

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.15.007

## 肺炎克雷伯菌外排泵基因研究与耐药性的关系\*

诸宏伟,臧欢欢,刘培培,沈怀云,王磊

蚌埠医学院第一附属医院儿科,安徽蚌埠 233004

**摘要:**目的 分析肺炎克雷伯菌外排泵基因研究与耐药性的关系,为细菌耐药管理提供依据。方法 选取 2016 年 1 月至 2018 年 12 月在该院住院的儿科患儿,从粪便、痰液、血液、组织液等标本中分离获得鉴定肺炎克雷伯菌 144 株,对其进行耐药性分析、基因分析及相关性分析。结果 耐药性分析结果显示,肺炎克雷伯菌对氨苄青霉素耐药率最高,对亚胺培南、美罗培南的敏感性较高。肺炎克雷伯菌的外排泵基因检出率为 0.0%~86.8%,阳性率最高为 AcrAB-TolC,最低为 qepA。检出外排泵基因 3~6 个,检出耐药药物品种 1~10 个,耐药药物品种数与外排泵基因存在正相关性( $r=0.412, P<0.05$ ),qacE $\Delta$ 1-sull 的耐药药物品种数高于其他类型的基因,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 肺炎克雷伯菌外排泵基因与耐药性存在相关性,外排泵类型、数量都会增加耐药风险。

关键词:肺炎克雷伯菌; 外排泵; 基因; 耐药

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)15-2133-03

Relationship between efflux pump gene and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae*\*

ZHU Hongwei, ZANG Huanhuan, LIU Peipei, SHEN Huaiyun, WANG Lei

Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Bengbu

Medical College, Bengbu, Anhui 233004, China

**Abstract: Objective** To analyze the relationship between efflux pump gene of *Klebsiella pneumoniae* and drug resistance, so as to provide basis for bacterial drug resistance management. **Methods** Totally 144 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated and identified from feces, sputum, blood, tissue fluid and other samples from January 2016 to December 2018 in the hospital. Drug resistance analysis, gene analysis and correlation analysis were performed. **Results** The results of drug resistance analysis showed that *Klebsiella pneumoniae* had the highest resistance rate to ampicillin, and the sensitivity to imipenem and meropenem was higher. The positive rate of efflux pump gene in *Klebsiella pneumoniae* was 0 to 86.8%, the highest positive rate was AcrAB-TolC and the lowest was qepA. Three to Six efflux pump genes and 1 to 10 drug-resistant drugs were detected, there was a positive correlation between them ( $r=0.412, P<0.05$ ), the data of qacE $\Delta$ 1-sull resistant varieties was higher than that of other types of genes, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The efflux pump gene of *Klebsiella pneumoniae* is correlated with drug resistance. The type and quantity of efflux pump will increase the risk of drug resistance.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; efflux pump; gene; drug resistance

细菌耐药已成为公共卫生问题,耐药菌感染是感染性疾病疗效欠佳、住院时间延长、患者死亡的重要原因。肺炎克雷伯菌是常见的病原菌,占医院感染的 15%~20%,可引起各种肺外感染,包括泌尿系统感染、肠炎、脑膜炎、菌血症等<sup>[1]</sup>。近年来因抗菌药物滥用、不合理用药等原因,肺炎克雷伯菌耐药率呈逐年上升趋势,已成为“超级耐药”细菌,在全世界广泛传播,分离率仅次于大肠杆菌<sup>[2]</sup>。外排泵是细菌耐药的重要途径,进行外排泵基因分析,有助于分析细菌的耐药机制。本文尝试分析肺炎克雷伯菌外排泵基因与耐药性的关系,为细菌耐药管理提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 菌株来源于 2016 年 1 月至 2018 年 12 月在该院住院的儿科患儿,从粪便、痰液、血液、组织液等标本中分离获得,经全自动菌株鉴定药敏分析仪进行初筛,对看家基因 GyrA、ParC 进行基因扩增与测序,并对比鉴定,确定菌种,共获得菌株 144 株。仪器设备:KB 药敏纸片,PCR 引物,PCR 反应试剂盒,序列测定,梯度 PCR 仪, D3024 台式高速微量离心机, CHB-100 恒温金属浴, JY-SPB 电泳仪,全自动菌株鉴定药敏分析仪,凝胶成像系统,超净工作台恒温水浴锅,紫外透射仪等。材料:琼脂糖, MH 培养基, DNA

