

耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分析*

刘宇豪¹, 陈晨¹, 次仁曲珍², 周俊英^{2,3} (1. 武汉大学, 武汉 430072;

2. 西藏山南妇幼保健院, 西藏山南 856000; 3. 武汉大学中南医院, 武汉 430071)

摘要:目的 对武汉大学中南医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(Carbapenem resistant Enterobacteriaceae, CRE)进行耐药性及基因分析,为 CRE 感染提供依据。方法 采用 WHONET5.6 软件对 CRE 菌株进行耐药分析;改良 Hodge 试验对 53 株 CRE 菌株采用亚胺培南、厄他培南和美洛培南三种药敏纸片进行表型筛选;对 31 株 CRE 进行耐药基因分析。结果 53 株 CRE 中,肺炎克雷伯菌 34 株占 64.15%,大肠埃希菌 12 株占 22.64%,阴沟肠杆菌 7 株占 13.21%;Hodge 试验阳性菌株有 31 株,占 58.49%(31/53),亚胺培南、厄他培南和美洛培南三种药敏纸片的 Hodge 试验结果一致;31 株 CRE 中,扩增出 blaKPC 基因的菌株有 29 株,占 93.55%,blaNDM 基因有 9 株,占 29.03%,blaKPC 和 blaNDM 两种基因同时含有的菌株是 8 株,占 25.81%,未扩增出 blaIMP, blaOXA 和 blaVIM 耐药基因。结论 31 株耐碳青霉烯类肠杆菌主要耐药机制携带 KPC 和 NDM 型碳青霉烯酶基因;重症医学科和呼吸内科病房检出的 CRE 主要是肺炎克雷伯菌,其耐药基因型主要是 KPC 型,干部病房 CRE 主要是大肠埃希菌,其耐药基因型主要是 KPC 和 NDM 的混合型。

关键词:耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌;改良 Hodge 试验;耐碳青霉烯酶耐药基因

中图分类号:R378.2;Q781 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)02-055-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.02.016

Drug Sensitivity and Resistance Gene of Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*

LIU Yu-hao¹, CHEN Chen¹, CIREN Qu-zhen², ZHOU Jun-ying^{2,3} (1. Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Shannan Maternal and Child Health Care Hospital in Tibet, Tibet Shannan 856000, China; 3. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: Objective To analyze the resistance genes of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) from Zhongnan Hospital of Wuhan University, so as to provide evidence for CRE infection. **Methods** WHONET 5.6 software was used to analyze the resistance of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolated. Phenotype screening of 53 CRE strains taken with the modified Hodge test by three drug susceptibility slip to imipenem, meropenem and ertapenem, and analysed resistance gene analysis of 31 CRE strains phenotype screening. **Results** In 53 CRE strains, 34 strains of *Klebsiella pneumoniae*, accounting for 64.15%, 12 strains of *Escherichia coli*, accounting for 22.64%, 7 strains of *Enterobacter cloacae* accounted for 13.21%, and there were 31 strains of Hodge test positive strains, accounting for 58.49% (31/53). The Hodge test results of three kinds of drug sensitive paper of imipenem, meropenem and ertapenem were consistent. In 31 strains of CRE, 29 strains of blaKPC gene were amplified, accounting for 93.55%, 9 strains of blaNDM gene, accounting for 29.03%, contained simultaneous and two genes of blaKPC and blaNDM were 8 strains, accounting for 25.81%, the resistance genes of blaIMP, blaOXA, and blaVIM were not amplified. **Conclusion** Resistance to carbapenems was mainly due to the production of KPC and NDM in *Enterobacteriaceae* of 31 strains. The CRE was detected in the Intensive Care Unit and Respiratory ward for mainly *Klebsiella pneumoniae*, and the main genotype was KPC. The CRE was detected in the Cadre ward mainly *Escherichia coli*, and the drug-resistant genotype was mainly a mixed type of KPC and NDM.

Keywords: carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE); modified Hodge test; carbapenemase gene

由于抗生素的不合理使用,细菌对抗生素的耐药率越来越高,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)检出率也逐年递增,CRE 耐药机制非常复杂,已在世界范围内引起广泛关注^[1,2]。本研究通过对中南医院 CRE 耐药菌株分布及耐药基因的分析,为 CRE 的感染控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2015~2017 年武汉大学中南医院检验科保存的 53 株 CRE。

1.2 主要试剂 Taq 酶(美国 Fermentas 公司), dNTP(湖北晶茂生物技术公司), DNA Marker 100bp(广州东盛生物科技), 6×Loading Buffer(大连 TaKaRa 公司), 细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒(北京庄盟公司), Goldview 核酸染料(北京赛

