

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌药物敏感性和耐药基因研究

王健, 潘亚萍, 徐元宏, 沈继录, 王中新

摘要 目的 研究碳青霉烯类抗生素耐药的肺炎克雷伯菌(CRKP)抗生素敏感性和耐药基因分析, 以及通过表型检测分析外排泵抑制剂对 CRKP 的亚胺培南、美罗培南和替加环素耐药性影响。方法 收集并筛选医院临床分离非重复的 CRKP, 采用纸片扩散法和 Vitek2 法测定临床常见抗菌药物的敏感性; 采用 Carba-NP 试验和改良 Hodge 试验对碳青霉烯酶进行筛选, 并对碳青霉烯酶耐药基因、ESBL 和 AmpC 酶基因进行 PCR 扩增和序列分析; 采用琼脂稀释法检测筛选菌株外排泵的表型; ERIC-PCR 进行同源性分析。结果 共筛选出 31 株 CRKP, Carba-NP 试验和改良 Hodge 试验显示有 1 株细菌不产碳青霉烯酶; KPC 酶基因的 PCR 检测结果显示有 27 株 KPC 酶检测阳性, 与碳青霉烯酶表型检测基本一致, 部分菌株同时还产生了 ESBL 和 AmpC 酶; 外排泵的抑制试验结果显示有 3 株对亚胺培南和美罗培南的最低抑菌浓度(MIC) 分别下降 4 倍和 8 倍, 而替加环素却未下降; ERIC-PCR 分型显示有 9 种类型, 其中 1 型 13 株, 为主要流行株。结论 CRKP 存在耐药基因积聚共存现象, 导致 CRKP 对大多数临床常用抗菌药物呈高度耐药; CRKP 产碳青霉烯酶以 KPC-2 型酶为主, 是 CRKP 对碳青霉烯类耐药的主要机制; 外排泵系统可能参与 CRKP 对碳青霉烯类耐药。

关键词 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 外排泵; 耐药

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1231-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.015

碳青霉烯类抗生素对大多数革兰阳性、阴性需氧菌、厌氧菌及多重耐药菌均有较强的抗菌活性, 已成为临床对抗耐药菌株有力的武器。2001 年首次报道了一株碳青霉烯类抗生素耐药的肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)^[1], 该株细菌能对包括碳青霉烯类抗生素在内的所有 β -内酰胺类抗生素耐药。随后不久, 世界各地均有 CRKP 菌株被报道的案例出现^[2-3]。

肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的耐药性是

目前全球性关注的热点问题^[4-5]。产碳青霉烯酶是肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物耐药最主要的耐药机制, 目前研究^[6]肺炎克雷伯菌对亚胺培南耐药主要系产生 KPC 型碳青霉烯酶。该研究对临床分离的 31 株 CRKP 的耐药表型和耐药基因进行检测分析以及外排泵抑制剂对 CRKP 的作用进行探究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 31 株 CRKP 来源于医院临床分离菌, 经法国梅里埃公司 Vitek2 全自动微生物鉴定系统鉴定, 对碳青霉烯类均耐药。

1.1.2 主要仪器和试剂 GeneAmp970 基因扩增仪(美国 PE 公司); C-880V CO₂ 孵箱、蛋白电泳分析系统(美国 Bio-Rad 公司); 高速冷冻离心机(中国 heal force 公司); 抗菌药物(美国 BBL 公司、英国 OXOID 公司); 药敏试验培养基为 Muller-Hinton 琼脂; 外排泵抑制剂(Phe-Arg- β -naphthylamide, PA β N)(美国 Sigma 公司); 标志物 DL 2 000、Ex Taq DNA 聚合酶试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 琼脂糖、引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 药敏实验及细菌鉴定 采用 CLSI 2014 版推荐的纸片扩散法和 Vitek2 法进行药敏试验并判读结果, 细菌鉴定采用全自动微生物鉴定。最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定按 CLSI2010 版推荐的琼脂稀释法进行。亚胺培南和美罗培南浓度范围为 128 ~ 0.06 mg/L。细菌接种菌量为 10⁴ CFU/点。质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、肺炎克雷伯菌(ATCC BAA1705/ATCC BAA1706)。

1.2.2 碳青霉烯酶的筛选

1.2.2.1 Carba-NP 试验 A 液配制: 取 25 ~ 50 ml 烧杯, 将 2 ml 0.5% 酚红溶液加入到 16.6 ml 纯水中, 加入 180 ml 10 mmol/L 硫酸锌溶液, 使用 0.1 N 氢氧化钠溶液(或 10% 盐酸溶液)调整 pH 值为 (7.8 \pm 0.1)。B 液配制: A 液 + 6 mg/ml 亚胺培南。步骤: 标记两个微量离心管分别为 a、b, 每管中加入

