

# 耐碳青霉烯类肠杆菌的同源性分析

申振华 申洁心 郑洪泽

作者单位: 251800 山东滨州, 阳信县人民医院检验科(申振华)  
265400 山东烟台, 山东玲珑英诚医院检验科(申洁心)  
256600 山东滨州, 滨州市人民医院检验科(郑洪泽)

通讯作者: 申洁心, Email: 2027414492@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.03.003

**【摘要】** 目的 研究耐碳青霉烯类肠杆菌科的基因分型, 为医院预防和控制耐碳青霉烯类肠杆菌的感染和暴发流行提供相关依据。方法 收集 2012 年 1 月—2016 年 11 月山东省阳信县人民医院临床分离的 89 株耐碳青霉烯类肠杆菌, 其中 69 株为肺炎克雷伯菌、20 株为大肠埃希菌, 建立肠杆菌基因间重复一致序列聚合酶链反应 (ERIC-PCR) 基因分型方法, 进行分子流行病学研究。结果 ERIC 结果显示, 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分为 7 个基因型 (E1~E7), 重症医学科 (ICU) 和急诊科主要存在 2 个基因型 (E3 和 E4); 耐碳青霉烯类大肠埃希菌分为 8 个基因型 (A1~A8), 均散在分布于临床的各个科室。结论 本研究耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌主要分布于 ICU 和急诊科, 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌可能存在局部暴发流行的趋势。

**【关键词】** 耐碳青霉烯类肠杆菌; 肺炎克雷伯菌; 大肠埃希菌; 同源性分析; 暴发流行

## Investigation on homology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* species

Shen Zhenhua, Shen Jiexin, Zheng Hongze. Department of Laboratory, Yangxin County People's Hospital, Binzhou 251800, Shandong, China (Shen ZH); Department of Laboratory, Shandong Linglong Yingcheng Hospital, Yantai 265400, Shandong, China (Shen JX); Department of Laboratory, Binzhou People's Hospital, Binzhou 256600, Shandong, China (Zheng HZ)

Corresponding author: Shen Jiexin, Email: 2027414492@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the gene classification of the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* species in order to provide relevant evidence for prevention and control of their infection and outbreak. **Methods** Eighty-nine strains of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, including 69 strains of *Klebsiella pneumoniae* and 20 strains of *Escherichia coli*, were collected from January 2012 to November 2016 in Yangxin County People's Hospital of Shandong Province; an *Enterobacterial* repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping method was established for molecular epidemiological studies. **Results** ERIC-PCR results showed that there were 7 genotypes (E1-E7) in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, of which 2 genotypes (E3 and E4) in the Intensive Care Unit (ICU) Department and Emergency Department. Besides, there were 8 genotypes (A1-A8) in the carbapenem-resistant *Escherichia coli*, which were scattered in various clinical departments. **Conclusion** In this study, the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteria are mainly distributed in the ICU and Emergency Department, and the carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* may have a local epidemic outbreak trend.

**【Key words】** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; Homology analysis; Epidemic outbreak

耐碳青霉烯类肠杆菌若经碳青霉烯类抗菌药物治疗无效, 则细菌的耐药基因极易通过质粒、整合子、插入序列共同区 (insertion sequence common region, ISCR) 等可移动元件广泛进行传播<sup>[1]</sup>, 导致不同菌属之间的感染, 引发医院内感染的暴发流行。

本研究针对我院临床分离的耐碳青霉烯类抗

菌药物的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌建立肠杆菌基因间重复一致序列聚合酶链反应 (*Enterobacterial* repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR) 同源性分析, 进行分子流行病学研究, 以监测我院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的暴发流行情况, 为感染的控制和相关新药的研发提

供依据,现报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集 2012 年 1 月—2016 年 11 月山东省阳信县人民医院临床分离的对亚胺培南、美罗培南、厄他培南等碳青霉烯类抗菌药物耐药的 89 株肠杆菌,其中 69 株为肺炎克雷伯菌,20 株为大肠埃希菌。

**1.2 仪器与试剂** 仪器包括 PE9700PCR 扩增仪(美国 PE 公司),Microscan 96 全自动微生物分析/药敏系统(德国西门子公司),EPS300A 型电泳仪(上海天能科技有限公司),紫外凝胶成像仪(上海复日科技有限公司),eppendorf 超速低温离心机、Thermo 生物安全柜、MUTI Block 数字干浴器、WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司),42 °C 孵箱,天平。试剂包括 10×Buffer 缓冲液、肉汤培养基、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)、Mg<sup>2+</sup>、DNA Mark、TaqDNA 聚合酶、6×loading buffer 上样缓冲液、ERIC-2 引物(大连宝生物工程有限公司)、琼脂糖、50X TAE 电泳缓冲液。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 DNA 模板的制备** 提取 89 株耐碳青霉烯类菌株的 DNA 作为模板。

