

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.15.001

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因检测与分子流行病学研究*

杨 雪¹, 刘 琳², 赵 丹², 张湘燕^{2△}

(1. 贵州医科大学, 贵阳 550000; 2. 贵州省人民医院, 贵阳 550000)

[摘要] 目的 对耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)耐药基因的携带情况与分子流行病学特征进行分析,为研究细菌耐药提供参考依据。方法 收集 2016 年 2 月至 2017 年 2 月临床分离到的 37 株 CRKP 菌株,采用微量肉汤稀释法检测菌株药物敏感性;改良霍奇实验及亚胺培南-EDTA 协同法检测碳青霉烯酶表型;PCR 检测 KPC-2、VIM、NDM-1、OXA-48 等耐药基因,进行测序及网上比对确定基因型;采用多位点序列分型(MLST)对菌株进行遗传相关性研究,MEGA 软件构建进化树、eBURST 软件分析亲缘关系。结果 37 株菌株对常用抗菌药物耐药性均在 90% 以上。所有菌株均检测到 KPC-2 基因,3 株同时携带 NDM-1 基因,其余基因均为阴性。MLST 分型为 ST11 有 25 株,ST524 2 株,ST789 4 株,ST35、ST29、ST1066 及 ST244 各 1 株,另外有 1 个新的 ST 型(2 株)已被 PubMlst 数据库确认收录并命名为 ST2792。ST11 型组及非 ST11 型组在年龄、性别、感染途径、抗菌药物使用情况等方面差异无统计学意义($P < 0.05$)。结论 携带 KPC-2 基因是导致细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因,ST11 型是最流行的克隆型。

[关键词] 克雷伯菌,肺炎;碳青霉烯类抗菌药物;耐药基因;多位点序列分型;分子流行病学

[中图法分类号] R378.99+6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)15-1977-04

Detection of drug resistance gene of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and molecular epidemiological study*

YANG Xue¹, LIU Lin², ZHAO Dan², ZHANG Xiangyan^{2△}

(1. Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550000, China;

2. Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the drug resistance gene carrying situation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) and molecular epidemiological characteristics to provide a reference basis for studying the bacterial drug resistance. **Methods** A total of 37 clinically isolated strains of CRKP were collected from February 2016 to February 2017. The broth microdilution method was used to determine the strain drug susceptibility. The phenotypes of CRKP carbapenemases were detected by using the modified Hodge test and EDTA-imipenem synergistic method. The drug resistance genes of KPC-2, NDM-1 and OXA-48 were detected by PCR. The sequencing and internet comparison were performed for determining the genotype. The multilocus sequence typing (MLST) was adopted to conduct the genetic correlation study on the strains. The evolutionary trees were constructed by using the MEGA software and the genetic relationship was analyzed by using the eBURST software. **Results** The drug resistance to commonly used antibacterial drugs was over 90%. The KPC-2 gene was detected in all strains, 3 strains simultaneously carried the NDM-1 gene, and other genes were negative. In MLST typing, 25 strains were ST11, each 2 strains were ST524 and ST789, each 1 strain was ST35, ST29, ST1066 and ST244 respectively. Also a new ST type(2 strains) was confirmed by the PubMlst database and named as ST1792. The ST11 type group and non-ST11 type group had no statistical difference in the aspects of the age, sex, infection route and antibiotics use ($P < 0.05$). **Conclusion** Carrying KPC-2 gene is the main cause leading to bacterial resistance to carbapenem and ST11 type is the most popular clone type.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; carbapenems antibacterial drugs; drug resistance genes; multilocus sequence typing; molecular epidemiology

