

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.07.018

耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌耐药基因分析

伍启康¹, 李小燕², 吴奎海¹, 李炜煊^{1△}

1. 广东省佛山市第一人民医院检验科, 广东佛山 528000; 2. 广州医科大学第四附属医院检验科, 广东广州 510182

摘要:目的 探讨耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌相关耐药基因分布情况。方法 收集 2015 年 1 月至 2017 年 12 月佛山市第一人民医院分离的 16 株阴沟肠杆菌为研究对象, 利用 VITEK2-Compact 全自动微生物分析系统进行细菌鉴定及药敏试验。采用改良 Hodge 试验和乙二胺四乙酸(EDTA)协同试验进行耐药表型筛选。采用 PCR 法检测碳青霉烯酶基因(*bla_{IMP}*、*bla_{KPC}*、*bla_{NDM}*、*bla_{VIM}*、*bla_{OXA-48}*)、ISCR1、I 类整合酶、I 类整合子基因盒基因。结果 16 株阴沟肠杆菌对亚胺培南、美罗培南均耐药。16 株细菌改良 Hodge 试验和 EDTA 协同试验均阳性。16 株均携带有碳青霉烯酶基因, 其中 14 株携带 *bla_{NDM-1}*, 2 株携带 *bla_{IMP-4}*。16 株 ISCR1、I 类整合酶和 I 类整合子基因盒均阳性, 携带的基因盒主要由 *dfrA17-aadA5* 或 *dfrA15-aadA2* 组成。结论 该院耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌携带的碳青霉烯酶基因以 *bla_{NDM-1}* 为主。

关键词: 阴沟肠杆菌; 碳青霉烯酶; 基因型; 耐药性

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)07-0930-04

Study on resistance gene in carbapenemase-resistant *Enterobacter cloacae*

WU Qikang¹, LI Xiaoyan², WU Kuihai¹, LI Weixuan^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Fourth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China

Abstract: Objective To investigate the distribution of resistance gene in carbapenemase-resistant *Enterobacter cloacae* isolates. **Methods** A total of 16 *Enterobacter cloacae* isolates were collected between January 2015 and December 2017 in the First People's Hospital of Foshan. The identification and antimicrobial susceptibility were analyzed by VITEK2-Compact microorganism analysis system. The modified Hodge test and EDTA double-disk synergy test were used for detection of carbapenemase-resistant phenotype. The genes of the carbapenems, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* and *bla_{OXA-48}* were analyzed by PCR. **Results** A total of 16 isolates were all resistant to imipenem and meropenem. All isolates were positive in the modified Hodge test and EDTA double-disk synergy test. Fourteen strains carried *bla_{NDM-1}* and two strain carried *bla_{IMP-4}*. ISCR1, class I integrase and gene cassettes were detected in all strains. Gene cassette was mainly made up of *dfrA17-aadA5* or *dfrA15-aadA2*. **Conclusion** The *bla_{NDM-1}* is the dominant genotype in the carbapenemase-resistant *Enterobacter cloacae* in our hospital.

Key words: *Enterobacter cloacae*; carbapenemase; genotype; drug resistance

阴沟肠杆菌作为条件致病菌, 已成为医院感染的重要病原菌, 可引起呼吸道、伤口、泌尿系统的感染和脑膜炎等疾病。随着广谱抗菌药物的广泛使用, 耐碳青霉烯类药物的肠杆菌科细菌(CRE)不断增加, 给临床治疗和医院感染控制带来了严峻的挑战。CRE 主要的耐药机制是产生碳青霉烯类水解酶^[1]。与此同时, I 类整合子和插入序列如共同区 1(ISCR1)在耐药基因水平转移中起着重要的载体作用^[2-3]。本研究主要调查佛山市第一人民医院(以下简称“本院”)分离阴沟肠杆菌

的临床分布、耐药率、碳青霉烯酶表型及其耐药基因产生情况, 为医院感染的诊断和治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月本院检验科微生物室分离的 16 株阴沟肠杆菌为研究对象。标本来源: 痰液 12 例, 尿液 2 例, 血液 2 例, 剔除同一患者同一部位重复分离菌株。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪器(德国 Eppendorf 公司); 凝胶仪(Bio-Rad 公司); TaqDNA 聚合酶、

dNTPs、DNA Marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均为 TaKaRa 公司产品。利用法国生物梅里埃公司的 VITEK2-Compact 仪器及其配套 GN 进行细菌鉴定和药敏试验。采用 AST-GN13 卡进行菌种鉴定和药敏试验,采用 K-B 法进行补充药敏试验,药敏纸片购自英国 OXOID 公司。根据 2015 年美国临床实验室标准化委员会(CLSI)标准判断结果,入选标准为亚胺培南耐药的阴沟肠杆菌,即最低抑菌浓度(MIC)≥ 4 μg/L 或 K-B 法折点 ≤ 19 mm;质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.3 方法

