

武汉地区耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因的研究

杨勇文 李从荣 李珍 潘月华 冯丽娜 陈浩俊 郭静

【摘要】目的 探讨武汉地区产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的主要耐药基因, 并对耐碳青霉烯类的耐药机制进行初步分析。**方法** 采用Carba NP试验对88株耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌进行耐药表型确证。采用PCR方法检测KPC、NDM、VIM、IMP以及OXA-48共5种主要的碳青霉烯酶耐药基因并行测序验证。**结果** 88株临床分离菌对头孢唑林和氨苄西林耐药率均高达100.0%, 对哌拉西林、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟和亚胺培南均> 90.0%; Carba NP实验阳性菌株76株(86.4%), 其中弱阳性1株; 29株检出NDM-1耐药基因, 24株携带KPC-2型碳青霉烯酶耐药基因, 14株检出IMP-1型耐药基因, 9株检出VIM-1型耐药基因, 未检出OXA-48型耐药基因; 4株联合产KPC和NDM基因肺炎克雷伯菌, 2株联合产NDM和VIM基因阴沟肠杆菌。**结论** 本地区肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制主要是携带NDM-1和KPC-2型碳青霉烯酶基因。

【关键词】 肠杆菌科细菌; 碳青霉烯酶; 耐药基因

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* resistant gene in Wuhan Yang Yongwen, Li Congrong, Li Zhen, Pan Yuehua, Feng Lina, Chen Haojun, Guo Jing. Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China,

Corresponding author: Li Congrong, Email: conrongli33@hotmail.com

【Abstract】Objective To investigate the major resistance gene product carbapenemases *Enterobacteriaceae* in Wuhan, and to analyze the mechanism of resistance to carbapenem-resistant preliminary. **Method** Caries NP test was used to confirm the resistant phenotype of 88 strains of carbapenem-resistant antimicrobial agents *Enterobacteriaceae*. The KPC, NDM, VIM, IMP and OXA-48 carbapenemase resistance genes were detected by PCR and then sequenced. **Results** Total of 88 clinical isolates of cefazolin and ampicillin resistance rates were all 100.0%, while to piperacillin, ampicillin/sulbactam, amoxicillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefotaxime, cefepime and imipenem were more than 90.0%. Carba NP test positive strains of 76 strains (86.4%), among which, 11 strains were weakly positive. Twenty-four strains of NDM-1 resistant gene were detected, 24 strains were resistant to KPC-2 carbapenemase, 14 strains were detected including IMP-1 resistance gene, 9 strains were detected including VIM-1 resistance gene, OXA-48 resistant gene was not detected. Four strains of *Klebsiella pneumoniae* combined with KPC and NDM genes, two strains of *Enterobacter cloacae* combined with NDM and VIM genes. **Conclusions** In Wuhan, *Enterobacteriaceae* carbapenem resistance mechanisms to antimicrobial agents mainly carrying NDM-1 and KPC-2 type carbapenem enzyme gene.

【Key words】 Resistance gene; Carbapenemases; *Enterobacteriaceae*

碳青霉烯类抗菌药物(如厄他培南、美罗培南和亚胺培南等)可有效杀灭多重耐药革兰阴性

菌, 是治疗产持续高产头孢菌素酶(AmpC beta-lactamase, AmpC)和(或)超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamases, ESBLs)革兰阴性杆菌感染的有限选择^[1-2]。然而, 随着这类抗菌药物的持续使用, 临床上不断检出耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌(carbapenem resistance

Enterobacteriaceae, CRE)^[3-4]。同时此类菌株易造成水平和克隆传播,易成为严重的公共卫生问题^[5-6]。本研究检测分析了武汉地区耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药表型和主要的碳青霉酶基因,现报道如下。

