTC		

表 2 6 株产 KPC 酶肺炎克雷伯菌对 12 种抗菌药物的 MIC 值( $\mu$ g/ml)

菌株	IPM	MEM	ETP	ATM	TZP	CTX	CAZ	FEP	FOX	LEV	AK	GM
Kp1	32	4	> 32	> 256	> 256	> 256	> 256	64	> 256	0.064	4	1
Kp2	16	8	> 32	16	8	> 256	128	128	> 256	2	> 256	> 256
Kp3	4	16	> 32	128	> 256	> 256	> 256	256	> 256	> 32	> 256	> 256
Kp4	24	4	> 32	> 256	> 256	> 256	> 256	128	> 256	> 32	> 256	> 256
Kp5	4	16	> 32	1	16	> 256	> 256	32	> 256	0.032	2	1
Kp6	1.5	4	6	1	32	> 256	> 256	64	> 256	0.750	1	0.25

注:IPM:亚胺培南,MEM:美罗培南,ETP:厄他培南,ATM:氨曲南,TZP:哌拉西林/他唑巴坦,CTX:头孢噻肟,CAZ:头孢他啶,FEP:头孢吡肟,FOX:头孢西丁,LEV:左氧氟沙星,AK:阿米卡星,GM:庆大霉素



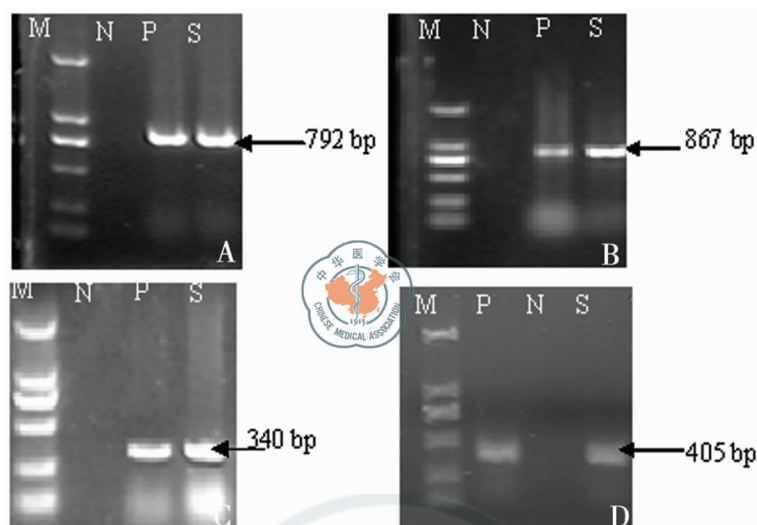


图 1 CTX-M1 群、SHV、KPC-gp 和 DHA 基因部分 PCR 电泳图

注: M: Marker, P: 阳性对照, N: 阴性对照, S: 阳性对照; (A) CTX-M1 群基因, (B) SHV 基因, (C) KPC-gp 基因, (D) DHA 基因

