

DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20194528

· 论 著 ·

## 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分子流行病学研究

龚 林, 刘小丽, 许慧琼, 梁建生

(武汉市疾病预防控制中心消毒与病媒生物防制所, 湖北 武汉 430015)

**[摘要]** **目的** 分析武汉两所医院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)临床分离株产碳青霉烯酶的情况,以及分子流行病学特征。**方法** 收集武汉两所医院2018年1—10月临床分离的42株非重复CRKP,采用Carba NP试验方法对菌株产碳青霉烯酶情况进行初筛,聚合酶链反应(PCR)检测碳青霉烯酶基因携带情况,采用质粒接合试验分析耐药基因的水平转移情况,应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行亲缘关系分析。**结果** 42株CRKP菌株中14株Carba NP试验阳性,其中有10株扩增出NDM-1基因,3株扩增出KPC-2基因。共13株CRKP碳青霉烯基因检测阳性,其中12株质粒接合试验成功。PFGE分析结果显示,携带NDM-1基因的CRKP菌株共分成6型,无明显优势型;携带KPC-2基因的CRKP菌株为同一型别。**结论** 检出产NDM-1和KPC-2的CRKP菌株,质粒接合试验提示质粒介导的水平传播在碳青霉烯酶基因的播散过程中可能起重要作用。

**[关键词]** 碳青霉烯酶;肺炎克雷伯菌;Carba NP试验;PFGE;分子流行病学

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2

### Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

GONG Lin, LIU Xiao-li, XU Hui-qiong, LIANG Jian-sheng (Department of Disinfection and Pest Control, Wuhan Centers for Disease Prevention and Control, Wuhan 430015, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze carbapenemase production and molecular epidemiological characteristics of clinically isolated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) from two hospitals in Wuhan City. **Methods** 42 non-repetitive CRKP strains were collected from two hospitals in Wuhan City from January to October 2018, carbapenemase production was screened by Carba NP test, carriage of carbapenemase genes was detected by polymerase chain reaction (PCR), horizontal transfer of drug resistance genes was analyzed by plasmid conjugation test, phylogenetic relationship was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Of 42 CRKP strains, 14 were positive for Carba NP test, 10 of which were amplified NDM-1 gene and 3 amplified KPC-2 gene. A total of 13 CRKP strains were positive for carbapenem gene detection, 12 of which were successful in plasmid conjugation test. PFGE showed that CRKP strains carrying NDM-1 gene were classified into 6 types, there was no dominant type; CRKP strains carrying KPC-2 gene were of the same type. **Conclusion** NDM-1 and KPC-2-producing CRKP strains were detected, plasmid conjugation test suggested that plasmid-mediated horizontal transfer might play an important role in the dissemination of carbapenemase genes.

**[Key words]** carbapenemase; *Klebsiella pneumoniae*; Carba NP test; pulsed-field gel electrophoresis; PFGE; molecular epidemiology

由于碳青霉烯类抗生素抗菌活性强且抗菌谱广,逐渐成为临床上治疗重症感染的主要药物<sup>[1]</sup>。但是,随着碳青霉烯类药物的广泛应用,耐碳青霉烯

类药物的细菌不断增加,降低了该类药物的治疗效果<sup>[2]</sup>。细菌对碳青霉烯类药物耐药的主要机制之一是产碳青霉烯酶,通过分析产碳青霉烯酶菌株的分

[收稿日期] 2018-12-29

[基金项目] 2017年度武汉市临床医学科研项目(公共卫生及卫生政策类)(WG17Q02)

[作者简介] 龚林(1988-),男(汉族),湖北省潜江市人,医师,主要从事医院感染监控与管理研究。

[通信作者] 梁建生 E-mail: wh-ljs@sohu.com

子流行特征,对预防和控制耐药菌的产生和耐药基因的传播具有重要意义。本研究对武汉两所医院临床分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)进行分子流行病学研究,为临床采取合理的防控措施提供实验室参考依据<sup>[3]</sup>。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 收集武汉两所医院 2018 年 1—10 月临床分离的非重复 CRKP 共 42 株。对亚胺培南,美罗培南和厄他培南 3 种药物其中的 1 种耐药,定义为耐碳青霉烯类药物。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),全自动细菌鉴定及药敏分析系统(法国梅里埃公司),脉冲场凝胶电泳仪(美国伯乐公司),凝胶成像仪(美国 UVP 公司)。主要试剂:细菌 DNA 提取试剂盒(北京康为世纪公司),PCR 反应试剂盒(日本 Takara 公司)。