2018-03-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171606)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 王健, 男, 硕士研究生;

徐元宏, 男, 教授, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xyhong1964@163.com

100 μl 细菌蛋白抽提液(美国 Thermo Scientific 公司) 1 μl 接种环待测物(从过夜的血平板上刮取), 涡旋震荡器上剧烈震荡 5 s 后 a 管中加入 100 μl A 液 b 管中加入 100 μl B 液, 涡旋振荡混匀, 35 °C 温箱孵育 2 h 观察结果(每 30 min 观察一次颜色变化)。

1.2.2.2 改良 Hodge 试验 按 CLSI 2012 推荐的方法进行, 将 0.5 麦氏浊度单位的大肠埃希菌 ATCC25922 稀释 10 倍后涂布于 M-H 平板, 中间贴厄他培南(10 μg) 纸片, 接种环自纸片外缘向平板边缘划线接种待检菌, 注意不要划破平板表面。35 °C 过夜培养, 次日, 厄他培南抑菌圈处出现矢状生长者为待检菌产碳青霉烯酶。

1.2.3 PCR 扩增 KPC、ESBL 和 AmpC 酶基因 提取并纯化细菌基因组 DNA 作为扩增模板, KPC、NDM-1、ESBL 和 AmpC 酶基因。产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下成像分析结果。扩增产物测序均由上海生工公司完成。获得序列与 GenBank 中序列进行比对, 以证实扩增产物为目的基因片段和确定基因型。

1.3 外排泵的抑制试验 在采用琼脂稀释法测定亚胺培南单药 MIC 的同时另设一组加入泵抑制剂 PAβN(终浓度 20 mg/L) 的亚胺培南的试验组。亚胺培南的浓度范围为 128 ~ 0.06 mg/L。外排泵表型检测结果的判断以添加和不添加 PAβN 时 MIC 值降低 4 倍或 4 倍以上者可推断认为该菌具有外排泵机制。

1.4 ERIC-PCR 同源性分析 引物序列: ERIC1: ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC; ERIC2: AAGTA-ACTGACTGGGGTGAGCG。扩增条件如下: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 35 °C 退火 1 min, 2 °C 延伸 1 min, 共 20 个循环, 随后 94 °C 变性 1 min,

42 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 进行 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。取扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳(100 V, 100 min, 0.5 × TBE)。

1.5 统计学处理 使用 WHONET 5.6 软件对纸片法的抑菌圈直径药敏结果和仪器法 MIC 药敏结果进行数据处理和分析。

2 结果

2.1 药敏试验结果 所有菌株对碳青霉烯类耐药率为 100%, 对头孢菌素类、氨基糖苷类和喹诺酮类耐药率均高于 80%, 而四环素类抗生素耐药率在 20% 左右, 见图 1。

2.2 碳青霉烯酶检测结果 结果显示有 29 株 CRKP 的 Carba-NP 试验和改良 Hodge 试验均为阳性, 阳性率 93.5%。24 号株 Carba-NP 试验阳性而改良 Hodge 试验阴性, 6 号株 Carba-NP 试验和改良 Hodge 试验均为阴性。

2.3 耐药基因检测结果 PCR 结果显示 KPC 酶基因检出率为 87.1%, 均为 KPC-2 型, NDM-1 的检出率为 71.0%; ESBLs 本次检测的耐药基因中 blaCTX-M、blaSHV 和 blaTEM 阳性率分别为 61.3%、96.8% 和 77.4%; 质粒介导的 AmpC 酶检测出 DHA、CTT、FOX 酶基因, 阳性率分别为 100%、61.3%、87.1%。未检出 SME、OXA-48、GES、VIM、IMP、VEB、AAC、EBC、MOX。

2.4 外排泵的抑制试验结果 泵抑制剂 PAβN 和亚胺培南、美罗培南和替加环素协同试验的结果显示有 3 株对亚胺培南和美罗培南的 MIC 分别下降了 4 倍和 8 倍, 而替加环素却未下降。

