

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌临床分离株中 喹诺酮类及 16SrRNA 甲基化酶基因的检测^{*}

张丽¹, 齐军², 吴宗勇², 张晓煜¹, 吴卫星¹ (1. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院肿瘤医院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院检验科, 广东深圳 518116; 2. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院肿瘤医院北京协和医学院肿瘤医院检验科, 北京 100029)

摘要:目的 了解临床分离株中耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)的氟喹诺酮类耐药基因及 16SrRNA 甲基化酶基因存在情况和药敏特点。方法 收集临床标本中分离的 6 株 CRKP, 采用 VITEK 2 compact 全自动微生物鉴定和药敏系统鉴定细菌及药敏试验, 采用聚合酶链反应(PCR)扩增氟喹诺酮类耐药基因和 16SrRNA 甲基化酶基因。结果 6 株 CRKP 临床分离株呈现多药耐药特点, 对环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别是 83.3% 和 83.3%, 对庆大霉素、阿米卡星和妥布霉素的耐药率分别是 66.7%, 50% 和 66.7%。检出喹诺酮类耐药相关基因 qnrB, qnrS 和 qnrD, 基因阳性率分别为 50%, 50% 和 33.3%, 未检出 qnrA, qnrC 和 qepA 基因。检出 16SrRNA 甲基化酶耐药相关基因 armA, 基因阳性率为 50%, 未检出 rmtA, rmtB, rmtC 和 npmA 基因。结论 6 株 CRKP 对喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素耐药严重, 其耐药性与喹诺酮类耐药基因及 16SrRNA 甲基化酶基因高度相关, 其耐药基因主要型别分别是 qnrB, qnrS, qnrD 和 armA。

关键词:耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 喹诺酮类耐药基因; 16SrRNA 甲基化酶基因; 耐药性

中图分类号:R378.996; Q781 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2018)05-027-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.05.008

Detection of Quinolone and 16SrRNA Methyltransferase gene of Clinical Isolated Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*

ZHANG Li¹, QI Jun², WU Zong-yong², ZHANG Xiao-yu¹, WU Wei-xing¹

(1. Department of Laboratory Medicine, National Cancer Center/ National Clinical Research Center for Cancer/ Cancer Hospital & Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Shenzhen 518116, China;

2. Department of Laboratory Medicine, National Cancer Center/ National Clinical Research Center for Cancer/ Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To understand the presence of quinolone resistance gene and 16SrRNA methylation enzyme gene and the characteristics of drug sensitivity in the clinical isolated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP). **Methods**

6 strains of CRKP isolated from clinical specimens were collected, and bacteria and drug sensitivity tests were identified by VITEK 2 compact automatic microbial identification and drug sensitivity system, and polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the quinolone resistance gene and 16SrRNA methylase gene. **Results** 6 strains of CRKP clinical isolates showed multidrug resistance, and the resistance rates for ciprofloxacin and levofloxacin were 83.3% and 83.3% respectively. The resistance rates for gentamicin, amikacin and tobramycin were 66.7%, 50% and 66.7%, respectively. The positive rates of qnrB, qnrS and qnrD genes were 50%, 50% and 33.3%, respectively. The negative rates of qnrA, qnrC and qepA were found. The 16SrRNA methylase resistance related genes were detected. The positive rate of armA gene was 50%, and rmtA, rmtB, rmtC and npmA genes were negative. **Conclusion** 6 strains of CRKP were resistant to quinolones and aminoglycos, and their resistance was highly correlated with quinolone resistance genes and 16SrRNA methylase genes. The main types of drug resistance genes were qnrB, qnrS, qnrD and armA.

Keywords: carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*; quinolone resistant genes; 16SrRNA methylase gene; drug resistance

肺炎克雷伯菌为条件致病菌, 在院内可以引起菌血症、尿道感染和肺部感染等^[1]。由于抗生素的

大量使用, 在高选择性压力下, 多药耐药的肺炎克雷伯菌不断出现, 甚至出现耐碳青霉烯类抗生素肺炎

^{*} 基金项目: 深圳市医疗卫生三名工程项目资助, 项目编号: SZSM201812062。

作者简介: 张丽(1977—), 女, 医学硕士, 副主任技师, 主要工作和研究方向: 微生物学检验及耐药机制研究, E-mail: zldh33@163.com。

