

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 12. 009

碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌临床分布及耐药基因检测

蔡心安¹, 蔡龙啸², 闫 敏¹, 姚慧琳^{3△}

1. 中国人民解放军联勤保障部队 901 医院检验科, 安徽合肥 230031; 2. 安徽医科大学第一临床医学院, 安徽合肥 230022; 3. 安徽省淮北矿工总医院检验科, 安徽淮北 235000

摘要:目的 了解中国人民解放军联勤保障部队第 901 医院 2017 年全院住院患者碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)检出情况, 并对 CRKP 的耐药基因携带情况进行分析。**方法** 收集中国人民解放军联勤保障部队 901 医院 2017 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日住院患者临床分离的 CRKP, 采用 PHNX10 分析其临床常用抗菌药物的耐药情况, 用琼脂稀释法确定每株待测菌的最低抑菌浓度(MIC), 用 WHONET5.6 软件统计分析 CRKP 的临床分布, 并用 PCR 法扩增碳青霉烯酶基因及其他 β -内酰胺酶基因。**结果** 该院 2017 年住院患者共检出 23 株 CRKP, 其中神经外科检出 12 株, 重症监护病房(ICU)检出 3 株, 普外科检出 2 株, 干部病房检出 2 株, 骨科、五官科、眼科、泌尿外科各检出 1 株; 标本类型主要为痰(16 例), 其次为创面; 23 株 CRKP 中 21 株携带 blaKPC-2 基因; 19 株同时携带 blaKPC-2、blaSHV-1 基因, 2 株同时携带 blaKPC-2、blaSHV-1、blaCTX-M-15 基因。**结论** 产 blaKPC-2 是该院 CRKP 主要原因, 应引起临床重视。

关键词:碳青霉烯耐药; 肺炎克雷伯菌; 基因; β -内酰胺酶; 最低抑菌浓度

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)12-1662-04

Clinical distribution of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and its drug resistant gene detection

CAI Xin'an¹, CAI Longxiao², YAN Min¹, YAO Huilin^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the 901 Hospital of the Joint Logistic Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Hefei, Anhui 230031, China; 2. First Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Huaibei Miner General Hospital, Huaibei, Anhui 235000, China)

Abstract: Objective To understand the detection status of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) in all inpatients of the 901 Hospital of the Joint Logistic Support Force of the Chinese People's Liberation Army in 2017, and analyze the carrying status of resistant genes of CRKP. **Methods** CRKP clinically isolated from hospitalized patients in the 901 Hospital of the Joint Logistic Support Force of the Chinese People's Liberation Army from January 1, 2017 to December 31, 2017 were collected, and the drug resistance of commonly used antimicrobial agents were analyzed by PHNX10. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each strain was determined by agar dilution method. The clinical distribution of CRKP was statistically analyzed with WHONET5.6 software. The gene of carbapenem and other β -lactamase were amplified by PCR. **Results** A total of 23 strains of CRKP were detected in the inpatients of the hospital in 2017, including 12 strains in neurosurgery, 3 strains in ICU, 2 strains in general surgery, 2 strains in cadre's ward, 1 strain each in orthopedics, ENT, ophthalmology and urology. The specimens were mainly sputum (16 cases), followed by wound surface. BlaKPC-2 gene was found in 21 of the 23 strains of CRKP, while blaKPC-2, blaSHV-1 and blaCTX-M-15 genes were present in 19 strains. **Conclusion** The main cause of producing blaKPC-2 in the hospital is carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*, which should be paid more attention in clinic.