* 基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研项目, WJ2017H0021。

作者简介:刘宇豪(1995—),男,大学本科, E-mail:355149859@qq.com。

通讯作者:周俊英,女,副主任技师,主要从事病原微生物的临床与教学工作,现在西藏山南妇幼保健院, E-mail:1348548858@qq.com。

百盛生物工程公司)。

1.3 PCR 引物合成 KPC, IMP, OXA-48, VIM

和 NDM 5 种引物由北京擎科公司合成,引物系列见表 1。

表 1

检测碳青霉烯酶基因所用的 PCR 引物

引物	序列 5'→3'	基因	长度(bp)
KPC	F:CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R:CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	blaKPC	798
IMP	F:GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC* R:GGTTTAAAYAAAACAACCACC	blaIMP	232
OXA-48	F:GCGTGGTTAAGGATGAACAC R:CATCAAGTTCAACCCAACCG	blaOXA-48	438
VIM	F:GATGGTGTGTTGGTCGCATA R:CGAATGCGCAGCACCAG	blaVIM	390
NDM	F:GGTTTGGCGATCTGGTTTTC R:CGGAATGGCTCATCACGATC	blaNDM	621

注: * Y=C or T。

1.4 PCR 反应条件 blaKPC 及 blaIMP 的反应条件为:94℃预变性 10 min,94℃变性 30 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 50 s,共 36 个循环,最后 72℃5 min。blaOXA,blaVIM 及 blaNDM 的反应条件为:94℃预变性 10 min;94℃30 s,58℃40 s,72℃50 s,36 个循环,72℃延伸 5 min。

1.5 药敏试验 按梅里埃药敏卡 AST-13 说明书进行。

1.6 CRE 表型删选实验 采用改良 Hodge 试验。

1.7 CRE 菌株基因组 DNA 提取 按照试剂说明书进行。

1.8 PCR 扩增体系 总体积为 25 μl,包含 DNA 模板 2 μl,MgCl₂ 25 mmol/L 2.5 μl,dNTP(10 mmol/L)0.5 μl,上、下引物各为 1 μl,10×PCR 缓冲液 2.5 μl,DNA 聚合酶(5 U/μl)1 μl,双蒸水 14.5 μl。

1.9 耐药性分析 采用 WHONET5.6 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 CRE 菌株的分布 53 株 CRE 菌株中,肺炎克雷伯菌 34 株占 64.15%,大肠埃希菌 12 株占 22.64%,阴沟肠杆菌 7 株占 13.21%;科室分布为重症监护病房 15 株 CRE 占 28.30%,呼吸内科病房 9 株占 16.98%,干部病房 6 株占 11.32%,其余科室 23 株占 43.40%;标本类型为尿液标本 20 株 CRE 占 37.74%,痰液 16 株占 30.19%,引流液 9 株占 16.98%,伤口分泌物 4 株占 7.55%,血液 2 株占 3.77%,脑脊液 2 株占 3.77%。

2.2 CRE 的耐药率 2016 年送检标本中,检出肺炎克雷伯菌 811 株,CRE 69 株,检出率为 8.51%;大肠埃希菌 1 581 株,CRE 33 株,检出率为 2.09%;阴沟肠杆菌 225 株,CRE 15 株,检出率为

6.67%。耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌耐药情况见图 1,图 2。

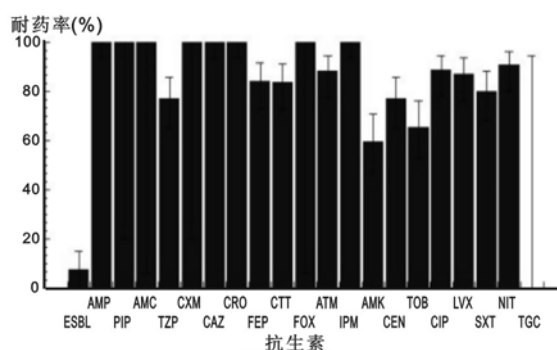


图 1 肺炎克雷伯菌耐药率 (%)

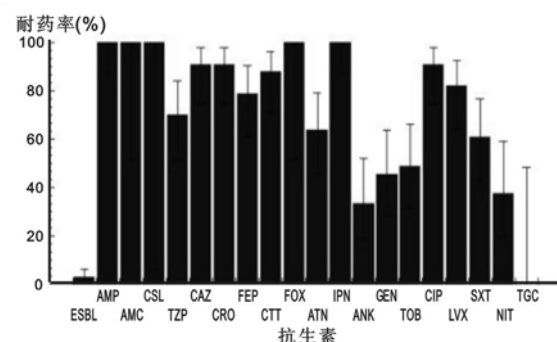


图 2 大肠埃希菌耐药率 (%)

2.3 亚胺培南、美罗培南和厄他培南 3 种药敏纸片的改良 Hodge 试验 53 株 CRE 菌株中,改良 Hodge 试验阳性株有 31 株,占 58.49%。其中亚胺培南、美罗培南和厄他培南 3 种药敏纸片的 Hodge 试验结果一致,见图 3。

