

114株耐碳氢酶烯肺炎克雷伯杆菌耐药表型及基因分析^{*}

湖南省宁乡市人民医院 刘拥荣 贺立飞^{*} 余亚敏 熊飞良 邓宁 赵巧, 宁乡 410600

摘要 目的:分析114株耐碳氢酶烯肺炎克雷伯杆菌(CRKP)的耐药表型与基因型,为控制耐碳氢酶烯肺炎克雷伯杆菌传播及临床治疗提供依据。方法:选取住院患者痰样本分离的114株CRKP,采用VITECK2全自动细菌鉴定仪进行菌种鉴定并验证其对碳青霉烯的敏感性。采用改良碳青霉烯灭活法(mCIM法)检测CRKP的耐药表型;采用PCR法检测碳氢酶烯酶blaKPC、blaNDM、blaIMP、blaVIM、blaOXA-4耐药基因。结果:114株CRKP经mCIM法检测阳性率为95.61%,耐药表型均为KPC型。耐药菌对青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类药物的耐药率均在95%~100%;对氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类和氯霉素类药物的耐药率分别为70%~75%、82%~87%、90%~95%和80%~84%(均 $P < 0.05$)。经PCR检测,blaKPC基因阳性检出率为100%。脉冲凝胶电泳(PFGE)分子分型共分为13个谱型,优势型别为KPN01.005型(35株),各菌株间相似性系数达92.0%以上。结论:宁乡市人民医院CRKP的耐药十分严重,与其携带blaKPC耐药基因密切相关。应加强细菌耐药性监测和医院感染的监控。

关键词 耐药菌;肺炎克雷伯杆菌;耐药表型;基因分析

中图分类号 R378.99⁺⁶ 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20210109

Drug-resistant phenotype and gene analysis of 114 strains of hydrocarbon-resistant Klebsiella pneumoniae LIU Yong-rong, He Li-fei^{*}, Yu Ya-min, XIONG Fei-liang, DENG Ning, ZHAO Qiao. People's Hospital of Ningxiang City, Ningxiang 410600, China

Abstract Objective: To analyze the drug-resistant phenotypes and genotypes of 114 strains of hydrocarbon-resistant Klebsiella pneumoniae (CRKP) to provide evidence for the control of the transmission and clinical treatment of K. pneumoniae. Methods: 114 CRKP strains isolated from sputum samples of hospitalized patients were selected, and VITECK2 automatic bacteria identification instrument was used to identify the strains and verify their drug sensitivity to carbapenem. The modified carbapenem inactivation method (mCIM) was used to detect the drug resistance phenotype of CRKP. The PCR was used to detect the resistance genes of blaKPC, blaNDM, blaIMP, blaVIM, and blaOXA4. Results: The positive rate of 114 CRKP strains detected by mCIM was 95.61%, and the drug-resistant phenotypes were all KPC type. The drug resistance rates of drug-resistant bacteria to penicillins, cephalosporins and carbapenems were all 95%-100%. The drug resistance rates to aminoglycosides, quinolones, tetracyclines and chloramphenicol drugs were 70% to 75%, 82% to 87%, 90% to 95%, and 80% to 84% respectively (all $P < 0.05$). After PCR, the positive detection rate of blaKPC was 100%. Pulse gel electrophoresis (PFGE) molecular typing was divided into 13 spectral types, the dominant type was KPN01.005 (35 strains), and the similarity coefficient between strains was over 92.0%. Conclusion: The drug resistance of CRKP in our hospital is very serious, which is closely related to the blaKPC resistance gene. The surveillance of bacterial resistance and hospital infection should be strengthened.

