

• 论 著 •

新生儿耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药性及耐药基因研究<sup>\*</sup>黄维真, 梁军荣, 王双杰, 张 清, 唐银琳, 黄昌国, 黄丽英, 潘新年<sup>△</sup>

(广西壮族自治区妇幼保健院, 南宁 530021)

**摘要:**目的 研究临床分离自新生儿的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药性及碳青霉烯酶耐药基因类型。方法 收集 2013 年 12 月至 2015 年 12 月南宁市 2 家妇幼保健院住院新生儿临床分离碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌 8 株。使用生物梅里埃公司的 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定仪对细菌进行鉴定以及菌株最低抑菌浓度(MIC)检测。改良 Hodge 试验筛选碳青霉烯酶阳性菌株, 乙二胺四乙酸(EDTA)纸片增效试验筛选产金属酶菌株。PCR 扩增碳青霉烯酶基因(KPC、GES、SME、NMC、IMI、IMP、NDM-1、VIM、SIM), 并对 PCR 阳性产物测序鉴定, 测序结果与 GenBank 数据库进行比对。结果 药敏结果显示, 8 株耐药菌株对大部分临床常用抗菌药物高度耐药, 对氟喹诺酮类抗菌药物和氨基糖苷类抗菌药物有较高的敏感性。表型确认试验显示, 6 株改良 Hodge 试验阳性, 7 株 EDTA 协同试验阳性。8 株碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌均携带 IMP-4 碳青霉烯酶基因, 未检出 KPC、GES、SME、NMC、IMI、NDM-1、VIM、SIM 型碳青霉烯酶基因。结论 本地区新生儿碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌对多种抗菌药物的耐药率较高, 新生儿临床分离碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌主要耐药机制是产 B 类碳青霉烯酶, IMP-4 是其酶型。

**关键词:**新生儿; 肺炎克雷伯菌; 耐药性; 碳青霉烯类; 耐药基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.15.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)15-2100-03

Study on drug resistance and drug resistance genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonates<sup>\*</sup>

HUANG Weizhen, LIANG Junrong, WANG Shuangjie, ZHANG Qing, TANG Yinlin, HUANG Changyuan,

HUANG Liying, PAN Xinnian<sup>△</sup>

(Maternal and Child Health Care Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract:** Objective To investigate the antimicrobial resistance and genotypes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborn patients. **Methods** A total of 8 strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinically isolated from neonatal inpatients in two maternal and child health care hospitals of Nanning City from December 2013 to December 2015 were collected and identified. The strain identification and minimal inhibitory concentration(MIC) were carried out by using the VITEK automatic microbiological analyzer. The carbapenemase positive strains were screened by the modified Hodge tests and metallo- $\beta$ -lactamase producing strains by imipenem-EDTA synergy tests. The carbapenemase genes(KPC, GES, SME, NMC, IMI, IMP, NDM-1, VIM, SIM) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), moreover the PCR positive productions were performed the sequencing identification. The detection results were performed the comparison with the GenBank database. **Results** The antibacterial susceptibility test results showed that 8 strains were highly resistant to commonly used antibacterial drugs, but highly sensitive to fluoroquinolones and aminoglycosides antibacterial drugs. The phenotypic validation test showed that 6 strains were positive in the modified Hodge test and 7 strains were positive in the EDTA synergy test. Eight strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* were all carried IMP-4 carbapenemase genes. No KPC, GES, SME, NMC, IMI, NDM-1, VIM and SIM types of carbapenemase genes were detected. **Conclusion** Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonates in this area has the high resistance to multiple antibacterial drugs, its main drug resistance mechanism is the production of B-carbapenemase (B-MBL) and IMP-4 is the main enzyme type.

