

17 株耐亚胺培南肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌相关耐药基因及分子流行病学分析^{*}

洪 宇, 冯福英[△], 郑宗富, 曾 琦, 张 薇, 罗湘湘(中国人民解放军第四七六医院, 福州 350002)

【摘要】 目的 了解 17 株亚胺培南耐药肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌相关耐药基因及分子流行病学状况。**方法** 采用 Hodge 试验检测碳青霉烯酶表型; 采用 PCR 法检测碳青霉烯酶、I 类头孢菌素酶(AmpC)和超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)耐药基因, 进行测序及网上比对确定基因型; 采用肠杆菌科基因间重复序列(ERIC)和多位点序列分型(MLST)对菌株进行同源性和遗传相关性分析。**结果** 15 株肺炎克雷伯菌检出 KPC-2、TEM-1、SHV 和 CTX-M 型基因, SHV12 和 CTX-M-24 为主要基因亚型; 2 株大肠埃希菌检出 KPC-2 基因, 其中 1 株大肠埃希菌检出 TEM-1 和 CTX-M-24 基因, 另一株大肠埃希菌检出 CMY-42 和 OXA-1 基因; 17 株菌未检测到 IMP、VIM 和 NDM 碳青霉烯酶。15 株肺炎克雷伯菌分为 A、B 和 C 三个 ERIC 类别, 12 株 A 类为 ST11 型, 2 株 B 类为 ST290 和 ST147 型, 1 株 C 类为 ST967 型, 2 株大肠埃希菌是同一 ERIC 类别。**结论** 17 株菌亚胺培南耐药主要与 KPC-2 基因有关, 产 KPC-2 肺炎克雷伯菌在本院神经外科病区呈克隆传播流行, ST11 型为此次流行的主要型别; 17 株菌同时也是产 ESBLs 株或产 ApmC 酶株; 首次在世界范围内发现 ST290 和 ST967 型产 KPC-2 肺炎克雷伯菌; 临床科室应加强院内感染控制措施。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; 大肠埃希菌; 耐药基因; 分子流行病学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.05.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)05-0610-04

Analysis on molecular epidemiology and related drug-resistance genes of 17 strains of imipenem-resistant *K. pneumoniae* and *E. coli*^{*} HONG Yu, FENG Fu-ying[△], ZHENG Zong-fu, ZENG Qi, ZHANG Wei, LUO Xiang-xiang (Department of Clinical Laboratory, 476 Hospital of PLA, Fuzhou, Fujian 35002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the status of molecular epidemiology and related drug-resistance genes in 17 strains of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Methods** The carbapenemase phenotypes were confirmed by the modified Hodge test; PCR was adopted to detect the resistance genes of carbapenemase, AmpC and ESBLs, then DNA sequencing was performed and the genotype was determined by internet comparison; the homology and genetic correlation of isolated strains were detected and analyzed by the enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR(ERIC-PCR) and multiple locus sequence typing (MLST). **Results** KPC-2, TEM-1, SHV and CTX-M genes were found in 15 strains of *K. pneumoniae*, and SHV-12 and CTX-M-24 were predominant genotypes. KPC-2 gene was detected in 2 strains of *E. coli*, one of which also had TEM-1 and CTX-M-24 gene and another had CMY-42 and OXA-1 gene. The carbapenemase genes of IMP, VIM and NDM were not detected in 17 strains. The homology and genetic relationship analysis revealed that the 15 strains of *K. pneumoniae* were divided into the three ERIC kinds of A, B and C, 12 strains of class A were ST11, 2 strains of class B were ST147 and ST290, and only 1 strain of C was ST967; 2 strains of *E. coli* were the same ERIC kind. **Conclusion** The imipenem-resistance of 17 strains is associated with KPC-2 gene, KPC-2-producing *K. pneumoniae* strains had clonal transmission and prevalence in the neurosurgery wards, and ST11 type of *K. pneumoniae* was the predominant clone attributed to this outbreak; 17 strains were the strains of producing ESBLs or AmpC simultaneously; This is the first discovery of KPC-producing *K. pneumoniae* of ST290 and ST967 in worldwide; the control measures of nosocomial infection in clinical departments should be enhanced.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; drug-resistance gene; molecular epidemiology

肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌是主要的院内感染菌, 碳青霉烯类药物是用于治疗肠杆菌科细菌引起感染最为有效的抗菌药物。本文选取 2013 年 10 月至 2015 年 3 月本院住院患者样本中分离的无重复的亚胺培南耐药肺炎克雷伯菌和大肠埃希

菌 17 株, 并对其进行碳青霉烯酶、AmpC 酶和 ESBLs 耐药基因的检测, 肠杆菌科基因间重复序列(ERIC)和多位点序列分型(MLST)的分子流行病学分析, 以了解这 17 株菌相关耐药基因携带和分子流行病学状况, 现将研究结果报道如下。

^{*} 基金项目: 南京军区医药卫生科研课题项目(11MA118); 中国人民解放军第四七六医院院长基金项目(YZJJ201411)。

作者简介: 洪宇, 男, 本科, 技师, 主要从事微生物检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: ffy158@163.com。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 17 株菌分离自 16 位住院患者,一位患者从不同部位分离出 2 株;其中 15 株为肺炎克雷伯菌,2 株为大肠埃希菌;12 株菌分离自神经外科病区,5 株来自其他 3 个科室病区;9 份痰液,4 份尿液,2 份肺泡灌洗液,脑脊液和分泌物各 1 份。ATCC25922(大肠埃希菌),ATCC700603(肺炎克雷伯菌)为质控株;ZY138、ZY54、ZY25 为本实验室保存的分别为 CMY-2、DHA-1、TEM-1 和 CTX-M-14 基因的阳性质控株。

1.2 菌株鉴定及药敏试验 采用美国 BD 公司的 Phoe-nixTM100 革兰阴性杆菌复合板条(BD PhoenixTM NMIC/ID-4)进行菌株鉴定及药物敏感试验。

1.3 细菌基因组模板制备 用 TIANGEN 公司生产的细菌基因组抽提试剂盒(TIANamp Bacterial DNA Kit),抽提菌株的基因组,基因组样品终体积为 100 μL。

1.4 质粒 DNA 模板制备 用 OMEGA bio-tek 公司生产的小量质粒抽提试剂盒(Plasmid Mini Kit I),抽提菌株的质粒,质粒样品终体积为 50 μL。

1.5 改良 Hodge 试验 按 CLSI 文件 M100-S23 方法进行。

1.6 耐药基因检测 均为 PCR 法。按文献[1]方法检测 AmpC 酶和超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)耐药基因;碳青霉烯酶检测引物和条件见表 1,分组采用多重 PCR,出现目的条带,再进行相应条带的全长基因扩增和测序;PCR 试剂采用大连宝生物公司的 TaKaRa Taq™ Hot Version 试剂盒;引物委托伯尚生物技术上海有限公司合成。

表 1 碳青霉烯酶不同基因型 PCR 引物序列及条件

基因名称	引物	序列(5'~3')	产物长度(bp)	温度(℃)
KPC	KPC1	ATCGCCGTCTAGTTCTGCTG	811	58
	KPC2	TCGCTGTGCTTGTCATCCTT		
IMP	IMP1	TCCTAAACACGGCTTGGTGG	340	58
	IMP2	TACGTTATCTGGAGCGTGCC		
VIM	VIM1	TCCACGCACTTTCATGACGA	481	58
	VIM2	TATGCCGATCTGCTACTCG		
NDM	NDM1	CCACGCACTTTCATGACGAC	251	58
	NDM2	ATAGAGCACACTCGCAGACG		
OXA1	OXA1F	ACAGAAGCATGGCTCGAAAGT	190	58
	OXA1R	TTGCTGTGAATCCTGCACCA		
OXA2	OXA2F	GATTTTTTCGATGGGACGGCG	501	58
	OXA2R	ATAGAGCGAAGGATTGCCCG		
OXA10	OXA10F	CCCTACGCAATTATCGGCCT	265	58
	OXA10R	TAAGCTGGCCTTCCAACCAG		
OXA20	OXA20F	GCAATACCTTTTTTGCCTGCG	408	58
	OXA20R	CAGCCTGTTTTTGGCACGTAG		
OXA23	OXA23F	GCCCTGATCGGATTGGAGAA	409	58
	OXA23R	CCCTTGCCCAACCAGTCTTT		
OXA24	OXA24F	TTTGGTTAGTTGGCCCCCTT	215	58
	OXA24R	CTCCACCAACCAGTCAACC		

