

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.01.005

· 论 著 ·

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因检测及同源性

黄 峰, 许元元

(皖北煤电集团总医院, 安徽 宿州 234000)

[摘要] **目的** 探讨耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)耐药基因型及同源性。**方法** 收集某院 2015 年 9 月—2016 年 2 月临床标本分离的 38 株 CRKP, 采用聚合酶链反应(PCR)方法检测耐药基因型, 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析菌株同源性。**结果** 38 株 CRKP 主要来源于重症监护病房(ICU)及外科重症监护病房(SICU), 分别占 39.48%、34.21%。38 株 CRKP 均检出 bla_{KPC} 和 bla_{SHV} 耐药基因, 6 株检出 bla_{CTX} 耐药基因。PFGE 显示共分成 A、B、C、D 4 个谱型, 其中以 C 型为主(65.78%, 25/38)。A 型菌株中菌株 14、15、16 携带 bla_{KPC-2} 型、bla_{SHV} 型、bla_{CTX-M-15} 耐药基因, 此 3 株细菌均是 SICU 患者分离的, 菌株 14 和 15 分离自同一天, 菌株 16 分离时间延后一周; C 型菌株中, 菌株 10、18、25、28 的同源性为 100%, 菌株 10、18 分离自 ICU 患者, 菌株 25、28 分离自神经内一科患者(均从 ICU 转出), 均是在 ICU 住院期间检出, 且分离时间相差 1 d。**结论** 该院 CRKP 耐药基因型以 bla_{KPC} 及 bla_{SHV} 为主, 存在克隆株医院内流行。

[关键词] 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌; 耐药基因型; 聚合酶链反应; 脉冲场凝胶电泳; 同源性

[中图分类号] R181.3⁺2 R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)01-0021-05

Detection of drug resistance genes and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

HUANG Feng, XU Yuan-yuan (General Hospital of Wanbei Coal-Electricity Group, Suzhou 234000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the drug-resistant genotypes and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP). **Methods** 38 strains of clinically isolated CRKB in a hospital between September 2015 and February 2016 were collected, drug resistance genes were detected with polymerase chain reaction (PCR), homology of strains was analyzed with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** All 38 strains were from intensive care unit(ICU) and surgical intensive care unit(SICU), accounting for 39.48% and 34.21% respectively. 38 strains all harboured drug resistance genes bla_{KPC} and bla_{SHV}, 6 strains harboured bla_{CTX}. PFGE revealed that strains were divided into types A, B, C, and D, type C was predominant(65.78%, 25/38). Of type A strains, strains 14, 15, and 16 carried drug resistance genes bla_{KPC-2}, bla_{SHV}, and bla_{CTX-M-15} respectively, these strains were all isolated from SICU patients, strains 14 and 15 were isolated on the same day, strain 16 was isolated on the following week; of type C strains, homology of strain 10, 18, 25, and 28 was 100%. strain 10 and 18 were isolated from ICU patients, strains 25 and 28 were isolated from patients in division I of neurology ICU(both were transferred from ICU), and both were isolated during patient hospitalization in ICU, the isolation time only differed for one day. **Conclusion** The main drug-resistant genotypes of CRKB in this hospital are mainly bla_{KPC} and bla_{SHV}, there is epidemic of clone strains in this hospital.

[Key words] carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; drug-resistant genotype; polymerase chain reaction; pulsed-field gel electrophoresis; homology

[Chin J Infect Control, 2018, 17(1): 21-25]

[收稿日期] 2017-03-26

[基金项目] 蚌埠医学院科研课题项目(BYKY16170)

