

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.04.019

耐碳青霉烯类抗菌药物的耐药性及其相关影响因素

罗洪英¹, 余水泉^{2△}

(1. 四川省宜宾市第三人民医院检验科 6444000; 2. 重庆市涪陵区中心医院检验科 408000)

摘要:目的 对耐碳青霉烯类肠杆菌科产碳青霉烯酶、整合子分布及外膜孔蛋白的缺失情况进行分析和特征讨论。方法 收集宜宾市第三人民医院患者的痰液、尿液、分泌物、血液等标本, 临床分离的 87 株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌(CRE)菌株进行分析。结果 对 87 株 CRE 菌株进行聚合酶链反应扩增碳青霉烯酶基因, 检出碳青霉烯酶基因 74 株, 占 85.06%。包括肺炎克雷伯菌 65 株(87.84%), 大肠埃希菌 6 株(8.11%), 阴沟肠杆菌、产酸克雷伯菌、产气肠杆菌各 1 株, 分别占 1.35%。整合酶基因检测结果显示, I 类整合子检出 52 株, 检出率为 59.77%(52/87), 其中 47 株来自产碳青霉烯酶菌株, 5 株为非产碳青霉烯酶菌株, 同时均以肺炎克雷伯菌检出的比例最高(分别为 39 株和 3 株); II 类整合子检出 8 株, 检出率为 9.20%(8/87), 其中 4 株来自产碳青霉烯酶菌株, 4 株为非产碳青霉烯酶菌株; 未检出 III 类整合子。I 类和 II 类整合子检出 3 株, 2 株来自产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌株, 1 株为非产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌株。肺炎克雷伯菌菌株外膜孔蛋白缺失情况表明, 70 株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌株中, 膜蛋白无异常达 18.57%, 其中产碳青霉烯酶菌株中膜蛋白无异常为 16.92%; OmpK35 表达下调的菌株占 24.29%, OmpK35 缺失的占 10.00%; OmpK36 表达下调和缺失的比例分别为 4.23% 和 57.14%; 产碳青霉烯酶菌株中 OmpK35 表达下调的菌株占 50.77%, OmpK35 缺失的占 9.23%; OmpK36 表达下调和缺失的比例分别为 3.08% 和 55.38%。结论 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的 CRE 的耐药情况非常严重, 且肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因检出最高, 耐药最严重; 耐药性的发生还与整合酶基因 I 类整合子, 以及孔膜蛋白表达减低与缺失密切相关。

关键词:耐碳青霉烯类肠杆菌; 产碳青霉烯酶; 整合子; 外膜孔蛋白

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)04-0492-04

Analysis of drug resistance of carbapenem-resistant antibiotics and its related influencing factors discussion

LUO Hongying¹, YU Shuiquan^{2△}

(1. Department of Laboratory, the Third People's Hospital of Yibin, Yibin, Sichuan 644000, China;

2. Department of Laboratory, Fuling District Central Hospital, Chongqing 408000, China)

Abstract: **Objective** To analyze and characterize the carbapenemase, integron distribution and the loss of outer membrane pore protein of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Methods** A total of 87 carbapenem-resistant strains isolated from clinical specimens of sputum, urine, secretions and blood were collected. A total of 87 isolates of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae(CRE) strains were analyzed to discuss the production of carbapenemase, integrin distribution and the outer membrane pore protein in the absence of analysis and characteristics. **Results** A total of 87 carbapenem antibiotics resistant strains of Enterobacteriaceae(CRE) were amplified by PCR for carbapenemase gene. The results showed that 74 strains of carbapenemase genes were detected, accounting for 85.06%, including *Klebsiella pneumoniae* 65 strains(87.84%), the highest proportion of detection; In addition, *Escherichia coli* detected in 6 cases(8.11%), *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter aerogenes* were detected in 1 patient, accounting for 1.35%. Fifty-two Class I integrons were detected in the integrase gene, and the detection rate was 59.77%(52/87). 47 strains were from carbapenemase-producing strains, 5 strains were from non-producing carbapenems, and the highest proportion was detected by *Klebsiella pneumoniae*(39 cases and 3 cases, respectively). The detection rate of class II integrons was 9.20%(8/87), and the positive rate of *Klebsiella pneumoniae* was the highest, Of which 4 strains were from carbapenemase-producing strains and 4 strains were from non-carbapenemase-producing strains. In this study, class III integrons were not detected. Three isolates of class I and class II integrons were identified, two were *Klebsiella pneumoniae*-producing *Klebsiella pneumoniae* strains and 1 *Klebsiella pneumoniae* isolates from non-carbapenemase-producing strains. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane pore protein loss a-

