

## 2009~2011 年耐碳青霉烯肺炎克雷伯杆菌的流行及整合子分析

徐艳玲<sup>1</sup>, 顾兵<sup>2</sup>, 黄茂<sup>1</sup>, 刘海燕<sup>1</sup>, 梅亚宁<sup>2</sup>, 王彤<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院呼吸科, <sup>2</sup>检验学部, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 分析 2009~2011 年南京医科大学第一附属医院分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌(CRKP)的流行状况及其携带的整合子的特征、基因盒的种类。方法: 细菌鉴定用 VITEK2compact 全自动鉴定系统或 API 细菌鉴定系统; 细菌药敏试验采用纸片扩散法(K-B 法); 根据 CLSI2012 M100-S22 判读结果; 聚合酶链反应(PCR)检测 I、II 和 III 类整合酶基因及 I 类整合子可变区基因盒。结果: 2009~2011 年本院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌的分离率显著增高, 从 1.6% 增至 11.2%; 分离的菌株中对  $\beta$ -内酰胺类药物耐药率均高于 95.0%; 整合子阳性率为 92.6%, 均为 I 类整合子, 整合子可变区阳性率为 78.7%, 检测到的基因盒以 aadA2 最为常见, 其次为 aacA4-catB8-aadA1 及 aadA2 + dfrA25。结论: 本院 CRKP 的分离率增长迅速, I 类整合子在 CRKP 中普遍存在, 有较强的从外周捕获耐药基因的能力; 建议采取有效措施控制 CRKP 的传播。

**[关键词]** 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌; 耐药; 整合子

**[中图分类号]** R378.99

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)04-506-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130418

## Analysis of the prevalence and integrons distribution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) in 2009-2010

Xu Yanling<sup>1</sup>, Gu Bing<sup>2</sup>, Huang Mao<sup>1</sup>, Liu Haiyan<sup>1</sup>, Mei Yaning<sup>2</sup>, Wang Tong<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the prevalence and integrons distribution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) which isolated at the affiliated hospital of Nanjing Medical University from 2009 to 2010. **Methods:** All the isolates were identified by VITEK2 compact or API identification system. The antibiotic susceptibility of 81 CRKP was detected by K-B method. Class I, II and III integrons and their variable regions were detected by PCR. **Results:** The isolating rate of CRKP increased rapidly from 1.6% in 2009 to 11.2% in 2011. Most of the isolates were resistant to the  $\beta$ -lactams. Among the 81 isolates, 92.6% of them are detected of intI1 and 78.7% of the isolates are detected of variable regions. The most common gene cassette is aadA2, followed by the aacA4-catB8-aadA1 and aadA2+dfrA25. **Conclusion:** The proportion of CRKP increased rapidly in our hospital and efficient measures should be carried out to inhibit the dissemination of CRKP; Class I integrons are common in the CRKP and the isolates have high capability to capture antibiotic resistance gene cassette.

**[Key words]** carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP); drug resistance; integrons

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 506-510]

碳青霉烯类抗生素是治疗医院获得性多重耐药性肠杆菌科细菌感染最主要的有效抗生素之一。随着碳青霉烯类抗菌药物广泛及不合理使用, 近年来

世界各地不断有肠杆菌科细菌耐药株报道<sup>[1-2]</sup>, 我国某些地区也有耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的出现<sup>[3-4]</sup>。虽然目前各地区耐碳青霉烯类的肠杆菌科细菌的比例有差异, 但其普遍增长迅速, 应当引起足够重视。肺炎克雷伯杆菌是重要的引起院内感染的肠杆菌之一<sup>[5]</sup>, 在耐碳青霉烯类肠杆菌中占较大比重, 南京医科大学第一附属医院耐碳青霉烯肺炎克雷伯杆菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81000754); 江苏省研究生培养创新工程项目(2011-719)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wt1046@sina.com

从 2009 年的 1.6% 迅速上升至 2011 年的 11.2%, 本研究以本院 2009~2011 年分离的 CRKP 菌株为研究对象, 进行耐药机制的研究, 现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株来源

2009 年 1 月~2011 年 12 月本院检验科收集到的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌 81 株, 去除同一病例中同一部位所获菌株。所有菌株均经法国生物梅里埃公司 VITEK2compact 全自动微生物分析鉴定系统或 API 细菌鉴定系统鉴定。

#### 1.1.2 仪器及试剂

扩增仪(美国 MJ 公司 PTC-100), 凝胶成像分析系统(美国 Kodak 公司); Premix Tap 反应液、*Hinf* I 酶均为日本 TaKaRa 公司产品; 细菌试剂 DNA 提取试剂盒为北京天净沙公司产品; 引物合成及测序由美国 Genscript 公司完成。药敏纸片及 M-H 琼脂培养基均由美国 Oxoid 公司提供。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 药物敏感试验

根据美国临床与实验室标准化委员会(CLSI)操作规范<sup>[6]</sup>, 采用纸片扩散法(K-B 法)测定 16 种抗生素的药敏情况, 药敏结果按照 CLSI2012 年版判断标准执行。质控菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

