

· 临床论著 ·

肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类抗菌药物的基因型研究

耿荣华 王晓杰 高华英 张锦前 成军

【摘要】目的 探讨肺炎克雷伯菌(Kpn)耐碳青霉烯类药物的耐药基因型。**方法** 收集2011年1月至12月本院分离到的肺炎克雷伯菌,用K-B法进行药敏实验,筛选出6株耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌(CRKP),采用改良Hodge试验检测菌株产碳青霉烯酶,用乙二胺四乙酸(EDTA)纸片法检测金属酶表型,聚合酶链式反应(PCR)鉴定肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯酶(KPC)基因及其他 β -内酰胺酶基因。**结果** 6株CRKP对头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、复方新诺明、哌拉西林/三唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、氨曲南、美罗培南、亚胺培南均耐药,对多黏菌素、米诺环素、磷霉素、阿米卡星等敏感,改良Hodge试验提示6株CRKP均产碳青霉烯酶,EDTA纸片法检测显示不产金属酶;PCR鉴定出该6株CRKP均携带 bla_{KPC-2} 型基因,部分菌株携带 bla_{SHV} 及 bla_{TEM} 型广谱 β -内酰胺酶耐药基因。**结论** bla_{KPC-2} 耐药基因为Kpn对碳青霉烯类药物耐药的主要原因。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; β -内酰胺酶; 碳青霉烯酶; 耐药基因

Investigation on carbapenem antibiotics resistance gene of *Klebsiella pneumoniae* GENG Rong-hua*, WANG Xiao-jie, GAO Hua-ying, ZHANG Jin-qian, CHENG Jun. *Aviation General Hospital of China Medical University, Beijing 100012, China

Corresponding author: WANG Xiao-jie, Email: wjwxj@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To understand the drug resistance genotype of *Klebsiella pneumoniae* (Kpn) resistant to carbapenems. **Methods** *Klebsiella pneumoniae* isolated in our hospital from January to December, 2011 were collected, K-B was used for drug susceptibility test, 6 *Klebsiella pneumoniae* strains were screened to be resistant to carbapenems. Modified Hodge test was used for the detection of strains producing carbapenemases, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) disk diffusion method was used for detection of metal enzyme phenotypes, KPC gene and other beta lactamases genes were identified by using PCR. **Results** There were 6 *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to carbapenems drug, they were resistant to cefotaxime, ceftazidime, cefuroxime, amoxicillin, clavulanate, ampicillin, ampicillin, subactam, gentamycin, SMZ/TMP, piperacillin/tazobactam, ceftazidime-sulbactam, cefepime, aztreonam, meropenem and imipenem, but sensitive to polymyxin, minocycline, fosfomycin, amikacin. All 6 strains produced carbapenemases but couldn't produce metal enzyme; all of the 6 strains carried bla_{KPC-2} , part of them carried bla_{SHV} and bla_{TEM} . **Conclusions** The bla_{KPC-2} is the main reason for the resistance of Kpn to carbapenem.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; β -lactamase; Carbapenem; Resistance gene

肺炎克雷伯菌属于肠杆菌科革兰阴性杆菌,是兼性厌氧的条件致病菌,当机体免疫功能低下、不合理使用广谱抗菌药物或各种侵入性操作等条件下均可引起该菌感染。近年来,由于超广谱抗菌药物广泛应用,细菌耐药率及院内感染率呈逐年上升趋势^[1],有文献报道由该菌引起的医院感染可达5%以上,常导致临床抗感染治疗的失败和病程的迁延。碳青霉烯类抗菌药物对革兰阴性菌产生的超广谱 β -

内酰胺酶及AmpC酶都很稳定,是治疗多耐药肺炎克雷伯菌及其所致严重感染常用的有效抗菌药物,但随着碳青霉烯类抗菌药物在临床上使用增加,耐药菌株随之不断增加。临床上可供选择的抗菌药物有限,故对于该细菌的耐药机制研究成为医疗卫生及相关部门关注的焦点。在对碳青霉烯类抗菌药物的多种耐药机制中,产酶是细菌对 β -内酰胺类抗菌药物耐药最重要的机制^[2]。其中产生KPC型碳青霉烯酶是主要耐药机制之一。本研究中通过对6株产KPC型碳青霉烯酶及其他 β -内酰胺酶耐药基因检测,明确其与耐药表型的相关性。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.04.017