Key words: carbapenem resistance; *Klebsiella pneumoniae*; gene; β -lactamase; minimum inhibitory concentration

碳青霉烯类抗菌药物是一类抗菌谱广泛的抗菌药物, 对各类 β -内酰胺酶十分稳定, 因此成为治疗肠杆菌科细菌所致感染的首选药物^[1], 但随着临床的广泛使用, 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌出现,

给临床治疗带来极大困难。碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)的主要耐药机制是产碳青霉烯酶和高产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、头孢菌素酶(AmpC 酶)或者合并膜孔蛋白缺失^[2]。不同地区或不同医院的

细菌耐药机制会有所差异,为了解中国人民解放军联勤保障部队 901 医院 CRKP 的临床分布及耐药机制,本研究采用 PCR 法对 2017 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日在中国人民解放军联勤保障部队 901 医院(以下简称本院)住院患者感染的 CRKP 进行碳青霉烯酶基因及其他 β -内酰胺酶基因进行研究,为临床治疗感染及预防院内感染提供帮助,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2017 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日在本院住院患者的各类临床标本中分离出的非重复 CRKP 23 株。其中包括痰标本 16 例,分泌物标本 3 例,导管标本 2 例,血液标本 1 例,尿液标本 1 例。

1.1.2 试剂与仪器 由 BD 公司 PHNX10 进行鉴定及药敏试验,抗菌药物氨苄西林、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、头孢他啶、亚胺培南、头孢吡肟、头孢唑啉标准品均购自中国药品生物制品鉴定所。药敏纸片亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦、头孢唑啉、氨曲南、头孢他啶、头孢吡肟均购自英国 Oxoid 公司。水解酪蛋白琼脂为天达诊断试剂公司产品,PCR 扩增试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒等为北京天根公司产品。

1.2 方法

1.2.1 可疑产碳青霉烯酶菌株筛选 仪器法报告的亚胺培南或美罗培南耐药肺炎克雷伯菌均作为可疑株,用 K-B 法对这些可疑株进行复检,以两种方法均报耐药的肺炎克雷伯菌作为试验对象。判断标准按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI) 2017 年标准执行,质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2.2 最低抑菌浓度(MIC)测定 采用琼脂稀释法,对倍连续稀释亚胺培南、美罗培南、氨苄西林、左氧氟沙星、阿米卡星、头孢他啶、头孢吡肟等 7 种抗菌药物,测定可疑产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的 7 种药物 MIC 值。

1.2.3 改良 Hodge 试验 用无菌生理盐水制备 0.5 号麦氏单位的大肠埃希菌 ATCC25922 悬液作为指示菌,10 倍稀释后按常规纸片法药敏试验操作 MHA 平板,自然干燥 10 min,在平板中心贴厄他培南纸片(10 μ g/片)。挑取 3~5 个血平板上过夜培养的待测菌和质控菌株的菌落,从纸片边缘向外划一条至少 25 mm 的直线,孵育后观察结果,待测菌株与抑菌环交叉处出现矢状生长的为产碳青霉烯酶阳性株^[3]。

1.2.4 碳青霉烯酶基因及其他 β -内酰胺酶基因引物设计 参照文献[4]设计引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成,碳青霉烯酶基因及其他 β -内酰胺酶基因引物序列见表 1。

表 1 β -内酰胺酶基因引物

引物名称	引物序列(5'-3')	靶基因	产物长度(bp)
TEM	F:AGGAAGAGTATGATTCAACA R:CTCGTCGTTTGGTATGGC	TEM	535
SHV	F:GGTTATGCGTTATATTCGCC R:GGTTAGCGTTGCCAGTGCTC	SHV	867
CTX-Ga	F:AGTGCAAACGGATGATGT R:GGCTGGGTAAAAATAGGTC	CTX-M-13~14,16~19, Toho-2	792
CTX-Gb	F:ACGCTACCCCTGCTATT R:CAGAAACCGTGGGTACGA	CTX-M-2,4~7, Toho-1	830
CTX-Ge	F:ACGCTGTTGTTAGGAAGTG R:TTGAGGCTGGGTGAAGT	CTX-M-1,3,10~12,15	759
OXA-1	F:CTGTTGTTTGGGTTTCGAAG R:CTTGCTTTTATGCTTGATG	OXA-1	440
OXA-10	F:GTCTTTCGAGTACGGCATTA R:GATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	OXA-10	822
KPC-gp	F:GCGGAACCATTCGCTAAACTC R:CGCCAACTCCTTCAGCAACA	KPC1~4	340
IMP-1	F:CTACGCAGCAGAGTCTTTG R:AACCAGTTTGCCTTACCAT	IMP-1,4~6,9,10,18	587
IMP-2	F:GTTTTATGTGTATGCTTCC R:AGCCTGTTCCCATGTAC	IMP-2,8,13,19,20	678
VIM-1	F:AGTGGTGAGTATCCGACAG R:ATGAAAGTGCGTGGAGAC	VIM-1,2,4,5	261
VIM-2	F:ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG R:CTACTCAACGACTGAGCG	VIM-2,6,8~11	801

