

产超广谱 β -内酰胺酶多重耐药的肺炎克雷伯菌 相关基因研究

李瑞蓉 李连青 李浩 高亚静 陕柏峰 崔雪萍 王春芳

基金项目:国家重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”(2009ZX10004-203)

作者单位:030006 太原市,山西中医学院第三中医院(李瑞蓉)

030012 太原市,山西省临床检验中心(李连青 崔雪萍)

030001 太原市,山西医科大学第一医院(李浩)

030001 太原市,山西医科大学(高亚静 陕柏峰 王春芳)

通讯作者:李连青, E-mail: sxllq@tom.com

【摘要】 目的 了解山西地区五家医院多重耐药的肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)的耐药特点,并研究其产超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum β -lactamaes, ESBLs)多重耐药的 KP 相关基因的流行情况。方法 收集 2010 年 1 月-2012 年 12 月山西地区五家医院临床标本中分离的 KP 2516 株,采用药敏试验(K-B 法)和 ESBLs 确证实验筛选多重耐药的 KP,采用 PCR 法扩增 ESBLs 多重耐药的 KP 相关基因,选取阳性产物进行测序并在 Genbank 进行分析。结果 2516 株 KP 中,筛选出 40 株产 ESBLs 的多重耐药 KP。PCR 法基因扩增检测出 40 株 blaTEM 型,1 株 SHV 型和 4 株 KPC 型;检测出染色体介导的 GyrA 型 32 株,质粒介导的 qnrA 型 8 株, qnrB 型 15 株,以及 qnrS 型 2 株;没有检出金属酶 NDM-1 基因。结论 多重耐药的 KP 耐药机制非常复杂,多重耐药菌株的出现导致同一菌株中同时携带几种基因。因此,应加强临床病例的监测,合理使用抗菌药物,减少泛耐药菌株的传播。

【关键词】 肺炎克雷伯菌;多重耐药;超广谱 β -内酰胺酶;基因型

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2014.01.004

The related gene research of multidrug resistance *klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β -lactamaes

LI Rui-rong¹, LI Lian-qing², LI Hao³, et al. ¹Third Hospital of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030006, China ²Clinical Laboratory Center of Shanxi Province, Taiyuan 030012, China ³The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

【Abstract】 Objective To investigate resistant characteristic of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* (KP) in the five hospitals of Shanxi province, and to study the related gene prevalence condition of multidrug resistance KP producing extended spectrum β -lactamaes (ESBLs) in several areas of Shanxi province. **Methods** 2516 strains of KP were isolated in clinical specimens from January 2010 to December 2012. multidrug resistance KP were detected by drug sensitive test (K-B method) and ESBLs confirmed experiment. The related gene of multidrug resistance KP was amplified by PCR method. The positive products were selected to sequenced, and the results were analyzed on Genbank. **Results** In 2516 strains of KP, 40 strains of multidrug resistance KP producing ESBLs were isolated. The detection of PCR method showed that there were 40 strains of TEM type, 1 strain of SHV type, 4 strains KPC type. There were 32 strains GyrA type chromosome-mediated, and 8 strains qnrA, 15 strains qnrB, 2 strains qnrS of plasmid-mediated. There was no metal enzyme NDM-1 gene detected. **Conclusion** The phenomenon of multidrug resistance KP is much more serious and the resistant mechanism is very complex as well. Multiple resistant strains lead to the same strains that carry several genes, so the monitoring of clinical cases should be strengthened and the use of antimicrobial agents should be rational so as to reduce the spread of resistant strains.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; Multidrug resistance; Extended spectrum β -lactamaes; Genotype

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是医院引起感染的常见病原菌,根据全国细菌耐药性监测网数据^[1,2]显示,临床标本分离出的菌株中,KP在

所有分离菌中排名第三位。主要原因是近二十年来抗生素在临床的不规范使用导致 KP 耐药的现象日趋严重,从而引发细菌的多重耐药问题。本文研究

收集山西地区五家三甲医院的多重耐药的 KP, 对相关基因进行分析研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2010 年 1 月-2012 年 12 月山西省不同地区五家三甲医院 (山西医科大学第一临床医学院, 山西省医科大学第二临床医学院, 山西省人民医院, 临汾市第一人民医院及长治市和平医院) 临床分离的 2516 株 KP。标本来源科室主要为呼吸科、神内科、ICU、血液科、肿瘤科和放疗科。所有菌株均于 -70 ℃ 保存。