**Key words:** neonate; *Klebsiella pneumoniae*; antibacterial resistance; carbapenem; drug resistance genes

碳青霉烯类抗菌药物是迄今已知的抗菌药物中抗菌谱广, 抗菌作用强, 对  $\beta$ -内酰胺酶高度稳定, 特别适用治疗由产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)或(和)头孢菌素酶(AmpC)细菌所引起的严重感染。随着碳青霉烯类药物在临床上的广泛使用, 产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌分离率逐年增高, 且在新生儿中也分离到耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌, 但有关新生儿产碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药研究鲜有报道, 本研究对临床分离自新生儿耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌进行耐药性及耐药基因进行研究, 为新生儿该类菌感染治疗及医院感染控制提供实验依据。

## 1 资料与方法

**1.1 菌株来源** 收集广西壮族自治区妇幼保健院(广西妇产医院、儿童医院)、南宁市妇幼保健院 2013 年 12 月至 2015 年 12 月从新生儿中分离的非重复厄他培南最低抑菌浓度(MIC)  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$  或者美罗培南、亚胺培南 MIC  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  的肺炎克雷伯菌株 8 株。

**1.2 菌株的鉴定及药敏试验** 细菌分离参照全国临床检验操作规程进行, 将收集到的菌株复苏, 应用 VITEK-2 Compact 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)鉴定细菌, 配套药敏卡

<sup>\*</sup> 基金项目: 广西医药卫生自筹经费计划课题(Z2014152)。

作者简介: 黄维真, 女, 副主任技师, 主要从事临床微生物检验方向的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: pxn16892003@163.com。

(GN-13)对分离自新生儿的肺炎克雷伯菌进行药敏试验(MIC法)。药敏试验判断标准参照 2013 版美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准。体外药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

**1.3 碳青霉烯酶、金属酶表型检测** (1)改良 Hodge 试验 筛查产碳青霉烯酶:无菌生理盐水将大肠埃希菌 ATCC 25922 菌悬液调至 0.5 麦氏浊度,并用生理盐水进行 1:10 稀释,用棉签将稀释后菌液均匀涂布于 MH 琼脂平皿上,干燥 10 min。将厄他培南纸片置于 MH 琼脂平皿上,使用 1 μL 接种环挑取 3~5 个过夜生长待测菌落垂直于厄他培南纸片从纸片边缘开始划线,长度为 20~25 mm,35 ℃ 孵育 16~20 h。如果在被测菌株与大肠埃希菌 ATCC 25922 抑菌圈交汇处长大肠埃希菌生长增强即为产碳青霉烯酶。(2)IPM+乙二胺四乙酸(EDTA)复合纸片试验 筛查金属酶:将待测菌配制成 0.5 麦氏菌液,均匀涂布 MH 平皿,待干后,间隔一定距离贴 2 张 IPM(10 μg)纸片,在其中 1 张 IPM 纸片上加 10 μL 0.5 mol EDTA 溶液,置 35 ℃ 孵育 18 h。加 EDTA 的纸片抑菌环直径与不加 EDTA 的纸片抑菌环直径差值大于等于 5 mm 即为阳性判断为产金属酶。

**1.4 碳青霉烯酶基因检测** 参考相关文献设计并合成 PCR 扩增引物(引物序列见表 1),引物由上海英俊生物公司合成。细菌总 DNA 提取采用煮沸法。PCR 反应,配置 25 μL 反应总体系,反应条件:(1)95 ℃,5 min;(2)95 ℃,40 s;55 ℃,40 s;72 ℃,1 min,共 35 个循环;(3)72 ℃,10 min 反应结束后,4 ℃,电泳鉴定。DNA Marker 购自大连宝生物有限公司。反应在梯度 PCR 仪(美国 Biometra 公司)上进行。

**1.5 DNA 测序分析** PCR 产物连接 pMD 18-T Vector(大连宝生物有限公司),转化感受态细胞,筛选阳性克隆菌,菌液 PCR 鉴定。由 invitrogen 对重组质粒的外源基因片段进行序列测定,测序结果与 GenBank 序列进行比对(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/),确定耐药基因类型。