\* 基金项目:安徽省高等学校自然科学研究一般项目(KJ2015B111by)。

作者简介:诸宏伟,男,副主任医师,主要从事儿科疾病研究。

marker DL-2000, PCR 反应应用 Eppendorf 管, dNTP 聚合酶。

## 1.2 方法

**1.2.1 药敏分析** 规范操作, 挑选单个菌落, 置入菌种保存管 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 需要检验时, 复苏细菌, 挑选冻存菌接种在 MH 血琼脂平板上, 划线后  $37^{\circ}\text{C}$  过夜静置培养。药敏试验采用 KB 纸片扩散法, 质控菌株: 肺炎克雷伯菌 ATCC 700603, 大肠埃希菌 ATCC 25922。参照美国 2015 年临床和实验室诊断标准、WHONET5.6 软件药敏数据分析, 进行药敏性判断。药敏药物主要包括氨苄青霉素、氨苄舒巴坦、头孢唑林、头孢曲松、头孢他啶、氨曲南、头孢吡肟、环丙沙星、呋喃妥因、庆大霉素、复方磺胺甲噁唑、亚胺培南、美罗培南、左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦。

**1.2.2 基因检测** 基因提取: 煮沸法提取 DNA, 将菌种接种到麦康凯平板上, 放入孵箱内  $35^{\circ}\text{C}$  过夜, 分离培养得到单个细菌菌落, 放入微量离心管装载。吸取  $200\ \mu\text{L}$  无菌双蒸水放入微量离心管, 以取菌环提取细胞的细菌菌落, 放入离心管, 均匀混合, 密封离心管, 将离心管放入  $100^{\circ}\text{C}$  沸水煮沸  $100\ \text{min}$ , 将煮沸后的离心管放入离心机  $8\ 000\ \text{r}/\text{min}$  离心  $30\ \text{s}$ , 取上清液置入另外一个微量离心管,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 备用。

基因检测: (1) 设计引物, 外排泵基因包括 *oqxA* (引物序列 P1: CTC GGC GCG ATG ATG CT, P2: CCA CTC TTC ACG GGA GAC GA, 产物  $392\ \text{bp}$ )、*oqxB* (引物序列 P1: TTC TCC CCC GGC GGG AAG TAC, P2: CTC GGC CA1 TTT GGC GCG TA, 产物  $512\ \text{bp}$ )、*AcrAB-TolC* (引物序列 P1: ATG CAA AAT TAT TCG CTT TCA GGC, P2: GAT ACA CAC CGC CTC CTC AAA, 产物  $420\ \text{bp}$ )、*qepA* (引物序列 P1: GCC GAA CGC CGC TGC CGA CAG, P2: TGC TGC TGA CGC TGG CGC TC, 产物  $512\ \text{bp}$ )、*tehA* (引物序列 P1: ATA GCC CAC CGC TTT GCC, P2: CGT TAC GCC AGC ACC CTC T, 产物  $301\ \text{bp}$ )、*emrD* (引物序列 P1: CCT GGC GTA GCG GAG ATG, P2: GGC CGT AGA ATA GCT GTG AAA T, 产物  $378\ \text{bp}$ )、*qacE $\Delta$ 1-sull* (引物序列 P1: TAG CGA GGG CTT TAC TAC TAA GC; P2: ATT CAG AAT GCC GAA CAC CG, 产物  $300\ \text{bp}$ )。 (2) 配置工作液, 取出引物进行高速离心, 根据引物标注的量向离心管加入无菌蒸馏水, 震荡溶解, 配置引物原液,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 将配置好的引物原液按照  $1:20$  比例稀释后离心。 (3) 检测基因, 操作前计算反应体系量, 将 EP 管放在冰盒上, 做好标记。取 EP 管, 计算反应体系中的各个试剂量顺序, 加入 EP 管, 加入 T 安全 DNA 聚合酶, 瞬时离心, 混合; 吸取  $23\ \mu\text{L}$  配置好的反应液, 加入到每个小的 EP 管, 每个 EP 管加入  $2\ \mu\text{L}$  DNA 模板液, 加入 1 滴石蜡油。反应完成后,  $8\ 000\ \text{r}/\text{min}$  瞬时离心, 放入 DNA 扩增仪