1.3 菌株鉴定及药敏试验 细菌的鉴定和药敏试验采用全自动细菌鉴定及药敏分析系统完成,大肠埃希菌 ATCC 25922 作为对照菌。药敏分析结果按 2018 年版美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准进行判断。

1.4 碳青霉烯酶表型检测 采用 Carba NP 试验对 CRKP 菌株产碳青霉烯酶情况进行初筛。制备 Carba NP 溶液 A 和 Carba NP 溶液 B,然后刮取平板上隔夜培养的受试菌株,分别加入装有 Carba NP 溶液 A 和 Carba NP 溶液 B 的离心管中,(35±2)℃ 孵育,孵育过程中每隔一段时间观察结果。结果判定:(1)若溶液 A 为红色或橙红色,且溶液 B 为浅橙色、黄色或深黄色,则结果判定为阳性;(2)若溶液 A 为红色或橙红色,且溶液 B 为红色或橙红色,则结果判定为阴性;(3)若溶液 A 为橙色、浅橙色、黄色或深黄色,则结果判定为无效,应结合其他试验判定。

1.5 碳青霉烯耐药基因扩增 采用细菌 DNA 提取试剂盒并按照试剂盒提供的实验方法提取菌株 DNA。采用普通 PCR 方法扩增常见碳青霉烯耐药基因(包括 KPC、VIM、IMP、NDM、OXA-48)。依据相关参考文献<sup>[4-8]</sup>设计引物和 PCR 扩增反应。PCR 反应体系共 50 μL,包括 PCR 反应试剂 mix 25 μL,上、下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL,最后

加 H<sub>2</sub>O 补足体积。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,选取阳性产物条带送往生工生物有限公司进行测序。1.6 质粒接合试验 分别取隔夜培养的供体菌(携带碳青霉烯耐药基因的 CRKP)和受体菌(大肠埃希菌 J53 AZr)菌液,混合后于 35℃ 培养 4 h,然后接种于双抗 LB 平板(含叠氮化合物 100 mg/L,亚胺培南 1.5 mg/L)上筛选接合转移子<sup>[9]</sup>。将双抗平板上生长的菌株作菌落 PCR 试验,若 PCR 扩增结果为阳性,则可判定为接合试验成功。

1.7 菌株间亲缘关系分析 通过脉冲场凝胶电泳试验(PFGE)分析产碳青霉烯酶基因 CRKP 菌株的亲缘关系。菌株包埋入胶块后,经裂解和清洗,使用限制性内切酶 XbaI 进行酶切,然后在 0.5×TBE 缓冲液中电泳 18.5 h。电泳参数为电压 6 V/cm、温度 14℃、脉冲时间 6~36 s。采用 BioNumerics 软件分析电泳凝胶成像图谱,图谱结果判读依据 Tenover 等<sup>[10]</sup>建议的标准。

## 2 结果

2.1 菌株来源 42 株 CRKP,其中分离自痰 28 株(66.7%),分泌物 6 株(14.3%),尿 5 株(11.9%),血 2 株(4.8%)和穿刺液 1 株(2.4%)。来源科室分别为 ICU 19 株(45.2%),呼吸内科 11 株(26.2%),肝胆外科 4 株(9.5%),普通外科 4 株(9.5%),脑血管外科 2 株(4.8%),急诊科和神经内科各 1 株(各占 2.4%)。

2.2 药敏情况 所有菌株对头孢唑林、头孢曲松和厄他培南均耐药;对亚胺培南和美罗培南耐药率分别为 85.7%(36/42)和 59.5%(25/42);对庆大霉素、复方磺胺甲噁唑和阿米卡星的耐药性稍低,分别为 45.2%(19/42)、45.2%(19/42)和 19.0%(8/42)。见图 1。

2.3 碳青霉烯酶表型和基因检测结果 经 Carba NP 试验检测,碳青霉烯酶阳性率为 33.3%(14/42)。PCR 结果显示,13 株耐药基因检测阳性,其中 NDM 阳性 10 株,KPC 阳性 3 株。所有携带碳青霉烯酶基因的菌株 Carba NP 试验结果均为阳性。所有菌株均未检出 VIM、IMP 和 OXA-48 基因。NDM 和 KPC 阳性产物经测序比对后,分别确定为 NDM-1 基因和 KPC-2 基因。I 医院检出 5 株 NDM-1 阳性菌株,II 医院检出 5 株 NDM-1 和 3 株 KPC-2 阳性菌株。见表 1。