克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP),该类菌除对 β -内酰胺类抗生素表现为高度耐药外,对氟喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素也表现出不同程度的耐药。本研究对临床标本中分离出的6株CRKP的氟喹诺酮类耐药基因和16SrRNA甲基化酶基因进行检测,报道如下:

1 材料和方法

1.1 研究菌株 分离自临床标本中对碳青霉烯类耐药的肺炎克雷伯菌,共6株。标本类型主要来源于痰液(5株)和血液(1株);临床资料显示6位患者均使用过碳青霉烯类抗生素,且预后不良。

1.2 仪器和试剂 离心柱型-基因组提取试剂盒和电泳级琼脂糖(北京天根生化科技有限公司),PCR试剂盒和核酸分子量标准(100bp ladder DNA marker,大连宝生),Mueller-Hinton培养基(Oxoid),PCR扩增仪(Bio-Rad),全自动凝胶成像系统(Alpha Innotech),Vitek-2 Compact全自动微生物分析系统(Biomérieux)。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定药敏试验:采用梅里埃 Vitek-2 Compact 全自动微生物分析系统对研究菌株进行鉴定和药敏试验,药敏判定参照抗生素敏感试验执行标准(CLSI 2016)进行,以 *Escherichia coli*

ATCC25922 作为质控菌株。

1.3.2 模板制备:挑纯培养菌落入已含有200 ng/ml 蛋白酶 K 溶液的0.5 ml 的 EP 管内,56℃水浴2 h,再改为95℃水浴10 min。15 000 r/min 离心30s,吸取上清液到另外一只0.5 ml 的 EP 管作为模板液,放置在-20℃冰箱保存备用。

1.3.3 耐药基因检测:见表1。基因组提取按试剂盒说明书操作。总反应体积10 μ l(模板液5 μ l),每个反应体系 P1, P2 引物各为0.5 μ mol/L, BSA0.02 g/dl, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgCl 2 mmol/L, Tris-HCl (pH9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5% (v/v), Taq DNA pol 1U。热循环参数为:93℃变性2 min,然后93℃ 60s→55℃ 60s→72℃ 60s,35个循环,最后一个循环的72℃延长至5 min。产物经2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳,再EB染色,在紫外光下观察结果,出现阳性对照相当的分子带为阳性。PCR方法分别检测喹诺酮类耐药基因 qnrB, qnrS, qnrD, qnrA, qnrC 和 qepA;16SrRNA 甲基化酶基因 armA, rmtA, rmtB, rmtC 和 npmA。扩增目的基因的引物及实验条件参照文献[2,3~6]进行。由上海生工公司完成引物合成。获得序列与 GenBank 中序列进行比对,以证实扩增产物为目的基因片段和确定基因型。

表 1

靶基因 PCR 扩增引物序列

靶基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	参考文献
qnrB	qnrB-F GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	[2]
	qnrB-R TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA		
qnrS	qnrS-F GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	[2]
	qnrS-R TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
qnrD	qnrD-F GGGTTGATTAACTGATAC	311	[3]
	qnrD-R TTCGCACTTTTCTAATATGAC		
qnrA	qnrA-F AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	[2]
	qnrA-R TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
qnrC	qnrC-F GGGTTGTACATTTATTGAATCG	307	[4]
	qnrC-R CACCTACCCATTTATTTTCA		
qepA	qepA-F GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	218	[5]
	qepA-R CTTCTGCCCCGAGTATCGTG		
armA	ArmA-F ATTTTAGATTTTGGTTGTGGC	101	[6]
	ArmA-R ATCTCAGCTCTATCAATATCG		
rmtA	RmtA-F AAATATTCGCATGGTTC	88	[6]
	RmtA-R TCATGTACACAAGCTCTTTCC		
rmtB	RmtB-FACTTTTACAATCCCTCAATAC	171	[6]
	RmtB-R AAGTATATAAGTTCTGTTCCG		
rmtC	RmtC-F CAGGGGTTCACAAAGT	246	[6]
	RmtC-R AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA		
npmA	NpmA-F GGGCTATCTAATGTGGTG	229	[6]
	NpmA-R TTTTATTTCGCTCTCTCGT		