**1.3.2 ERIC-PCR 方法检测细菌的同源性** 应用肠杆菌科基因间重复序列分析耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌的菌属同源性。引物序列 ERIC-2 为 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'。

**1.3.2.1 PCR 的反应体系** 反应体系共 50 μL,其中 10Xbuffer 缓冲液 5 μL、TaqDNA 聚合酶 0.5 μL、dNTP 4 μL、Mg<sup>2+</sup> 3 μL、引物 2.5 μL、DNA 模板 2 μL,加入无菌去离子水至 50 μL。

**1.3.2.2 PCR 的反应条件** 95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,26 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 1 min,4 个循环。94 °C 变性 1 min,40 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,40 个循环。72 °C 延伸 10 min。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行分析,电泳时间 1 h,电压 60 V。应用紫外凝胶成像系统观察结果。

### 2 结果

**判定标准:** 电泳基因分型主条带的位置及数量相同,有 1~2 条非主条带不相同的菌株归为同一基因型;主条带位置及数量不相同或者非主条带差 3 条以上的菌株归为不同基因型。本院耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌共分成 7 个基

因型(E1~E7),包括 E1(76 号)、E2(77、80 号)、E3(81~84、86、90、94~96 号)、E4(85、87、97 号)、E5(88 号)、E6(89、91 号)、E7(92、93 号),分布在急诊科和重症医学科(Intensive Care Unit, ICU)的肺炎克雷伯菌主要为 2 个基因型(E3 和 E4)。而本院耐碳青霉烯类抗菌药物的大肠埃希菌主要共分为 8 个基因型(A1~A8),包括 A1(3、6、22、25、26、49 号)、A2(7、18 号)、A3(15、65、78、79 号)、A4(16、19、21 号)、A5(23 号)、A6(24 号)、A7(34、36 号)、A8(73 号),都散在分布于临床各个科室。耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的部分 ERIC-PCR 电泳分型结果见图 1。

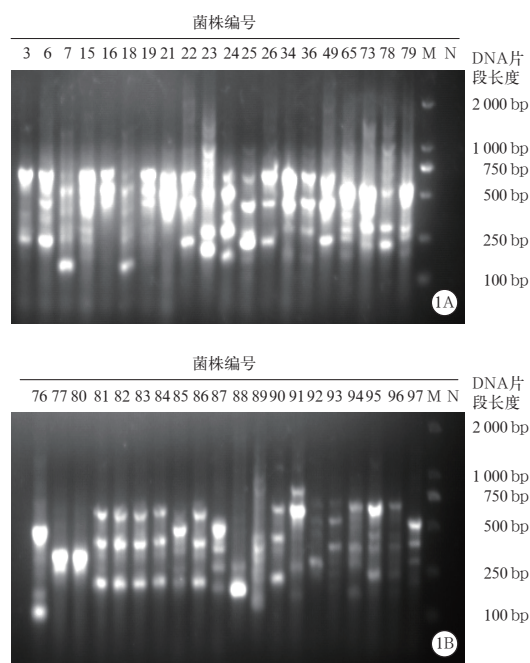


图 1 耐碳青霉烯类大肠埃希菌(A)和耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(B)的部分 ERIC-PCR 电泳分型结果

大多数相同基因型的菌株分布于不同的科室,只有少数相同基因型的菌株同时分布于 ICU 和急诊科,如来自急诊和 ICU 的 81~84 号、86 号菌株为同一基因型,并且均为肺炎克雷伯菌,我们推测可能存在局部流行暴发感染的趋势。

### 3 讨论

肠杆菌属于临床最常见的致病菌,包括多种类型的细菌,主要为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌等,可引起多种器官局部及全身多部位的感染。由于临床上不合理地使用抗菌药物,造成细菌耐药类型发生变迁,使其极易演变为“超级细菌”,导致感染者的病死率升高。

自首例携带 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷

伯菌于 2001 年被报道以来,世界各地开始相继出现与产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌相关的报道。近几年来,耐碳青霉烯类抗菌药物的肠杆菌科细菌的分离率在国内也呈现逐年升高趋势。碳青霉烯类抗菌药物为临床治疗肠杆菌感染较为有效的药物,若细菌对此类抗菌药物耐药,耐药菌株无法得到及时的控制和治疗,极有可能在医务人员与患者之间、患者之间引发交叉感染,甚至导致医院内感染的暴发流行。