2.5 ERIC-PCR 基因分型 31 株 CRKP 主要分为 9 型, 其中 1 型 13 株, 4 型和 5 型各 5 株, 6 型和 8 型各 2 株, 2、3、9 型各 1 株。见图 2。

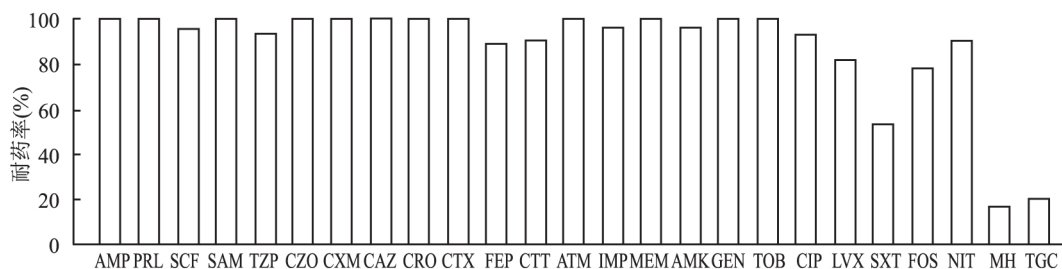


图 1 31 株 CRKP 对常见抗生素的耐药率和敏感率

AMP: 氨苄西林; PRL: 哌拉西林; SCF: 头孢哌酮/舒巴坦; SAM: 氨苄西林/舒巴坦; TZP: 哌拉西林/他唑巴坦; CZO: 头孢唑啉; CXM: 头孢呋辛; CAZ: 头孢他啶; CRO: 头孢曲松; CTX: 头孢噻肟; FEP: 头孢吡肟; CTT: 头孢替坦; ATM: 氮曲南; IMP: 亚胺培南; MEM: 美罗培南; AMK: 阿米卡星; GEN: 庆大霉素; TOB: 妥布霉素; CIP: 环丙沙星; LVX: 左旋氧氟沙星; SXT: 复方新诺明; FOS: 磷霉素; NIT: 呋喃妥因; MH: 米诺环素; TGC: 替加环素

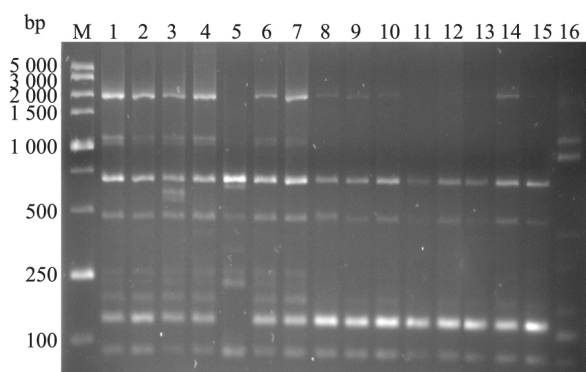


图2 部分临床菌株 ERIC-PCR 基因分型图谱

M:Marker;1、2、4、6、7:1型;3:2型;5:3型;8、9、10、14:4型;11、12、13、15:5型;16:6型

3 讨论

碳青霉烯类对质粒介导的超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、染色体及质粒介导的头孢菌素酶(AmpC酶)均具有高度稳定性,但可被碳青霉烯酶水解灭活,造成碳青霉烯类抗生素耐药。随着临床应用的不断增加,产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌感染持续增多,我国克雷伯菌属细菌对碳青霉烯类药物耐药率呈逐年上升趋势,形势不容乐观^[7]。本研究中筛选的31株CRKP,同时对青霉素类、头孢菌素、氨基糖苷等其他 β -内酰胺类抗菌药物也表现出高度耐药,而对四环素类耐药率较低。数据表明本院分离的CRKP多为高水平耐药的三重耐药菌,而有效抗生素范围很窄,这对本院临床治疗感染带来严重挑战,前景令人担忧。

革兰阴性菌对碳青霉烯类的耐药机制,最突出的是碳青霉烯酶的产生^[8],其他的还有高产AmpC酶伴外膜孔蛋白的丢失、靶位点的改变和主动泵出系统的过量表达。目前常见的碳青霉烯酶主要有KPC、IMP、VIM、NDM等,国内以KPC和IMP为主^[9]。Carba-NP试验和改良Hodge试验是CLSI推荐的碳青霉烯酶表型检测方法。本研究中所有产KPC菌Carba-NP试验和改良Hodge试验均阳性,表明Carba-NP试验和改良Hodge试验检测KPC型碳青霉烯酶有较高的灵敏度,可用于对疑似产碳青霉烯酶细菌进行表型初筛试验。31株CRKP有4株KPC基因检测阴性,其中3株均携带NDM-1基因,NDM-1可水解碳青霉烯类抗生素,剩下的6号株Carba-NP试验和改良Hodge试验均为阴性,KPC基因和NDM-1基因检测也阴性,而膜孔蛋白OmpK35/36均未缺失,可能由于细菌产ESBLs酶出