资料与方法

一、材料

1. 细菌来源:收集武汉市3家三甲医院(湖北省人民医院、湖北省妇幼保健院和武汉市中心医院)于2014年5月至2016年2月住院患者的分离纯培养菌落,并通过药敏试验筛选出对美罗培南和(或)亚胺培南耐药的88株肠杆菌科细菌,其中包括肺炎克雷伯菌37株(42.0%)、大肠埃希菌19株(21.6%)、阴沟肠杆菌14株(15.9%)、弗劳地柠檬酸杆菌8株(9.1%)、产气肠杆菌4株(4.5%)、奇异变形杆菌3株(3.4%)、产酸肺炎克雷伯菌2株(2.4%)和摩根摩根菌1株(1.1%);分别分离自尿液42份(47.7%)、痰液34份(38.6%)、分泌物4份(4.6%)、导管2份(2.3%)、血液2份(2.3%)以及胆汁2份(2.3%)。主要来源于重症医学科(15株、17.1%)、神经外科(15株、17.1%)、神经内科(14株、16.0%)和泌尿外科(11株、12.5%)。

质控菌株为肺炎克雷伯菌(ATCC700603)和大肠埃希菌(ATCC 25922),均购置于中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会临床检验中心。

2. 仪器与试剂:高速低温离心机(Thermo Scientific);PCR扩增仪(ABI 9700 PCR扩增);

琼脂糖水平电泳仪(北京六一DYCP-31F);细菌鉴定仪(BD公司Phoenix 100型);PCR mix试剂(Takara公司);KPC、NDM、IMP、VIM、OXA引物均由生工公司合成;血平皿和MH琼脂平皿(广州市迪景微生物科技有限公司)及相关药敏纸片(英国OXOID公司);组织细胞裂解液购于北京索莱宝科技有限公司;亚胺培南粉末购于大连美仑生物技术有限公司。

二、方法

1. 细菌鉴定及药敏试验:采用BD Phoenix™-100全自动系统进行菌落鉴定和药敏试验。菌株生化鉴定结果参照BD菌种库数据判断,药敏试验结果参考CLSI 2015标准判读。

2. Carba NP试验确证碳青霉酶表型:严格参考试剂说明书配制细胞裂解液,用移液器分别取200 μl至编号A、B两个1.5 ml无酶EP管中,接种环挑取1 μl足量(于血平皿经35℃培养18~24 h)新鲜菌落至A和B管,置于冰块上解离10~15 min并适当混匀。随后低温离心获取上清液(13 000 r/min、10 min)(离心半径r=10 cm)。离心间歇配制Carba NP试剂(参考CLSI 2015版标准^[7]),之后再对应的离心管中加入相应的配制试剂,于35℃培养箱中孵育,2 h内进行结果判读。肺炎克雷伯菌ATCC 1705为阴性对照(由浙江大学邵逸夫医院俞云松教授惠赠)。

3. 基因检测:加热煮沸法(100℃干浴10 min)提取菌株DNA模板,常规PCR法扩增KPC、NDM、IMP、VIM、OXA-48基因序列,引物信息详见表1。扩增程序:预变性95℃、5 min;随后变性95℃、45 s;各基因相应的退火温度见表1,时间为35 s,随后72℃延伸50 s,35个循环,最后72℃延伸8 min。

表1 5种主要碳青霉酶PCR引物信息

引物名称	引物序列(3'→5')	退火温度(℃)	产物长度(bp)	引物来源
KPC-F	TCGCTAAACTCGAACAGG	63	785	参考文献 ^[8]
KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCAATCC			
NDM-F	TTGGCCTTGCTGTCTTG	60	89	参考文献 ^[8]
NDM-R	ACACCAGTGACAATATCACCG			
VIM-F	AAGTCCGTTAGCCATTCCG	59	114	NCBI数据库在线设计
VIM-R	GCGATATGCGACCAACACC			
IMP-F	GGGCGTTGTTCTAAACATGG	61	185	NCBI在线设计
IMP-R	TAAGCCACTCTATTCCGCC			
OXA-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	60	743	参考文献 ^[9]
OXA-R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC			