analysis results suggest that a total of 70 strains of carbapenem antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains,the membrane protein is no abnormal ratio of 18.57%,of which carbapenem producing strain accounting for16.92%;The proportion of down regulated OmpK35 expression was 24.29%,and OmpK35 deletion was 10.00%;The proportion of down regulated OmpK36 was 4.23% and OmpK36 deletion57.14%,respectively. Among the carbapenem producing strains,the percentage of down regulated OmpK35 was 50.77%, OmpK35 deletion was 9.23%,and the ratio of OmpK36 expression down and deletion was 3.08% and 55.38%,respectively. **Conclusion** The resistance of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae to carbapenem-resistant bacteria is severe,and the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene is the most sensitive and the drug-resistant is the most serious. The occurrence of drug resistance is also related to the integrase Gene class I integrons and decreased expression of porcine membrane protein are closely related to the deletion.

Key words: carbapenems-resistant Enterobacteriaceae; carbapenemase; integron; outer membrane porin

目前细菌的耐药性随着医学科学的发展及临床实践中各种主客观因素的影响作用,已成为全球关注的问题之一,同时也是临床面临的新挑战^[1-2]。肠杆菌科细菌与人们的日常生活密切相关,其中大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌等均为常见的病原菌,并以多重耐药菌株引起的感染为显著特点。碳青霉烯类抗菌药物是目前临床治疗的最常用药物之一,但近年来随着其在临床使用的不断增加,以及较多的不合理使用,导致出现了碳青霉烯类抗菌药物耐药的菌株。碳青霉烯类耐药机制包括产碳青霉烯酶、外膜通透性障碍、细菌生物膜的形成、整合子的介导等,其中产碳青霉烯酶和外膜通透性障碍是对碳青霉烯类耐药最主要的特征^[3-5]。现探讨碳青霉烯类抗菌药物的耐药情况,以及耐碳青霉烯类肠杆菌科产碳青霉烯酶、整合子分布、外膜孔蛋白的缺失情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集宜宾市第三人民医院 2014 年 2 月至 2016 年 8 月各个科室患者的痰液、尿液、分泌物、血液等标本,对 87 株耐碳青霉烯类抗菌药物的肠杆菌科细菌(CRE)菌株进行研究。

1.2 方法 菌株鉴定按照原卫生部《全国临床检验操作规程(第 3 版)》标准。采用 VITEK-2 Compact 全自动细菌分析鉴定系统(法国生物梅里埃公司),药敏检测使用抗菌药物纸片(英国 Oxoid 公司),药敏纸片使用纸片扩散法;质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603,依照 2007 年 CLSI 制定的标准,使用推荐的折点判断耐药性。应用聚合酶链式反应(PCR)检测常见碳青霉烯酶基因并描述分布特征,使用煮沸法制备菌株模板后,运用 25 μL 反应体系,PCR 扩增 KPC、NDM-1(中国疾病预防控制中心传染预防控制所推荐)基因序列,引物序列(NDM-1:正义链 5'-CAG CAC ACT TCC TAT CTC-3',反义链 5'-CCG CAA CCA TCC CCT CTT -3';KPC:正义链 5'-TGR AAG TTA CCG CGC TGA GG-3',反义链 5'-CCA GAC GAC GGC ATA GTC AT-3'),反应过程:95 ℃预变性 10 min 后变性 30 s,

