

产酸克雷伯菌耐碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究*

徐小红¹, 巫之韵^{1,2}, 蔡美莉¹, 王梅华¹, 陈 莺¹, 曹颖平¹, 李 彬¹

(1. 福建医科大学附属协和医院检验科, 福州 350001; 2. 福建医科大学, 福州 350001)

摘要:目的 分析产酸克雷伯菌耐碳青霉烯类抗生素的分子机制。方法 收集福建医科大学附属协和医院2011年8月~2012年8月临床分离非重复耐碳青霉烯类抗生素的产酸克雷伯菌株5株,检测厄他培南(ETP)、亚胺培南(IPM)及美罗培南(MEM)的最低抑菌浓度(MIC)筛查菌株;采用改良Hodge试验进行碳青霉烯酶表型鉴定、琼脂稀释法测其药敏;聚合酶链反应(PCR)扩增超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、碳青霉烯酶耐药基因;对检出碳青霉烯类基因的产酸克雷伯菌进行接合试验。结果 5株产酸克雷伯菌对17种抗菌药物中耐药率 $\geq 80\%$ 的有9种,分别为头孢西丁、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、厄他培南、亚胺培南、庆大霉素、头孢哌酮/舒巴坦、氨曲南。对替加环素、美罗培南、多黏菌素B和哌拉西林/他唑巴坦的耐药性较低。改良Hodge试验检出4例产碳青霉烯酶。2株携带碳青霉烯类耐药基因(1株仅IMP-4阳性,1株KPC-2和IMP-8同时阳性),3株检出 β -内酰胺酶基因。结论 福建医科大学附属协和医院产酸克雷伯菌耐碳青霉烯类抗生素耐药机制可能为携带IMP及KPC基因,并且发现了产酸克雷伯菌同时携带两种碳青霉烯类耐药基因的现象。

关键词:产酸克雷伯菌,碳青霉烯酶,金属 β -内酰胺酶,肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶,耐药机制

中图分类号:R378.996;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)01-019-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.006

Study on the Resistance Mechanisms of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Oxytoca*

XU Xiao-hong¹, WU Zhi-yun^{1,2}, CAI Mei-li¹, WANG Mei-hua¹, CHEN Ying¹, CAO Ying-ping¹, LI Bin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2. Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the resistance mechanism of Carbapenem-Resistant *Klebsiella oxytoca*. **Methods** Carbapenem-Resistant *Klebsiella oxytoca* were collected from Fujian Medical University Union Hospital. The modified hodge test (MHT) was used for carbapenemase phenotype screening. The minimum inhibit concentration (MIC) was detected using agar dilution method for 17 drugs. PCR and DNA sequencing were used to detect common β -Lactamase genes and carbapenemases genes. Conjugation experiments demonstrated the transferability of the carbapenem-resistant determinants. **Results** 5 Carbapenem-Resistant *Klebsiella oxytoca* of 4 isolates were positive detected by MHT. Minimum inhibit concentration was detected by using agar dilution method for 17 drugs. More than 80% isolates were resistance to nine drugs. 2 isolates conjugated successfully of 5 Carbapenem-Resistant *Klebsiella oxytoca* Isolates. There were 2 isolates included carbapenemases gene (1 isolates were only IMP producers, 1 isolate contained the IMP and KPC), 3 isolates produce ESBLs gene. **Conclusion**

The due to CRE strains isolated from Fujian Medical University Union Hospital may be metallo-enzyme carbapenemase and KPC gene. And the isolate that produce two Carbapenem-Resistant gene had been found in this hospital.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*; carbapenemases; resistance mechanisms; IMP; KPC

碳青霉烯类抗生素是目前治疗产超广谱 β -内酰胺酶细菌感染重要的药物。在最近几年内,由于临床未严格按抗生素使用规则的要求,碳青霉烯类抗生素耐药现象逐年增加。目前克雷伯菌属耐碳青霉烯类抗生素现象的报道主要以肺炎克雷伯菌为主,产酸克雷伯菌耐碳青霉烯类抗生素的数据较少。产酸克雷伯菌作为医院感染的病原菌之一,也可引起相应的感染,比如肺炎、败血症、腹腔感染、胆道感染等。因此对2011年8月~2012年8月收集自福建医科大学附属协和医院的5株耐碳青