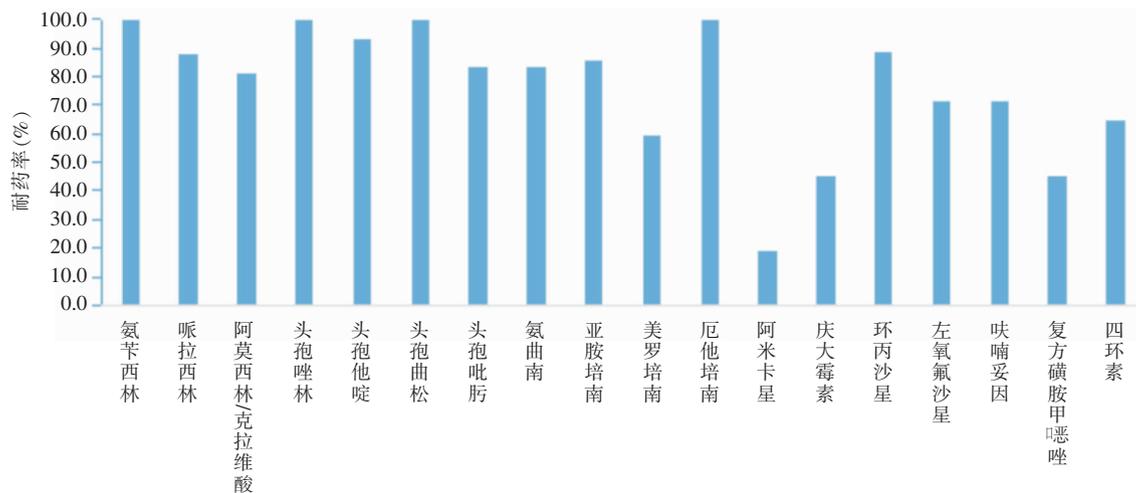


图1 42株肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的耐药率

Figure 1 Resistance rates of 42 strains of *Klebsiella pneumoniae* to commonly used antimicrobial agents

表1 42株CRKP碳青霉烯酶表型和基因型检测结果

Table 1 Detection results of carbapenemase phenotype and genotype of 42 CRKP strains

编号	医院	来源	科室	Carba NP 试验	耐药基因	编号	医院	来源	科室	Carba NP 试验	耐药基因
WH1	I	尿	普外科	+	NDM-1	WH22	II	痰	ICU	+	KPC-2
WH2	I	尿	普外科	-		WH23	II	尿	ICU	+	KPC-2
WH3	I	痰	ICU	-		WH24	II	分泌物	肝胆外科	-	
WH4	I	尿	普外科	-		WH25	II	分泌物	呼吸内科	-	
WH5	I	痰	急诊科	+		WH26	II	痰	呼吸内科	+	NDM-1
WH6	I	痰	神经内科	-		WH27	II	痰	ICU	-	
WH7	I	痰	ICU	+	NDM-1	WH28	II	痰	呼吸内科	+	NDM-1
WH8	I	痰	ICU	+	NDM-1	WH29	II	痰	脑血管外科	-	
WH9	I	痰	ICU	-		WH30	II	痰	ICU	-	
WH10	I	痰	ICU	-		WH31	II	穿刺液	肝胆外科	+	NDM-1
WH11	I	痰	ICU	-		WH32	II	分泌物	ICU	-	
WH12	I	尿	普外科	+	NDM-1	WH33	II	痰	ICU	-	
WH13	I	痰	ICU	-		WH34	II	痰	脑血管外科	-	
WH14	I	痰	ICU	-		WH35	II	痰	ICU	-	
WH15	I	分泌物	呼吸内科	-		WH36	II	痰	呼吸内科	-	
WH16	I	分泌物	ICU	-		WH37	II	痰	呼吸内科	+	NDM-1
WH17	I	痰	ICU	+	NDM-1	WH38	II	痰	呼吸内科	-	
WH18	II	痰	呼吸内科	-		WH39	II	痰	呼吸内科	-	
WH19	II	痰	呼吸内科	-		WH40	II	血	ICU	+	NDM-1
WH20	II	痰	ICU	+	KPC-2	WH41	II	痰	呼吸内科	-	
WH21	II	血	肝胆外科	-		WH42	II	分泌物	肝胆外科	-	