续表 1 碳青霉烯酶不同基因型 PCR 引物序列及条件

基因名称	引物	序列(5'~3')	产物长度(bp)	温度(℃)
OXA51	OXA51F	CGTGCTTCGACCGAGTATGT	504	58
	OXA51R	AGGCTGAACAACCCATCCAG		
OXA58	OXA58F	AAGTGGGATGGAAAGCCACG	326	58
	OXA58R	TCCCTCTGCGCTCTACATA		
OXA1 ¹	OXA1F	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	669	58
	OXA1R	TCCTGTAAGTGCGGACACAA		

注:1 表示完整 OXA1 基因 PCR 引物。

1.7 ERIC 检测 采用 PCR 法,PCR 条件及判读标准按文献[2]进行。引物 ERIC2:5'-AGA TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'。

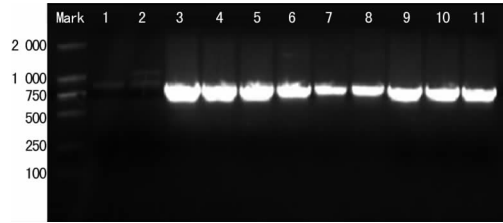
1.8 PCR 产物分析和测序 PCR 产物在含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.0%琼脂糖凝胶中电泳,出现目的条带为阳性,用凝胶成像系统摄像保存后切胶回收纯化,纯化产物直接测序。测序工作委托伯尚生物技术上海有限公司完成,所测序列与 GeneBank 数据库比对以确定基因型。

1.9 MLST 分型 扩增肺炎克雷伯菌 7 个管家基因并进行网上比对及分型,实验方法参照文献[3]进行。

2 结果

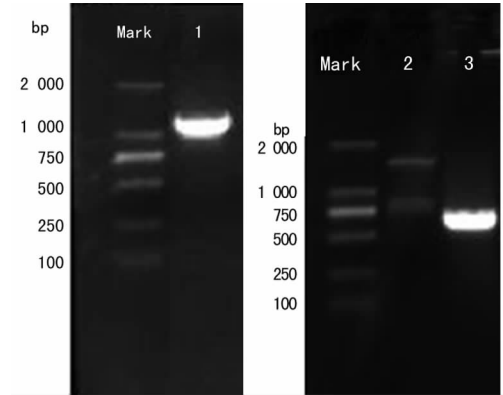
2.1 Hodge 试验结果 15 株肺炎克雷伯菌中 13 株为 Hodge 试验阳性,2 株为阴性;1 株大肠埃希菌 Hodge 试验阳性,另一株为阴性。

2.2 耐药基因检测结果 菌株病区分布及检出相关耐药基因见表 2,部分耐药基因 PCR 产物电泳结果见图 1~2。



注:Mark 表示 DNA 标记物;1~11 表示阳性样本。

图 1 KPC 基因(811 bp)扩增产物电泳图



注:Mark 表示 DNA 标记物;1 表示 330 株;2 表示 297 株;3 表示 330 株。

图 2 CMY、OXA1 扩增产物电泳图

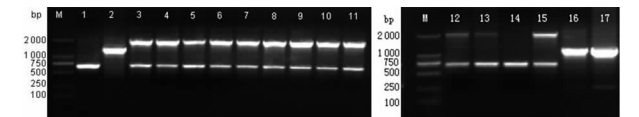
2.3 ERIC-PCR 结果17 株菌 ERIC-PCR 产物电泳结果见图 3;15 株肺炎克雷伯菌分 3 类,A 类 12 株,B 类 2 株,C 类 1 株;2 株大肠埃希菌定为 D 类。