退火 55 ℃和 52 ℃均 30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环。产物采用 1.2%琼脂糖凝胶电泳,Goldview I 型核酸染色剂染色,紫外灯下观察结果。对整合子分布特征进行总结分析,PCR 检测体系同上,引物(整合子 1:正义链 5'-GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG-3',反义链 5'-ACA TCG GTC TAA ATC ATC GTC-3';整合子 2:正义链 5'-CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T-3',反义链 5'-GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G-3';整合子 3:正义链 5'-AGT GGG TGG CGA ATG AGT G-3',反义链 5'-TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG-3');与此同时还通过电泳对外膜孔蛋白的缺失情况进行分析。

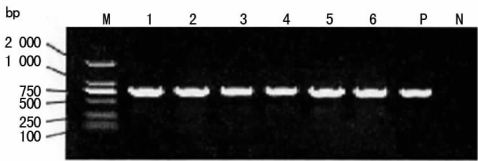
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较应用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的 CRE 菌株产碳青霉烯酶情况 87 株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的 CRE 菌株进行 PCR 扩增碳青霉烯酶基因,检出碳青霉烯酶基因 74 株,占85.06%。包括肺炎克雷伯菌 65 株,占 87.84%,大肠埃希菌检出 6 株(8.11%),阴沟肠杆菌、产酸克雷伯菌、产气肠杆菌各检出 1 株,分别占 1.35%。见表 1。PCR 图谱以大肠埃希菌进行分析。见图 1。

表 1 耐碳青霉烯类抗菌药物的 CRE 菌株产碳青霉烯酶的分布特征

细菌类型	菌株数(n)	百分率(%)
肺炎克雷伯菌	65	87.84
大肠埃希菌	6	8.11
阴沟肠杆菌	1	1.35
产酸克雷伯菌	1	1.35
产气肠杆菌	1	1.35
合计	74	100.00



注:M 表示 DNA 标记物;P 表示阳性;N 表示阴性

图 1 大肠埃希菌 PCR 图谱

2.2 耐碳青霉烯类 CRE 菌株表型耐药情况 74 株分离菌中检测出携带 KPC 型碳青霉烯酶基因 33 株,阳性检出率为 44.59%。未检测到 NDM-1 基因。

2.3 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的 CRE 菌株整合子情况 I 类整合子共检出 52 株,检出率为 59.77% (52/87),其中 47 株来自产碳青霉烯酶菌株,5 株为非产碳青霉烯酶菌株,同时均以肺炎克雷伯菌检出的比例最高(分别为 39 株和 3 株);II 类整合子检出共 8 株,检出率为 9.20% (8/87),其中 4 株来自产碳青霉烯酶的菌株,4 株为非产碳青霉烯酶菌株;未检出 III 类整合子。I 类和 II 类整合子检出 3 株,2 株来自产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌株,1 株为非产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌株。见表 2。

表 2 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的 CRE 菌株整合子的分布特征(n)

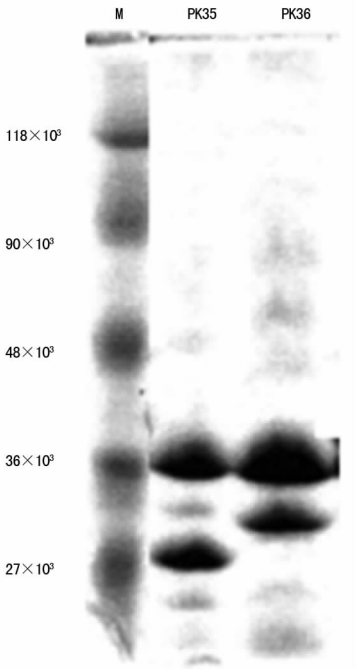
细菌类型	I 类整合子	II 类整合子	I 和 II 类整合子
产碳青霉烯酶菌株			
肺炎克雷伯菌	39	4	2
大肠埃希菌	3	0	0
阴沟肠杆菌	2	0	0
产酸克雷伯菌	1	0	0
产气肠杆菌	2	0	0
合计	47	4	2
非产碳青霉烯酶菌株			
肺炎克雷伯菌	3	1	1
大肠埃希菌	1	0	0
阴沟肠杆菌	0	1	0
产酸克雷伯菌	0	1	0
产气肠杆菌	1	1	0
合计	5	4	1
总计	52	8	3