2.4 CRE 菌株耐药相关基因扩增结果 31 株 CRE 中,携带 blaKPC(798bp)基因有 29 株,检出率 96.67%,携带 blaNDM(621bp)基因有 9 株,检出率 29.03%,同时扩增出 blaKPC 和 blaNDM 基因有 8 株,检出率 25.81%,未扩增出 blaIMP,

blaOXA, blaVIM 基因, 见图 4, 图 5。

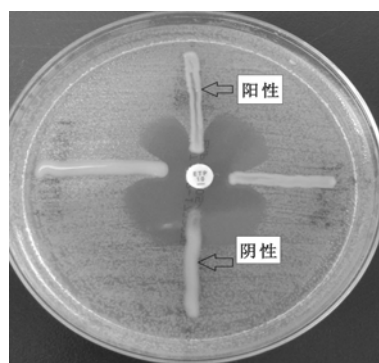


图3 改良 Hodge 试验结果示意图

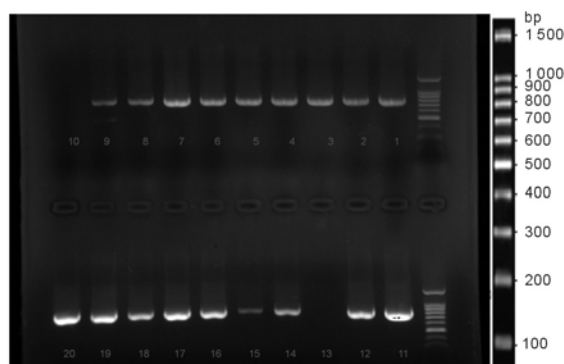


图4 blaKPC 电泳结果示意图

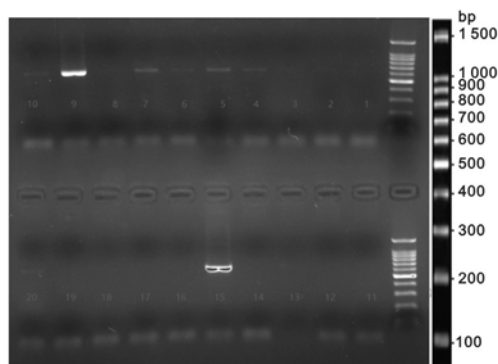


图5 blaNDM 基因型电泳结果示意图

3 讨论 药敏结果显示, CRE 对碳青霉烯类、头孢菌素类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类等抗菌药物耐药率较高, 对庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、复方新诺明、替加环素等抗菌药物耐药率较低。治疗 CRE 感染时, 建议临床优先考虑替加环素, 或替加环素与氨基糖苷类抗生素联合使用。

改良 Hodge 试验是 CLSI 推荐检测碳青霉烯酶表型的筛查方法, 本实验 53 株 CRE 中, Hodge 试验阳性 31 株, 其阳性菌株少的原因可能与某些菌株产碳青霉烯酶量较低有关^[3]。Hodge 试验采用亚胺培南、美罗培南和厄他培南 3 种药敏纸片, 其试验结果一致, 但观察结果发现: 厄他培南和美罗培南矢状箭头较为明显, 亚胺培南不及它们明显, 因此建议 Hodge 试验时, 首选厄他培南或美罗培南纸片。

在药物选择压力下, CRE 携带耐药基因的质

粒、转座子等可发生水平传播^[4], 抗菌药物选择压力不仅能使耐药基因广泛传播, 而且会促进耐药基因通过突变、插入序列等方式, 使自身基因发生变化, 进而使耐药性发生改变, 引起耐药基因的传播^[5]。本研究中发现 1 株不常见耐药基因型, 推测该菌株可能携带一种新的耐碳青霉烯酶基因, 因此建议扩大耐药基因检测范围, 或者测序进一步确认该菌株的基因型。31 株耐药基因分析中, CRE 基因型主要是 KPC, 其次是 NDM, 这与目前国内及世界范围内, 肠杆菌科细菌携带碳青霉烯酶基因为 KPC-2 和 NDM-1 一致^[6]。重症医学科和呼吸内科病房检出的 CRE 主要是肺炎克雷伯菌, 耐药基因型主要是 KPC 型, 干部病房 CRE 主要是大肠埃希菌, 耐药基因型主要是 KPC 和 NDM 的混合型。医院应重点加强对这些科室 CRE 的监管力度, 严格控制临床医生合理使用抗生素, 特别是碳青霉烯类药物的用药指征, 防止 CRE 区域性传播。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 张芳芳, 王晓丽, 瞿洪平, 等. 肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的主要类型和流行病学分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(6): 521-525.
Zhang FF, Wang XL, Qu HP, et al. Prevalence and genotypes of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 14(6): 521-525.
- [3] Amjad A, Mirza I, Abbasis, et al. Modified hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production[J]. Iran J Microbiol, 2011, 3(4): 189-193.
- [4] Schuurmans JM, Van Hijum SA, Piet JR, et al. Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains[J]. Plasmid, 2014, 72: 1-8.
- [5] Jacquier H, Marcade G, Raffoux E, et al. In vivo selection of a complex mutant TEM(CMT) from an inhibitor-resistant TEM (IRT) during ceftazidime therapy[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(12): 2792-2796.
- [6] Li H, Zhang J, Liu Y, et al. Molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in China from 2008 to 2011: predominance of KPC-2 enzyme[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 78(1): 63-65.