1.2 仪器与试剂 菌株鉴定用法国梅里埃 API20E 鉴定板, 药敏纸片和产超广谱 β -内酰胺酶 (extended spectrum β -lactamaes, ESBLs) 确证纸片均购于英国 Oxiod 公司。DNA 提取和 PCR 扩增试剂为北京生物工程公司产品。主要仪器为生物安全柜 (BIOBASE), 电热恒温培养箱 (德国贺利斯公司), 高压灭菌锅 (HIRAYAMA), -70 ℃ 低温冰箱 (日本 SANYO 公司), 电子天平 (上海奥豪斯国际贸易有限公司), 高速离心机和微量加样器 (德国 Eppendorf), PCR 扩增仪 (上海 BIONEER 柏业贸易有限公司), 水平凝胶电泳槽 (上海复生生物工程研究所), Bio-RAD 紫外线透射拍照系统 (意大利 BIORAD)。

1.3 药敏试验及 ESBLs 确证实验 药敏试验采用 K-B 纸片法。ESBLs 确证实验依据 2009 年 CLSI 推荐标准方法, 同时使用头孢他啶 (30 μ g) 和头孢他啶/克拉维酸 (30/10 μ g), 头孢噻肟 (30 μ g) 和头孢噻肟/克拉维酸 (30/10 μ g) 两对药敏纸片, 当两种药物中有任何一个在加克拉维酸后抑菌环直径与不加克拉维酸的抑菌环直径相比增大值 ≥ 5 mm, 可确认为 ESBLs 菌株。质控菌株 KP ATCC70063、大肠埃希菌 ATCC25922 均购于卫生部临床检验中心。

1.4 PCR 模板制备 采用煮沸法提取模板, 用接种环挑取血琼脂培养基上 2~3 个单个的新鲜菌落置于内含 200 μ l 双蒸水的 1.5 ml 离心管中。振荡 3 s 混匀后, 沸水中煮 15 min, 以离心半径 3 cm, 10 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液作为 DNA 模板, -20 ℃ 冰箱保存备用。

1.5 引物序列 根据引物设计软件 premier 5.0 确定引物序列, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, PCR 扩增基因型及引物序列见表 1。反应体系 F (20 μ mol/L) 1 μ l 和 R (20 μ mol/L) 1 μ l, 10 \times buffer 为 2 μ l, dNTP (10 mol/L) 为 1 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μ l, Taq 酶 1 U, 模板 DNA 2 μ l, 补足纯水至 20 μ l。TEM、SHV、KPC 型反应条件为 94 ℃ 预变性 5

min, 然后 94 ℃ 变性 60 s, 52 ℃ 退火 60 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延长 10 min。GyrA、qnrA、qnrB 和 qnrS 反应条件为 94 ℃ 预变性 2 min, 然后 94 ℃ 变性 45 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延长 5 min。NDM-1 型反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min, 然后 94 ℃ 变性 15 s, 退火 30 s (引物 1 退火温度 55 ℃, 引物 2 退火温度 60 ℃), 72 ℃ 延伸 30 s, 25 个循环, 最后 72 ℃ 延长 5 min。

表 1 PCR 扩增基因型及引物序列

基因名称	引物序列	产物长度 (bp)
TEM	F-GGCGGAATGGCTCATCACGA	650
	R-ACGCTCGCTTTGCTAT	
SHV	F-TGCGCAAGCTGCTGACCAGC	305
	R-TTAGCGYTGCCAGTGCTCGA	
GyrA	F-TGCCGAGAGAAATTACACC	625
	R-AATATGTTCATCAGCCC	
qnrA	F-AAGGAAGCCGTATGGATATT	670
	R-AGCTAATCCGGCAGCACTAT	
qnrB	F-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469
	R-ACGATGCCTGGTAGTTCTCC	
qnrS	F-ATGGAACCTACGATCAGACATAT	657
	R-TTAGTCAGGACAAACAATAACCC	
KPC	F-GCTACACCTAGTCCACCTTC	989
	R-ACAGTGGTTGTAATCCATGC	
NDM-1 (引物 1)	F-17U-191CAGCACACTTCCTATCTC	292
	R-17L-465CCGCAACCATCCCTCTT	
NDM-1 (引物 2)	F-58GGCGGAATGGCTCATCACGA	287
	R-344CCGAACACAGCCTGACTTTC	