1.2.5 碳青霉烯酶基因及其他 β -内酰胺酶基因的

PCR 扩增与测序 改良 Hodge 试验阳性菌株,采用

煮沸法提取细菌基因组 DNA。PCR 反应总体积为 50 μL , 包括上、下游引物各 1 μL , PCR Magic Mix 25 μL , DNA 模板 5 μL (5 ng), 用双蒸水 (ddH₂O) 补充至 50 μL 。循环参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 40, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外凝胶电泳成像仪下观察并拍照。PCR 阳性产物送上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序, 测序结果进行 BLAST 比对分析。

2 结 果

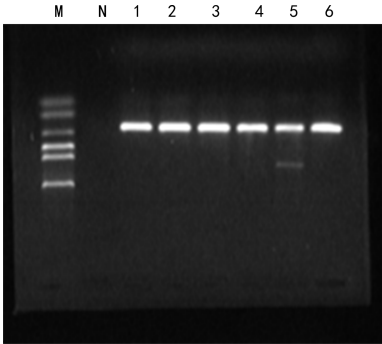
2.1 23 株 CRKP 临床分布情况 CRKP 分布广泛, 23 株 CRKP 检出的临床科室为神经外科 (12 株, 占 52.17%)、重症监护病房 (ICU, 3 株, 占 13.04%)、普外科 (2 株, 占 8.70%)、干部病房 (2 株, 占 8.70%)、泌尿外科 (1 株, 占 4.35%)、骨科 (1 株, 占 4.35%)、五官科 (1 株, 占 4.35%)、眼科 (1 株, 占 4.35%)。神经外科与 ICU 共占 65.21%, 重症患者 CRKP 检出较高。

2.2 CRKP 临床标本分布情况 23 株 CRKP 中, 16 株 (69.57%) 为痰标本, 5 株 (21.74%) 来源于分泌物或脓液, 1 株 (4.35%) 为血液标本, 1 株 (4.35%) 为中段尿标本。其中痰标本占近 70%, 而从无菌体液中检出 CRKP 具有重要意义。

2.3 23 株 CRKP 的最低抑菌浓度 (MIC) 氨苄西林 MIC 为 64~4 096 $\mu\text{g/mL}$, 阿米卡星 MIC 为 1~2 048 $\mu\text{g/mL}$, 亚胺培南 MIC 为 1~1 024 $\mu\text{g/mL}$, 美罗培南 MIC 为 1~1 024 $\mu\text{g/mL}$, 头孢他啶 MIC 为 64~2 048 $\mu\text{g/mL}$, 头孢吡肟 MIC 为 64~2 048 $\mu\text{g/mL}$, 左氧氟沙星 MIC 为 0.5~512.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临床检出 23 株 CRKP 对临床常用抗菌药物的 MIC。

2.4 改良 Hodge 试验结果 23 株 CRKP 改良 Hodge 试验结果均为阳性。

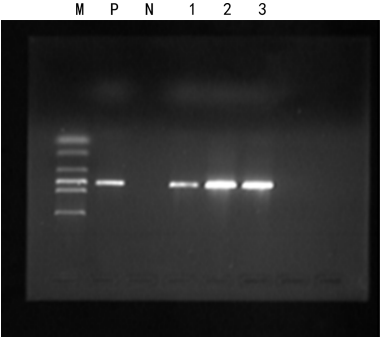
2.5 临床分离 CRKP 碳青霉烯酶基因检测结果 23 株 CRKP 中 21 株携带 blaKPC-2 基因, 其电泳图见图 1。PCR 扩增产物经测序、BLAST 比对分析, 证实为 blaKPC-2 基因。