于2%琼脂糖凝胶中电泳扩增产物，用GelRed核酸染色剂染色，在Gel-Box凝胶成像系统中拍照并记录结果。胶回收预期目的片段大小一致的PCR产物进行测序，所得碱基基因序列于NCBI数据库中的已知序列进行比对，确证扩增产物的基因型别。

结 果

一、药敏试验

88株分离菌对头孢唑林和氨苄西林耐药率均高达100.0%；对哌拉西林、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟和亚胺培南均> 90.0%，详见表2。

二、CarbaNP检测结果

88株对亚胺培南和（或）美罗培南耐药的肠杆菌科细菌中，检出76株阳性菌株（占86.4%），其中11株菌为弱阳性（见图1）。

三、耐药基因检测及测序验证结果

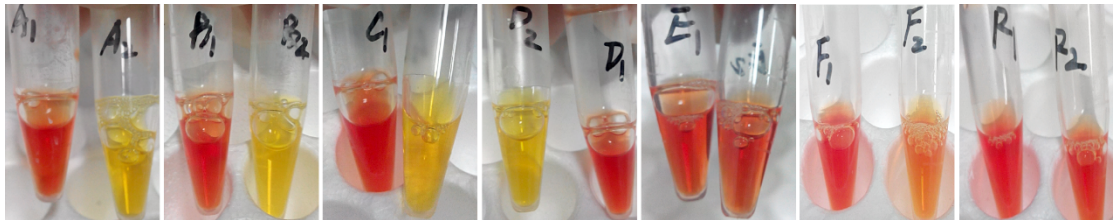
88株临床分离菌中，24株携带KPC-2型耐药基因，29株检出NDM-1型耐药基因，未检出OXA-48基因；3株肺炎克雷伯菌同时检出KPC-2和NDM-1基因，2株阴沟肠杆菌同时检出NDM-1和VIM-1型基因（详见表3），PCR及测序结果见图2~8。

讨 论

肠杆菌科细菌为临床上最常见的革兰阴性杆

表 2 88 株分离菌对 18 种抗菌药物的耐药情况

抗菌药物	耐药（R）		中介（I）		敏感（S）	
	菌株数	耐药率（%）	菌株数	中介率（%）	菌株数	敏感率（%）
氨苄西林	88	100.0	0	0.0	0	0.0
哌拉西林	87	98.8	0	0.0	1	1.2
阿莫西林/克拉维酸	86	97.7	0	0.0	2	2.3
氨苄西林/舒巴坦	85	96.6	3	3.4	0	0.0
哌拉西林/他唑巴坦	81	92.0	2	2.3	5	5.7
头孢唑林	88	100.0	0	0.0	0	0.0
头孢他啶	82	93.2	0	0.0	6	6.8
头孢噻肟	86	97.7	0	0.0	2	2.3
头孢吡肟	84	95.5	1	1.1	3	3.4
氨曲南	75	85.2	0	0.0	13	14.8
亚胺培南	80	90.9	7	8.0	1	1.1
美洛培南	69	78.4	4	4.5	15	17.0
阿米卡星	39	44.3	0	0.0	49	55.7
庆大霉素	69	78.4	0	0.0	19	21.6
环丙沙星	68	77.3	0	0.0	20	22.7
左旋氧氟沙星	69	78.7	2	2.1	17	19.1
复方新诺明	37	42.0	0	0.0	51	58.0
氯霉素	54	61.0	12	13.4	23	25.6