2.4 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌外膜孔蛋白缺失情况 对碳青霉烯类抗菌药物耐药比例较高的肺炎克雷伯菌,菌株外膜孔蛋白缺失结果显示,共 70 株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌株中,膜蛋白无异常达 18.57%,其中产碳青霉烯酶菌株中膜蛋白无异常为 16.92%;OmpK35 表达下调菌株占 24.29%,OmpK35 缺失占 10.00%;OmpK36 表达下调和缺失的比例分别为 4.23%和 57.14%;产碳青霉烯酶菌株中 OmpK35 表达下调的

菌株占 50.77%,OmpK35 缺失占 9.23%;OmpK36 表达下调和缺失的比例分别为 3.08%和 55.38%。见表 3 和图 2。

表 3 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌株外膜孔蛋白缺失情况[n(%)]

蛋白模式	肺炎克雷伯菌	产碳青霉烯酶菌株数
OmpK35 表达下调	17(24.29)	33(50.77)
OmpK35 缺失	7(10.00)	6(9.23)
OmpK36 表达下调	3(4.23)	2(3.08)
OmpK36 缺失	40(57.14)	36(55.38)
膜蛋白无异常	13(18.57)	11(16.92)



注:M 表示标准蛋白质分子

图 2 孔膜蛋白电泳图

3 讨论

近年来,抗菌药物广泛应用于临床抗感染,细菌在抗菌药物的选择压力下,耐药性也逐渐表现出来^[6-8]。亚胺培南或美洛培南抗菌药物是目前临床特异性强、效果良好的药物,但目前耐碳青霉烯类杆菌的分离率也逐年升高,主要耐药菌株常见一些革兰阴性杆菌,同时也是引起临床感染最常见的细菌类型,包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌属等,以及非发酵革兰阴性杆菌(铜绿假单胞菌、不动杆菌属等)。细菌的耐药性之所以能在抗菌药物出现之后迅速产生,并且扩散,主要原因之一与基因水平转移密切相关,细菌的耐药基因多位于质粒、转座子、整合子等区域,现研究临床杆菌的相关机制,对指导临床合理使用抗菌药物意义重大^[9-11]。

本研究对 87 株耐碳青霉烯类抗菌药物的 CRE 菌株进行 PCR 扩增碳青霉烯酶基因,检出碳青霉烯酶基因 74 株(85.06%),其中包括肺炎克雷伯菌 65

株,占 87.84%,大肠埃希菌检出 6 株(8.11%),阴沟肠杆菌、产酸克雷伯菌、产气肠杆菌各 1 株,分别占 1.35%。该耐药机制的研究近年来早已成为微生物领域的又一个关注焦点^[8,12],其相关机制除了与上述碳青霉烯酶基因的表达有关外,还与整合酶基因相关。本研究整合酶基因检测结果表明,I 类整合子共检出 52 株,检出率 59.77%(52/87),其中 47 株来自产碳青霉烯酶菌株,5 株为非产碳青霉烯酶菌株,同时均以肺炎克雷伯菌检出的比例最高(分别为 39 株和 3 株);II 类整合子检出 8 株,检出率 9.20%(8/87),其中 4 株来自产碳青霉烯酶菌株,4 株为非产碳青霉烯酶菌株;未检出 III 类整合子。I、II 类整合子检出 3 株,2 株来自产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌株,1 株为非产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌株。