现假阳性结果^[10]或其他耐药机制。

本研究中KPC型碳青霉烯酶均为KPC-2型,检出率87.1%。KPC-2酶能单独引起碳青霉烯类耐药,不依赖于膜孔蛋白的丢失,基因由可转移的70 kb质粒编码,位于质粒的转座子上,具有高传播可能。2009年,英国卡迪夫大学的研究团队在肺炎克雷伯杆菌中首次发现了一种新型金属 β -内酰胺酶,即NDM酶,该酶可以水解除氨基糖苷以外的所有 β -内酰胺类药物,包括碳青霉烯类抗生素,其最常见NDM-1型,在我国NDM-1检出率逐年上升^[11]。本院CRKP中NDM-1型检出率较高,为71.0%,加大了临床治疗CRKP感染的难度,因此院感科要引起重视。我国ESBLs流行的种类以CTX型和SHV型为主^[12],本院流行耐药基因型与国内报道基本一致。本研究AmpC酶阳性率为100%,主要为DHA型和FOX型。所有菌株未检出EBC、ACC和MOX酶基因。耐药基因检测结果显示,26株菌同时携带KPC、ESBL、AmpC三种酶基因,说明CRKP存在多种耐药基因积聚共存现象。Ogbolu et al^[13]认为产 β -内酰胺酶的细菌往往同时携带其他种类抗菌药物的耐药基因。耐药细菌通过产生多种 β -内酰胺酶基因以及质粒水平转移导致耐药性播散及拓宽耐药谱,可能是导致菌株耐药性更强、耐药谱更广的原因。

外排泵系统的表达是肺炎克雷伯菌产生耐药性的重要机制^[14]。细菌的外排泵系统包括:耐药结节化细胞分化家族、ATP结合盒家族、主要易化子超家族、小多重耐药家族和多药及毒性化合物外排家族。通过外排泵表型抑制试验,结果显示3株细菌对亚胺培南和美罗培南的MIC分别下降了4倍和8倍,可能是外排泵机制导致的耐药。Filgona et al^[15]也发现外排泵抑制剂可以降低CRKP对厄他培南、多尼培南的MIC值。Seecoomar et al^[16]研究发现产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌中ArcAB外排泵与 β -内酰胺类耐药有关。

本研究中31株CRKP的基因分型显示有9种类型,其中1型13株,为主要流行株,表明我院可能存在1型克隆株的播散流行,由于CRKP耐药严重,易发生流行,因此要严格控制抗菌药物的使用,加强院内感染的防控措施。其次为4型和5型各5株,6型和8型各2株,2、3、9型各1株。

CRKP通常合并其他抗生素耐药,发展为多重耐药菌,有效治疗药物有限,给临床治疗带来了极大的困扰。我院肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶为KPC-2

型酶,且常常合并产生 ESBLs 酶和 AmpC 酶,形成耐药基因的积聚共存现象,导致细菌的多重耐药。外排泵的表达可能参与肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药,其关系有待进一步研究。同时临床应加强医院感染控制及用药管理,避免耐亚胺培南肺炎克雷伯菌传播扩散。

参考文献

- [1] Yigit H, Queenan A M, Anderson G J, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4): 1151-61.
- [2] Pulcrano G, Iula D V, de Luca C, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST512 carrying blaKPC-3 in a hospital in southern Italy [J]. *APMIS*, 2014, 122(1): 42-6.
- [3] 李天娇,王旭明,符生苗,等. 海南发现 4 株产 NDM-1 多重耐药的肺炎克雷伯菌 [J]. *中国热带医学*, 2013, 13(12): 1468-74.
- [4] 徐安,卓超,苏丹虹,等. 2005-2014 年 CHINET 克雷伯菌属细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(3): 267-74.
- [5] Lee C R, Lee J H, Park K S, et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 895.
- [6] 毕颖敏,沈震,董栋,等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌药物敏感性及其 blaKPC 基因检出率 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(3): 298-302.
- [7] 徐安,卓超,苏丹虹,等. 2005-2014 年 CHINET 克雷伯菌属细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(3): 267-74.
- [8] 李维特,张捷. 耐碳青霉烯肠杆菌科细菌耐药机制的研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(3): 714-6.
- [9] 刘婧娴,俞静,刘瑛. 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药基因及流行病学研究进展 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15(1): 91-6.
- [10] Carvalhaes C G, Picao R C, Nicoletti A G, et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(2): 249-51.
- [11] Dong F, Lu J, Wang Y, et al. A five-year surveillance of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in China reveals increased predominance of NDM-1 [J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(8): 562-9.
- [12] Zhang Y, Zhao C, Wang Q, et al. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in China: geographic distribution, clinical characteristics, and antimicrobial resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(10): 6115-20.
- [13] Ogbolu D O, Daini O A, Ogunludun A, et al. High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 37(1): 62-6.
- [14] Jimenez-Castellanos J C, Wan Ahmad Kamil W N, Cheung C H, et al. Comparative effects of overproducing the AraC-type transcriptional regulators MarA, SoxS, RarA and RamA on antimicrobial drug susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(7): 1820-5.
- [15] Filgona J, Banerjee T, Anupurba S. Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in North India [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2015, 9(8): 815-20.
- [16] Seecoomar G D, Marmol B C, Kwon D H. Promoter deletions of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-encoding genes (blaKPC-2) and efflux pump (AcrAB) on beta-lactam susceptibility in KPC-producing enterobacteriaceae [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 348(2): 120-6.