表 1 耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌基因引物表

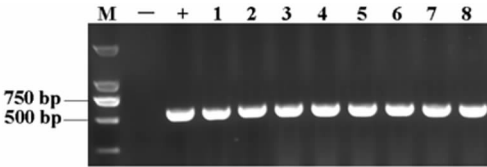
| 基因    | 引物序列<br>(5'~3')            | 退火温度<br>(℃) | 产物长度<br>(bp) |
|-------|----------------------------|-------------|--------------|
| KPC   | F:ATGTCACGTATCGCCGTCT      | 60          | 893          |
|       | R:TTTTCAGAGCCTTACTGCC      |             |              |
| GES   | F:AGTCGGCTAGACCGAAAG       | 55          | 399          |
|       | R:TTGTCCGTGCTCAGGAT        |             |              |
| SME   | F:AACGGCTTCATTTTGTTTAG     | 60          | 830          |
|       | R:GCTTCGCA ATAGTTTATCA     |             |              |
| NMC   | F:TGCAGCTTAATATTTTCAGATTAG | 60          | 2 122        |
|       | R:ATTTTTCATGAGAAGTTAAGCC   |             |              |
| IMI   | F:CCATTACCCATCACAAC        | 60          | 440          |
|       | R:CTACCGCATAATCATTTGC      |             |              |
| NDM-1 | F:GTGCCGTCGATCCCAAC        | 60          | 382          |
|       | R:CTTCCAACGGTTTGATCGTC     |             |              |
| IMP   | F:CTACCGCAGCAGAGTCTTTG     | 55          | 588          |
|       | R:AACCACTTTTGCTTACCAT      |             |              |
| VIM   | F:GATGGTGTGTTGGTCGCATA     | 55          | 390          |
|       | R:CGAATGCGCAGCACCAG        |             |              |
| SIM   | F:TACAAGGGATTCGGCATCG      | 58          | 571          |
|       | R:TAATGGCCTGTTCCCATGTG     |             |              |

2 结 果

**2.1 药敏结果** 抗菌药物药敏试验显示所有菌株对大多数临床常用抗菌药物耐药,碳青霉烯类抗菌药物的 MIC 值范围有所不同,亚胺培南为 1~16 μg/mL,厄他培南为 0.5~8 μg/mL,对氨基糖苷类敏感性 87.5%,所有菌株对氟喹诺酮类抗菌药物全部敏感,药敏试验结果见表 2。

表 2 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对抗菌药物 MIC(μg/mL)

| 抗菌药物      | 菌株号   |       |       |       |       |       |       |      |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|           | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8    |
| 氨苄西林      | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32  |
| 阿米卡星      | ≤2    | ≤2    | ≤2    | ≤2    | ≤2    | ≤2    | ≤2    | ≥64  |
| 环丙沙星      | ≤0.25 | ≤0.25 | ≤0.25 | ≤0.25 | ≤0.25 | ≤0.25 | ≤0.25 | 1.00 |
| 头孢曲松      | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64   | 16    | ≥64   | ≥64   | ≥64  |
| 厄他培南      | ≥8    | 2     | ≥8    | ≥8    | 0.5   | ≥8    | ≥8    | ≥8   |
| 亚胺培南      | 4     | ≤1    | 4     | 2     | 4     | ≥16   | 8     | ≥16  |
| 复方磺胺甲噁唑   | ≤20   | ≤20   | ≤20   | ≤20   | ≥320  | ≤20   | ≥320  | ≥320 |
| 妥布霉素      | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≥16  |
| 氨苄西林/舒巴坦  | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32   | ≥32  |
| 氮曲南       | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64   | 2     | ≥64   | ≥64   | ≥64  |
| 头孢替坦      | ≥64   | ≤4    | ≥64   | ≥64   | 16    | 32    | ≥64   | ≥64  |
| 头孢唑林      | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64  |
| 头孢吡肟      | ≥64   | 16    | 32    | 32    | ≤1    | ≥64   | 32    | 16   |
| 庆大霉素      | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≤1    | ≥16  |
| 左氧氟沙星     | ≤0.25 | 1.00  | ≤0.25 | ≤0.25 | 1.00  | ≤0.25 | 1.00  | 1.00 |
| 头孢他啶      | ≥64   | ≥64   | ≥64   | ≥64   | 4     | ≥64   | ≥64   | ≥64  |
| 哌拉西林/他唑巴坦 | ≥128  | 8     | ≥128  | ≥128  | ≤4    | ≥128  | ≥128  | ≥128 |