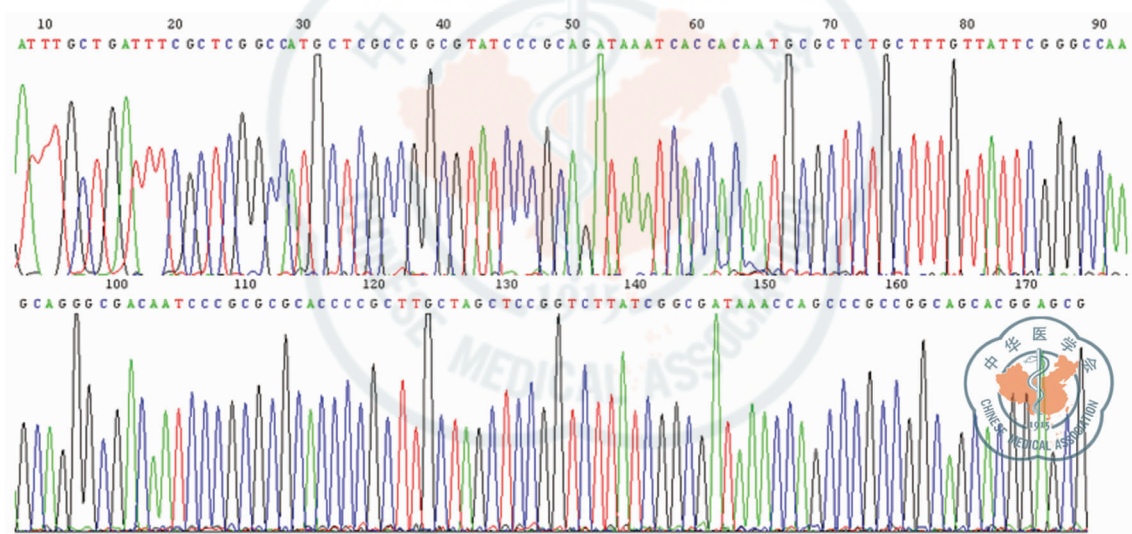


图 2 SHV-12 基因 PCR 产物部分测序图

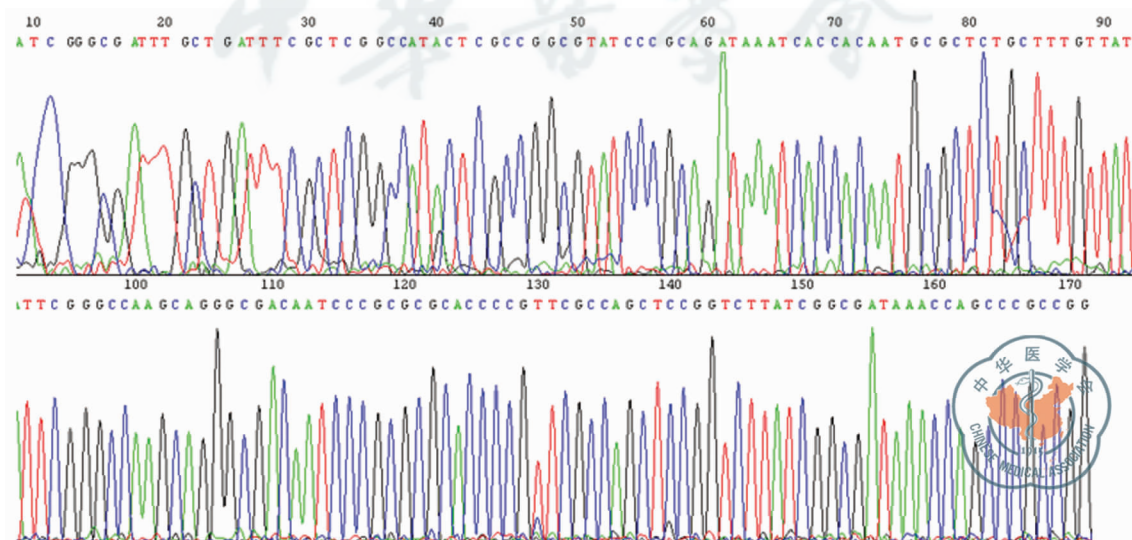


图 3 SHV-11 基因 PCR 产物部分测序图

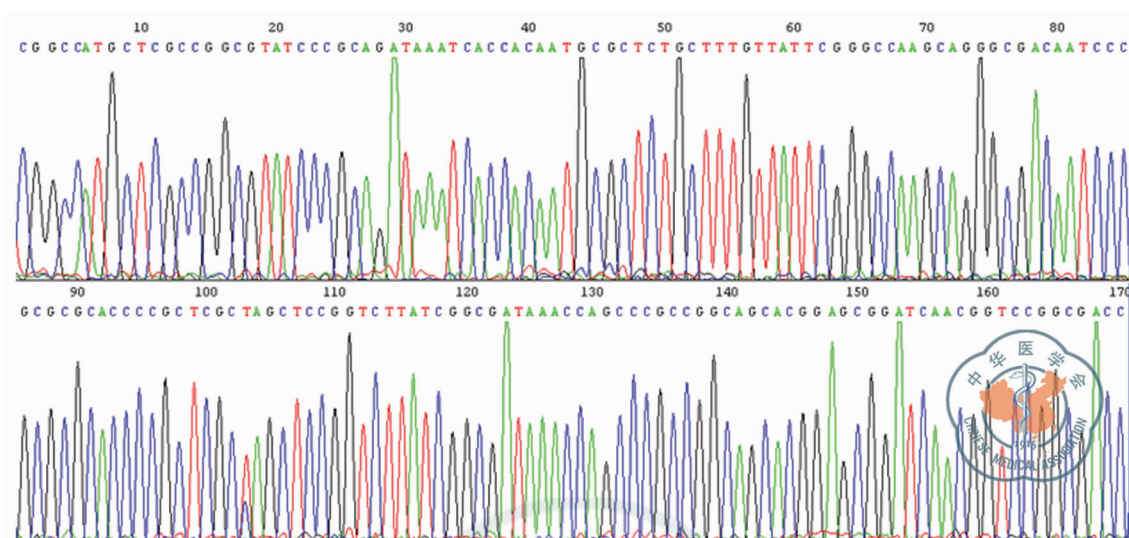


图 4 SHV-2 基因 PCR 产物部分测序图

## 讨 论

肺炎克雷伯菌是引起医院内感染的主要病原菌之一。近年来,产 ESBLs 和 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌发生率较高,由于碳青霉烯类抗菌药物对产 ESBLs、AmpC 酶的肺炎克雷伯菌具有高度稳定性,并具有杀菌活性强大等特点,是目前治疗肠杆菌科细菌引起严重感染的最佳药物<sup>[8]</sup>。2006 年本院首次发现 1 株对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌,2007~2008 年未发现对碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌,但自 2009 年以来已检出 16 株对碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌。提示碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌引起的感染呈增加趋势,且存在治疗失败的病例,因此,临床上应对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌应引起高度重视。国外已有报道 KPC-2 型碳青霉烯酶对碳青霉烯类抗菌药物的作用,产酶菌株对亚胺培南低水平敏感<sup>[1]</sup>。本研究中 6 株肺炎克雷伯菌经 PCR 及序列分析证实均产 KPC-2 型碳青霉烯酶;药敏结果显示,仅菌株 Kp6 对亚胺培南中介水平耐药,Kp1、Kp2、Kp4 对亚胺培南均高水平耐药,提示某些菌株对亚胺培南敏感性降低不仅由于产 KPC-2 型碳青霉烯酶,还可能有其他耐药机制参与,尚待进一步研究。药敏结果显示菌株 Kp5 和 Kp6 对氨曲南敏感,其余菌株对氨曲南耐药;菌株 Kp2 对哌拉西林/他唑巴坦敏感,其余菌株对哌拉西林/他唑巴坦中介或耐药。说明产 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌存在对氨曲南、哌拉西林/他唑巴坦敏感株和耐药株。ESBLs 和质粒介导的 AmpC 酶同时存在的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物敏感,

而对其他  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物均耐药<sup>[9]</sup>。

本研究中 6 株肺炎克雷伯菌均携带 ESBLs 和质粒介导的 AmpC 酶,同时也携带 KPC-2 型碳青霉烯酶,因此,导致肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低。

本研究发现 Kp1 和 Kp4 含 KPC-2、CTX-M-14、DHA-1 和 SHV-12 基因,且 Kp4 同时含 CMY-2 型头孢菌素酶;Kp2 和 Kp3 同时含 KPC-2、CTX-M-14、DHA-1 和 SHV-11 基因,且 Kp5 和 Kp6 同时含 KPC-2、CTX-M-14、DHA-1 和 SHV-2 基因。提示碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌均携带多种  $\beta$ -内酰胺类耐药基因。

