

临床分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药机制研究*

程莉, 谭婷婷, 魏红霞, 张葵

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘要:目的 探究肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的分子机制。方法 通过 Carba NP 确证试验检测碳青霉烯酶表型; PCR 扩增碳青霉烯酶基因, 质粒介导 AmpC 酶基因, 超广谱 β -内酰胺酶基因; 采用多序列位点分型 (MLST) 对菌株进行遗传相关性分析。结果 50 株耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌中, 42 株 PCR 扩增 KPC-2 阳性, 1 株 NDM-1 阳性, 其余 7 株未检测到碳青霉烯酶基因; 产 KPC-2 肺炎克雷伯菌相关耐药基因的携带率为: bla CTX-M 21.5%, bla SHV 42.9%, bla TEM 69.1% 和 bla DHA 4.8%; MLST 结果显示 42 株 KPC-2 阳性菌株中, 37 株为 ST11 型。结论 KPC-2 的产生是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制, 且该院存在着 ST11 产 KPC-2 肺炎克雷伯菌的暴发流行。

关键词:碳青霉烯类抗菌药物; 肺炎克雷伯菌; 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)03-112-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.030

Resistance Mechanisms of Clinical Isolated Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*

CHENG Li, TAN Ting-ting, WEI Hong-xia, ZHANG Kui

(Department of Laboratory Medicine, the Affiliated Drum

Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanisms of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Methods Carba NP confirmatory test were used to detect carbapenemases. Carbapenemase genes, ESBL genes and plasmid-mediated AmpC genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The genetic correlation analysis was carried out by using multiple sequence type (MLST). Results 42 out of the 50 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains were KPC-2-positive strains, 1 strain was positive for NDM-1, the other 7 strains were not detected for any carbapenemase genes. The percentages of KPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* with the bla CTX-M, bla SHV, bla TEM, bla DHA were 21.5%, 42.9%, 69.1% and 4.8% respectively. The results of MLST showed that 37 out of 42 KPC-2 positive strains were ST11. Conclusion The production of KPC-2 is the main mechanism of *Klebsiella pneumoniae* resistance to carbapenem and there is an outbreak of ST11 KPC-2 *Klebsiella pneumoniae* in this hospital.

Keywords: carbapenems; *Klebsiella pneumoniae*; drug resistance mechanism

肺炎克雷伯菌是人类重要的条件致病菌之一, 该菌可以引起多种类型的感染, 如尿道感染、肠道感染、菌血症及肺部感染等^[1]。随着产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 菌株的产生, 碳青霉烯类抗生素广泛应用于治疗耐药肠杆菌引起的感染, 从而引起耐碳青霉烯肠杆菌科细菌, 尤其是耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (CRKP) 在全球医疗机构内的广泛播散, 对公共健康卫生造成了极大的威胁。本研究旨在探究本院 2013 年临床分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药机制及分子流行病学状况, 为临床选择抗菌药物提供参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集我院 2013 年 1 月~12 月临床分离的碳青霉烯抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌, 剔除同一患者相同部位分离的重复菌株, 所有菌株经法国生物梅里埃 ATB 细菌鉴定仪或 Vitek 2 Compact 全自动细菌鉴定仪进行菌株鉴定。

1.2 仪器和试剂 亚胺培南药物购自 Oxiod 公司产品; PCR 引物由 Invitrogen 公司合成; PFGE 分型标准菌株 H9812 购自卫生部临床检验中心; 2×PCRMasterMix, PCR 产物纯化试剂盒均购自北京天根公司。ATB 细菌鉴定仪和 Vitek2 全自动细菌鉴定仪购自法国生物梅里埃公司。PCR 扩增仪购于爱普拜斯应用生物系统贸易 (上海) 有限公司,

* 基金项目: 南京市医学科技发展资金 (ZKX13028)。

作者简介: 程莉 (1990—), 女, 硕士, 初级检验技师, 主要研究方向: 临床微生物学及耐药机制研究, Tel: 15751866705, E-mail: chenglmed@163.com。