Susceptibility and characterization of drug resistance genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

Wang Jian, Pan Yaping, Xu Yuanhong, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the antimicrobial susceptibility and analysis of antibiotic resistant gene in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) strains. Efflux pumps inhibitor phenotype analysis were used to study the role of efflux pump inhibitor in resistance to meropenem, imipenem, and tigecycline among clinical isolates of CRKP. **Methods** The CRKP strains were collected and screened. The drug sensitivity tests were performed by the Kirby-Bauer method and Vitek2 compact system. Carbapenemase production were confirmed by modified Hodge test and Carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP) test. The genotypes of carbapenem resistant genes, ESBLs genes, and AmpC were detected by PCR and DNA sequence analysis. The contribution of efflux mechanisms was screened by agar dilution method. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) was used to type 31 clinical CRKP isolates. **Results** A total of 31 CRKP strains were isolated, the Carba-NP test

and the modified Hodge test showed that only 1 strains of CRKP did not produce carbapenems. PCR results showed that 27 strains were positive for KPC enzyme gene, which was basically consistent with the detection of carbapenemases phenotype. In the inhibition experiment, the minimum inhibitory concentration of meropenem, imipenem decreased by 4 times and 8 times respectively after treated with PA β N in 3 isolate. 31 *Klebsiella pneumoniae* strains were classified into 9 types based on ERIC-PCR profiles, including 13 genotyping 1, which was the main epidemic strains. **Conclusion** The coexistence of drug resistance genes in CRKP shows high levels of resistance to routine antibiotic. Production of KPC-2-type carbapenemase is the common resistant mechanism to carbapenems for *Klebsiella pneumoniae* in our hospital. The efflux pump system might be involved in the carbapenem resistance of *Klebsiella pneumoniae*.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase; efflux pump; drug resistance

(上接第 1230 页)

Effect of chronic unpredicted mild stress on the apoptosis of hippocampal astrocytes in rats

Jin Qiying, Wu Hongfang, Zhang Yuanyuan, et al

(Dept of Neurology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

Abstract Objective To observe the expression of apoptosis related protein Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and cysteine-containing aspartate-specific proteases-3 (Caspase-3) in hippocampal astrocytes of depression rats. **Methods** Ninety healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group and model group. Chronic unpredicted mild stress (CUMS) method was used to establish animal model. After successful preparation of the model, behavioral tests were conducted using sugar preference test, open-field test and Morris water maze test. Rats were sacrificed at 1, 7, 14 days after the successful preparation of the model, the expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in hippocampus were detected by Western blot. The distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Bax, GFAP and Bcl-2, GFAP and Caspase-3 in hippocampus of CUMS rats were observed by laser scanning confocal microscopy. **Results** The percentage of sweet water preference, total distance traveled, activity time, upright frequency and grooming behavior in model group were lower than those in control group ($P < 0.01$). The average escape latency was higher in model group than in control group ($P < 0.01$). Compared with the control group, the expression of Bax and Caspase-3 increased in hippocampus 1, 7, 14 days after CUMS ($P < 0.01$), the expression of Bcl-2 was decreased ($P < 0.01$), and Bax/Bcl-2 ratio increased ($P < 0.01$). The results of double immunofluorescence showed that GFAP and Bax, GFAP and Bcl-2, GFAP and Caspase-3 were expressed at the same time in the hippocampus of rats. Compared with the control group, the fusion of GFAP and Bax, GFAP and Caspase-3 in the hippocampus of 7 days rats after CUMS was increased, and the fluorescence fusion of GFAP and Bcl-2 decreased. **Conclusion** The apoptosis of hippocampal astrocytes in CUMS rats increases, suggesting that the apoptosis of hippocampal astrocytes in depression rats may be one of the reasons for the depression of the hippocampus of depressed rats.

Key words depression; hippocampus; astrocyte; apoptosis