扩增基因。 (3) 最后进行琼脂糖凝胶电泳, 吸取  $1\ \mu\text{L}$  上样缓冲液,  $4\ \mu\text{L}$  的扩增产物混合, 加入凝胶点样孔, 第一个点样孔加入  $4\ \mu\text{L}$  DNA 标记, 最后一个加入无菌水, 作为阴性对照。电泳仪电压  $100\ \text{V}$ , 电泳  $40\ \text{min}$ , 然后用  $0.5\ \mu\text{g}/\text{L}$  溴化乙锭染色, 进行自动分析。

**1.3 观察指标** 分析抗菌药物耐药情况、外排泵基因检出情况、耐药菌药物品种数与外排泵基因阳性个数的相关性等。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行统计学处理, 计数资料以率表示, 外排泵基因阳性与阴性耐药情况对比采用  $\chi^2$  检验, 相关性分析采用 Spearman 相关性分析, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 耐药情况** 耐药性分析结果显示, 肺炎克雷伯菌中对氨苄青霉素耐药率最高, 为  $85.4\%$  ( $123$  例), 对亚胺培南、美罗培南的敏感性较高, 分别为  $4.2\%$  ( $6$  株)、 $7.6\%$  ( $11$  株)。

**2.2 肺炎克雷伯菌的外排泵基因检出情况** 本研究一共检测了 7 种类型外排泵基因, 其中 *AcrAB-TolC*  $125$  例, 占  $86.8\%$ ; *emrD*  $120$  例, 占  $83.3\%$ ; *oqxA*、*oqxB* 均为  $114$  例, 占  $79.2\%$ ; *qacE1-sull*  $112$  例, 占  $77.8\%$ ; *tehA*  $98$  例, 占  $68.1\%$ ; *qepA* 未检出。

**2.3 相关性分析** 本研究检出外排泵基因  $3\sim 6$  个, 检出耐药药物品种  $1\sim 10$  个, 耐药药物品种数与外排泵基因存在正相关性 ( $r = 0.412, P < 0.05$ ), 其中 *qacE $\Delta$ 1-sull* 的耐药药物品种数为 5 种, *AcrAB-TolC*、*emrD*、*oqxA*、*oqxB*、*tehA* 耐药药物品种数为 2 种, 明显低于 *qacE $\Delta$ 1-sull*, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

肺炎克雷伯菌是人类呼吸道及肠道的常居菌, 也是社区获得性和医院内感染都相关的重要条件致病菌。近年来由该菌所致的院内感染日渐增多, 该菌对各种抗菌药物的耐药率及检出的耐多药肺炎克雷伯菌、耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌甚至泛耐药肺炎克雷伯菌亦有增多趋势, 导致临床医生在治疗该菌导致的感染时困难重重。2015 年中国细菌耐药监测网显示, 在耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌中, 以肺炎克雷伯菌最多, 其对亚胺培南、美罗培南的耐药率均超过  $10.0\%$ , 各医院泛耐药肺炎克雷伯菌的总检出率达  $19.7\%$ 。

细菌耐药一般为各种耐药机制协同作用的结果, 其中外排泵在细菌耐药性方面发挥了重要作用。 *AcrAB-TolC* 是目前被广泛研究的一种外排泵系统, *AcrA* 是一种膜融合蛋白, 横跨细胞膜, 将内膜蛋白 *AcrB* 和外膜蛋白 *TolC* 连接在一起, 使之形成一个贯穿细胞膜的密封通道, 将药物由胞内运输到胞外。内膜蛋白 *AcrB* 负责摄取并转运特异的底物, 外排多种抗菌药物如内酰胺类、喹诺酮类、大环内酯类等, 还能整个 *AcrAB-TolC* 泵提供能量。外膜蛋白 *TolC* 序列相对保守, 可与不同的膜融合蛋白(下转第 2139 页)

- Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] 杨益锋, 曾丹, 石青峰, 等. CS5100 全自动血凝分析仪检测低分子肝素抗-Xa 活性的性能验证[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(57):201.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of performance of quantitative measurement procedures, approved guideline-3rd edition: EP5-A3[S]. Wayne, PA, USA, CLSI, 2014.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias, approved guideline 3rd edition: EP15-A3[S]. Wayne, PA, USA, CLSI, 2014.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedure: a statistical approach; approved guideline: EP-6A[S]. Wayne, PA, USA, NCCLS, 2003.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: C28-A2[S]. Wayne, PA, USA, NCCLS, 2000.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: EP17-A2[S]. Wayne, PA, USA, CLSI, 2012.
- [8] 丛玉隆, 冯仁丰, 陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004:96-108.
- [9] 孙臻懿, 潘洁, 彭波. 游离甲状腺素线性及回收实验的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(5):341-346.
- [10] 李育敏, 张水兰, 阚丽娟, 等. EP-15A3 在荧光定量 PCR 测定 HBV-DNA 精密度和正确度验证中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5):629-631.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证: WS/T 492-2016[S]. 北京: 北京标准出版社, 2016.
- [12] 贾建美, 刘春霞. AU2700 全自动生化仪检测 K、ALT 和 CREA 的分析性能验证[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(3):111-114.
- [13] 张淑斌, 史伟峰. 罗氏 Cobas8000 e602 检测促甲状腺激素的性能验证[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(5):584-586.
- [14] 中华医学会内分泌学分会. 成人甲状腺功能减退症诊治指南[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33(2):167-180.
- [15] 姚爱荣. 罗氏电化学发光项目试剂盒分析性能验证[J]. 新疆医学, 2016, 46(7):842-846.

(收稿日期:2019-11-28 修回日期:2020-04-10)

(上接第 2134 页)

结合, 形成多种外排泵的外膜通道。若 TolC 基因缺失, 则外排泵作用减弱, 细菌对药物的敏感性随之增加。若移除肺炎克雷伯菌的 AcrAB-TolC 泵, 则细菌的适应性、耐药性及毒力都将改变。

本研究显示, 肺炎克雷伯菌的耐药情况并不乐观, 尽管对亚胺培南、美罗培南的敏感性较高, 但是对其他抗菌药物都存在不同程度的耐药。相关性分析显示, 肺炎克雷伯菌外排泵基因与耐药性存在相关性, 外排泵类型、数量都会增加耐药风险, 外排泵的基因携带数越多, 则耐药的药物品种数也越多, qacE $\Delta$ 1-sull 对耐药影响较大。外排泵基因类型较多, 包括 ABC 超家族、MFS 家族、RND 家族、SMR 家族、MATE 家族等, 不同类型的基因类型引起的耐药机制不尽相同, 目前已发现的外排泵基因超过 30 种<sup>[3-4]</sup>, 本文简单分析了 7 种外排泵基, 其中阳性率最高为 AcrAB-TolC, 占 86.8%, 最低为 qepA, 未检出。检出的耐药药物品种为 1~10 个, qacE $\Delta$ 1-sull 的耐药药物品种数高于其他类型的基因。

外排泵基因的检测在耐药预测、合理用药、耐药机制分析方面有重要意义。外排泵抑制剂已进入临床研究阶段, 尽管尚无上市药物, 但是外排泵抑制剂具有重大的发展潜力<sup>[5-6]</sup>。近年来, 局域外排泵基因、外排泵引起耐药机制的研究越来越深入, 有学者尝试

针对外排泵进行新药研发, 如研发新的抗菌药物剂型, 对药物从纳米粒子、纳米胶束、脂质体等层面进行改造, 降低药物外排泵引起的耐药风险<sup>[7]</sup>。

## 参考文献

- [1] 杨雪, 刘琳, 张湘燕. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌的耐药机制及治疗策略研究进展[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(4):430-434.
- [2] 李佛萧, 刘向群. 多重耐药肺炎克雷伯杆菌外排泵 AcrAB-TolC 的研究[J]. 中国热带医学, 2017, 17(11):1081-1085.
- [3] 刘海洋, 张亚培, 侯渊博, 等. 肺炎克雷伯菌 OqxAB 外排泵与生物膜形成相关性研究[J]. 中国抗菌药物杂志, 2017, 42(8):698-703.
- [4] 赵云金, 许文芳, 金法祥, 等. acrAB 外排泵对肺炎克雷伯菌耐环丙沙星作用的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(16):3604-3606.
- [5] 李碰玲, 王敏, 赵志丹, 等. 新生儿科产 NDM-1 耐碳青霉烯类抗菌药物肺炎克雷伯菌主动外排泵基因 acrA 的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(5):405-410.
- [6] 陈小燕, 潘珏. 细菌耐药外排泵的研究进展[J]. 微生物与感染, 2016, 11(3):183-187.
- [7] 王于莉, 姜昕汝, 郑月娟. 外排泵介导肺炎克雷伯菌耐药的研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6):1351-1357.

(收稿日期:2019-12-20 修回日期:2020-03-07)