通讯作者: 张葵, 主任技师, 硕士研究生导师, Tel: 13505151066, E-mail: zhangkui6103@163.com。

凝胶成效分析仪和 CHEF-Mapper XA PFGE 系统购于 Bio-Rad 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验:采用琼脂稀释法检测亚胺培南的敏感性,结果判读参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2015年推荐的标准。药敏试验使用的质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 购自卫生部临床检验中心。

1.3.2 Carba NP 确证实验:用接种环挑取一接种环的待测细菌分别加入含有 100 ml 细菌总蛋白抽提试剂的“a”和“b”玻璃试管中乳化,震荡 5 s 后,在两管中分别加入 100 ml 的 A 液和 B 液,混匀,在 35℃ 下孵育 2 h,结果根据 2015 年 CLSI 的规定标准进行判断。

1.3.3 耐药基因检测:采用水煮法提取细菌基因组 DNA,PCR 反应体系为 50 μ l,其中,2 \times PCR Master Mix 为 25 μ l,模板 DNA 2 μ l,上下游引物各 2 μ l。引物序列参照文献产物^[2,3]。对所收集菌株进行碳青霉烯酶基因(blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaOXA, blaIMP, blaSPM, blaAIM, blaGIM, blaSIM, blaDIM, blaBIC),超广谱 β 内酰胺酶基因(ESBL)(blaTEM, blaCTX-M, blaSHV)以及质粒携带的 AmpC 基因(blaGES, blaPER, blaVEB, blaACC, blaFOX, blaMOX, blaCIT, blaEBC, blaDHA)进行检测。经琼脂糖凝胶电泳后成像观察结果,收集可疑 PCR 阳性产物送上

海美吉有限公司进行测序,所得到的测序结果通过 NCBI 数据库进行在线 BLAST(basic local alignment search tool)比对确认。

1.3.4 MLST 分型:参照 http://bigdb.web.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html 数据库合成 MLST 分析所需要的 7 个管家基因,扩增肺炎克雷伯菌的管家基因并进行网上比对及分型。

2 结果

2.1 药敏试验及 Carba NP 确证试验 本次试验共检测到 50 株亚胺培南耐药菌株,菌株来源如下:痰液 16 株,血液 14 株,尿液 8 株,腹腔积液 4 株,导管 5 株,分泌物 2 株,胆汁 1 株。

50 株耐亚胺培南肺炎克雷伯菌中 43 株为 Carba NP 确证试验阳性,其中 42 株为 KPC-2 阳性,1 株为 NDM-1 阳性;7 株 Carba NP 确证试验阴性且均未检测到碳青霉烯酶基因。

2.2 耐药基因检测结果 42 株产 KPC-2 肺炎克雷伯菌携带多种 β -内酰胺酶基因:blaCTX-M 9 株(21.5%),blaSHV 18 株(42.9%),blaTEM 29 株(69.1%),blaDHA 2 株(4.8%),具体基因携带情况见表 1。产 NDM-1 的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌未检测到其他 β -内酰胺酶基因。7 株不产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的其他耐药基因携带情况见表 1。

表 1 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药基因携带情况(单位:株)

MLST 分型 基因	产碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (n=43)					不产碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (n=7)
	产 KPC-2 肺炎克雷伯菌 (n=42)				产 NDM-1 肺炎克雷伯菌 (n=1)	
	ST11 型 (n=37)	ST15 型 (n=3)	ST709 型 (n=1)	ST23 型 (n=1)		
KPC	37	3	1	1	0	0
NDM	0	0	0	0	1	0
TEM	26	1	1	1	0	3
CTX-M	8	0	1	0	0	5
SHV	16	1	0	1	0	3
DHA	1	1	0	0	0	1

注:PCR 扩增和 DNA 测序检测 50 株耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌,碳青霉烯酶基因:blaVIM, blaOXA, blaIMP, blaSPM, blaAIM, blaGIM, blaSIM, blaDIM, blaBIC;质粒携带的 AmpC 基因:blaGES, blaPER, blaVEB, blaACC, blaFOX, blaMOX, blaCIT, blaEBC 均未检测到。表 1 为所检测到的耐药基因的分布情况。