1.3.1 改良 Hodge 试验表型筛查 依据 CLSI M100-S23 进行改良 Hodge 试验。在生理盐水中配制 0.5 麦氏标准浊度的大肠埃希菌 ATCC25922,用生理盐水 1:10 稀释并涂布至 M-H 平板,在平板中央贴上 10 μg 厄他培南药敏纸片,从药敏纸片边缘向平板边缘划待测菌,35 °C 孵育过夜,在被测菌株划线

与大肠埃希菌抑菌环交叉处细菌有增强生长的趋势为阳性,即产碳青霉烯酶。

1.3.2 乙二胺四乙酸(EDTA)协同试验 配制 0.1 mol/L EDTA-Na₂,加 10 μL 至美罗培南(MEM)纸片上,无菌条件下自然干燥备用。配制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液,均匀涂布于 MH 琼脂平板,将 MEM 和 MEM-EDTA-Na₂ 的纸片贴于琼脂表面。结果判断:含酶抑制剂纸片与单药纸片的抑菌圈直径相差 ≥ 5 mm,提示该菌产生金属 β-内酰胺酶^[4]。

1.3.3 PCR 扩增 细菌的 DNA 提取参考试剂盒说明书,-20 °C 保存。相关基因的 PCR 反应体系均为 20 μL,其中含 Mg²⁺ 的 10×buffer 2 μL,dNTP 200 μmol/L,上下游引物 0.2 μmol/L,DNA 模板 1 μL,TaqDNA 聚合酶 1 U,加入灭菌去离子水至 20 μL。bla_{IMP}、bla_{KPC}、bla_{NDM}、bla_{VIM}、bla_{OXA-48} 等碳青霉烯酶阳性菌株由广州医科大学第四附属医院微生物室提供,具体引物序列见表 1。

表 1 PCR 反应的引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	基因名称	退火温度(°C)	片段大小(bp)	参考文献
IMP-F	ATGAGCAAGTTATCTGTATTC	bla _{IMP}	56	741	[5]
IMP-R	TTAGTTGCTTGTTTTGATG				
VIM-F	GTCTATTTGACCGGTC	bla _{VIM}	56	774	[5]
VIM-R	CTACTCAACGACTGAGCG				
KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	bla _{KPC}	56	798	[6]
KPC-R	CTTGTATCCTTGTTAGGCG				
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	bla _{NDM}	56	621	[6]
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC				
OXA-48F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	bla _{OXA-48}	52	438	[6]
OXA-48R	CATCAAGTTCAACCCAACCG				
int1-F	GCATCCTCGGTTTTCTGG	I 类整合酶	62	457	[7]
int1-R	GGTGTGGCG GGCTTCGTG				
5-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	I 类整合子	62	可变	[8]
3-CS	AAGCAGACTTGACCTGA	基因盒			
ISCR1-F	ATGGTTTCATGCGGGTT	ISCR1	61	475	[9]
ISCR1-R	CTGAGGGTGTGAGCGAG				

1.3.4 PCR 产物序列分析 得到的 PCR 产物加入 1.5% 琼脂糖凝胶,电压为 120 V,电泳时间 40 min,最后经溴化乙锭染色 20 min 后在凝胶成像系统上观察结果,阳性产物送华大基因科技公司进行纯化并双向测序,利用 DNASTar 软件对测序结果进行序列校正,得到的序列与 GenBank 中序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行对比分析,确定基因亚型。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel2010 对数据

进行整理分析。

2 结果

2.1 药敏试验 16 株阴沟肠杆菌对碳青霉烯类抗菌药物,第三代、第四代头孢菌素均耐药,对氨曲南、阿米卡星、左氧氟沙星耐药率分别为 93.8%、31.2%、56.3%。见表 2。