霉烯类抗生素的产酸克雷伯菌进行研究,以期了解其耐药的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:具体操作方法参见文献[1],共分离出5株产酸克雷伯菌,其中2株分离自血液,2株分离自中段尿,1株分离自拭子。分别来自儿科2株,ICU 1株,血液科1株,泌尿外科1株。

1.1.2 试剂与仪器:具体试剂与仪器型号参见文献[1]。

* 基金项目:国家自然科学基金(81201328,81171656);福建省高校杰青项目(JA13134);福建省卫计委中青年骨干人才培养项目(2015-ZQW-ZD-15)。

作者简介:徐小红(1987-),女,检验师,硕士研究生,研究方向:细菌耐药机制,E-mail:vancy1988@163.com。

通讯作者:曹颖平,E-mail:caoyingping@aliyun.com;李彬,E-mail:leonlee307@126.com。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验:具体操作方法参见文献[1]。

1.2.2.1 采用改良 Hodge 试验:具体操作方法参见文献[1]。

1.2.2 耐药基因的检测:具体操作方法及引物序列参见文献[1]。

1.2.3 接合试验:具体操作方法参见文献[1]。

2 结果

2.1 菌株的药敏试验结果 见表1。

表1 抗菌药物对5株耐碳青霉烯类抗生素产酸克雷伯菌的MIC值

抗生素	MIC($\mu\text{g/ml}$)					
	R	KOX1	KOX2	KOX3	KOX4	KOX5
亚胺培南	≥ 4	2	4	16	16	128
厄他培南	≥ 2	4	4	64	16	8
美罗培南	≥ 4	0.5	0.5	0.5	0.5	1
替加环素	≥ 8	1	0.5	2	2	32
多黏菌素 B	≥ 8	0.25	0.5	0.25	0.25	64
头孢他定	≥ 16	128	512	256	512	1
头孢噻肟	≥ 4	64	512	256	128	2
头孢吡肟	≥ 32	32	32	64	64	0.125
头孢西丁	≥ 32	512	512	512	512	256
庆大霉素	≥ 16	512	512	256	256	256
阿米卡星	≥ 64	512	512	4	8	64
左旋氧氟沙星	≥ 8	0.125	1	4	32	1
环丙沙星	≥ 4	0.5	2	16	2	0.5
四环素	≥ 16	1	4	8	16	1
哌拉西林/他唑巴坦	$\geq 128/4$	4/2	512/4	8/4	16/8	1/0.5
头孢哌酮/舒巴坦	$\geq 64/32$	64/32	256/128	64/32	256/128	4/2
氨基糖苷	≥ 16	128	128	128	128	128

2.2 表型鉴定 5株耐碳青霉烯类抗生素产酸克雷伯菌中有4株改良 Hodge 试验阳性。见图1。

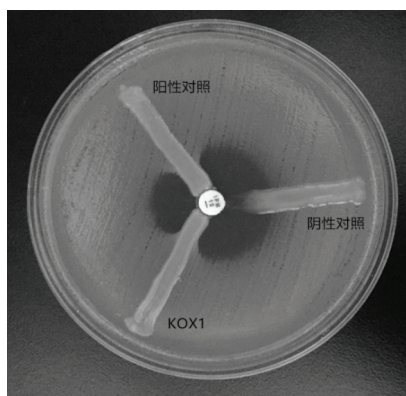
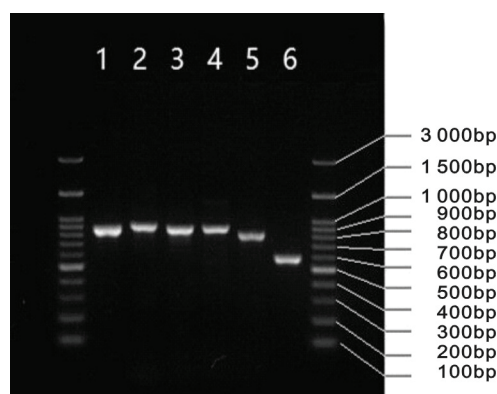