2.3 MLST 分型结果 42 株 KPC-2 肺炎克雷伯菌中,37 株为 ST11 型,3 株为 ST15 型,其余两株分别为 ST23 型和 ST709 型。

3 讨论 碳青霉烯类抗生素是治疗由产 ESBLs 肠杆菌科细菌引起的感染的首选药物,随着临床上该药物的大量使用,碳青霉烯耐药菌株不断出现,

而此类菌株往往同时对多种抗生素耐药,这对全球公共卫生造成了极大威胁^[4,5]。目前国内外研究发现:肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药的主要机制是碳青霉烯酶的产生^[6];其次为产 ESBLs 或 AmpCs 酶过度表达合并外膜孔蛋白的丢失。其它机制如外排泵的高表达主要见于非发酵菌,药物靶

位改变多为革兰阳性菌,后两者在肺炎克雷伯菌中均极少见^[7,8]。肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPCs)最初于1996年在肺炎克雷伯菌中发现而得名,目前已在肠杆菌以及鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌等革兰阴性菌中发现^[9],其中以肺炎克雷伯菌最为常见。研究发现我院肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药主要是由产碳青霉烯酶导致,且绝大多数为KPC-2酶。产KPC肺炎克雷伯菌同时携带ESBL基因,但质粒介导的AmpC酶基因的携带率较低,这与Cao等^[4]的研究结果相一致。

7株肺炎克雷伯菌不产碳青霉烯酶但对碳青霉烯类抗生素耐药提示存在其它耐药机制。提取这7株菌株的外膜蛋白进行十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)检测外膜蛋白表达情况,并无发现OmpK35、OmpK36的缺失。在培养基中加入羧苄氧氯苯(CCCP)后,其最低抑菌浓度值(MIC)降低4倍或4倍以上,提示该菌株中存在底物为碳青霉烯类抗生素的外排泵,外排泵的作用导致了细菌的耐药,但具体机制仍有待进一步研究。

近期有报道指出ST11是我国耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌株的主要流行型,ST11已经进化成为了高危险性的克隆群^[9]。近些年来,我国医院多次报道ST11的CRKP菌株克隆流行^[10],本次研究发现我院存在产KPC-2肺炎克雷伯菌的广泛播散,提示此类菌株可能会引起暴发流行,需高度关注。

总之,碳青霉烯酶尤其是KPC-2的产生是引起我院肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因,其次为外排泵的表达。我院存在ST11产KPC-2肺炎克雷伯菌的克隆播散。需密切关注细菌对碳青霉烯类药物敏感性情况并及时采取有效的预防控制措施,预防耐药细菌的暴发流行。

参考文献:

- [1] 吉维民. 慢性阻塞性肺病患者下呼吸道感染病原菌分布和耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3):139-141.
Ji WM. The distribution and drug resistance analysis of COPD patient infect bacterium in clinic[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(3):139-141.
- [2] Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, et al. Genetic features of bla_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(11):5403-5407.
- [3] Dallenne C, Da Costa A, Decré D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3):490-495.
- [4] Cao X, Xu X, Zhang Z, et al. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2014, 13(1):16.
- [5] 严育忠, 范惠清, 陆燕春. 产KPC酶肺炎克雷伯菌中ESBL的检测[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3):62-65.
Yan YZ, Fan HQ, Lu YC. ESBL detection in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(3):62-65.
- [6] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3):440-458, table of contents.
- [7] Bornet C, Chollet R, Mallea M, et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(4):985-990.
- [8] Neuwirth C, Siebor E, Duez JM, et al. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins[J]. J Antimicrob Chemother, 1995, 36(2):335-342.
- [9] Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance [J]. Infect Drug Resist, 2012(5):133-141.
- [10] Sun K, Chen X, Li C, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing *K. pneumoniae* in a Chinese teaching hospital [J]. APMIS, 2015, 123(2):123-127.
- [11] Yan JJ, Wang MC, Zheng PX, et al. Associations of the major international highrisk resistant clones and virulent clones with specific ompK36 allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan [J]. New Microbes New Infect, 2015, 5(130):1-4.