医疗器械、医护人员的手、患者病房之间的变动、周转等均有成为“超级细菌”传染源的可能性。耐碳青霉烯类肠杆菌感染可在医院病房内大规模暴发流行,给患者的生命安全和经济造成了极大的损失<sup>[2]</sup>。因此,进行临床分离菌株的基因同源性分析对传染源和传播途径等因素的流行病学调查具有重要的意义。

对菌属之间进行同源性分析的方法较多,包括脉冲场凝胶电泳、随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)和重复序列 PCR(rep-PCR)<sup>[3]</sup>。脉冲场凝胶电泳属于检测金标准,既有很高的分辨率,又有很好的重复性。但是脉冲场凝胶电泳实验成本太高,难以在普通实验室开展<sup>[4]</sup>。RAPD 的优点为分辨率高,但因其引物合成的随机性,重复性相对较差。

1990 年,Sharples 等<sup>[5]</sup>首次于大肠埃希菌的基因组中发现 ERIC 片段,并将此片段称为“基因间的重复单位”。1991 年,Hulton 等<sup>[6]</sup>在肠杆菌科细菌中也找到了同样高度保守的重复序列片段,称之为 ERIC。ERIC 大多数存在于开放阅读框上下游的不翻译区域,即为基因组中可转录的非编码区域,长约为 126 bp 的序列<sup>[7]</sup>,其中包括几个反向重复序列。Versalovic 等<sup>[8]</sup>根据 ERIC 中心一段长度约 44 bp 的高度保守反向重复序列设计了反向引物,发展了 ERIC-PCR。起初 ERIC-PCR 由一个 2~4 人的团队做科研验证,之后 ERIC-PCR 陆续被用于细菌的同源性鉴定分析<sup>[9]</sup>。研究人员选择在疾病暴发状态下进行标本的采集,以研究患病风险,使 ERIC-PCR 成功应用于疾病的临床诊断。

ERIC-PCR 以 ERIC 的核心序列设计引物,由于不同的细菌之间 ERIC 重复序列位置及数量分布不同,因此可得到不同细菌之间不同片段长度的 DNA 指纹图谱<sup>[10-11]</sup>。目前,ERIC-PCR 为细菌基因学分

型最简便、快速、稳定的方法。

本研究结果显示,应用 ERIC-PCR 基因分型可将本院的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分为 7 个基因型,但在 ICU 和急诊科主要为 2 个基因型,具有很高的菌株分型相似度;耐碳青霉烯类大肠埃希菌则分为 8 个基因型,散在分布于临床的各个科室。我院耐碳青霉烯类大肠埃希菌在全院为散发状态;但在 ICU 和急诊科的部分菌株属于同一基因型,且均为肺炎克雷伯菌。因此,我院存在耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌局部流行暴发趋势的可能性极大,应当加强医院内的监测工作,增强医务人员的无菌操作意识,采取必要的措施隔离相关患者,合理、规范地使用抗菌药物,以防止耐碳青霉烯类肠杆菌的大规模暴发。

综上所述,细菌之间的同源性分析为医务人员早期预防和控制院内感染提供了可靠的依据。

#### 参考文献

- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? [J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(5): 381-393.
- 胡容,丁贵梅,向小节. 鲍曼不动杆菌感染病原菌院内分布及耐药性: 一个区域医疗中心 2014—2016 年的数据分析[J]. 实用检验医师杂志, 2018, 10(1): 40-42, 46.
- 邵海枫, 蒯守刚, 王卫萍, 等. 黏质沙雷菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(12): 1196-1198.
- 孙静静. 耐碳青霉烯 G- 杆菌碳青霉烯酶基因、整合子和 ISCR1 结构特征及基因分型研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6503-6508.
- Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria [J]. Mol Microbiol, 1991, 5(4): 825-834.
- Morsink MC, Dekter HE, Dirks-Mulder A, et al. Molecular diagnostic analysis of outbreak scenarios [J]. Biochem Mol Biol Educ, 2012, 40(2): 112-120.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823-6831.
- 苏小燕. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药机制及同源性分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
- 李犹平, 倪学勤. ERIC-PCR 技术特点及其应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(18): 5358-5360.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, García I, et al. Interaction of plasmid and host quinolone resistance [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(4): 1037-1039.

(收稿日期: 2018-07-02)

(本文编辑: 张耘菲)