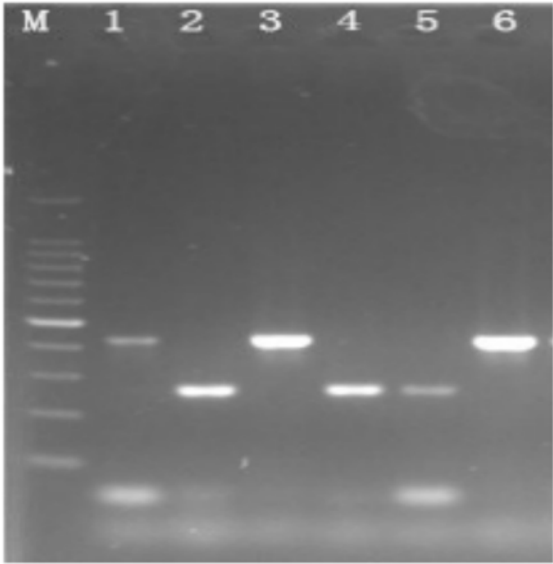
2 结果

2.1 药敏试验结果 临床分离的6株CRKP对氟喹诺酮类和氨基糖苷类表现为不同程度的耐药, kpn142对环丙沙星和左氧氟沙星敏感, 另外5株菌均耐药; 有3株菌对阿米卡星敏感, 分别是kpn23, kpn7659和kpn138, 另外3株菌为耐药。具体药敏结果可参考文献[7]。

2.2 耐药相关基因检测结果 见表2, 图1~2。有1株菌同时扩增到qnrB, qnrD和armA; 6株菌都检测到喹诺酮类相关耐药基因或16SrRNA甲基化酶基因或者同时检测到两类耐药基因。未检测到qnrA, qnrC, qepA, rmtA, rmtB, rmtC和npmA基因。

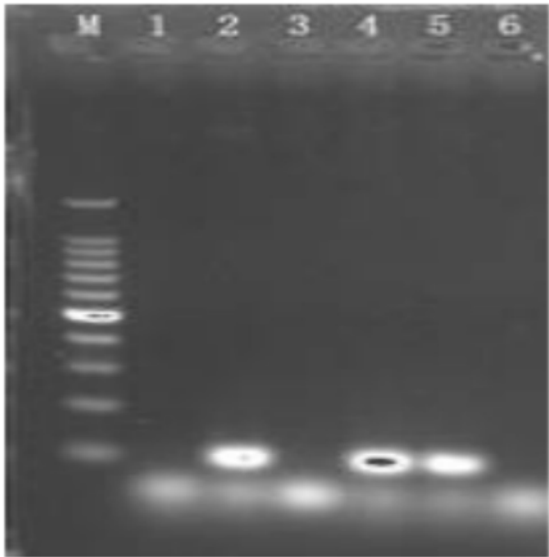
表2 6株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分离株的喹诺酮类相关耐药基因和16SrRNA甲基化酶基因检测

耐药基因		菌株编号					
		kpn23	kpn26	kpn138	kpn142	kpn2099	kpn7659
喹诺酮类耐药基因	bla _{qnrB}	-	+	-	+	+	-
	bla _{qnrS}	+	-	+	-	-	+
	bla _{qnrD}	-	+	+	-	-	-
	bla _{qnrA}	-	-	-	-	-	-
	bla _{qnrC}	-	-	-	-	-	-
	bla _{qepA}	-	-	-	-	-	-
16SrRNA甲基化酶相关耐药基因	bla _{armA}	-	+	-	+	+	-
	bla _{rmtA}	-	-	-	-	-	-
	bla _{rmtB}	-	-	-	-	-	-
	bla _{rmtC}	-	-	-	-	-	-
	bla _{npmA}	-	-	-	-	-	-
	基因数合计	1	3	2	2	2	1



注: M. 100bp ladder DNA 标准分子量; 1~6: 临床分离株。

图1 bla_{qnrS}、bla_{qnrB} 基因 PCR 产物电泳图



注: M. 100bp ladder DNA 标准分子量; 1~6: 临床分离株。

图2 bla_{armA} 基因 PCR 产物电泳图

3 讨论 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)通常对青霉素类、头孢菌素类、β-内酰胺类复合药物、氨基糖苷、碳青霉烯类等抗生素均表现为耐药, 课题组对临床分离的6株CRKP进行了β-内酰胺类耐药相关机制的初步研究, 发现这6株CRKP同时携带ESBLs, AmpC酶和碳青霉烯酶基因, 并且对所有β-内酰胺类的抗生素高度耐药^[7]。同时也发现这6株CRKP对氟喹诺酮类和氨基糖苷类也表现