Key words Drug-resistant bacteria; Klebsiella pneumoniae; Drug-resistant phenotype; Gene analysis

碳青霉烯类抗生素是抗菌谱最广、抗菌活性最强的一类非典型 β -内酰胺类抗菌药物^[1],因其对 β -内酰胺酶稳定以及毒性低等特点,曾被认为是治疗肺炎克雷伯杆菌感染最有效的药物。但近年来,随着碳青霉烯类抗生素的广泛应用,细菌耐药性也不

断增加。自1996年美国北卡罗来纳州首次报道耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌(hydrocarbonase-resistant Klebsiella pneumoniae, CRKP)以来^[2],肺炎克雷伯杆菌(Klebsiella pneumoniae, KPN)引起的医院感染逐年增高,且多重耐药包括耐碳氢酶烯类的菌株不断增加,甚至出现暴发流行^[3-5]。本研究对114株CRKP菌株进行药敏分析,以明确其耐药机制,指导临床合理使用抗菌药物。

^{*}基金项目:长沙市科技计划项目(No:kq1801189)

^{*}通信作者:贺立飞, E-mail: hlfei6907@163.com

材料与方 法

菌株来源 选取湖南省宁乡市人民医院 2016 年 1 月~2018 年 12 月收治的住院患者的痰样本进行菌株分离培养。所有痰样本培养前先进行涂片,采用显微镜检观察,白细胞与上皮细胞比例 > 2.5 者为合格痰样本,4℃ 冰箱保存以进行菌株分离培养等相关研究^[6,7]。

仪器与试剂 VITECK2 Compact 全自动细菌鉴定仪购自法国梅里埃生物公司;ABI2720 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司;InGenius 凝胶成像分析系统购自英国 Syngene 公司;DYY-7 型点用仪购自北京六一仪器厂。2 × Taq Master Mix、D2000 DNA Marker 均购自北京百泰克生物技术有限公司;胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)购自青岛海博生物技术有限公司;美罗培南药敏纸片(10μg/片)购自英国 OXIOD。所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

方法

菌株鉴定: 细菌分离及鉴定以《全国临床检验操作规程》为标准,并经 VITECK2 Compact 全自动微生物分析仪对菌株进行鉴定。

碳青霉烯酶表型检测: 采用 2017 年美国临床实验室标准化委员会(national committee for clinical laboratory, CLSI)推荐的改良碳青霉烯灭活法(mCIM 法),具体操作步骤如下。用 1 μL 接种环刮取 1 环血琼脂平板上过夜,培养的纯菌落于 2 mL TSB 中,涡旋振荡 10~15 s;将美罗培南药敏纸片(10μg)浸入菌悬液中,35℃ 温育 4 h;制备 0.5 麦氏浊度的质控菌株 ATCC 25922 菌悬液;用无菌棉签蘸取菌悬液均匀涂布于 MH 琼脂平板上;用无菌镊子将药敏纸片从菌悬液中取出,贴在该 MH 琼脂平板上,35℃ 孵育 18~24 h。结果判读:抑菌圈直径 6~15 mm 或在 16~18 mm 内存在菌落,则碳青霉烯酶阳性;抑菌圈 ≥ 19 mm,则碳青霉烯酶阴性;抑菌圈直径在 16~18 mm 为中性。

碳青霉烯酶基因分析: 参照文献委托上海生工生物工程技术有限公司合成。共设计 PCR 引物 5 组,5 组引物序列和目标长度见表 1。

采用 PCR 法检测 blaKPC、blaNDM、blaIMP、blaVIM、blaOXA-48 基因。PCR 反应体系配制如下:首先加入 2 × Taq PCR Master Mix 10.0 μL,随后加入上下游引物各 1.0 μL、DNA 模板 2.0 μL,最后加无菌双蒸水 6 μL 补足至 20 μL。设置反应条件:94℃

表 1 碳青霉烯酶基因 PCR 引物序列

扩增基因型	引物碱基序列(5'→3')	产物长度(bp)
KPC	GCTACACCTAGCTCCACCTTC ACAGTGGTTGGTAATCCATGC	920
NDM	GCCAGCTCGCACCGAAT GAACGCCGCACCAAACG	566
IMP	GAATAGAATGGTTAACTCTC CCAAACCACTACTAGTTATC	188
VIM	GTTTGGTCCGATATCGCAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382
OXA-48	GATGTGTCATAGTATTCGTCG TCACAACAATAAAAGCACTG	422