注: M 为 DNA Marker, 自下而上 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; N 为阴性对照; 1~6 泳道为试验菌株。

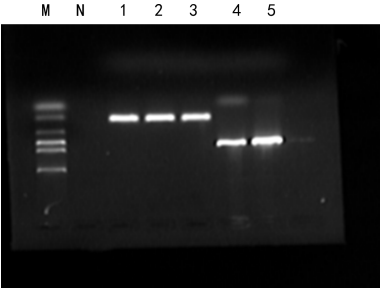
图 1 blaKPC-2 基因电泳图

2.6 其他 β -内酰胺酶基因检测结果 对 21 株产 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌, 同时检测其他 β -内酰胺酶基因, 结果显示 19 株携带 blaKPC-2 基因同时携带 blashv-1 基因, 2 株携带 blaKPC-2 基因同时携带 blashv-1、blactx-m-15 基因。blashv-1、blactx-m-15 基因电泳图见图 2、3。



注: M 为 DNA Marker, 自下而上 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; P 为阳性对照, N 为阴性对照; 泳道 1~3 为试验菌株。

图 2 blashv-1 基因电泳图



注: M 为 DNA Marker, 自下而上 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; N 为阴性对照; 泳道 1~3 为 blaKPC-2 试验菌株, 泳道 4~5 为 blactx-m-15 试验菌株。

图 3 blactx-m-15 基因电泳图

3 讨 论

近年来, 随着广谱抗菌药物的广泛使用、侵袭性操作应用等原因, 细菌性耐药问题成为全球医学界共同关注的焦点^[5]。近几年, 长期大量、不规范合理使用碳青霉烯类抗菌药物导致对其耐药的肠杆菌呈逐年发展的趋势^[6]。在社区及医院内感染中, 肠杆菌科细菌是重要的病原菌, 临床上多重耐药菌的出现也使其耐药问题日益严峻^[7]。肺炎克雷伯菌检出率在各家医院均处于前 5 位, 是造成医院内感染的重点细菌, 其耐药率呈逐年上升的趋势。据全国细菌耐药监测网 (CHINET) 监测报告, 2015—2016 年我国肺炎克雷伯对碳青霉烯类的耐药率为 14.4%~15.8%^[8], 各地区稍有不同, 可能与用药方式和习惯有关。本院 2017 年 CRKP 检出率为 8.2%, 根据 CHINET 监测数据显示, 2017 年 CRKP 的检出率平均为 9.0%, 安徽省细菌耐药监测网显示, 安徽省 CRKP 的检出率平均为 17.8%。可见本院肺炎克雷伯菌的耐药情况低于全省, 这可能与本院用药情况、用药习惯等有关, 今后继续加强用药管理, 延缓耐药菌产生。

产生碳青霉烯水解酶是肠杆菌科细菌碳青霉烯耐药的主要机制^[9]。本研究发现,本院 23 株 CRKP 均产 ESBLs,耐药基因检出情况为 19 株同时携带 blaK-PC-2、blaSHV-1, 2 株同时携带 blaKPC-2、blaSHV-1、blaCTX-M-15,与宫雪等^[2]报道相似。提示本院 CRKP 的主要耐药机制可能是 KPC-2 型碳青霉烯酶同时联产 SHV-1 型酶。另 2 株未检出 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌,其耐药机制后续将继续研究。

本研究中 CRKP 分布广泛,在临床能引起多个部位感染,主要分离自痰标本,占各类标本的 69.57%,这些细菌来自不同科室,而临床主要来源于神经外科和 ICU 这些重症患者,占总分离率的 65.21%,与国内报道一致^[10]。经国内一些专家研究证实,CRKP 可以在重症病房与普通病房间传播,是导致肺炎克雷伯菌耐药性不断上升及 CRKP 检出率逐年提高的主要原因。

综上所述,为预防 CRKP 检出率上升,有效控制医院内感染的发生,应积极配合医院感染部门,并与临床进行沟通,做好 CRKP 的监测与防控工作,以降低产生 CRKP 风险,为临床治疗肺炎克雷伯菌导致的感染提供帮助。

参考文献

[1] 姚志宏,刘真真.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的流行病学、耐药与传播机制研究进展[J].中国抗生素杂志,2017,42(12):1107-1112.