肺炎克雷伯菌是临床最常见的条件致病菌之一,可引起肺炎、尿路感染、败血症、伤口感染、脑膜炎等^[1]。近年来随着抗菌药物的广泛应用,尤其是第 3 代头孢菌素及碳青霉烯类的不合理使用,导致细菌出现严重的耐药性。2015 年我国耐药细菌监测网提供的数据显示,全国肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类的耐药率为 7.6%,各省为 0.5%~20.0%,均较 2014 年有所增加^[2]。耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的感染增加了临床治疗的难度和患者预后风险。本研究收集 37 株 CRKP 菌株,检测相关耐药基因,采用多位点序列分型(MLST)对其进行分子流行病学研究,以揭示其耐药克隆的特征,以期防治 CRKP 的传播提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 随机选取 2016 年 2 月至 2017 年 2 月贵州省人民医院临床分离到的 CRKP,排除同一患者重复菌株,共 37 株。标本来源包括痰液、血液、中段尿、腹腔积液等。菌株经美国 BD 公司 Phoenixm-100 全自动微生物分析系统检测。

1.1.2 主要试剂 药敏纸片及 M-H 平板均购自英国 Oxoid 公司,0.5 mol/L 的 EDTA 溶液为本室所有;2×Taq Master Mix 和离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自北京康维世纪有限公司。所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.1.3 主要仪器 全自动微生物鉴定仪购自美国 BD 公司,PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司,电泳仪购自北京六一仪器厂,凝胶成像仪购自美国 Alpha Innotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定、药敏试验及表型确证 采用 Phoenixm-100 全自动微生物分析系统进行细菌鉴定,用微量肉汤稀释法测定 13 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),结果判定按美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2015 年版标准执行;质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922 及 *K. pneumoniae* 标准菌株 ATCC 700603 均购自卫生部临床检验中心。碳青霉烯类检测参照 CLSI 介绍使用改良霍奇实验。金属 β-内酰胺酶检测采用亚胺培南+EDTA 复合纸片的双纸片协同法。

1.2.2 耐药基因检测 PCR 法检测 A 类(KPC-2、GES)、B 类(IMP、VIM、NDM-1)和 D 类 OXA-48 耐药基因。参照 GeneBank 中目的基因的标准序列及相关文献设计引物^[3-4]。PCR 反应体系为 50 μL,包括 2×Taq Master Mix 25 μL,上、下游引物各 2 μL,DNA 模板 2 μL,灭菌蒸馏水 19 μL。PCR 反应条件:94 °C

预变性 4 min,94 °C 变性 1 min,退火温度 1 min,72 °C 延伸 1 min,38 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,见表 1。扩增的产物经 1.5%的琼脂糖凝胶中经 110 V 电泳 1 h 后,用凝胶成像系统观察结果并拍照分析。PCR 产物经上海生工生物工程公司完成测序,结果用 BLAST 软件与 Genbank 上已公布的基因序列进行比对。

表 1 耐药基因引物扩增序列及退火温度

引物名称	序列(5'~3')	退火温度(°C)	片段长度(bp)
KPC-2	F:GTTTGTGATTGGCTAAAGG	52	203
	R:TGTGCTTGTCACTCTTGTTA		
IMP	F:TGACGAAGTTATCTGTATTC	60	740
	R:TTAGTTGCTTGGTTTTGATG		
NDM-1	F:CAGCACACTTCTATCTC	54	292
	R:CCGAACCAATCCCCTCTT		
GES	F:GTTTTTGCAATGTGCTCAACG	55	371
	R:TGCCATAGCAATAGGCGTAG		
OXA-48	F:GCGTGTATTAGCCTTATCGG	60	783
	R:TTTTCTGTTTGAGCACTTC		
VIM	F:GATGGTGTGGTTCGCAT	60	390
	R:CGAATGCGCAGCACCAG		

1.2.3 MLST 实验 根据 MLST 网站(http://bigsd-b.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html)提供的引物序列,扩增肺炎克雷伯菌的 7 个管家基因,包括 gapA、infB、mdh、pgi、phoE、rpoB 及 tonB,引物序列及退火温度见表 2。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后拍照并送至上海生工生物工程公司测序。将测序所得到的结果在肺炎克雷伯菌 MLST 数据库官方网站(https://pubmlst.org/bigsd?db=pubmlst_seqdef&set_id=13&page=sequenceQuery)中进行 BLAST 比对,得到每个管家基因的等位基因编号,和数据库中已有序列不能完全比对的,经再次 PCR 及测序后确认为新的等位基因型,将序列及测序文件递交至数据库以获得新的命名。将 7 个管家基因所得到的编号按照 gapA-infB-mdh-pgi-phoE-rpoB-tonB 组合,与 MLST 数据库中已有管家基因谱进行比对,得到每株细菌对应的 ST 型。