注:M,DNA 标准参照;- ,阴性对照;+,阳性对照;1~8 号阳性标本。

图 1 PCR 扩增 IMP 基因产物电泳结果

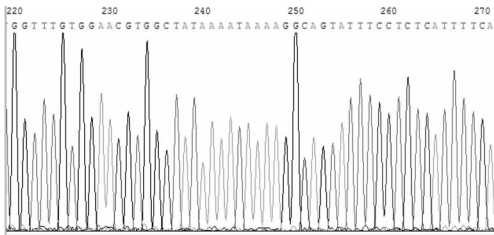


图 2 PCR 产物测序结果

**2.2 碳青霉烯酶、金属酶表型检测结果** 8 株碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌改良 Hodge 试验阳性 6 株(弱阳性 1 株)阳性率为 75.0%。双纸片增效试验阳性 7 株,阳性率为 87.5%。

**2.3 PCR 扩增碳青霉烯酶基因结果** 8 株碳青霉烯类耐药肺

炎克雷伯菌全部检出 IMP 基因, blaIMP 基因阳性率为 100.0%, 扩增结果见图 1。所有肺炎克雷伯菌株 KPC、GES、SME、NMC、IMI、NDM-1、VIM、SIM 基因均为阴性。

**2.4 PCR 产物测序结果** 基因测序结果显示, 检出 IMP 基因确认均为 blaIMP4 型, 经与 NCBI Blast 比较, 与 IMP-4 亚型同源性 99.0%。PCR 产物测序结果见图 2。

### 3 讨 论

2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测报告肠杆菌科细菌中碳青霉烯类耐药株以肺炎克雷伯菌为最多, 其对亚胺培南、美罗培南和厄他培南的耐药率逐年上升<sup>[1]</sup>, 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌不断增多给临床感染治疗带来很大困难。新生儿机体免疫力低, 抗菌药物使用种类有限, 感染治疗以  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物为主, 此类耐药菌株出现对新生儿危害更大。本研究结果显示 8 株分离自新生儿的肺炎克雷伯菌对大部分临床常用抗菌药物高度耐药。氨基糖苷类和喹诺酮类因其对耳、肾和骨骼的不良反应, 新生儿中几乎不使用, 使得其保持较高的敏感性。本组细菌对厄他培南耐药率为 87.5%、亚胺培南耐药率为 75.0%, 厄他培南筛选耐药肺炎克雷伯菌敏感性高于亚胺培南, Landman 等<sup>[2]</sup>指出厄他培南应该作为药敏试验检测最佳底物。因此对于新生儿临床分离菌株应采用厄他培南进行筛选或同时检测 2 种碳青霉烯类抗菌药物可提高耐药肺炎克雷伯菌检出。