[作者简介] 黄峰(1975-), 男(汉族), 安徽省濉溪县人, 副主任技师, 主要从事微生物耐药机制研究。

[通信作者] 黄峰 E-mail: huangfeng508@126.com

近年来,由于抗菌药物的长期及不合理使用,导致肺炎克雷伯菌耐药菌株逐年增多^[1]。碳青霉烯类抗生素主要包括亚胺培南、美罗培南、比阿培南、帕尼培南等,凭借其良好的抗菌活性,已成为临床上治疗多重耐药菌感染主要的抗菌药物之一^[2]。但随着该类药物的广泛应用,目前耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)已在全球范围内出现并传播^[3],给临床抗感染治疗带来了极大困扰。我院近年来 CRKP 感染患者逐渐增多,本研究对我院收集的 CRKP 进行耐药基因型及同源性检测,同时结合病原菌相关信息进行分析,旨在了解我院肺炎克雷伯菌耐药基因携带情况以及同源性,为感染防控提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集皖北煤电集团总医院 2015 年 9 月—2016 年 2 月临床标本分离的 38 株 CRKP(排除同一患者重复分离株),其中分离自血 3 株,痰 32 株,尿 1 株,深静脉导管 2 株。菌种鉴定按法国生物梅里埃 Vitek 2 Compact 全自动细菌药敏分析仪及配套革兰阴性菌的鉴定卡(Vitek-GN)进行标准操作。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 购自卫生部临床检验中心。

1.2 仪器及试剂 Vitek 2 Compact 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)及配套革兰阴性菌的鉴定卡(Vitek-GN)。聚合酶链反应(PCR)扩增仪为 PTC-200 型 PCR 分析仪。PCR 扩增试剂盒(Taq PCR Master Mix)、DNA Marker D、4S Red plus 核酸染色剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。电泳仪为北京市六一仪器厂生产的 DYY-6C 型,美国 Bio-rad 公司的凝胶成像系统。DNA 测序仪器为 ABI-PRISM 3730,测序试剂为 BigDyeterminator v3.1,脉冲场电泳仪 DR II (Bio-Rad),凝胶成像仪(Gel DocTM XR+,Bio-Rad)。

1.3 耐药基因检测 水煮法提取细菌 DNA 模板,采用 PCR 方法扩增 *KPC*、*SME*、*NDM-1*、*IMP*、*VIM*、*SHV*、*CTX*、*OXA* 等耐药基因。反应体系为 50 μ L, Taq PCR Master Mix 25 μ L,上、下游引物各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, 双蒸水 20 μ L。所测基因及其引物序列见表 1,反应参数:预变性 94 $^{\circ}$ C 10 min,变性 95 $^{\circ}$ C 45 s,退火(每个基因温度略有不同,具体见表 1)45 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 70 s,循环 35 个周期,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经含 4S Red plus 核酸染色剂的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,使用美国 Bio-rad 公司的凝胶成像系统(宿州市 CDC 提供)观察结果并照相。

表 1 CRKP 耐药基因检测 PCR 引物序列及产物长度

Table 1 PCR primers sequences and product length of CRKP drug resistance genes

基因名称	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)	产物长度(bp)	参考文献
<i>KPC</i>	P1:GCTACACCTAGCTCCACCTTC	55	920	[4]
	P2:ACAGTGGTTGGTAATCCATGC			
<i>SME</i>	P1:AACGGCTTCATTTTTGTTTAG	55	830	[4]
	P2:GCTTCCGCAATAGTTTTATCA			
<i>NDM-1</i>	P1:CAGCACACTTCTATCTC	55	292	[5]
	P2:CCGCAACCATCCCCTCTT			
<i>IMP</i>	P1:CTACCGCAGCAGAGTCTTTG	60	587	[5]
	P2:AACCAGTTTGCCTTACCAT			
<i>VIM</i>	P1:AGTGGTGAGTATCCGACAG	65	261	[6]
	P2:ATGAAAGTGCGTGGAGAC			
<i>SHV</i>	P1:TCTTCCGATGCCGCCAGTCA	68	1 017	[7]
	P2:CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC			
<i>CTX-M</i>	P1:ATCTGACGCTGGGTAAGC	55	162	[7]
	P2:ATATCGTTGGTGGTGCCATA			
<i>OXA</i>	P1:GCGTGGTTAAGGATGAACAC	52	438	[8]
	P2:CATCAAGTTCAACCCAACCG			