2.2 碳青霉烯酶表型检测 16 株阴沟肠杆菌改良 Hodge 试验和 EDTA 协同试验均阳性,分别提示 16 株菌株产碳青霉烯酶和产金属 β-内酰胺酶。

2.3 PCR 分析 14 株携带 bla_{NDM-1} 基因, 2 株携带 株 ISCR1、I 类整合酶和 I 类整合子基因盒均阳性, bla_{IMP-4} 基因, 其余 3 种碳青霉烯酶基因均未检出。16 见表 3。

表 2 16 株阴沟肠杆菌药敏试验结果

菌株编号	标本来源	CRO		CAZ		FEP		ATM		IMP		MEM		AK		LEV	
		MIC (μg/mL)	定性结果	MIC (μg/mL)	定性结果	MIC (μg/mL)	定性结果	MIC (μg/mL)	定性结果	MIC (μg/mL)	定性结果	MIC (μg/mL)	定性结果	MIC (μg/mL)	定性结果	MIC (μg/mL)	定性结果
ec1	尿液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	1	S	4	R	4	R	2	S	0.25	S
ec2	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥16	R	8	R	16	R	≥8	R
ec3	血液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	64	R	4	R	4	R	64	R	≥8	R
ec4	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	4	R	4	R	≤2	S	1	S
ec5	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥16	R	16	R	32	R	≥8	R
ec6	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	64	R	16	R	8	R	16	R	8	R
ec7	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	64	R	4	R	4	R	64	R	1	S
ec8	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥16	R	8	R	≥64	R	≥8	R
ec9	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	64	R	4	R	4	R	64	R	1	S
ec10	尿液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	64	R	4	R	4	R	64	R	1	S
ec11	血液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	4	R	4	R	≤2	S	1	S
ec12	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥16	R	16	R	16	R	≥8	R
ec13	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥16	R	16	R	16	R	≥8	R
ec14	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥16	R	16	R	16	R	≥8	R
ec15	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥16	R	16	R	16	R	≥8	R
ec16	痰液	≥64	R	≥64	R	≥64	R	≥64	R	4	R	4	R	≤2	S	1	S

注: CRO 为头孢曲松; CAZ 为头孢他啶; FEP 为头孢吡肟; ATM 为氨曲南; IMP 为亚胺培南; MEM 为美罗培南; AK 为阿米卡星; LEV 为左氧氟沙星; S 为敏感; R 为耐药。

表 3 16 株阴沟肠杆菌相关耐药基因分布

菌株编号	NDM-1	IMP-4	ISCR1	I 类整合酶	I 类整合子基因盒
ec1	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec2	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec3	+	-	+	+	dfrA15-aadA2
ec4	+	-	+	+	dfrA15-aadA2
ec5	-	+	+	+	dfrA17-aadA5
ec6	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec7	+	-	+	+	dfrA15-aadA2
ec8	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec9	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec10	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec11	-	+	+	+	dfrA17-aadA5
ec12	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec13	+	-	+	+	dfrA17-aadA5
ec14	+	-	+	+	dfrA15-aadA2
ec15	+	-	+	+	dfrA15-aadA2
ec16	+	-	+	+	dfrA17-aadA5

注: + 为阳性; - 为阴性。

3 讨 论

碳青霉烯类抗菌药物是治疗革兰阴性杆菌感染, 特别是肠杆菌科细菌感染效果最好的 β-内酰胺类药

物, 一旦碳青霉烯类药物耐药, 临床治疗此类菌株感染将面临极大困难。本研究显示, 耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌对氨基糖苷类、氟喹诺酮类抗菌药物有一定敏感性。由于氨基糖苷类抗菌药物具有较强的肾毒性和耳毒性, 使用该药时应慎重。在临床治疗此类感染时, 应根据药敏结果选择中介或者敏感的抗菌药物联合用药, 如多黏菌素 B 或替加环素联合碳青霉烯类抗菌药物。阴沟肠杆菌耐药机制十分复杂, 多种耐药机制可协同作用, 造成阴沟肠杆菌出现耐药水平高及多重耐药的現象。目前阴沟肠杆菌产碳青霉烯酶以 A 类 KPC-2 为主, B 类和 D 类少见。但本院的耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌均产金属 β-内酰胺酶, 78.5% (14/16) 为携带 bla_{NDM-1} 基因, 携带 bla_{IMP-4} 基因仅发现 2 株。差异存在的原因可能与各地区间抗菌药物使用情况以及地区环境不同所致。赵岐刚等^[10]对 64 株耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌进行研究, 发现 29 株携带 IMP-4 基因, 35 株携带 IMP-8 基因, 未检出 VIM、OXA-48、NDM 基因。在我国, NDM-1 基因在鲍曼不动杆菌检出率较高, 在肠杆菌科细菌中报道病例较少, 由于该基因常位于接合型质粒上, 在不同菌株之间易发生水平转移。LIU 等^[11]对 11 株耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌进行研究, 其中 8 株 NDM-1 阳性, 仅 2 株 IMP-4 阳性。8 株 NDM-1 基因上游均含有转座元件

ISAba125,可能来源于鲍曼不动杆菌。近年来,有关肠杆菌科细菌携带 bla_{IMP-4} 的报道逐渐增加, HU 等^[12]对中国 5 所教学医院分离到的 51 株 CRE 进行检测,发现 bla_{KPC-2}、bla_{NDM-1}、bla_{IMP-4} 阳性率分别为 54.7%、17.6%、11.8%。可见,我国不同地区 CRE 携带的碳青霉烯酶基因有所差异。但 SIDJABAT 等^[13]发现, 29 株耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌均携带 bla_{IMP-4} 基因;同时, DU 等^[14]在 1 例长期住院患者中先后分离出耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌和大肠埃希菌,且 HI2 质粒携带的 bla_{IMP-4} 基因在两者之间传播。