1.2.4 MEGA 软件构建进化树、eBURST 软件分析亲缘关系 将本研究获得的等位基因序列数据及 ST 信息使用 MEGA 软件构建进化树、eBURST 软件进行亲缘关系分析。

1.2.5 临床资料的分析 对 37 株细菌的临床资料进行收集整理,包括感染者性别、年龄、基础疾病、感染途径、住院病房、侵入性操作、感染 CRKP 前抗菌药

物使用情况、预后情况、住院时间等,将其分成 ST11 型组及非 ST11 型组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。年龄、住院时间的组间比较采用 *t* 检验,其他项目的组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 管家基因引物扩增序列及退火温度

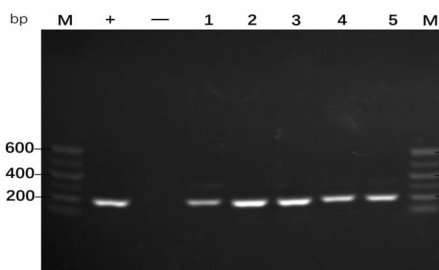
管家基因	序列(5'~3')	退火温度 (°C)	片段长度 (bp)
gapA	F: TGAAATATGACTCCACTCACGG	60	450
	R: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT		
infB	F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG	50	318
	R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC		
mdh	F: CCAAACCTCGTTCAGGTTTCAG	50	477
	R: CCGTTTTTTCCCAGCAGCAG		
pgi	F: GAGAAAAACCTGCTGTACTGCTGGC	50	432
	R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT		
phoE	F: ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	50	420
	R: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT		
rpoB	F: GCGGAAATGGCWGAGAACCA	50	501
	R: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC		
tonB	F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	45	414
	R: ATTTCGCCGGCTGRGCRGAGAG		

2 结 果

2.1 药敏结果 37 株 CRKP 对 13 种药物呈现不同程度的耐药,对碳青霉烯类药物(亚胺培南、美罗培南)呈现不同程度耐药,4~256 μg/mL。对氨基糖苷类的庆大霉素、第 3 代头孢菌素头孢曲松及临床上常用的抗菌药物联合 β-内酰胺酶抑制剂(阿莫西林/克拉维酸、头孢哌酮/舒巴坦)均出现高水平耐药,较为特别的是,哌拉西林/他唑巴坦的耐药率为 91.9%,32~256 μg/mL。而对阿米卡星耐药率稍低,为 89.2%,1~256 μg/mL;对于阿奇霉素、左氧氟沙星、头孢西丁、头孢他啶耐药率均为 97.3%。

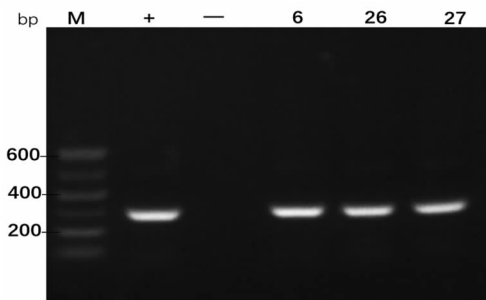
2.2 改良霍奇实验及金属酶检测结果 改良霍奇实验显示 37 株菌株均为阳性,阳性率 100%,金属酶检测结果有 3 株阳性,阳性率为 8.1%。

2.3 耐药基因检测 PCR 检测结果显示,37 株菌株均含有 KPC-2 基因,检出率最高,有 3 株同时含有 NDM-1 基因,均未检出 OXA-48、GES、IMP、VIM 基因。所有阳性基因均经测序,BLAST 软件与 Genbank 上已公布的基因序列进行比对,同源性均大于或等于 99.0%,见图 1、2。