1.4 测序及 DNA 序列分析 PCR 扩增阳性产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序,测序结果在 Genbank 用 BLAST 与已知序列比

较,以确定其基因型。

1.5 脉冲场凝胶电泳(PFGE) (1)细菌凝胶包埋:取新鲜营养琼脂培养物以 TE 缓冲液制成药

4.0~4.2 麦氏浊度单位的菌悬液,与 1% 的低熔点琼脂糖混合后灌注模具使之凝固,制成 25 mm × 10 mm × 2 mm 的凝胶包埋块。(2) 细菌消化与裂解:将凝胶包埋块置 5 mL 细胞裂解液(CLB)中于 54℃ 水浴摇床转速 170 r/min 裂解 2 h,超纯水洗涤胶块 2 次,每次 10 min,TE 洗涤胶块 4 次,每次 15 min,TE 保存备用。(3) 细菌染色体限制性酶切:从消化、裂解、洗涤好的凝胶包埋块上切下 10 mm × 2 mm × 2 mm 的小条凝胶,置于含 200 μL 酶切缓冲液(M 缓冲液)的离心管中,缓冲 5 min,吸弃缓冲液,加入新的 M 缓冲液,再加入 60 U 限制性内切酶 XbaI,37℃ 水浴中孵育 2 h。(4) PFGE 与图像获取:以 0.5 × TBE 置换酶切缓冲液,终止酶切。将酶切后的小条凝胶包埋于以 0.5 × TBE 配制的低熔点电泳凝胶中,充分凝固后将电泳凝胶置于脉冲电场电泳槽内。如下设置电泳参数并启动电泳:电泳时间 18.5 h,电压 6 V/cm,电场夹角 120°,电泳结束后将凝胶以 EB 染色 30 min,然后纯水脱色 2 次,每次 30 min,置成像仪紫外下拍照。(5) 图谱分析:将 Bionumerics (6.0 版)分析条带位置。容忍度设为 1%,优化度设为 1.5%,以 Dice 系数计算图谱相似度,非加权平均数法(UPGMA)构建系统发育树。

2 结果

2.1 CRKP 菌株科室分布 38 株 CRKP 主要来源于重症监护病房(ICU)及外科重症监护病房(SICU),分别占 39.48%、34.21%。见表 2。

表 2 38 株 CRKP 科室分布及构成比

Table 2 Department distribution and constituent ratios of 38 strains of CRKP

科室	株数	构成比(%)
ICU	15	39.48
SICU	13	34.21
神经外科	2	5.26
神经内一科	4	10.53
心内科	2	5.26
康复科	1	2.63
呼吸内科	1	2.63
合计	38	100.00

2.2 耐药基因检测结果 38 株 CRKP 均检测出 KPC 和 SHV 耐药基因,检出率均为 100.00%,6 株检测出 CTX 耐药基因,检出率 15.79%,未检

测到 SME、NDM-1、IMP、VIM、OXA 耐药基因。见图 1。



注:M 分子量标志;1—3 为 KPC 耐药基因阳性;4 为阴性对照;5—7 为 SHV 耐药基因阳性;8—10 为 CTX 耐药基因阳性

图 1 CRKP 耐药基因扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of amplification products of CRKP drug resistance genes

2.3 基因测序 在 PCR 扩增产物中任取 3 个阳性扩增产物送上海生工生物工程技术有限公司用 ABI-PRISM 3730 测序仪进行双向测序,测序结果经 BLASTn(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn)比对,与美国 Genbank 上已登录的基因号比对,分别证实为 bla_{KPC-2} 型、bla_{SHV} 型、bla_{CTX-M-15} 型。