改良 Hodge 试验是 CLSI 推荐的碳青霉烯酶表型检测方法,本研究通过改良 Hodge 试验进行了菌株的表型检测,结果均为阳性,并以 EDTA 协同试验检测金属酶,通过 PCR 检测证实菌株的产酶类型为属于 Ambler 分类中的产碳青霉烯酶和产金属 β-内酰胺酶,但可能存在其他耐药机制如细菌外膜蛋白、AmpC 酶缺失或菌株携带且高表达超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)等,需进一步通过基因扩增或耐药菌基因组测序来探讨,这亦为本课题组下一步工作。

I 类整合子、ISCR1 为可移动的遗传元件,在细菌耐药的水平传播中起着重要作用。I 类整合子在整合酶的作用下,可以捕获外来的耐药基因,并在位于整合子上游的启动子的作用下得到表达,从而获得积累多重耐药性的属性。ISCR1 以滚环形式转座临近的耐药基因,并提供启动子,常参与构建复杂性 I 类整合子构成。DU 等^[14]发现,携带 bla_{NDM-1} 基因的阴沟肠杆菌 I 类整合子和 ISCR1 阳性,基因盒类型为 dfrA12-aadA2。SIDJABAT 等^[13]发现,携带 bla_{IMP-4} 基因的阴沟肠杆菌 I 类整合子和 ISCR1 也为阳性,基因盒类型为 bla_{IMP-4}-aacA4。本研究发现 16 株均检测到 I 类整合子和 ISCR1,这些都加剧了多重耐药性细菌的播散。此外,16 株细菌扩增出基因盒内两种基因型组合分别为 dfrA17-aadA5、dfrA15-aadA2。本研究下一步工作将放在耐药菌接合转移实验和同源性分析,进一步验证碳青霉烯酶耐药基因的水平转移能力及是否存在克隆性传播现象。

综上所述,CRE 的耐药情况较为严重,本院耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌以携带 bla_{NDM-1} 的碳青霉烯酶耐药基因为主。临床工作中,需要加强对耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌耐药性的检测,规范抗菌药物的使用;同时,加强医务人员对 CRE 等多重耐药菌感染的预防和控制。

参考文献

[1] 徐英春,肖永红,卓超,等.中国碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的流行病学和防控策略[J].中国执业药师,2013,10

(4):3-8.

[2] 李彦媚,赵喜红,徐泽智,等.新型细菌耐药元件:整合子系统[J].中国抗生素杂志,2012,37(1):1-7.

[3] 纪冰,李保松,李霞,等.2017 年临床分离阴沟肠杆菌的耐药性及其 ESBLs 基因研究[J].中华医院感染学杂志,2019,29(15):2261-2264.

[4] 闫文娟,李轶王,王山梅,等.耐碳青霉烯类抗菌药物大肠埃希菌耐药机制的研究[J].检验医学,2016,31(1):56-60.

[5] QUEENAN A M, BUSH K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.

[6] NORDMANN P, NAAS T, POIREL L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.

[7] SHIBATA N, DOI Y, YAMANE K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrase carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5407-5413.

[8] WU K, WANG F, SUN J, et al. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(3): 264-267.

[9] WU K, SUN J, WANG Q, et al. Novel ISCR1-linked resistance genes found in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(5): 404-408.

[10] 赵岐刚,贾秀芹,庞峰,等.阴沟肠杆菌产碳青霉烯酶的基因型与临床感染的特征分析[J].中华医学杂志,2015,95(40):3264-3268.

[11] LIU C, QIN S, XU H, et al. New Delhi Metallo-β-Lactamase 1(NDM-1), the Dominant Carbapenemase Detected in Carbapenem-Resistant Enterobacter cloacae from Henan Province, China [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135044.

[12] HU L, ZHONG Q, SHANG Y, et al. The prevalence of carbapenemase genes and plasmid-mediated quinolone resistance determinants in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from five teaching hospitals in central China [J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(9): 1972-1977.

[13] SIDJABAT H E, TOWNELL N, NIMMO G R, et al. Dominance of IMP-4-producing enterobacter cloacae among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Australia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(7): 4059-4066.

[14] DU H, CHEN L, CHAVDA K D, et al. Genomic Characterization of Enterobacter cloacae Isolates from China That Coproduce KPC-3 and NDM-1 Carbapenemases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(4): 2519-2523.