预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,退火条件参照文献,72℃ 延伸 30 s,39 个循环;72℃ 再延伸 7 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳 100 V 40 min 后,观察结果并拍照,进行 PCR 阳性产物测序比对分析。

统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计学软件,计数资料用百分数(%)表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

CRKP 药物敏感性 氨苄西林的耐药率最高,明显高于链霉素、环丙沙星、氯霉素的耐药率($P < 0.05$),链霉素的耐药率最低(均 $P < 0.05$),见表 2。

表 2 114 株 CRKP 的药物敏感性(%)

类型	药物	耐药率
青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类	氨苄西林	97.73 ± 2.34
氨基糖苷类	链霉素	72.58 ± 1.84*
喹诺酮类	环丙沙星	83.27 ± 2.49* [△]
四环素类	多西霉素	91.38 ± 1.45 [△]
氯霉素类	氯霉素	83.27 ± 2.26* [△]

注:与氨苄西林比较,* $P < 0.05$;与链霉素比较,[△] $P < 0.05$

mCIM 试验及碳青霉烯酶基因分析 114 株 CRKP 中有 109 株(95.61%) mCIM 试验为阳性,109 株 CRKP 均扩增出目的条带,通过测序和在线比对,其耐药基因型全部为 blaKPC 型,检出率为 100%。

脉冲场凝胶电泳(PFGE)及聚类结果 114 株 CRKP 通过 PFGE 后得到 15 条分子量大小均为 50~700 kb 的电泳条带;受试菌株经过限制性内切酶 XbaI 酶切后,共得到 13 个 PFGE 谱型,其中以 KPN01.005 为优势谱型,占 30.7%,其次分别为 KPN01.009 和 KPN01.0012,分别占 24.6% 和 20.2%,见表 3。通过聚类分析,上述菌株呈现高度的相似性,相似性系数达 92% 以上,见图 1。

表3 114株CRKP的PFGE谱型分布

PFGE 分型	菌株(例)	构成比(%)
KPN01.001	2	1.8
KPN01.002	1	0.9
KPN01.003	2	1.8
KPN01.004	3	2.6
KPN01.005	35	30.7
KPN01.006	6	5.3
KPN01.007	4	3.5
KPN01.008	2	1.8
KPN01.009	28	24.6
KPN01.0010	3	2.6
KPN01.0011	3	2.6
KPN01.0012	23	20.2
KPN01.0013	2	1.8