2 结果

2.1 药敏试验结果 2516 株 KP 中共检出 40 株多重耐药 KP 菌株。ESBLs 确证实验结果显示, 40 株多重耐药的 KP 全部为 ESBLs 菌株。

2.2 PCR 扩增基因分型 40 株多重耐药的 KP 中, 全部扩增出 TEM 基因型, 扩增率为 100.0%; 1 株扩增出 SHV 型, 扩增率为 2.5%; 32 株扩增出染色体 GyrA, 扩增率为 80.0%; 8 株含质粒 qnrA 型, 扩增率为 20.0%; 15 株含质粒 qnrB 型, 扩增率为 37.5%; 2 株含质粒 qnrS 型, 扩增率为 5.0%; 4 株扩增出 KPC 基因型, 扩增率为 10.0%; 没有菌株扩增出 NDM-1 型, 结果见表 2。TEM 型、GyrA 型、qnrA 型和 KPC 型 PCR 产物电泳图见图 1~图 4。

3 讨论

KP 属于肠杆菌科一种重要的条件致病菌。在引起医院感染的条件致病菌中占有非常重要的地位,

表 2 40 株 ESBLs KP 的 PCR 扩增基因分型结果

基因型	株数	扩增率(%)
TEM	40	100.0
SHV	1	2.5
GyrA	32	80.0
qnrA	8	20.0
qnrB	15	37.5
qnrS	2	5.0
KPC	4	10.0

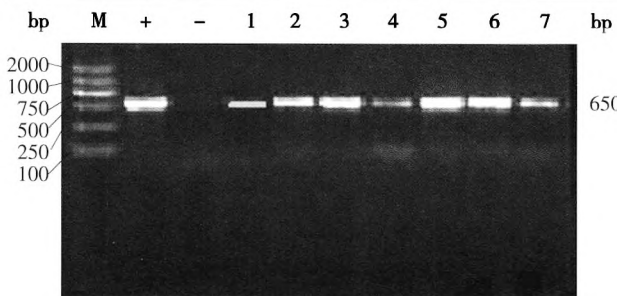


图 1 TEM 型 PCR 产物电泳图

注: M 为 2000 bpMarker; + 为阳性对照, - 为阴性对照; 1~7 为 TEM

基因型产物(650 bp)

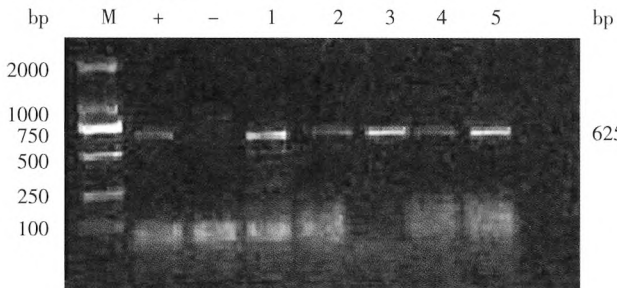


图 2 GyrA 型 PCR 产物电泳图

注: M 为 2000 bpMarker; + 为阳性对照, - 为阴性对照; 1~5 为 GyrA

基因型产物(625 bp)

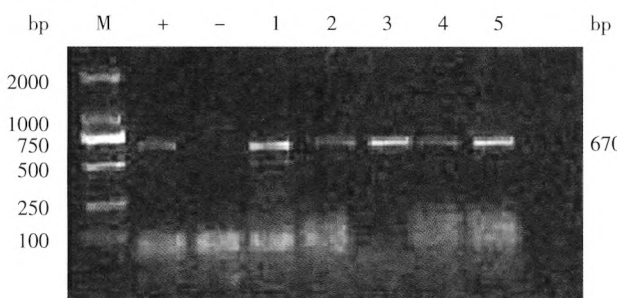


图 3 qnrA 型 PCR 产物电泳图

注: M 为 2000 bpMarker; + 为阳性对照, - 为阴性对照; 1~5 为 qnrA

基因型产物(670 bp)