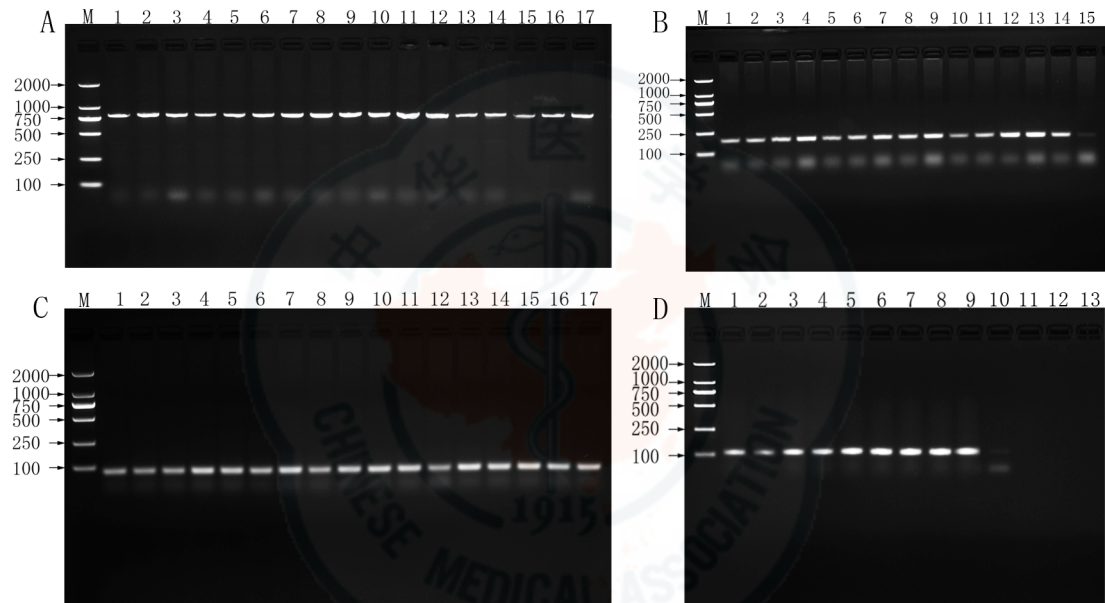


注：A、B、C、D、F标记为阳性结果，E、R标记为阴性结果及对照

图1 Carba NP实验部分结果

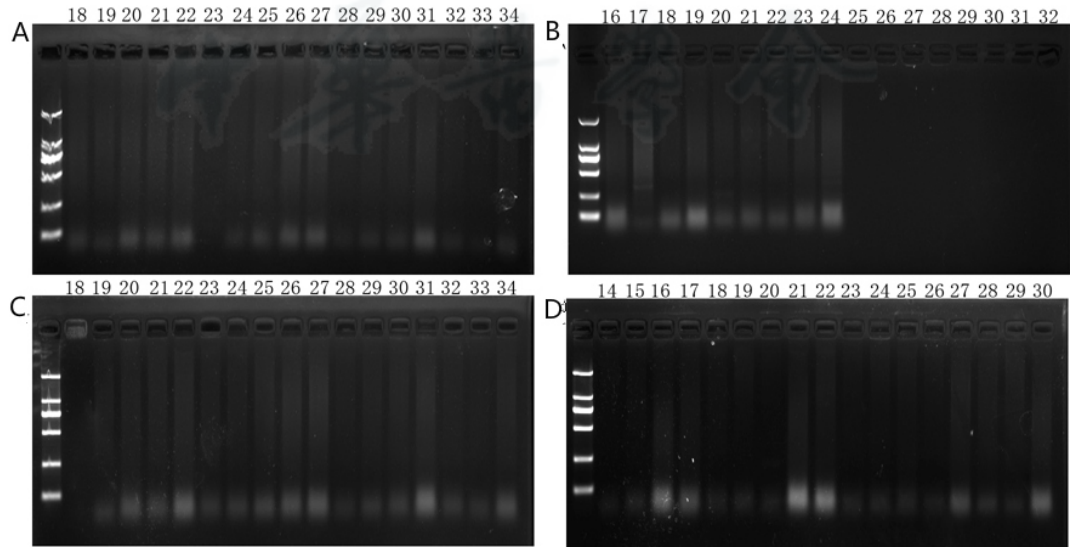
菌属之一，随着抗菌药物的广泛和不合理的使用，菌株在面临严峻的碳青霉烯类抗菌药物选择压力下，CRE不断被检出^[10-11]。CRE耐药机制主要包括：①产生碳青霉烯酶，即A类酶中的KPC酶；B类金属酶中的VIM、IMP，有研究报道超级细菌携带NDM-1型酶；②头孢菌素酶高表达联合外膜蛋白缺失；③碳青霉烯类药物作用靶位的改变及外排泵亢进^[12-13]。