图1 改良 Hodge 试验结果图

2.3 耐药基因检测 碳青霉烯类耐药基因及常见ESBLs 基因检测:5株产酸克雷伯菌中携带的耐药基因分别为 KOX1 携带 IMP-4, TEM-1, SHV-12 及 CTX-M-22 基因, KOX3 携带 KPC-2, IMP-8, CTX-M-79 及 CTX-M-14 基因, KOX4 携带 TEM-1 及 CTX-M-14 基因, KOX5 携带 TEM-1 基因。扩增产物电泳图见图2。



1. TEM-1; 2. SHV; 3. CTX-M-1; 4. CTX-M-9; 5. KPC; 6. IMP

图2 常见 β -内酰胺酶基因实验结果图

2.4 接合试验 2株携带碳青霉烯类耐药基因产酸克雷伯菌均接合成功。

3 讨论 碳青霉烯类抗生素是目前公认的治疗肠杆菌科细菌感染最有效抗生素之一,特别是用于治疗产ESBLs的肠杆菌科细菌引起的感染。自1997年在美国北卡罗莱纳州发现第一株耐碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯菌以来^[2],耐碳青霉烯类克雷伯菌属的检出率逐年增高。目前报道较多的碳青霉烯类耐药主要的机制之一是产碳青霉烯酶,如KPC酶、金属酶等。国内检出的碳青霉烯酶以Ambler分类A类酶KPC酶居多^[3],而B类金属酶的报道尚少。

采用改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶表型的筛查共检出4株产碳青霉烯酶,与PCR法比较,有2株呈假阳性,可能原因为被测菌株产Ampc和(或)ESBL酶,也可能是携带了其他在实验中尚未检测出或者未知的碳青霉烯酶有关,具体原因还有待日后进一步说明。同时2014年该医院李彬等^[4]学者报道碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药机制以产金属酶为主,鉴于该医院碳青霉烯类耐药的流行情况,在临床工作中可采用改良 Hodge 试验与EDTA抑制试验联合使用的方法来提高实验室碳青霉烯酶的检出率。

实验中分离的5株产酸克雷伯菌对多数抗生素耐药,如头孢西丁、头孢吡肟、头孢他定、头孢噻肟、亚胺培南、厄他培南、头孢哌酮/舒巴坦、氨基糖苷等,但对多黏菌素B和替加环素仍较敏感。或许替加环素及多黏菌素B可以考虑用于治疗该类菌株引起的感染最后的药物选择。

同时比对药敏结果发现该5株产酸克雷伯菌对厄他培南的耐药性高于美罗培南和亚胺培南,考虑或许存在除了金属酶介导以外其他的耐药机制, Tsai 等^[5]学者的研究表明 OmpK35/36 蛋白丢失会导致菌株对碳青霉烯类抗生素抑菌浓度增高,以致对厄他培南耐药。OmpK35 的丢失同时携带

blaCTX-M-15 或 blaDHA-1 amp-R 基因的菌株可升高厄他培南的 MIC 值,可是对美罗培南和亚胺培南影响比较小。实验中的菌株是否存在与上述同样的耐药机制,有待日后进一步研究。此外,5株产酸克雷伯菌对美罗培南均比较敏感,可能原因之一为亚胺培南和美罗培南这两种抗生素抗菌机理不一样,亚胺培南作用靶位是 PBP2,但美罗培南的抗菌活性较强主要是由于它对 PBP2 和 PBP3 这两种蛋白均有较高的亲和力^[6],因此该菌虽然对亚胺培南耐药,仍可对美罗培南敏感。另一个可能的原因为亚胺培南早上市于美罗培南,临床应用相对较多^[7]。因此,或许在临床治疗中治疗该类菌株引起的感染或许可以考虑使用美罗培南。