2.4 PFGE 同源性分析 38 株 CRKP 可分为 A、B、C、D 4 个谱型,其中以 C 型为主(65.78%, 25/38)。菌株 04、16、15、13、29、32、14 为 A 型,Dice 系数 > 90.00%,其中菌株 16、15、14 除携带 KPC 和 SHV 耐药基因外,还携带 CTX 耐药基因;菌株 21、33、11 为 B 型,Dice 系数 > 92.00%,此 3 株细菌全部携带 KPC、SHV 和 CTX 耐药基因;菌株 03、06、05、09、17、12、23、38、19、20、02、10、18、25、28、26、08、30、07、01、27、24、31、37、35 为 C 型,此型菌株均携带 KPC 和 SHV 耐药基因,Dice 系数 > 88.00%;菌株 34、36、22 为 D 型,Dice 系数 > 95.00%,此型菌株均携带 KPC 和 SHV 耐药基因。见表 3。A 型菌株中 14、15、16 号菌携带 bla_{KPC-2}、bla_{SHV}、bla_{CTX-M-15} 耐药基因,此 3 株细菌均是 SICU 患者分离的,菌株 14 和 15 分离自同一天,菌株 16 分离时间延后一周;C 型菌株中,菌株 10、18、25、28 的同源性为 100%,菌株 10、18 分离自 ICU 患者,菌株 25、28 分离自神经内一科患者(均从 ICU 转出),均是在 ICU 住院期间检出,且分离时间相差 1 d。各菌株的来源科室、部位及分离时间见图 2。

表 3 38 株 CRKP 菌株 PFGE 分型结果

Table 3 PFGE typing results of 38 strains of CRKP

谱型	株数	构成比(%)	菌株编号
A 型	7	18.42	04,16,15,13,29,32,14
B 型	3	7.90	21,33,11
C 型	25	65.78	03,06,05,09,17,12,23,38,19,20,02,10,18,25,28,26,08,30,07,01,27,24,31,37,35
D 型	3	7.90	34,36,22

3 讨论

目前,人们认为肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物的主要耐药机制有三种:(1)青霉素结合蛋白对碳青霉烯类亲和力的改变;(2)AmpC 酶过度表达及膜蛋白丢失;(3)碳青霉烯酶的产生^[9]。其中最重要机制是碳青霉烯酶的产生^[10-11]。碳青霉烯酶按照 Ambler