2.4 MLST 分型结果15 株肺炎克雷伯菌 MLST 分型结果见表 3。

表 2 17 株菌病区分布及检出耐药基因分布

菌株	病区	菌种	耐药基因					
			TEM	SHV	CTX-M	KPC	OXA	AmpC
68	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-1	CTXM14	KPC-2	—	—
82	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-27	CTXM14	KPC-2	—	—
113	重症医学	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-31	CTXM24	KPC-2	—	—
121	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
122	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
124	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
248	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
249	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
251	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
252	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
254	神经内科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-11	CTXM24	KPC-2	—	—
289	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
295	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
316	神经外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-11	CTXM14	KPC-2	—	—
329	泌尿外科	肺炎克雷伯菌	TEM-1	SHV-12	CTXM24	KPC-2	—	—
297	神经内科	大肠埃希菌	TEM-1	—	CTXM24	KPC-2	—	—
330	神经内科	大肠埃希菌	—	—	—	KPC-2	OXA1	CMY42

注:—表示无数据。



注:3~13 和 15 为 A 类;1 和 14 为 B 类;2 为 C 类;16~17 为 D 类。

图 3 ERIC-PCR 产物电泳图

表 3 15 株肺炎克雷伯菌 MLST 分型结果

菌株	标本	管家基因型							ST 型
		gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	
68	痰	2	1	1	37	10	1	86	290
82	痰	2	1	19	4	9	4	34	967
113	痰	3	3	1	1	1	1	4	11
121	脓液	3	3	1	1	1	1	4	11
122	痰	3	3	1	1	1	1	4	11
124	痰	3	3	1	1	1	1	4	11
248	痰	3	3	1	1	1	1	4	11
249	痰	3	3	1	1	1	1	4	11
251	痰	3	3	1	1	1	1	4	11
252	痰	3	3	1	1	1	1	4	11
254	痰	3	3	1	1	1	1	4	11

续表 3 15 株肺炎克雷伯菌 MLST 分型结果

菌株	标本	管家基因型							ST 型
		gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	
289	尿	3	3	1	1	1	1	4	11
295	尿	3	3	1	1	1	1	4	11
316	脑脊液	3	4	6	1	7	4	38	147
329	尿	3	3	1	1	1	1	4	11

3 讨 论

肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌可通过产碳青霉烯酶、ES-
BLs、ApmC 或合并膜孔蛋白缺失共同作用而表现出对碳青霉
烯类抗菌药物耐药或敏感性下降^[4-5]。本次通过对相关耐药基
因检测,15 株肺炎克雷伯菌检出 KPC-2 基因,同时检出 TEM-
1、SHV 和 CTX-M 型基因,CTX-M 型有 CTX-M-24 和 CTX-
M-14 亚型,SHV-12 为主要基因亚型,与文献[6-7]报道的以
KPC-2 为主要亚型并同时检出 TEM、SHV 和 CTX-M 型基因的
报道相同;2 株大肠埃希菌检出 KPC-2 基因,其中 1 株大肠
埃希菌检出 TEM-1 和 CTX-M-24 基因,另一株大肠埃希菌检
出 CMY-42 及 OXA-1 基因;2 种 17 株菌未检出 IMP、VIM、
NDM 碳青霉烯酶。耐药基因检测结果揭示 17 株菌携带 KPC-
2 为亚胺培南耐药主要因素,其中 16 株菌是产 ESBLs 酶株,1

株是产 AmpC 酶株;分析株中亚胺培南耐药是否存在膜蛋白的缺失或其他耐药机制的共同作用有待进一步分析,1 株大肠埃希菌未能检测到常见的 TEM-1 和 CTX-M 基因,却检出 OXA 和 CMY 基因,这种不常见的模式有待进一步研究。

不同细菌 ERIC 在基因中的位置不同,ERIC-PCR 通过扩增细菌基因组重复 DNA 片断来获得菌株特异性图谱,以确定菌株间的同源关系;MLST 是一种基于核酸序列的细菌分型方法,通过 PCR 扩增多个管家基因内部片段并测定其序列,分析菌株的变异,通过将实验结果提交数据库与已知流行株进行比较,分析不同时间不同地区临床分离株的遗传相关性。通过 ERIC 和 MLST 分型实验,15 株肺炎克雷伯菌分为 A、B 和 C 三个 ERIC 类别,A 类有 12 株,为本次院内流行的克隆株,均为 ST11 型,与国内其他地区和中国台湾地区^[8]报道的流行 ST 型相同;B 型和 C 型为散发,ST 型分别为 ST290、ST147 和 ST967,ST290 和 ST967 产 KPC-2 肺炎克雷伯菌是世界范围内首次发现。2 株大肠埃希菌 ERIC 类别相同,未做 ST 分型。菌株的病区分布可见此次流行传播主要在神经外科病区,表明相关科室医院感染控制措施有待加强。