M: Marker600D; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1~5: 菌株编号

图 1 KPC-2 基因扩增产物电泳图

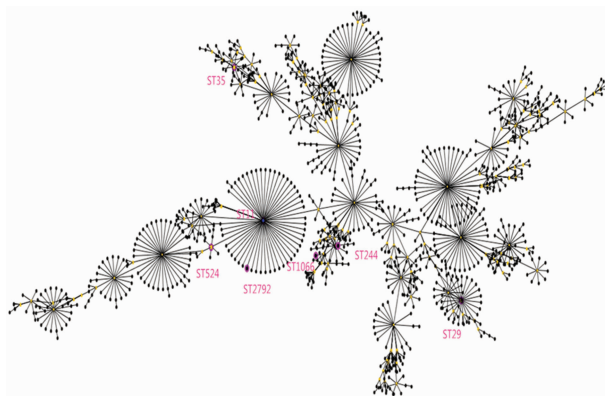


M: Marker600D; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 6、26、27: 菌株编号

图 2 NDM-1 基因扩增产物电泳图

2.4 MLST 及分子遗传学结果分析 37 株菌株经 7 个管家基因的 PCR 结果测序比对,可分为 8 个 ST 型,以 ST11 25 株为主,其次为 ST789 4 株、ST524 2 株,ST35、ST29、ST1066 及 ST244 各 1 株。有 1 个新的 ST 型已被 PubMlst 数据库确认收录并命名为 ST2792(2 株),见图 3、4。

2.5 临床资料分析 通过比较发现,ST11 型组及非 ST11 型组在年龄、性别、感染途径、抗菌药物使用情况及住院时间等差异无统计学意义($P < 0.05$)。但总体而言,感染者年龄大、住院时间长、基础疾病多、入院后有较多的侵入性操作、使用多种抗菌药物治疗都是 CRKP 感染的潜在原因。



图中每一个点代表一个 ST,蓝色代表各自克隆复合体的祖先,黄色代表各自克隆复合体亚群的原始型,标有红色圆圈带有数字的点表示本次研究中所得到的 ST 型,其他黑色的点表示本次试验外数据库中的 ST