出不同程度的耐药。这两类药物是临床上应用较为广泛的两大抗生素药物, 然而, 随着这两种药物在临床发挥巨大抗菌作用的同时, 对其耐药的菌株也逐年增加。课题组对氟喹诺酮类和氨基糖苷类的相关耐药基因也进行了检测研究。

氟喹诺酮类抗生素对肺炎克雷伯菌具有较好的抗菌作用, 因而被广泛应用于临床。但是, 随着抗生素的大量使用, 肺炎克雷伯菌对氟喹诺酮类抗

生素的耐药性也越来越严重,耐药率已高达60%~70%^[8]。此次研究的6株CRKP药敏结果显示:环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别是83.3%和83.3%,耐药率均超过50%。据报道,多种革兰阴性杆菌中都存在有qnr基因,包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌等。关于肺炎克雷伯菌中质粒介导的qnr基因的报道也比较多。李娟等^[9]人对37株肺炎克雷伯菌中质粒介导氟喹诺酮类耐药基因qnr进行研究,发现其阳性率为18.92%,其主要型别为qnrS。而CRKP中qnr基因存在情况如何呢?本次6株CRKP,仅有一株菌对环丙沙星和左氧氟沙星敏感。对6株CRKP进行喹诺酮相关耐药基因检测,发现qnrB, qnrS和qnrD基因阳性率分别为50%, 50%和33.3%,未检测到qnrA, qnrC和qepA。6株CRKP对氨基糖苷类抗生素的耐药率也超过了50%。有研究报道^[10],肺炎克雷伯菌可获得armA或rmtB型16SrRNA甲基化酶基因,造成对所有的氨基糖苷类抗生素耐药。杭亚平等^[11]对29株CRKP进行检测,发现9株armA阳性,而本次研究的6株CRKP中就有3株armA阳性。armA阳性株对氨基糖苷类抗生素的耐药率明显高于armA阴性菌株。尤其是对阿米卡星的耐药率达100%,但armA阴性菌株对阿米卡星的耐药率只有5.3%^[11]。本次6株CRKP有3株菌检出armA,药敏显示对阿米卡星均耐药,另外3株armA阴性,药敏显示对阿米卡星均敏感,与杭亚平等^[11]研究结果一致。

CRKP对β-内酰胺类抗生素广泛耐药,此时氟喹诺酮类及氨基糖苷类抗生素成为治疗该类细菌的一个选择,但是,分析本次分离的6株CRKP药敏特点,这两类抗生素的耐药情况也很严重,呈现多药耐药的特点,通过检测耐药基因发现,氟喹诺酮类及氨基糖苷类抗生素耐药与喹诺酮类耐药基因和16SrRNA甲基化酶基因同时存在有关,但是本次研究存在菌株数量较少的局限,若大范围检测,是否还存在其他的耐药特点和机制,也是课题组进一步研究的方向。

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] Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(2):394-397.
- [3] Kim HB, Park CH, Kim CJ, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2):639-645.
- [4] Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, et al. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8):2992-2993.
- [5] Zhao JY, Dang H. Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China[J]. Microb Ecol, 2012, 64(1):187-199.
- [6] Bercot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16SrRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 71(4):442-445.
- [7] 张丽, 朱元祺, 张小兵, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(23):5734-5736, 5745.
Zhang L, Zhu YQ, Zhang XB, et al. Detection of genotypes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2014, 24(23):5734-5736, 5745.
- [8] Ma JY, Zeng ZL, Chen ZL, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2):519-524.
- [9] 李娟, 李从容, 黄俊, 等. 肺炎克雷伯菌中质粒介导耐氟喹诺酮类耐药基因qnr的流行现状及耐药特征[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(4):28-29.
Li J, Li CR, Huang J, et al. Prevalence of qnr gene of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Mod Lab Med, 2008, 23(4):28-29.
- [10] Yu F, Wang L, Pan J, et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: coexistence of rmtB and armA genes in the same isolate[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 64(1):57-63.
- [11] 杭亚平, 宁长秀, 汪红, 等. 耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌临床分离株中16S rRNA甲基化酶基因的检测[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(4):327-331.
Hang YP, Ning CX, Wang H, et al. Detection of 16S rRNA methylase genes in clinical isolates carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2014, 30(4):327-331.