2.4 质粒接合试验和菌株药敏结果 10株NDM-1阳性CRKP菌株与大肠埃希菌J53的质粒结合试验获得了9个接合子,仅WH12 CRKP菌株未能接

合成功。供体菌、接合子与受体菌药敏结果显示,除对氨曲南敏感外,所有接合子对绝大多数β-内酰胺类药物耐药,但耐药水平较供体菌有所降低。部分

接合子对氨基糖苷类、氟喹诺酮类、磺胺类、四环素类药物敏感,但 MIC 值高于受体菌。3 株 KPC-2 阳性菌株均接合成功,接合子对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、氟喹诺酮类药物均耐药,对阿莫西林/克拉维酸、氨基糖苷类、四环素类药物均敏感。

2.5 菌株间亲缘关系分析 PFGE 分析结果显示,

10 株 NDM-1 阳性 CRKP 菌株图谱共分为 6 个型别,分别定义为 A、B、C、D、F、G 型;其中 D 型、E 型各 3 株,C 型和 F 型分别各 2 株,A 型、B 型和 G 型各 1 株,其中 3 株 D 型均来自 II 医院呼吸内科,2 株 F 型均来自于 I 医院的 ICU。3 株 KPC-2 阳性菌株均为 E 型,来自于 II 医院的 ICU。见图 2。

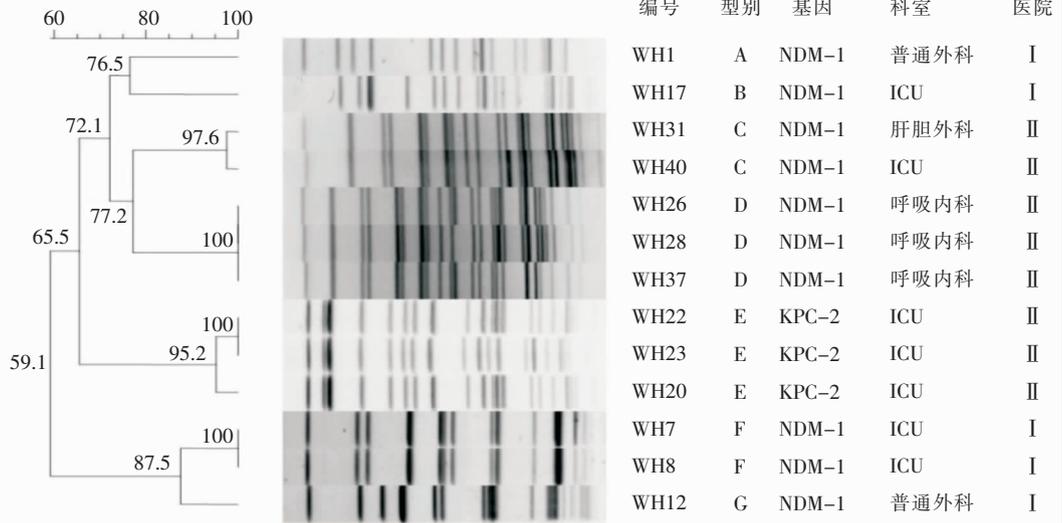


图 2 携带碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌 PFGE 分析

Figure 2 PFGE analysis of *Klebsiella pneumoniae* carrying carbapenemase gene

3 讨论

肺炎克雷伯菌常定植于人体肠道和呼吸道,可引起消化道、血液、呼吸道、皮肤软组织等部位感染,是临床上常见的条件致病菌之一<sup>[11]</sup>。碳青霉烯类药物作为广谱抗菌药物,是治疗肺炎克雷伯菌的重要药物之一,随着碳青霉烯类药物在临床的广泛应用,CRKP 逐年增加。本研究中分离的 CRKP 菌株大部分来源于 ICU,患者病情严重、长期住院、免疫力低下,较容易感染耐药菌。同时,CRKP 多分离自痰标本,提示此类耐药菌常定植于呼吸道,引起呼吸系统感染。NDM-1 和 KPC-2 的检出率分别为 23.8%(10/42)和 7.1%(3/42),低于既往研究<sup>[12-14]</sup>的数据,提示产 NDM-1 和 KPC-2 的 CRKP 菌株在此两所医院流行率相对较低。另外,也可能是医院监测系统不完善,未能发现所有产酶菌株。

本研究显示,14 株 CRKP 菌株 Carba NP 试验初筛碳青霉烯酶阳性,经过 PCR 检测显示其中有 13 株 CRKP 菌株扩增出碳青霉烯酶基因,仅有 1 株