作者单位: 100012 北京, 中国医科大学航空总医院(耿荣华、高华英); 首都医科大学附属北京地坛医院(王晓杰、张锦前、成军)

通讯作者: 王晓杰, Email: xjwxj@yahoo.com.cn

资料与方法

一、实验菌株及质控菌株

收集本院2011年1月至2011年12月对碳青霉烯类(亚胺培南、美罗培南)耐药的6株肺炎克雷伯菌株,标本均来源于患者痰或气道分泌物,剔除同一患者相同部位重复菌株,6例患者年龄为70~90岁,其中女性2例,均以感染性疾病入院,肺部检查大面积阴影,患者呼吸困难,白细胞计数、C反应蛋白(CRP)不同程度增高,入院前均有侵入性操作以及大剂量广谱抗菌药物使用史。标本经法国梅里埃公司API法细菌鉴定系统对细菌进行鉴定。质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922。

二、药敏试纸及主要试剂

药敏纸片均购自北京天坛生物制品股份有限公司。主要抗菌药物有头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢呋辛(CXM)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、氨苄西林(AM)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、庆大霉素(GEN)、复方新诺明(SXT)、头孢哌酮/舒巴坦(SCF)、哌拉西林/三唑巴坦TZP)、氨曲南(ATM)、头孢吡肟(FEP)、左氧氟沙星(LEV)、美罗培南(MEM)、亚胺培南(IPM)、多黏菌素B(PO)、磷霉素(P)、阿米卡星(AN)和米诺环素(MC)。

DNA质粒提取试剂盒及DNA凝胶回收试剂盒均购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司试剂盒。*Taq*酶购于上海鼎国生物技术有限责任公

司;T4 DNA连接酶、IPTG购于Promega公司;DNA Marker、限制性核酸内切酶购自TaKaRa(大连)公司;X- α -gal(日本Clontech);DNA连接酶、pGEM-T、IPTG及X- β -gal(美国Promega);*EcoR* I日本TaKaRa);PCR反应体系其余化学试剂均为国产分析纯和生化试剂。

三、表型筛查及表型确认

标本采集及分离培养严格按照《全国临床检验操作规程》第3版进行。用WHONET 5.6软件分析2011年1月至2011年12月本院CRKP的耐药性。根据2009临床与实验室标准协会(CLSI)说明,参照文献^[3]及2010年9月我国卫生部、中医药管理局、总后勤部卫生部联合颁布的《产NDM-1泛耐药肠杆菌科细菌感染诊疗指南》^[4]。将临床分离6株CRKP进行表型筛查,继而通过改良Hodge试验确认产碳青霉烯酶及EDTA抑制试验确认是否产金属酶进行表型确认。

四、提取细菌DNA质粒

将平皿上过夜培养的受试菌落接种于5 ml LB肉汤中,37℃振荡培养12~16 h后,12 000 r/min,离心2 min沉淀菌体,完全弃除上清。严格按操作说明进行质粒提取。

五、PCR扩增及基因序列分析

所选购的耐碳青霉烯酶耐药基因及ESBLs型耐药基因扩增所用的引物及预期产物大小,根据GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中已发布的各型bla基因序列设计引物见表1。

以上引物由美国Invitrogen公司合成;所有PCR

表1 耐药基因引物名称、序列及目的片段大小

耐药基因	扩增引物序列(5' → 3')	目的片段大小(bp)
bla _{KPC-2}	GCTACACCTAGCTCCACCTTC ACAGTGGTTGGTAATCCATGC	989
bla _{SHV}	GGGTTATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	927
bla _{TEM}	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	861
bla _{VEB}	CGACTTCCATTTCCTGATGC GGACTCTGCAACAAATACGC	642
bla _{PER}	TGACGATCTGGAACCTTT AACTGCATAACCTACTCC	850
bla _{CTX-M-1}	ATGGTTAAAAAATCACTGCGC TCCCGACGGCTTTCCGCCTT	944
bla _{CTX-M-2}	ATGATGACTCAGAGCATTTCG TCCCGACGGCTTTCCGCCTT	900
bla _{CTX-M-9}	CGGCCTGTATTTCGCTGTTG TCCCGACGGCTTTCCGCCTT	877
bla _{OXA-1}	CTGTTGTTTGGGTTTCGCAAG CTTGGCTTTTAIGCTTGATG	720
bla _{OXA-10}	GTCTTTCAAGTACGGCATT GATTTCTTAGCGCAACTTA	720