本研究采用Carba NP试验确证纳入菌株的碳青霉烯酶表型，该试验使菌体内的碳青霉烯酶释放至体外，水解亚胺培南产酸后使体系的pH（7.8 ± 0.1）改变，最终通过酸碱指示剂酚红的颜色变化进行判断^[14]。尽管Carba NP试验操作简单，在一般实验条件和配置下均可以进行^[15]，但前期准备相对繁琐。本研究中88株检出76株（占86.4%）对亚胺培南和（或）美罗培南耐药的肠杆菌科细菌。其中



注：A：KPC：肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶；B：IMP：水解亚胺培南金属酶；C：NDM：新德里金属β-内酰胺酶；D：VIM：产维罗纳整合子型金属β-内酰胺酶

图2 CRE耐药基因检测部分阳性结果

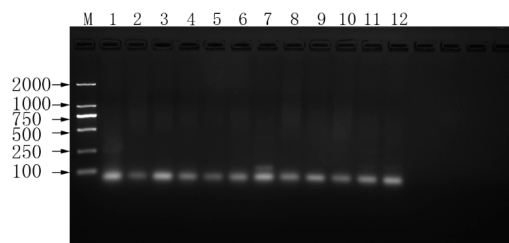


注：A：KPC：肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶；B：IMP：水解亚胺培南金属酶；C：NDM：新德里金属β-内酰胺酶；D：VIM：产维罗纳整合子型金属β-内酰胺酶

图3 CRE耐药基因检测阴性对照及部分阴性结果

表3 CRE 耐药基因型 (株)

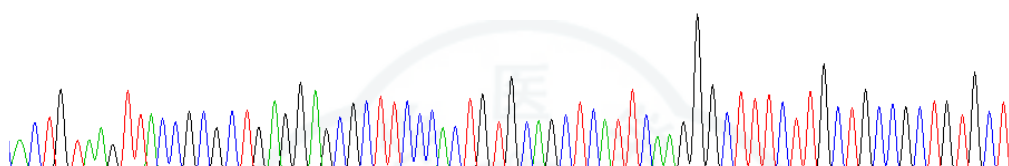
细菌	KPC	NDM	VIM	IMP	合计
肺炎克雷伯菌	24	13	0	13	50
大肠埃希菌	0	8	0	1	9
产酸克雷伯菌	0	1	0	0	1
弗劳地柠檬酸杆菌	0	3	1	0	4
阴沟肠杆菌	0	4	8	0	12
合计	24	29	9	14	69 ^a

注：^a：包含联合产酶菌株

注：OXA-48（苯唑西林酶48型）结果均为阴性

图4 部分OXA-48基因检测结果

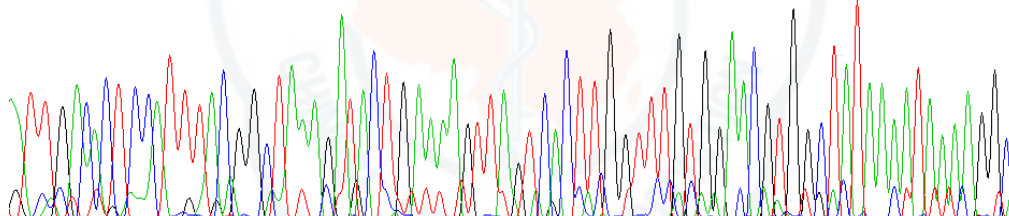
AAC T G T AAG T TAC C G G C T G AG G AG C G C T T C C C A C T G T G C A G C T C A T T C A A G G G C T T T C T T G C T G C C G C T G T G C T G