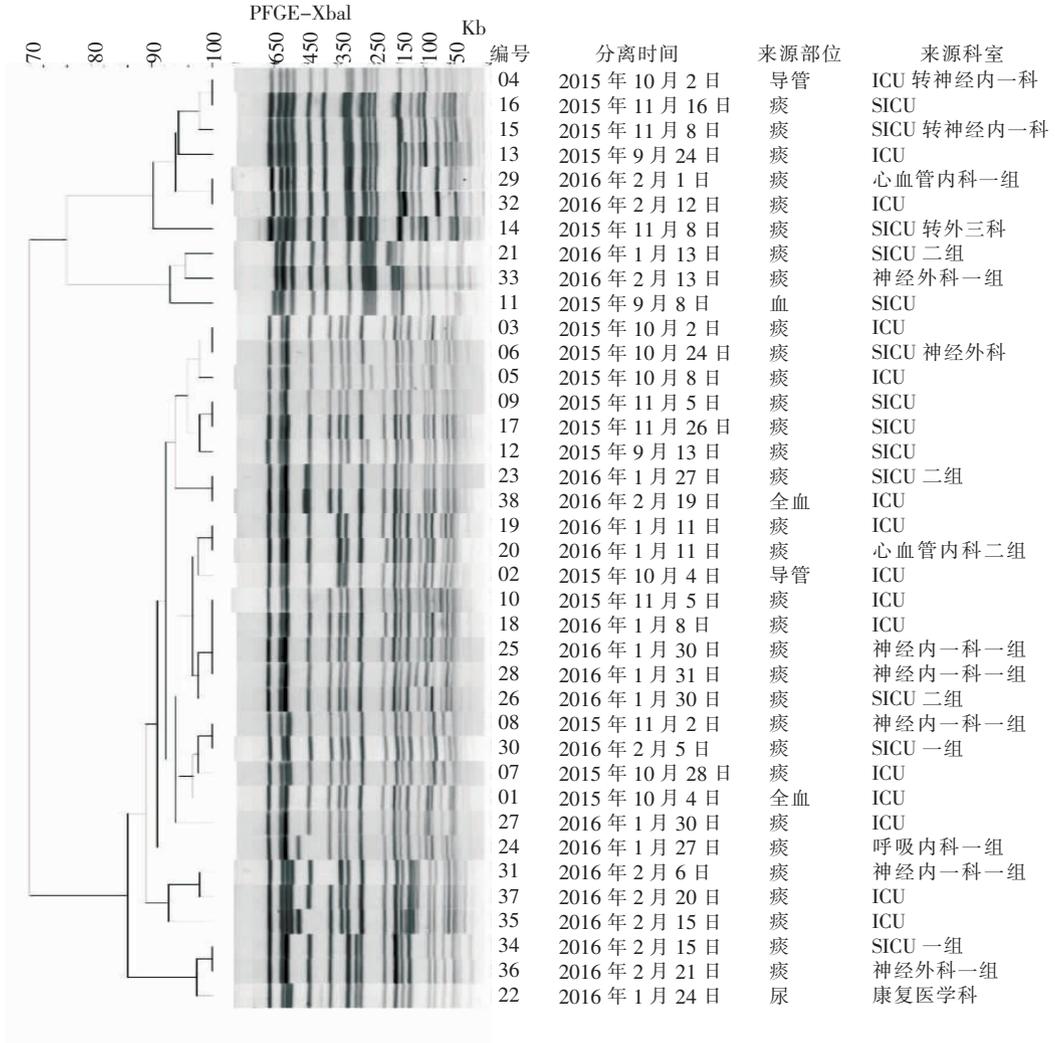


图 2 38 株 CRKP 的聚类分析图

Figure 2 Cluster analysis of 38 strains of CRKP

分子分类分为 A、B、D 三类:A 类为丝氨酸蛋白酶,分为 *KPC*、*GES*、*IMI/NMC-A*、*SME* 基因型;B 类为金属酶,分为 *IMP*、*VIM*、*GIM*、*SPM*、*SIM*、*NDM-1* 基因型;D 类为 OXA 酶,由 *bla_{OXA}* 等位基因编码^[12]。产碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯酶类抗生素耐药的主要机制之一,肺炎克雷伯菌几乎可以产生所有类型的 β-内酰胺酶,SHV、OXA、CTX 都属于 β-内酰胺酶,但 OXA 系列,一般在肠杆

菌科细菌中较少见。肺炎克雷伯菌产生的主要 β-内酰胺酶之一是 SHV 酶,其水解头孢菌素能力强^[13]。本研究中 38 株 CRKP 全部检出 *KPC* 和 *SHV* 耐药基因,检出率均为 100.00%,得出的结论与前面学者观点一致,同时经测序后分别证实为 *bla_{KPC-2}* 型及 *bla_{SHV}* 型,另有 6 株 CRKP 同时还携带 *bla_{CTX-M-15}* 耐药基因,说明 CRKP 的耐药机制十分复杂,也是导致临床治疗越来越困难的原因。