表2 6株肺炎克雷伯耐药菌株对于18种抗菌药物的抑菌圈直径及MIC结果

抗菌药物	抑菌圈直径 (mm)	折点 (K-B) (mm)	MIC (mm)	折点 (MIC) (mm)
头孢噻肟	6	22~26	—	—
头孢他啶	6	17~21	≥ 64	4~16
头孢呋辛	6	14~23	≥ 64	8~32
氨苄西林	6	13~17	≥ 32	8~32
阿莫西林/克拉维酸	6	13~18	—	—
氨苄西林/舒巴坦	6	11~15	≥ 32	8/4~32/16
庆大霉素	6	12~15	≥ 16	4~16
复方新诺明	6	10~16	≥ 320	2/38~4/76
哌拉西林/三唑巴坦	6	17~21	≥ 128	16/4~128/4
氨曲南	6	17~21	≥ 64	4~16
头孢吡肟	6	14~18	≥ 64	8~32
左氧氟沙星	6	13~17	≥ 8	2~8
美罗培南	8	13~16	≥ 16	4~16
亚胺培南	9	13~16	≥ 16	4~16
头孢哌酮/舒巴坦	16	15~21	—	—
多黏菌素	18	—	—	—
米诺环素	20	12~16	—	—
阿米卡星	24	14~17	≤ 2	16~64
磷霉素	15	12~16	—	—

注：“—”代表此药物因缺乏折点解释，而未进行试验

反应体系一致，均为共25 μl，包括有2 μl DNA模板，Premix Taq DNA聚合酶12.5 μl 所有PCR用的DNA酶、缓冲液、dNTP的2倍浓度的混合物均购自大连宝生物工程（有限公司），相应引物各1 μl；PCR反应条件：95 ℃ 5 min，35个循环，94 ℃ 1 min，56 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，最后延伸72 ℃ 10 min。将PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳，Gold View染液染色，用凝胶成像系统观察结果并照相。在长波紫外灯下，将显像条带进行DNA条带切下进行DNA凝胶回收。

六、连接和转化

将DNA回收产物、T载体、T4连接酶配成体系。加封口膜后16 ℃水浴过夜。将连接产物与大肠杆菌感受态细胞进行转化，以IPTG作为诱导剂、X-gal作为染色剂，按步骤操作后37 ℃孵育箱过夜。

七、蓝白斑筛选

挑取白色菌落重新摇菌提质粒。操作步骤同前。

八、酶切

所有PCR产物纯化后，由北京金唯智科技有限公司进行测序，再将测序结果应用Blast序列比对软件进行基因确证。

结 果

一、药敏试验

药敏试验结果提示6株肺炎克雷伯菌对头孢噻

肟、头孢他啶、头孢呋辛、氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、复方新诺明、哌拉西林/三唑巴坦、头孢吡肟（FEP）、左氧氟沙星（LEV）、氨曲南均耐药，对美罗培南、亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦抑菌圈直径减小，对多黏菌素、米诺环素、阿米卡星、磷霉素抑菌圈较大。同时耐药菌株又进行MIC法检测，见表2。

二、改良Hodge试验结果

改良Hodge试验显示所有菌株均为阳性结果，确定产碳青霉烯酶（见图1）。ATCCBAA-1705为阳性对照、ATCCBAA-1706为阴性对照，其余5株细菌均获得同样结果。

三、EDTA抑制试验

双纸片协同试验：在含EDTA纸片方向处，亚胺培南抑菌圈无扩大，EDTA抑制试验阴性。另外5株细菌均获得同样结果，见图2。

四、基因确证

按上述步骤进行操作，将酶切产物进行电泳，电泳条带显示成功的质粒送至北京金唯智科技有限公司进行测序，最终将测序结果应用Blast序列比对软件进行基因确证。结果提示为碳青霉烯酶基因，其中6株菌均携带KPC-2基因，5株菌携带SHV基因，3株菌携带TEM基因，其中2株菌同时携带3种耐药基因。