[2] 宫雪,王勇,张吉生,等.耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药机制及同源性分析[J].临床检验杂志,2018,36(4):270-273.

[3] 马红玲,肖圣达,杜帅先,等.碳青霉烯酶 3 种检测方法间的比较[J].临床血液学杂志,2018,31(2):105-107.

[4] 姚慧琳,范德胜,陆士海,等.重症监护病房耐亚胺培南肺炎克雷伯菌耐药基因检测[J].蚌埠医学院学报,2013,38(1):99-102.

[5] 高倩倩,殷杏,祝俊英,等.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的分子特征[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(1):53-57.

[6] 张艳双,刘静,万楠,等.耐碳青霉烯肠杆菌科(CRE)耐药分子机制及控制流行的应对策略[J].现代检验医学杂志,2019,34(2):1-4.

[7] 姚欣,冯莉,朱良苗.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学及耐药机制[J].中国抗生素杂志,2018,43(1):85-90.

[8] 李耕,吕媛,郑波,等.中国细菌耐药监测研究 2015-2016 革兰氏阴性菌监测报告[J].中国临床药理学杂志,2017,33(23):2521-2542.

[9] 刘周,李昕,储雯雯,等.碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌临床分布及耐药特征分析[J].临床医学,2018,39(3):274-277.

[10] 董爱英,陈东科,李春娟,等.30 株 CRE 临床感染特点及 blaNDM-1 基因检出情况分析[J].中国抗生素杂志,2018,43(5):513-518.

(收稿日期:2019-07-29 修回日期:2020-03-09)

(上接第 1661 页)

[4] 刘静,徐秀章,丁浩强,等.广州地区无偿献血者的 CD36 缺失频率及其分子基础研究[J].中国输血杂志,2018,31(10):1132-1135.

[5] JAYEWARDENE A F, MAVROS Y, HANCOCK D P, et al. Associations between CD36 gene polymorphisms, fat tolerance and oral fat preference in a young-adult population[J]. Eur J Clin Nutr, 2016, 70(11):1325-1331.

[6] MOMENI-MOGHADDAM M A, ASADIKARAM G, AK-BARI H, et al. CD36 gene polymorphism rs1761667 (G>A) is associated with hypertension and coronary artery disease in an Iranian population[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2019, 19(1):140-144.

[7] WANG D D, LI W G, ZHANG Y Y. Association of CD36 expression and polymorphism with serum biochemical indices in cherry valley duck[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2):15027994.

[8] JOMOUI W, TEPAKHAN W, KARNPEAN R. Strong linkage of the single nucleotide polymorphism rs77308790 with an α^0 -thalassemia (α^{SEA} Deletion) allele and applica-

tion for double-check diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis syndrome in Thailand [J]. Hemoglobin, 2019, 43(4/5):236-240.

[9] 杨彩虹,杨敏,于璐,等.高分辨率熔解曲线技术用于结核分枝杆菌临床分离株异烟肼耐药性的快速检测[J].中国人兽共患病学报,2017,33(5):403-412.

[10] KHATAMI F, LARIJANI B, HESHMAT R, et al. Hypermethylated RASSF1 and SLC5A8 promoters alongside BRAF^{V600E} mutation as biomarkers for papillary thyroid carcinoma[J/OL]. J Cell Physiol, 2020[2020-02-13]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32017063/?from_single_result=Hypermethylated+RASSF1+and+SLC5A8+promoters+alongside+BRAF%28V600E%29+mutation+as+biomarkers+for+papillary+thyroid+carcinoma&expanded_search_query=Hypermethylated+RASSF1+and+SLC5A8+promoters+alongside+BRAF%28V600E%29+mutation+as+biomarkers+for+papillary+thyroid+carcinoma.

(收稿日期:2020-02-15 修回日期:2020-03-10)