注：Gene Accession: KU680813.1

图5 KPC-2 测序峰图

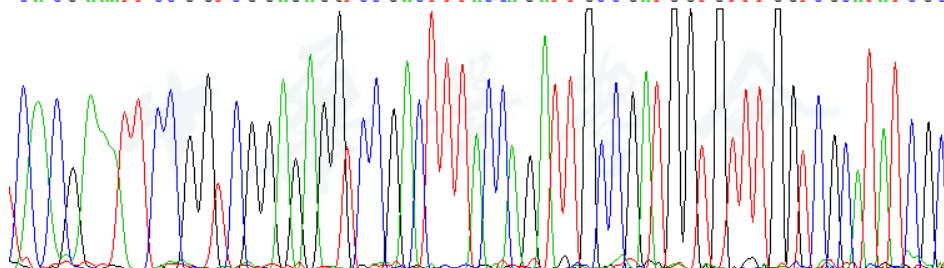
AT T G A C A C T C C A T T T A C G G C T A A A G A T A C T G A A A A G T T A G T C A C T T G G T T T G T G G A A C G T G G C T A T A A A T A A A G G C T



注：Gene Accession: KU051710.1

图6 IMP-4测序峰图

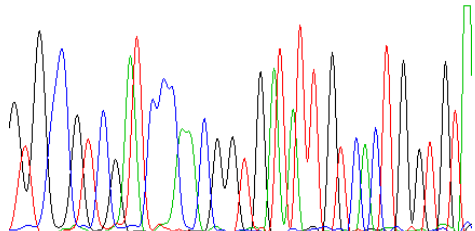
C A C G A A A T T C C G G T C G G A G A G T C C G A C T T T A C C A G A T T G C C G A T G G T G T T T G G T C G C A T A T C G C



注：Gene Accession: LC169588.1

图7 VIM-19测序峰图

G T G C G T C G A T C C A C G G T G T A T T G T C A C T G G T G T A



注：Gene Accession: JF826285.1

图8 NDM-1测序峰图

11株菌为弱阳性，可能因外膜蛋白缺失和（或）外排泵等菌体胞膜上的耐药机制不能参与的方法学上缺陷所致。1株菌为阴性结果，尚待进一步深入研究。因此，Carba NP试验可能存在弱阳性和假阴性问题^[16-17]，需要同时对阳性标本进行耐药基因确证。

通过参考文献及NCBI在线设计肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶（*Klebsiella pneumoniae* carbapenem,

KPC)、新德里金属 β -内酰胺酶型(New Delhi metallo- β -lactamase, NDM)、维罗纳整合子型金属 β -内酰胺酶(Verona-integron metallo- β -lactamase, VIM)、水解亚胺培南金属酶(imipenemase, IMP)、苯唑西林酶48型(oxacillinase-48, OXA-48)基因通用引物对88株细菌进行PCR扩增,经测序验证后结果表明,武汉地区肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物的主要耐药机制为NDM-1型碳青霉烯酶(29/88、33.0%)。NDM酶为新近发现的B类金属碳青霉烯酶,NDM-1~8亚型均被国内外研究报道^[18]。2010年,Kumarasamy等研究中^[19]预测产NDM-1型碳青霉烯酶将在中东地区传播泛滥,可能与NDM-1易于基因突变和获取具有转移性的功能元件有关。2011年Poirel等^[20]报道了1株来自印度患者分离的弗劳地柠檬酸杆菌携带blaNDM-1基因表现出对厄他培南、亚胺培南、美罗培南高水平耐药(MIC值均> 32 $\mu\text{g/ml}$);证实此种耐药质粒可不同菌株间传播。Li等^[21]研究报道我国出现的NDM-1型碳青霉烯酶。总之,NDM-1型酶在武汉地区的流行情况不容乐观。其余24株携带KPC-2基因的菌株且为KPC-2型,阳性率达27.3%,与北京地区CRE的产酶流行情况存在较大差异^[22],可能与医疗人群携带菌群不同有关。产KPC和NDM型耐药基因均可由质粒介导,可通过菌株自身克隆以及不同菌种间水平转移,导致耐药菌株的广泛传播^[23-25]。耐药菌株的同源性有待于通过多位点可变数目串联重复序列(multilocus variable number tandem repeats, MLVA)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)以及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)等分型技术确定^[26]。另外,本研究还发现了4株NDM-1联合产KPC-2型基因的肺炎克雷伯菌及2株联合产NDM-1和VIM-1型的阴沟肠杆菌。但18株细菌未检测到耐药基因存在其他耐药机制;需产酶表型检测的基础上进行基因的扩增和测序确证,才能最大程度的避免漏检。