近年来的研究提示,产生 ESBL 和 AMPC 酶的同时合并外膜孔蛋白缺失现象的菌株也可导致耐药作用。外膜孔蛋白表达减低或者缺失对碳青霉烯类抗菌药物耐药作用起着重要的作用,特别是 OmpK35、OmpK36、OmpK37,使用抗菌药物治疗的同时,不少菌株会产生下调这些孔蛋白表达的作用,或者诱导其缺失^[13-15]。本研究结果显示,70 株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌株中,膜蛋白无异常达 18.57%,其中产碳青霉烯酶菌株中膜蛋白无异常为 16.92%;OmpK35 表达下调菌株占 24.29%,OmpK35 缺失占 10.00%;OmpK36 表达下调和缺失的比例分别为 4.23%和 57.14%;产碳青霉烯酶菌株中 OmpK35 表达下调的菌株占 50.77%,OmpK35 缺失占 9.23%;OmpK36 表达下调和缺失的比例分别为 3.08%和 55.38%。碳青霉烯酶是能够水解碳青霉烯类抗菌药物的 β -内酰胺酶,其包括 Ambler 分子分类为 A、B、C、D 的 4 类酶,其中 C 类酶,即头孢菌素酶仅水解头孢菌素而不水解碳青霉烯;肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶是目前引起 CRE 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因,其基因位于可移动的质粒上,几乎可以水解除头孢菌素类以外的所有 β -内酰胺类抗菌药物,包括碳青霉烯类。而与此同时,产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌可通过质粒、整合子、插入序列的基因元件进行水平传播使其他细菌获得耐药性。耐碳青霉烯类肠杆菌与产碳青霉烯酶、整合子、外膜孔蛋白均存在相互关联,且这些机制本身又存在不同程度的协同等作用,本研究结果也说明了其间的复杂相关性。

综上所述,对碳青霉烯类抗菌药物耐药的 CRE 耐药情况严峻,且肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因检出率最高,耐药最严重;耐药性的发生还与整合酶基因

I 类整合子,以及孔膜蛋白表达减低与缺失密切相关。本研究拟为新型抗菌药物的研发提供一些理论支持,为预防抗菌药物耐药性的产生提供依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 赵慧铮,师志云,李刚,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药性分析与分子流行病学研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(3):494-497.
- [3] 陈刚,茹纳丹,翁幸璧.耐碳青霉烯类鲍氏不动杆菌 β -内酰胺酶与膜孔蛋白 carO、oprD 基因研究[J].中华医院感染学杂志,2014,24(15):3641-3644.
- [4] 李渊婷,金凤玲.肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物的耐药机制及临床治疗进展[J].中国感染控制杂志,2015,14(9):644-648.
- [5] 王炜,苏建荣.铜绿假单胞菌碳青霉烯酶耐药的机制研究[J].临床和实验医学杂志,2014,13(8):610-613.
- [6] 李军,邹明祥,王海晨,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药机制的研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(21):4801-4804.
- [7] 张传明.碳青霉烯非敏感大肠埃希菌耐药机制初步研究及分子流行病学调查[D].重庆:重庆医科大学,2015.
- [8] 杨秋,陆文婷,芮勇宇.耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌耐药机制及分子流行病学研究[J].实用医学杂志,2015,12(24):4129-4132.
- [9] 梁光辉,徐韞健.耐碳青霉烯肺炎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.
- [10] 解春宝,喻华,肖代雯,等.一株对 3 种碳青霉烯类抗菌药物均耐药的肺炎克雷伯菌耐药机制研究[J].检验医学,2014,29(4):369-374.
- [11] 刘萍,闫雪雷,张坚磊,等.23 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分析[J].山东医药,2016,56(24):91-93.
- [12] 刘淑敏,许云敏,牛敏,等.急诊重症监护病房耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的分子流行特征[J].中国感染与化疗杂志,2015,15(4):372-376.
- [13] 代强,郑波.2012 美国疾病预防控制中心耐碳青霉烯类肠杆菌控制指南简介[J/CD].中国医学前沿杂志(电子版),2013,5(8):30-31.
- [14] 杨勇文,李从荣.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因研究进展[J].山东医药,2016,56(2):96-98.
- [15] 徐丽英,丁卉,陈丽燕,等.30 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的调查分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(12):2678-2680.

(收稿日期:2017-07-05 修回日期:2017-09-09)