本次研究可以看出,本院自 2013 年 10 月起出现的 17 株亚胺培南耐药主要与 KPC-2 型碳青霉烯酶有关,其中携带 KPC-2 肺炎克雷伯菌在本院神经外科病区呈克隆传播流行,ST11 型为此次流行的主要型别;17 株菌同时也是产 ESBLs 株或产 ApmC 酶株;首次在世界范围内发现 ST290 和 ST967 产 KPC-2 肺炎克雷伯菌;本院未出现产 KPC 大肠埃希菌克隆的流行传播;临床科室应加强院内感染控制措施,避免耐药株的扩散传播。

参考文献

[1] 冯福英,胡望平,杨湘越,等.耐头孢西丁革兰阴性杆菌高

(上接第 609 页)

al. Position paper: breast cancer screening, diagnosis, and treatment in Denmark[J]. Acta oncol, 2014, 53(4): 433-444.

[2] Zimmermann T. Intimate relationships affected by breast cancer: interventions for couples[J]. Breast Care, 2015, 10(2): 102-108.

[3] 高润芳. 乳腺癌易感基因突变相关性乳腺癌的治疗及预后[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(1): 65-68.

[4] Anderson E, Berg J, Black R, et al. Prospective surveillance of women with a family history of breast cancer: auditing the risk threshold[J]. Brit J Cancer, 2008, 98(4): 840-844.

[5] Tunin R, Uziely B, Woloski-Wruble AC. First degree relatives of women with breast cancer: who's providing information and support and who'd they prefer[J]. Psycho-oncology, 2010, 19(4): 423-430.

[6] Bebis H, Altunkurek SZ, Acikel C, et al. Evaluation of breast self-examination(BSE) application in first and second degree relatives of patients with breast cancer[J]. A-

产 AmpC 酶发生率及基因型与耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(6): 601-604.

[2] 冯福英,张亚彬,苏丽萍,等.革兰阴性杆菌菌种分布及耐药性和分子流行病学研究[J]. 福州总医院学报, 2007, 22(3): 176-178.

[3] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 4178-4182.

[4] 宁长秀,胡龙华,汪红,等.南昌 4 家教学医院碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药机制及同源性分析[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(4): 306-310.

[5] 梁权辉,徐韞健.耐碳青霉烯肺克雷伯菌和大肠埃希菌耐药机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2): 165-167.

[6] 甘龙杰,吴秀凤,高丽钦,等.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌基因型检测及同源性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(3): 316-318.

[7] 高丽华,齐艳,吕凌云.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌多重 β -内酰胺酶基因型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6): 1426-1428.

[8] Wang JT, Wu UI, Lauderdale TL, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Taiwan[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121668.

(收稿日期:2015-07-25 修回日期:2015-09-20)

sian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(8): 4925-4930.

[7] 王萍玉,丁宁,候超. 山东地区女性乳腺癌知识的认知情况调查[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(9): 2104-2107.

[8] Dieterich M, Stubert J, Reimer T, et al. Influence of lifestyle factors on breast cancer risk[J]. Breast care, 2014, 9(6): 407-414.

[9] Fuller MS, Lee CI, Elmore JG. Breast cancer screening: an evidence-based update[J]. Med Clin North Am, 2015, 99(3): 451-468.

[10] 杨越,杨学松,郭学君,等. 丽江市妇女对乳腺癌认知度 973 例调查报告[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(9): 42-45.

[11] 王艳丽,王艳华. 国内开展护理健康教育的研究进展[J]. 中国继续医学教育, 2015, 7(3): 124-125.

[12] Dodd JM, Ahmed S, Karnon J, et al. The cost-effectiveness of providing antenatal lifestyle advice for women who are overweight or obese: the limit randomised trial[J]. BMC Obes, 2015, 2: 14.

(收稿日期:2015-06-28 修回日期:2015-09-18)