图 3 eBURST 软件分析结果

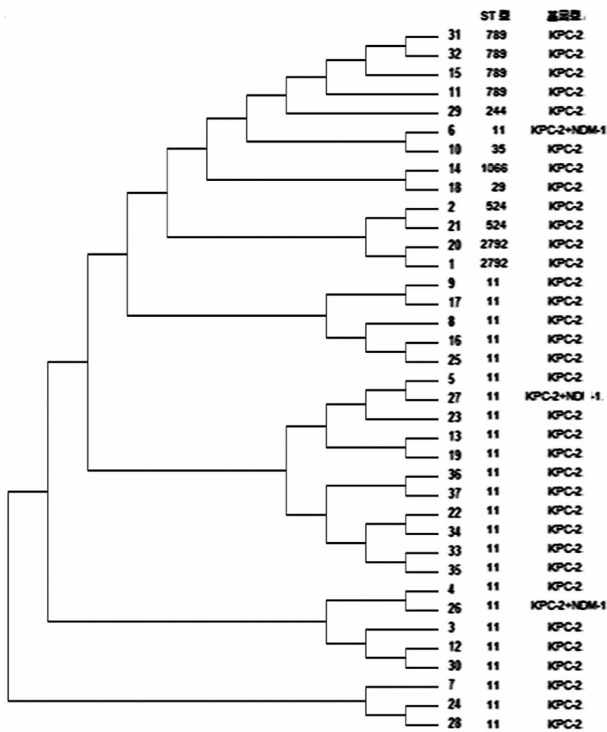


图 4 META 分析构建 37 株菌株进化

3 讨 论

产生碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因^[5]。目前,碳青霉烯酶包括 Ambler 分类中的 A、B、D 类。A 类主要水解除头霉素类以外的几乎所有 β -内酰胺类抗菌药物,包括 KPC、GES 等;B 类能水解青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物,但不能水解氨基糖苷类,主要包括 IMP、VIM、NDM-1 等;D 类为苯唑西林水解酶,主要为 OXA-48。本研究中 37 株菌株改良霍奇实验均为阳性,且经测序发现全部携带 KPC-2 基因,仅有 3 株同时携带 NDM-1 基因,未发现 GES、IMP、VIM、OXA-48 基因,说明 KPC-2 是 CRKP 对碳青霉烯类抗菌药物耐药最主要的原因,与国内外研究一致^[6-8]。携带 KPC-2 基因的 CRKP 菌株对本研究中的 13 种抗菌药物均呈现了高水平耐药,耐药率基本达到 90% 以上,多耐药、高水平耐药情况严重;而同时携带 KPC-2 和 NDM-1 的菌株对包括氨基糖苷类在内的 13 种抗生素全部耐药,但其耐药水平并未高于只携带 KPC-2 基因的耐药菌株,说明同时携带多种碳青霉烯酶基因可以扩大耐药范围,但并不一定提高耐药水平。目前已有研究证实,KPC-2 编码的基因位于 T4401 的转座子上^[9],毛彩萍等^[10]在 KPC-2 基因阳性的菌株中检测到插入序列 ISKpn6,且这两个基因连锁排列;这导致 KPC-2 基因可以通过转座子、插入序列等方式在不同菌株间传播^[11],造成爆发流行。

本研究中 37 株菌株主要来源于重症监护室 ICU (24.3%)、神经内科 ICU (27.0%)、呼吸内科 ICU

(8.1%)、神经外科(10.8%)等;标本类型主要为痰(73%)和尿(11%),可能与患者基础疾病重,住院时间长,使用多种抗菌药物及进行侵入性操作有关^[12]。利用 MLST 对 37 株菌株进行分型及建立进化树,得到包括 ST11 (25 株)、ST524 (2 株)、ST35 (1 株)、ST1066 (1 株)、ST29 (1 株)、ST244 (1 株)、ST789 (4 株)及新发现的 ST2792 (2 株)在内的 8 种 ST 型,其中 ST11 是最流行的克隆型,这也是我国 CRKP 最主要的 ST 型别^[13]。本研究新发现的 ST2792 与最流行的 ST11 有高度的亲缘关系,仅有 1 个管家基因(infB)发生了变异,其携带的耐药基因也与 ST11 一致,且耐药性也无明显差别。将 ST11 型与非 ST11 型菌株的临床资料进行了对比发现,两组在年龄、基础疾病、使用抗生素种类及住院时间等方面差异无统计学意义($P>0.05$),说明 ST11 型并没有感染 CRKP 的特有风险。这与 DHAR 等^[14]的研究结果相似,可能由于这些 ST 型基本上同属一个克隆群,少数位点的变异并不会给临床感染带来特殊风险。

综上所述,本研究耐药基因检测发现 KPC-2 基因为最流行的耐药基因,同时含有 NDM-1 的菌株,也应引起重视。MLST 结果显示 ST11 型为最流行的克隆型,新发现的 ST2792 与其为同一克隆系。在同一区域不同时间可能存在相同基因型或克隆群的 CRKP 的流行,临床及相关检验科室需加强监测,避免耐药菌株的播散。然而,本研究未对其他耐药机制进行检测,可能存在一定的局限性,因此还有待进一步研究和更多实验结果的支持。

参考文献

- [1] ZHANG W L, WANG X J, ZHAO X R, et al. Drug resistance analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing beta-ESBLs[J]. *Med Innov China*, 2015, 12(30): 105-108.
- [2] CARSS. National report on bacterial drug resistance surveillance in 2015[EB/OL]. [2015-12-12]. http://news.medlive.cn/lab/in-foprogress/show88818_246.html.
- [3] YAN J J, HSUEH P R, KO W C, et al. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(8): 2224-2228.
- [4] WALSH T R, WEEKS J, LIVERMORE D M, et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(5): 355-362.
- [5] CHENG L, CAO X L, ZHANG Z F, et al. Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella* (下转第 1985 页)