由于抗生素的广泛应用导致 KP 出现多重耐药。资料^[3]表明,多重耐药的 KP 主要发生在免疫功能低下、有潜伏性疾病及重症监护的患者中。

本文研究从 2010 年-2012 年山西地区五家医院临床分离的 2516 株 KP 中,检测出 40 株多重耐

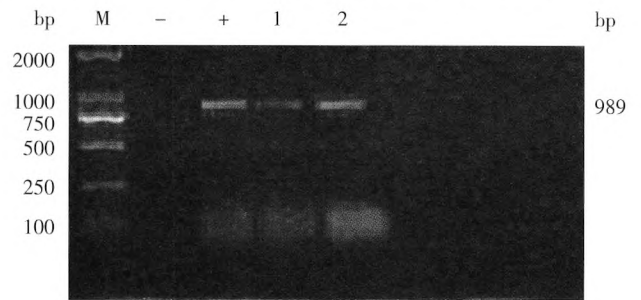


图 4 KPC 型 PCR 产物电泳图

注: M 为 2000 bpMarker; + 为阳性对照, - 为阴性对照; 1, 2 为 KPC

基因型产物(989 bp)

药的 KP, 说明 KP 是造成医院感染的重要致病菌。KP 的多重耐药问题引起了医学界的极大关注^[4,5]。2008 年印度新德里首先从 KP 中发现了超级细菌金属酶 NDM-1^[6]。国际上陆续报道在英国、巴基斯坦等国都发现产 NDM-1 泛耐药肠杆菌科的细菌(超级细菌)。我国也已经发现 3 例超级细菌。

KP 的主要耐药机制是三代头孢抗生素的应用导致 ESBLs 和头孢菌素酶的出现。ESBLs 除了能水解青霉素类、一代头孢和二代头孢抗生素外,还可水解三代头孢抗生素以及单环 β-内酰胺酶,甚至第四代抗生素。第四代头孢类碳青霉烯类抗生素是目前所使用的抗菌药物中抗菌谱最广、抗菌活性最强的一类抗生素,常作为多重耐药的革兰阴性杆菌的最后一道防线,但目前已经发现 ESBLs 耐药菌株。ESBLs 菌株往往携带氟喹诺酮类、氨基糖苷类等抗生素多种耐药基因,通过接合、转化和转导等形式使耐药基因在细菌间扩散。

对氟喹诺酮耐药的菌株主要与染色体介导的突变有关^[7],但 1998 年 Martínez 等^[8]在美国的 Alabama 大学分离到一株多重耐药的 KP,及 2002 年 Tran 等^[9]的研究证实,质粒能介导喹诺酮耐药,质粒介导的耐药能在肠杆菌科和铜绿假单胞菌间传播。2007 年土耳其^[10]也报道发现了产 qnrA 的基因。qnr 可在不同细菌中迅速水平传播,其引发的感染不易控制,使得院内感染大范围的流行;qnr 基因常与其他多种耐药基因共同整合作用,导致临床医生在治疗相关细菌感染时选药或联合用药的空间缩小,亚洲、美洲和欧洲等地相继出现有关报道^[11,12],因此其耐药问题越来越受到人们的关注。

碳青霉烯酶编码基因可以由染色体介导,也可以定位在质粒、整合子等可转移的基因元件上,通过质粒或转座子在不同菌种之间进行传播。碳青霉烯酶编码的 KPC 基因自 2001 年在美国纽约地区报道^[13]后,已在全球很多国家和地区出现。Wei 等^[14]于