鉴于以上的药敏结果,此次研究还对分离到的5株耐碳青霉烯类抗生素产酸克雷伯菌进行耐药基因分析,发现2株携带 IMP 基因,1株携带 KPC 基因,说明2011~2012年福建医科大学附属协和医院产酸克雷伯菌临床分离株的耐药机制已出现携带金属酶耐药基因的情况,这与国内外^[3,8]及和福州同地区福建医科大学附属第一医院^[9]报道的其耐药机制以产 KPC 为主不同,可以看出随着时间的推移,耐药基因的流行基因型也发生不断的变化,菌株携带的耐药基因已出现向多样化发展的现象。该研究是福州地区首次对产金属酶产酸克雷伯菌的报道。另外,KOX5 菌株检出含常见的碳青霉烯类基因及 ESBLs 基因,但其对亚胺培南及替加环素表现出很高的耐药性,是否存在其他的耐药机制有待后续的探讨。

此外,该研究发现了同一菌株中存在对同一类抗生素耐药的耐药基因的现象,同时具有3种以上耐药基因的菌株有2株,携带多种类别的耐药基因相比单独携带一种耐药基因的潜在危害性更大,因为其会使耐药谱增大,更加容易造成泛耐药。

有文献报道,金属酶及 KPC 酶基因一般位于质粒上^[10],在本次实验中,两株携带碳青霉烯类耐药基因的产酸克雷伯菌均结合成功,说明 KPC 及 IMP 基因位于质粒上可通过接合作用转移到受体菌等其他菌株中,存在发生水平播散进而造成暴发流行的可能,因此提示我们在日常工作中应高度重视临床耐药监测和院感控制工作,以预防耐药菌株暴发流行。

综上,该研究碳青霉烯类耐药的原因主要以携带碳青霉烯酶基因 IMP 及 KPC 为主,同时携带多种耐药基因的情况给临床治疗带来了很大的挑战。携带多种耐药基因临床分离菌株的检出及质粒水平转移导致耐药性播散的情况向我们敲响警钟,必

须加强监测该类致病菌的检出,尽可能避免侵袭性操作并且加强环境消毒和手卫生工作,还应合理应用抗生素尤其是碳青霉烯类或许能降低 CRE 菌株感染率。

参考文献:

- [1] 徐小红. 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌耐药机制及危险因素分析[D]. 福建:福建医科大学,2014.
- [2] Xu XH. Study on the resistabce mechanisms and clinical risk factors of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates[D]. Fujian: Fujian Medical University, 2014.
- [3] 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.
- [4] 宁明哲, 张之烽, 周万青, 等. 耐亚胺培南的肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因检测及其同源性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(2): 58-59, 63.
- [5] Ning MZ, Zhang ZF, Zhou WQ, et al. Carbapenemase gene detection and homology analysis of impenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Mod Lab Med, 2014, 29(2): 58-59, 63.
- [6] 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.
- [7] Tsai YK, Liou CH, Fung CP, et al. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79640.
- [8] Balm MN, Ngan G, Jureen R, et al. OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* establishing in Singapore [J]. BMC Infectious Diseases, 2013, 13(1): 58.
- [9] Gomez S, Pasteran F, Faccone D, et al. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2013, 19(5): 233-235.
- [10] Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, et al. Prevalence and mechanisms of resistance to carbapenems in Enterobacteriaceae isolates from 24 hospitals in Belgium [J]. J Antimicrob Chemother, 2013; 68 (8): 1832-1837.
- [11] 甘龙杰, 吴秀凤, 高丽钦, 等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌基因型检测及同源性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(3): 316-318.
- [12] Gan LJ, Wu XF, Gao LQ, et al. Analysis genotype and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2014, 26 (3): 316-318.
- [13] DeLea FR, Chen L, Porcella SF, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (13): 4988-4993.

收稿日期: 2015-10-31

修回日期: 2016-04-23