CRKP 菌株未能扩增出碳青霉烯基因,表明 Carba NP 试验在检测碳青霉烯酶时具有很高的灵敏度和特异度。Vasoo 等<sup>[15]</sup>研究结果表明,Carba NP 试验对常见的碳青霉烯酶(OXA-48 除外)检出率很高,灵敏度和特异度接近 100%。与本实验研究结论类似,表明该方法可以用于对碳青霉烯酶进行初筛。

本研究 13 株产碳青霉烯酶 CRKP 菌株中有 12 株成功进行了质粒接合试验,表明耐药基因可通过质粒介导在不同细菌间水平传播。对接合子和受体菌的药敏结果进行分析,携带 NDM 和 KPC 基因的菌株对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类等抗菌药物的 MIC 均相对较高。对接合子和供体菌的药敏结果进行分析,供体菌除了携带碳青霉烯基因外,可能还获得了其他耐药元件、耐药基因或其他耐药机制等,使得菌株产生更高水平的耐药。

本研究对 13 株携带 NDM-1 基因和 KPC-2 基因的 CRKP 进行 PFGE 分型,结果显示 10 株携带 NDM-1 基因 CRKP 菌株共分为 6 个型,无明显优势型;然而,3 株携带 KPC-2 基因 CRKP 菌株则为

同一型别,且集中分布于 ICU。PFGE 分型结果提示,两所医院可能存在 KPC-2 基因克隆传播,NDM-1 基因克隆传播和水平传播并存的现象。此两种方式会加速碳青霉烯酶基因在医院内和医院间的传播,从而引起更多的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物产生耐药。

综上所述,两所医院分离的 CRKP 与其携带的碳青霉烯酶基因 NDM-1 和 KPC-2 有关,且该类基因可通过质粒转移在细菌间进行水平传播。因此,应高度重视碳青霉烯酶基因导致的碳青霉烯类耐药<sup>[16]</sup>,制定和实施有效的多重耐药菌防控措施,从而可减少其在医院内和医院间的传播。

#### [参 考 文 献]

- [1] 何建业,曹在秋,代志峰.耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌的耐药基因分析[J].检验医学,2017,32(11):985-989.
- [2] 龚林,刘小丽,许慧琼,等.阴沟肠杆菌临床分离株 armA 基因分布与分子分型研究[J].中国消毒学杂志,2017,34(10):912-914.
- [3] 赵辉,贾楠,徐茶,等.产 NDM-1 肺炎克雷伯菌引起的新生儿感染及其同源检测[J].中华医院感染学杂志,2016,26(10):2357-2360.
- [4] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 1151-1161.
- [5] Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- $\beta$ -lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5407-5413.
- [6] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.
- [7] 杨启文.中国碳青霉烯耐药肠杆菌科菌流行病学及耐药机制研

究[D].北京:北京协和医院,2015:1-164.

- [8] 郑芬.革兰阴性超级细菌碳青霉烯酶基因和可移动耐药元件结构研究[D].广东:南方医科大学,2013:1-90.
- [9] 王峰,孙景勇,张芳芳,等.碳青霉烯类耐药的大肠埃希菌中 blaNDM 基因型检测及流行病学分析[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(1):56-60.
- [10] Tenover FC, Arbeit RD, Geering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [11] 吴丹丹,蔡加昌,刘进.耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的感染现状[J].中国抗生素杂志,2011,36(1):1-6.
- [12] 傅芬蕊.耐碳青霉烯类不动杆菌的耐药机制与分子流行病学研究[D].福建:福建医科大学,2015:1-74.
- [13] 王选.嘉兴地区产 NDM-1 肠杆菌科细菌流行及传播机制研究[D].浙江:温州医科大学,2016:1-56.
- [14] 杨朵,胡智颖,辛续丽.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌中 KPC 基因分布[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(4):465-467.
- [15] Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 3097-3101.
- [16] 孙龙,李曦,华孝挺,等.无迁徙生长碳青霉烯耐药奇异变形杆菌耐药机制及分子分型研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(10):734-739.

(本文编辑:孟秀娟、左双燕)

**本文引用格式:**龚林,刘小丽,许慧琼,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分子流行病学研究[J].中国感染控制杂志,2019,18(7):643-647. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20194528.

**Cite this article as:** GONG Lin, LIU Xiao-li, XU Hui-qiong, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chin J Infect Control, 2019, 18(7): 643-647. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20194528.