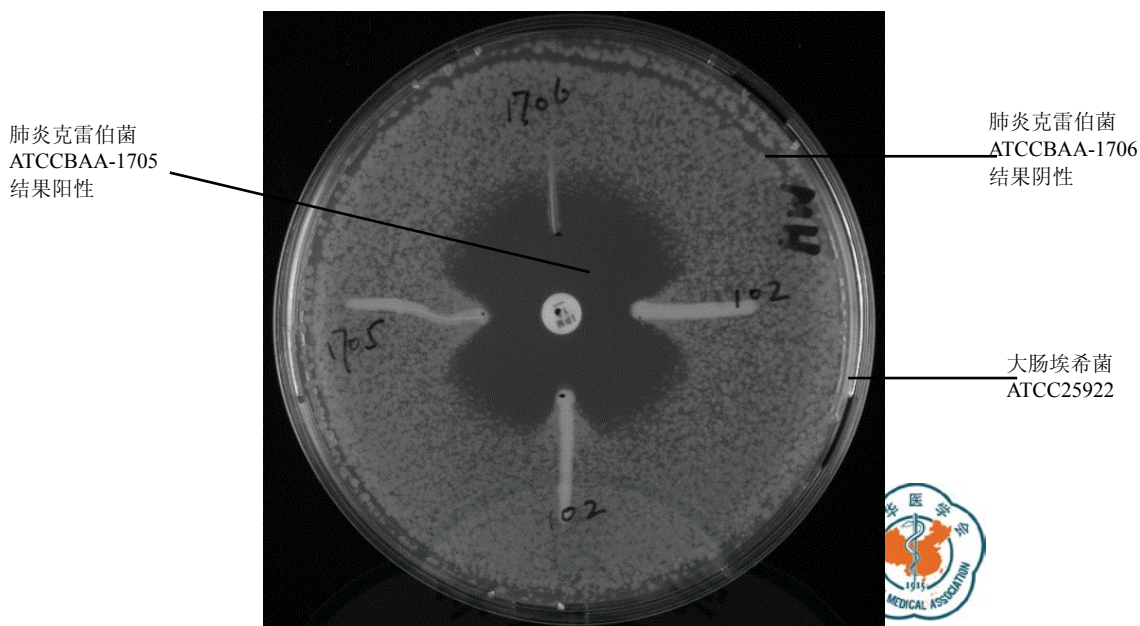


图1 改良Hodge试验检测102号菌株产碳青霉烯酶阳性结果

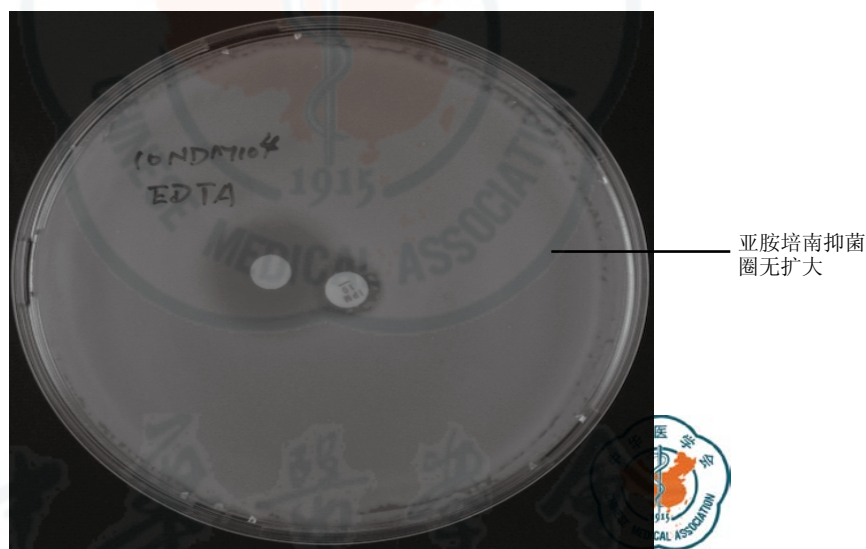


图2 双纸片协同试验检测104号菌产金属酶阴性结果

讨 论

肺炎克雷伯菌广泛分布于自然界中,近年来成为仅次于大肠埃希菌的最重要的条件致病菌^[5],经验性抗感染治疗通常首选三代头孢菌素。但随着该类抗菌药物的广泛应用,在抗菌药物治疗的选择性压力下,逐渐出现了产新的 β -内酰胺酶菌株,其中以超广谱 β -内酰胺酶(entended-spectrum β -lactamase, ESBLs)和AmpC β -内酰胺酶最具临床意义。大多数ESBLs来源于TEM和SHV酶类,是