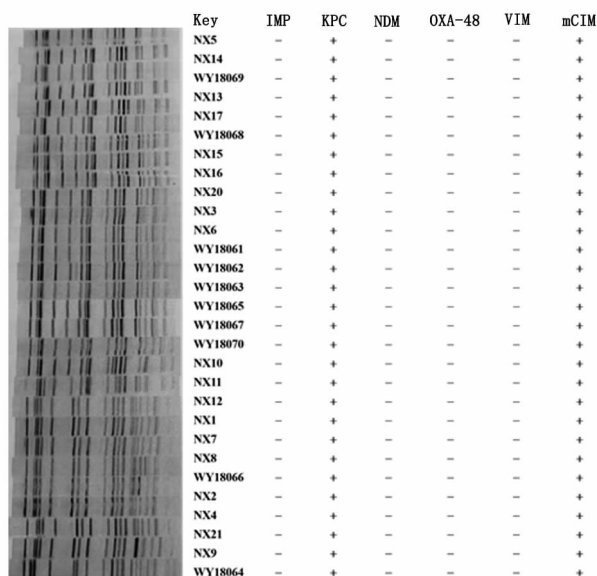


图1 菌株聚类分析

讨论

KPN已成为院内感染最常见的条件致病菌。由于抗菌药物的大量使用,在选择性压力下多重耐药KPN菌株不断出现。CRKP在世界上多个国家及地区均被检出,且呈高度扩散趋势。欧洲国家耐药监测网的数据显示,CRKP在2009~2012年从2.2%骤升至19.4%^[8]。国内,自2007年在浙江省首次报道CRKP以来,已在多个地区或医院有类似报道^[9,10]。本文中114株CRKP对青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类药物的耐药率均在95%~100%;对氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类和氯霉素类药物的耐药率分别为70%~75%、82%~87%、90%~95%和80%~84%(均P<0.05)。经mCIM法检测阳性率为95.61%,耐药表型均为KPC型。

上述KPC耐药基因检测blaKPC阳性,表明痰液分离的CRKP具有较高的耐药率,应该引起重视。

近几年,CRKP不断增加,碳青霉烯酶能水解几乎所有的β-内酰胺类抗菌药物,临床上可治疗此类感染的仅有多粘菌素和替加环素,但也已出现了耐药菌株。众多研究表明,碳青霉烯类抗生素耐药涉及多种因素,包括产生各种碳青霉烯酶、外膜蛋白的缺失、外排泵的过表达等^[11~13]。其中以产碳青霉烯酶为主,该类酶包括按Ambler分类中的A、B、D类。其中A类中以KPC型碳青霉烯酶为主,并于2001年由美国研究者首次报道,国内于2007年首次报道在1株KPN中检测到KPC-2。B类又称为金属β-内酰胺酶,其活性部位结合有锌离子,催化活性依赖金属离子。迄今为止,已经确定的金属β-内酰胺酶除IMP、VIM、GIM、SIM、SPM等外,还包括最近发现NDM-1^[14],该型已经被许多国家和地区报道。OXA-48属于Ambler分类中的D类酶,不被克拉维酸抑制,是近年来发现的一种新的碳青霉烯类水解酶,编码该类酶的基因位于质粒等可移动遗传因子上,可在细菌间广泛传播,该型在国外的绝大多数国家和地区均有报道,呈播散流行趋势^[15]。

mCIM试验是2017年CLSI推荐用于碳青霉烯酶表型确认的一种新型方法,被认为具有非常高的敏感性和特异性^[16]。本研究显示,114株CRKP经mCIM法检测阳性率为95.61%,耐药表型均为KPC型。本研究中blaKPC基因阳性检出率为100%。PFGE分子分型共分为13个谱型,优势型别为KPN01.005型,各菌株间相似性系数达92.0%以上。因此,本院CRKP的耐药十分严重,与其携带blaKPC耐药基因密切相关。说明产KPC是导致其耐药的最主要原因,与Vera-Leiva等^[17]、Wang等^[18]的研究结果一致。

因此,应加强监管抗菌药物的使用,加强临床用药过程对交叉感染的防护措施,以预防和控制耐药菌株的播散并及时监测致病菌的变化。

参考文献

- 1 Chang LW, Buising KL, Jeremiah CJ, et al. Managing a nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: an early Australian hospital experience [J]. Intern Med J, 2015, 45 (10): 1037-1043.
- 2 Mackenzie FM, Forbes KJ, Dorai-John T, et al. Emergence of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Lancet, 1997, 350 (9080): 783-789.
- 3 Mammina C, Aleo A, Bonura C, et al. Multiclonal emergence of car-