综上所述,碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的耐药性存在很大差异,临床上应用亚胺培南等碳青霉烯类抗菌药物治疗严重感染时,需对细菌的耐药性进行检测,应及时更换敏感的抗菌药物,防止治疗失败并预防耐药菌株的暴发流行。

## 参 考 文 献

- 1 Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, et al. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(10):3725-3736.
- 2 Woodford N, Tien PM Jr, Young K, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(12):4793-4799.
- 3 Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing

- $\beta$ -lactamase KPC-2. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12): 3881-3889.
- 4 张嵘, 蔡加昌, 周宏伟, 等. 肠杆菌科细菌中质粒介导的 KPC-2 型碳青霉烯酶的检测. 中华检验医学杂志, 2008, 31(10): 1134-1141.
- 5 Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S21 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-first informational supplement. 2011. <http://www.rsu.ac.th/medtech/files/CLSI%202011.pdf>
- 6 沈继录, 朱德妹, 吴卫红, 等. 革兰阴性杆菌碳青霉烯酶产生与细菌耐药性关系的研究. 中华检验医学杂志, 2008, 31(4): 408-414.
- 7 胡付品, 朱德妹, 叶信予, 等. 对头孢吡肟敏感的疑似产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌和克雷伯菌的分子生物学特征. 中华检验医学杂志, 2008, 31(10): 1128-1133.
- 8 叶素娟, 杨青, 俞云松. 2005 年中国 CHINET 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性分析. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(4): 283-286.
- 9 We ZQ, Chen YG, Yu YS, et al. Nosocomial spread of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple  $\beta$ -lactamases. J Med Microb, 2005, 54(9): 885-888.
- (收稿日期: 2011-11-16)  
(本文编辑: 孙荣华)

姜梅杰, 秦霞. 碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肺炎克雷伯菌  $\beta$ -内酰胺酶基因的检测[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(4): 337-332.