能的分子作用靶点。

参考文献

- [1] LI C F, PENG W C, SONG X, et al. Anticancer effect of icaritin inhibits cell growth of colon cancer through reactive oxygen species, Bcl-2 and cyclin D1/E signaling[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5):3537-3542.
- [2] WADE M, LI Y C, WAHL G M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2):83-96.
- [3] NAKAJI S, HIRATA N. Evaluation of the viability of hepatocellular carcinoma in the caudate lobe using contrast-enhanced endoscopic ultrasonography after transarterial chemoembolization [J]. *Endoscopic Ultrasound*, 2016, 5(6):390-392.
- [4] 冯潜, 石世代, 周勇, 等. KLF4 调控 MMP9 对原发性肝癌的侵袭迁移能力的影响[J]. *重庆医学*, 2015, 44(22):3025-3029.
- [5] DEFORZH E, VARGAS T R, KROPP J, et al. IMP-3 protects the mRNAs of cyclins D1 and D3 from GW182/AGO2-dependent translational repression[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6):2578-2588.
- [6] WANG N, WANG X B, TAN H Y, et al. Berberine suppresses cyclin D1 expression through proteasomal degradation in human hepatoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11):1899-1911.

(上接第 1980 页)

- pneumoniae ST11 clone with high prevalence of oqxAB and rmtB in a tertiary hospital in China; results from a 3-year period[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2016, 15(1):1-8.
- [6] PITOUT J D, NORDMANN P, POIREL L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(10):5873-5884.
 - [7] WANG L H, WEI D D, WAN L G, et al. Diversity of the genetic environment of the blaKPC-2 gene among *klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a chinese hospital [J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(1):15-21.
 - [8] LOGAN L K, WEINSTEIN R A. The epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae; The impact and evolution of a global menace[J]. *Infect Dis*, 2017, 215(1):S28-36.
 - [9] RIBEIRO V B, ANDRADE L N, LINHARES A R, et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil[J]. *Med Microbiol*, 2013, 62(23):1721-1727.

- [7] FUSTÉ N P, FERREZUELO F, GARÍ E. Cyclin D1 promotes tumor cell invasion and metastasis by cytoplasmic mechanisms[J]. *Mol Cell Oncol*, 2016, 3(5):e1203471.
- [8] MOGHADDAM S J, HAGHIGHI E N, SAMIEE S, et al. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(4):588-593.
- [9] CHE Y F, YE F, XU R L, et al. Co-Expression of XIAP and cyclin D1 complex correlates with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(5):1798-1807.
- [10] 向尹, 杨阳, 周杰. HBV DNA 载量与肝硬化和原发性肝癌的相关性探究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(23):3231-3232.
- [11] KRIEGMAIR M C, BALK M, WIRTZ R, et al. Expression of the p53 inhibitors MDM2 and MDM4 as outcome predictor in muscle-invasive bladder cancer[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10):5205-5213.
- [12] TEVERONI E, LUCA R, PELLEGRINO M, et al. Peptides and peptidomimetics in the p53/MDM2/MDM4 circuitry - a patent review[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(12):1417-1429.
- [13] 丁浩, 张吉翔. 人着色性干皮病基因 D 对 HepG2 细胞 Mdm2 和 Mdm4 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(1):48-52.

(收稿日期:2017-11-02 修回日期:2018-02-01)

- [10] 毛彩萍, 樊瑶, 叶珍, 等. 耐药肺炎克雷伯菌 β -内酰胺酶编码基因及 KPC ISKpn6 连锁检测[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(18):4424-4426.
- [11] 张冀霞, 刘颖梅, 陈宏斌, 等. 我国产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的基因型及流行病学研究[J]. *中华内科杂志*, 2014, 53(2):116-120.
- [12] 豆清娅, 邹明祥, 李春辉, 等. 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌的耐药机制研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(13):2906-2909.
- [13] DAUTZENBERG M J, HAVERKATE M R, BONTEN M J, et al. Epidemic potential of *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST258; a systematic re-view and meta-analysis[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(3):e009971.
- [14] DHAR S, MARTIN E T, LEPHART P R, et al. Risk factors and outcomes for C-arbapenem resistant *klebsiella pneumoniae* isolation, stratified by its multilocus sequence typing: ST258 versus Non-ST258[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2016, 3(1):213-217.

(收稿日期:2017-11-02 修回日期:2018-02-10)