由广谱酶TEM-1、TEM-2和SHV-1的酶活性区经过1~4个关键氨基酸突变衍生而来,另外,还有非TEM型非SHV型(包括CTX-M型、PER型、VEB型和OXA型等)。肺炎克雷伯菌产ESBLs菌株以携带两种以上基因型多见^[6]。因抗菌药物的选择性压力不同,不同国家以及同一国家的不同地区ESBLs基因型常有不同,呈明显的地域特征^[7]。碳青霉烯类抗菌药物对革兰阴性菌产生的超广谱 β -内酰胺酶很稳定,具有抗菌谱广、杀菌活性强的特点,在临床治疗严重感染中具有举足轻重的作用,被誉为针对多重耐药革兰阴性菌的最后一道防线。碳青霉烯耐药问题一直受到人们的关注。Yigit等^[8]于2001年

首先报道在美国北卡罗来纳的肺炎克雷伯菌中发现KPC-1, 2003年KPC-2在马里兰的肺炎克雷伯菌中被发现^[9]。由于存在这种耐药机制的细菌具有多重耐药性, 并且KPC基因位于可转移性质粒上, 使得产KPC的菌株具有全球流行的趋势。相继在美国的其他州和其他国家也陆续发现了携带KPC基因的菌株, 甚至在美国出现了CRKP菌株流行^[10], 中国大陆地区也出现了因产KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase-2*) 型碳青霉烯酶, 造成碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的Kpn局部流行^[11]。产新德里金属 β -内酰胺酶 (New Delhi metallo- β -lactamase, NDM-1) 的Kpn菌株的报道, 使泛耐药Kpn菌株引起了人们的高度关注。

本研究6株CRKP对头孢菌素及碳青霉烯类抗菌药物耐药率接近100%, 经过改良Hodge试验证实均产碳青霉烯酶, 均不产金属酶NDM-1。同时进行了多种常见引物进行基因扩增, 结果显示该6株菌均携带KPC-2基因, 5株菌携带SHV基因, 3株菌携带TEM基因, 其中2株菌同时携带以上3种耐药基因。从分子水平证实了菌株耐药的复杂性。本研究结果提示耐药基因主要为KPC-2基因, 同时质粒介导的blaKPC-2型基因具有在不同种属细菌之间转移和传播的特性^[9], 故在临床工作中进行治疗器械的严格消毒管理, 严格医务执行人员的洗手制度, 防止院内交叉感染。同时, 规范临床抗菌药物的使用, 注意预防性用药时间不宜过长, 增强患者的免疫力, 宜早期进行病原菌监测, 根据细菌培养和药敏测定, 有针对性地使用敏感抗菌药物, 以及保证病房空气流通, 保持病房环境清洁等方面, 是防止该类病原菌耐药及扩散传播的重要手段。

参 考 文 献

- 1 华杰, 李艳霞. 肺炎克雷伯菌医院感染及耐药性监测. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(10): 1172-1173.
- 2 Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(4): 557-584.
- 3 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility Testing Nineteenth Informational Supplement, 2009, 29(3): 38-42, 46-47, 120-121, 136-139.
- 4 中华人民共和国卫生部, 中医药管理局, 总后勤部卫生部. 产NDM-1泛耐药肠杆菌科细菌感染诊疗指南. [EB/OL]. [2010-09-28]
- 5 Graven DE. What is healthcare-associated pneumonia, and how should it be treated? Curr Opin Infect Dis, 2006, 19(2): 153-160.
- 6 胡龙华, 余方友, 熊建球, 等. 肺炎克雷伯菌临床分离株产广谱和超广谱 β 内酰胺酶的基因型研究. 中国抗生素杂志, 2009, 34(6): 372-375.
- 7 Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 933-951.
- 8 Yigit H, Qeenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 1151-1161.
- 9 Smith ME, Hanson ND, Herrera VL, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolate. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(3): 711-714.
- 10 Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med, 2005, 165(12): 1430-1435.
- 11 冯雅君, 沈萍, 杜小幸, 等. 产碳青霉烯酶KPC-2肺炎克雷伯菌局部流行. 浙江医学, 2008, 30(9): 923-925, 930.

(收稿日期: 2013-01-09)

(本文编辑: 孙荣华)

耿荣华, 王晓杰, 高华英, 等. 肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类抗菌药物的基因型研究 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7 (4): 541-545.