目前,PFGE 分型被认为是细菌分子流行病学研究的“金标准”,该分型技术具有对细菌整个染色体进行分析、分辨率高、重复性好、结果稳定、易于标准化的特点^[14]。PFGE 分型与流行病学资料相结合可对耐药菌进行溯源及预警。本次研究 PFGE 的结果分析发现 38 株 CRKP 可分为 A、B、C、D 4 个谱型,其中以 C 型为主,占 65.78%,每个谱型的 Dice 系数几乎都在 90.00% 以上,更有甚者有少数细菌的同源性为 100.00%,说明这些细菌应为同一起源。38 株 CRKP 的体外药敏试验结果显示对大多数抗菌药物耐药,仅替加环素、阿米卡星、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑、庆大霉素存在活性,这是各谱型之间的共同耐药特点。在 B、C、D 型细菌中,各型携带的耐药基因型均分别相同,也验证了耐药基因型检测的正确性。A 型中菌株编号为 14、15、16 的 3 株细菌除携带 bla_{KPC-2} 型及 bla_{SHV} 型耐药基因外,还携带 bla_{CTX-M-15} 型耐药基因,病史资料分析发现此 3 株细菌均是 SICU 患者分离的,而且菌株 14 和 15 的分离时间是同一天,菌株 16 分离时间延后一周,说明存在暴发流行。在 C 型菌株中菌株 10、18、25、28 同源性为 100%,追溯此 4 例患者病史资料发现,菌株 10、18 分离自 ICU 患者,但分离时间相差 2 个月,菌株 25、28 分离自神经内一科的患者(均从 ICU 转出),而且此两株细菌的分离时间相差 1 d,均是在 ICU 住院期间培养出肺炎克雷伯菌,感染细菌属于同一克隆株。

本研究结果显示,本院 CRKP 主要由 KPC 碳青霉烯酶及 β-内酰胺酶共同作用,增强了菌株的耐药性,表现为多重耐药及泛耐药,同时存在着 4 种不同的谱型,并在 ICU、SICU 等科室流行,同时也暴露出本院感控工作存在不足,有待改进。有学者认为医院感染应重点关注耐药菌株的传播^[15]。本次研究没能在耐药菌株暴发流行的时候对所在科室进行及时、全面检测,没能找出耐药菌株的传播途径,有待于进一步研究。有效控制多重耐药菌医院感染的重点在于预防控制措施的实施,因此,笔者认为一旦发现该类细菌出现,相关部门应及时采取有效的控制措施,加强科室内部环境及物品消毒,及时隔离相关患者,切实加强医护人员无菌操作技术,尤其是手卫生,控制传播途径,以减少医院内交叉感

染,防止耐药菌蔓延。

[参 考 文 献]

- [1] Tijet N, Sheth PM, Lastoovelska O, et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase(KPC)-producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canada, 2008-2011[J]. Plos One, 2014, 9(12): e116421.
- [2] 林伯熹,李彬,刘秀琴,等. 碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(2):194-199.
- [3] 孙晔佳,顾克菊. 某院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌检出与耐药表型分布[J]. 中国感染控制杂志,2017,16(2):130-133,137.
- [4] 沈瀚,宁明哲,周万青,等. 亚胺培南不敏感大肠埃希菌碳青霉烯酶基因的检测[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(6):643-644,646.
- [5] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [6] 卢焕,玉艳红,覃金爱,等. 耐碳青霉烯类鲍氏不动杆菌金属 β-内酰胺酶检测与同源性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2015, 25(2):282-284.
- [7] 刘淑敏,许云敏,牛敏,等. 急诊重症监护病房耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的分子流行特征[J]. 中国感染与化疗杂志,2015, 15(4):372-376.
- [8] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.
- [9] 陈捷,朱立军,李万翔. 肠杆菌科细菌碳青霉烯酶基因的检测[J]. 中国微生态学杂志,2016,28(7):825-827.
- [10] Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(3): 470-482.
- [11] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.
- [12] 杨莉,张红岩. 碳青霉烯酶基因型的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2014,26(3):366-368.
- [13] 张伟铮,何慧婵,许振杰,等. 耐碳青霉烯类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.
- [14] 孙康德,陈旭,虞中敏,等. 碳青霉烯类耐药克雷伯菌属细菌的药物敏感性及其同源性分析[J]. 检验医学,2014,29(11):1136-1140.
- [15] 张筠,邓在春,马红映,等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及同源性分析[J]. 中国现代医生,2015,53(27):16-19.

(本文编辑:文细毛)