- bapenam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Tuscany, Italy [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(6): 576-578.
- 4 Ridolfo AL, Rimoldi SG, Pagani C, et al. Diffusion and transmission of carbapenam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the medical and surgical wards of a university hospital in Milan, Italy [J]. *J Infect Public Health*, 2016, 9(1): 24-33.
 - 5 Cristina ML, Alicino C, Sartini M, et al. Epidemiology management and outcome of carbapenam-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in hospitals within the same endemic metropolitan area [J]. *J Infect Public Health*, 2018, 11(2): 171-177.
 - 6 Lu MC, Tang HL, Chiou CS, et al. Clonal dissemination of carbapenamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Two distinct sub-lineages of Sequence Type 11 carrying blaKPC-2 and blaOXA-48 [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 52(5): 658-662.
 - 7 Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al. Colistin Resistance in Carbapenam-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory Detection and Impact on Mortality [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(6): 711-718.
 - 8 Hajje Z, Gharsallah H, Naija H, et al. Successful treatment of a carbapenam-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla OXA-48, bla VIM-2, bla CMY-2 and bla SHV- with high dose combination of imipenem and amikacin [J]. *IDCases*, 2016, 4(1): 10-12.
 - 9 Sisto A, D'Ancona F, Meledandri M, et al. Carbapenam non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* from micronet network hospitals, Italy, 2012 to 2015 [J]. *Euro Surveill*, 2015, 17(33): 826-832.
 - 10 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(5): 481-491.
 - 11 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2017年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2018, 18(5): 325-333.
 - 12 李玉雪, 郭玉梅. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌的耐药表型及同源性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(17): 2572-2575.
 - 13 Carcas AJ, Sevillano D, Gonzalez N, et al. Evaluating the optimal time for amikacin administration with respect to haemodialysis using an in vitro pharmacodynamic simulation against epidemic nosocomial OXA-48 producing *Klebsiella pneumoniae* ST405 strains [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2019, 54(83): 73-84.
 - 14 Guo L, An J, Ma Y, et al. Nosocomial Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e160754.
 - 15 Hernandez-Garcia M, Perez-Viso B, Leon-Sampedro R, et al. Outbreak of NDM-1-CTX-M-15-DHA-1 producing *Klebsiella pneumoniae* high-risk clone in Spain due to an undetectable colonized patient from Pakistan [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2019, 754(82): 172-179.
 - 16 Wang YC, Tang HL, Liao YC, et al. Cocarriage of Distinct bla KPC-2 and bla OXA-48 Plasmids in a Single Sequence Type 11 Carbapenam-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolate [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(6): 6353-6361.
 - 17 Vera-Leiva A, Barria-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase main carbapenamase in Enterobacteriaceae [J]. *Rev Chilena Infectol*, 2017, 34(5): 476-484.
 - 18 Wang Q, Wang X, Wang J, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Carbapenam-resistant Enterobacteriaceae: Data From a Longitudinal Large-scale CRE Study in China (2012-2016) [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(suppl_2): S196-S205.

(2019-08-23 收稿 2020-11-30 修回)

医学名词规范使用的注意事项

1. 严格运用全国科学技术名词审定委员会审定公布的名词, 不应一义多词或一词多义。
2. 未经审定公布的词语, 可选用中国医学科学院医学情报研究所最新版《中文医学主题词表(CMeSH)》、《医学主题词注释字顺表》及中医古籍出版社的《中国中医药学主题词表》中的主题词。
3. 尚无统一译名的名词术语, 于文内第1次出现时注明原词或注释。
4. 中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和中国药典委员会编写的《中国药品通用名称》为准, 不得使用商品名。
5. 中药药典未收录者附注拉丁文。
6. 冠以外国人名体的征、病名等人名后不加“氏”或“s”, 如帕金森病; 若为单字名, 则保留“氏”字, 如福氏杆菌、尼氏染色(Nissl's staining)。
7. 名词术语一般应用全称, 若全称较长且反复使用, 可用缩略语或简称, 第1次出现时写出全称, 并加括号写出简称, 后文用简称。已通用的中文简称可用于文题, 但在文内仍应写出全称, 并注简称。
8. 中国地名以最新公布的行政区划名称为准, 外国地名的译名以新华社公开使用的译名为准。
9. 复合名词用半字线连接, 如下丘脑-垂体-肾上腺轴。
10. 英文名词除专有名词(国名、地名、姓氏、协作组、公司、会议等)首字母大写外, 其余均小写。德文名词首字母大写。