2007 年首次报道了我国 KPC 型耐药菌株的出现。产 KPC 酶的菌株主要从 ICU, 神经内科重症住院患者中分离, 而且大部分为肠杆菌科的细菌。

本文研究的 40 株多重耐药的 KP 中, PCR 扩增结果显示, 40 株全部扩增出 TEM 型, 4 株扩增出 KPC 型, 32 株扩增出 GyrA 型, 8 株扩增出 qnrA 型, 15 株扩增出 qnrB 型, 2 株扩增出 qnrS 型。质粒介导的 qnrA、qnrB、qnrS 型等耐药基因是 ESBLs KP 对喹诺酮类抗生素耐药的重要机制。KPC 酶是 KP 对碳青霉烯类抗生素耐药的重要机制之一, 除此之外可能还存在其他耐药机制。本文研究中, 山西地区五家医院 ESBLs 多重耐药的 KP 基因型以 TEM 型为主; 多重耐药的喹诺酮类耐药基因型 qnr 主要是 qnrA1 和 qnrB4。没有检测出金属酶 NDM-I 基因。

另外, 本文研究发现 5 株 KP 同时存在 GyrA、TEM、qnrA 和 qnrB 基因型, 说明 qnr 基因常与其他多种耐药基因共同整合在一起。这与美国学者^[11]发现在 ESBLs 菌株中检出率高可能与质粒携带多重耐药基因相关的结论一致。

本文研究用 PCR 基因扩增实验证实有 4 株 KPC 型菌株。相关报道大多数是由质粒介导的 KPC 酶, 染色体介导的 KPC 酶很少见。本文研究中的 40 株多重耐药 KP 经基因测序及在 GenBank 数据库中进行比对, 发现分离自长治市和平医院的 2 株 KPC 型菌株可能是由染色体介导的 KP, 同源性序列达 99%。有报道^[15]显示, 2007 年在铜绿假单胞菌中发现 KPC 基因型, 其基因可能位于染色体上。携带 KPC-2 型泛耐药的 KP 容易导致院内感染的流行暴发^[16]。另有研究^[17]表明, 美国及以色列的部分产 KPC 酶 KP 中还携带有质粒介导的喹诺酮耐药决定簇 qnrA 和 qnrB。

抗生素的广泛应用导致耐药菌株呈不断上升趋势, 多重耐药和泛耐药菌株的出现导致同一菌株中携带几种耐药基因, 极大增加了临床治疗的难度。临床医生应合理使用抗生素, 加强细菌耐药性监测及医院感染的控制, 减少耐药株的产生及传播。

4 参考文献

- 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9: 321-329.
- 朱德妹, 汪复, 张婴元. 2003 年上海地区细菌耐药性监测. 中国感染与化疗杂志, 2005, 5: 4-12.
- 张亚莉, 杨云滨, 汪能平, 等. 危重患者医院感染临床调查分析. 中华医院感染学杂志, 2003, 13: 120-123.
- 靳颖, 刘锦, 王俊妨, 等. 产 KPC 酶肺炎克雷伯菌耐药情况及基

因型分析. 实用检验医师杂志, 2013, 5: 229-232.

- Melano R, Corso A, Petroni A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52: 36-42.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 5046-5054.
- 卜劲松. 201 株肺炎克雷伯菌耐药性分析及其 gyrA 基因分析. 中华医院感染学杂志, 2012, 22: 9-11.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 1998, 351: 797-799.
- Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5638-5642.
- Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, et al. qnrA prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive Enterobacteriaceae isolates from Turkey. *Jpn J Infect Dis*, 2008, 61: 13-17.
- Ghosh AS, Ahamed J, Chauhan KK, et al. Involvement of an efflux system in high-level fluoroquinolone resistance of *Shigella dysenteriae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242: 54-56.
- 陈刚, 糜祖煌, 翁幸璧, 等. 多药耐药肺炎克雷伯菌尿液分离株检出 GyrA 基因新亚型. 中华医院感染学杂志, 2011, 21: 4426-4430.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 1151-1161.
- Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 763-765.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 1553-1555.
- 黄支密, 糜家睿, 盛以泉, 等. 携带 blaKPC-2 型碳青霉烯酶基因泛耐药致肺炎克雷伯菌感染的暴发. 世界感染杂志, 2010, 10: 17-22.
- Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52: 2680-2682.

(收稿日期: 2014-01-20)

(本文编辑: 李霏)