综上,Carba NP试验对于检测耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌具有较好的敏感度和特异度。产NDM-1和KPC-2型碳青霉烯酶为武汉地区CRE主要的耐药机制。Carba NP试验结合常规PCR的方法可有效地检出碳青霉烯酶,可有效防止此类菌株的

进一步播散和扩散。

参 考 文 献

- [1] Viau R, Frank KM, Jacobs MR, et al. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods[J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29(1): 1-27.
- [2] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm[J]. Trends Mol Med, 2012, 18(5): 263-272.
- [3] Pecora ND, Li N, Allard M, et al. Genomically informed surveillance for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system[J]. MBio, 2015, 28, 6(4): e01030.
- [4] Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control[J]. J Intern Med, 2015, 277(5): 501-12.
- [5] Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician[J]. Mayo Clin Proc, 2015, 90(3): 395-403.
- [6] Jean SS, Lee WS, Lam C, et al. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options[J]. Future Microbiol, 2015, 10(3): 407-425.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement[S]. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
- [8] Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(14): 27.
- [9] Poirel L, Heritier C, Tolun V, et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumonia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(1): 15-22.
- [10] Woodford N, Wareham DW, Guerra B. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making?[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(2): 287-291.
- [11] Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4): 682-707.
- [12] Shahcheraghi F, Aslani MM, Mahmoudi H, et al. Molecular study of carbapenemase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae resistant to carbapenems and determining their clonal relationship using pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(5): 570-576.
- [13] Ruppe E, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli[J]. Ann Intensive Care, 2015, 5(1): 61.
- [14] Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(3): 487-489.
- [15] Osterblad M, Hakanen AJ, Jalava J. Evaluation of the Carba

- NP test for carbapenemase detection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(12):7553-7556.
- [16] Hombach M, von Gunten B, Castelberg C, et al. Evaluation of the rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(12):3828-3833.
- [17] Poirel L, Nordmann P. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(9):3003-3008.
- [18] Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria[J]. Biomed Res Int, 2014, 24(9):856.
- [19] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9):597-602.
- [20] Poirel L, Ros A, Carricajo A, et al. Extremely drug-resistant *Citrobacter freundii* isolate producing NDM-1 and other carbapenemases identified in a patient returning from India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(1):447-448.
- [21] Li B, Xu XH, Zhao ZC, et al. High prevalence of metallo- β -lactamase among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China[J]. Can J Microbiol, 2014, 60(10):691-695.
- [22] 董方, 宋文琪, 徐桦巍, 等. 对碳青霉烯类抗生素不敏感肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶基因型研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(4):270-274.
- [23] Chen L, Mathema B, Chavda KD, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding[J]. Trends Microbiol, 2014, 22(12):686-696.
- [24] Zhao WH, Hu ZQ. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria[J]. Future Microbiol, 2015, 10(5):873-887.
- [25] Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria[J]. Crit Rev Microbiol, 2013, 39(2):113-122.
- [26] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. 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.

(收稿日期: 2016-08-27)

(本文编辑: 孙荣华)

杨勇文, 李从荣, 李珍, 等. 武汉地区耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, 11(4):352-358.