改良 Hodge 试验是临床实验室标准化协会 (CLIS) 推荐的用于检测碳青霉烯酶表型确认试验。碳青霉烯类抗菌药物加上 EDTA 纸片增效试验常作为检测金属  $\beta$ -内酰胺酶方法。文献报道改良 Hodge 试验检测分离菌株中的肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶, 敏感度和特异度均大于 90.0%, 在筛选产金属  $\beta$ -内酰胺酶敏感性低。本研究 EDTA 纸片增效试验阳性率高于改良 Hodge 试验, 这与所检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌都是产金属酶 IMP 基因有关。本研究中有 1 株 EDTA 纸片增效试验、改良 Hodge 试验均阴性菌株, 但 PCR 检出金属酶 IMP 基因。金属酶多数由质粒介导, 极易在不同菌株中传播, 表型确认试验假阴性势必造成碳青霉烯酶基因漏检, 对于新生儿特殊人群当 EDTA 表型筛查阴性时, 建议培养基中添加锌, 有助于提高方法的敏感性<sup>[3]</sup>, 或者应用其他金属抑制剂筛查或用 PCR 对常见金属酶进行扩增。

产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机制。碳青霉烯酶分为 A、D 类丝氨酸碳青霉烯酶, B 类金属  $\beta$ -内酰胺酶, 其中最主要的 A 类碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶。有文献报道产 KPC-2 型碳青霉烯酶是国内医院成人肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类耐药的主要原因<sup>[4]</sup>。

肺炎克雷伯菌 B 类金属酶包含 VIM、IMP 和 NDM-1, IMP 型是主要型别。质粒介导的 IMP-1 于 1991 年在日本的铜绿假单胞菌中首次被发现<sup>[5]</sup>, 其后在中国台湾、澳大利亚先后检测到产 IMP-8、IMP-4 的肺炎克雷伯菌<sup>[6]</sup>。国内 2008 年在武汉报道 IMP-4 肺炎克雷伯菌<sup>[7]</sup>, 汪玥等<sup>[8]</sup>研究发现儿科分离碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌较多, 并且均携带碳青霉烯酶基因, IMP-4 是主要酶型。产 IMP-4 型金属酶肺炎克雷伯菌是国内分离自儿童对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要型别<sup>[9-10]</sup>。本研究发现, 8 株分离自新生儿的耐碳青霉烯类肺炎

克雷伯菌均为产 IMP-4 型金属  $\beta$ -内酰胺酶, KPC、GES、SME、NMC、IMI、NDM-1、VIM、SIM 型碳青霉烯酶未被检出。研究发现新生儿耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌与成人菌株以 KPC 型为主不同, 与儿童分离株产 IMP-4 报道一致。

产 IMP-4 金属酶是本地区新生儿肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类的主要原因, 细菌的耐药特征表现为对多种抗菌药物耐药。因此开展新生儿耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌耐药基因检测, 及时进行流行病学调查, 为临床抗菌药物合理使用以及遏制该类菌株引起的感染和流行具有非常重要意义。

### 参考文献

- [1] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 5(5): 365-374.
- [2] Landman D, Salamera J, Singh M, et al. Accuracy of carbapenem nonsusceptibility for identification of KPC-possessing Enterobacteriaceae by use of the revised CLSI breakpoints[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(11): 3931-3933.
- [3] Giakkoupi P, Vourli S, Polemis MA, et al. Supplementation of growth media with  $Zn^{2+}$  facilitates detection of VIM-2-Producing *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1568-1569.
- [4] Espedido B, Iredell J, Thomas L, et al. Wide dissemination of a carbapenemase plasmid among gram-negative bacteria; Implications of the variable phenotype[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4918-4919.
- [5] Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(1): 147-151.
- [6] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 306-325.
- [7] Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, et al. Carbapenem-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detection of a conjugative plasmid (blaKPC-2 plus qnrB4) and a blaIMP-4 gene[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2): 798-799.
- [8] 汪玥, 孙自镛, 陈忠举, 等. 碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4): 339-344.
- [9] 张嵘, 蔡加昌, 胡云建, 等. IMP-4 型金属  $\beta$ -内酰胺酶合并膜孔蛋白 OmpK36 缺失引起肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素高水平耐药[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(9): 845-851.
- [10] 虞涛, 鲍连生, 刘芳, 等. 儿童产 IMP-4 及 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌分子流行病学分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(3): 254-259.

(收稿日期: 2016-02-18 修回日期: 2016-04-26)