#### 1.2.2 细菌总 DNA 制备

采用细菌 DNA 提取试剂盒按试剂盒操作说明提取细菌 DNA 并做电泳分析。

#### 1.2.3 整合子检测及分类

采用兼并引物同时扩增整合子 5' 保守区的 I、II 和 III 类整合酶基因检测整合子, 即整合酶基因 PCR。上游引物序列 5'-TGCGGGTYAARGATBTKGATTT-3', 下游引物序列 5'-CARCACATGCGTRTARAT-3'<sup>[7]</sup>, 预期扩增片段为 491 bp, 扩增体系: Premix Taq 25  $\mu$ l, 模板 2  $\mu$ l, 浓度为 20 pmol/L, 上下游引物各 1  $\mu$ l, 灭菌蒸馏水 21  $\mu$ l, 总循环体系 50  $\mu$ l, 循环参数见文献<sup>[8]</sup>。阳性扩增产物用限制性内切酶 *Hinf* I 酶切分析, 取 10  $\times$  H 缓冲液 2  $\mu$ l, *Hinf* I 酶、PCR 产物 8  $\mu$ l, 37.0 $^{\circ}$ C 水浴所得酶切产物用含 Goldview 的 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析。根据电泳结果进行分类: I 类整合子: 整合酶 PCR 扩增产物经酶切后为 1 条片段, 大小为 491 bp; II 类整合子: 整合酶 PCR 扩增产物经酶切后为 2 条片段, 大小分别为 300、190 bp; III 类整合子: 整合酶 PCR 扩增产物经

酶切后为 2 条片段, 大小分别为 119、372 bp。

#### 1.2.4 整合子可变区扩增及测序

根据 I 类整合子可变区两侧的保守区设计引物, 扩增整合子可变区, 即为整合子 PCR。上游引物 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3', 下游引物 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3', 循环体系同整合酶基因, PCR 循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s(每个循环延长 5 s), 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。所得 PCR 产物 8  $\mu$ l 用含 Goldview 的 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。将整合子可变区的 PCR 扩增产物经 QIA 纯化后进行 DNA 测序(南京金斯瑞公司完成), 结果在 GenBank 数据库中采用 Blast 软件进行同源性分析。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析, 率的比较采用 Fisher 确切概率法,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 病原菌及其分布

#### 2.1.1 CRKP 的分离率

本院在 2009、2010、2011 年分离的 CRKP 的株数分别为 6、12、63 株, 分别占各年分离的肺炎克雷伯杆菌总数的 1.6% (6/379)、3.3% (12/384) 和 11.2% (63/626)(图 1)。

#### 2.1.2 CRKP 的科室分布及标本来源

2009~2011 年本院分离的 CRKP 主要分布于 ICU、老年医学科、急诊科、脑外科, 其中 ICU 占 42.0% (34/81), 老年医学科占 16.9% (14/81), 急诊科占 10.8% (9/81)(表 1)。患者以男性居多, 占 88.9%。在分离的 81 株 CRKP 中, 72.8% (59/81) 的菌株来源于痰液, 7.1% (6/81) 为血液, 6.2% (5/81) 来源于导管(图 2)。

### 2.2 药敏结果

81 株 CRKP 对亚胺培南、美罗培南、阿莫西

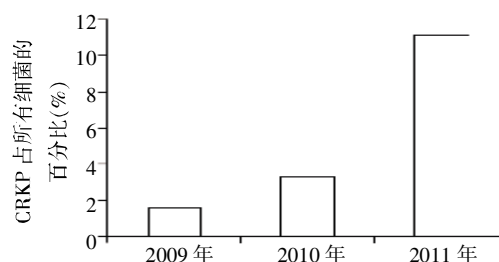


图 1 2009~2011 年本院 CRKP 的流行状况

Figure 1 The prevalence of CRKP in 2009~2011 in our hospital

表 1 81 株 CRKP 的科室来源构成比

Table 1 The department proportion of 81 strains of CRKP

科室	菌株数	构成比(%)	科室	菌株数	构成比(%)
ICU	35	43.2	风湿科	1	1.2
老年医学科	14	16.9	胸外科	1	1.2
急诊科	10	10.8	骨创科	1	1.2
肝胆外科	2	2.5	肝胆外科	1	1.2
整形烧伤科	3	3.7	消化科	1	1.2
脑外科	4	4.9	呼吸科	1	1.2
综合内科	3	3.7	胃肠外科	1	1.2
神经内科	1	1.2	血液科	1	1.2
总数	81	100.0			

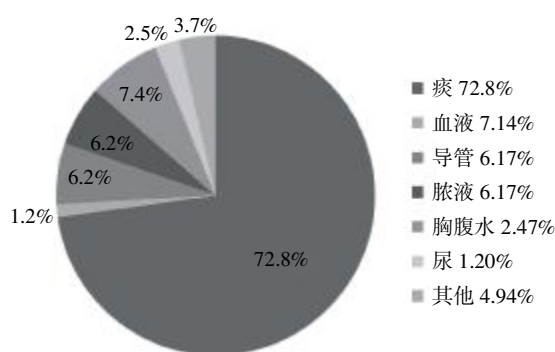


图 2 81 株 CRKP 的标本来源构成比

Figure 2 Specimen proportion of 81 strains of CRKP

林/棒酸、头孢唑啉、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢吡肟、氨基糖苷均耐药。对头孢哌酮 + 舒巴坦、头孢他啶、头孢西丁的耐药率也均高于 95.0%，对米诺环素及复方新诺明的耐药率分别为 13.6% 及 35.8% (表 2)。

### 2.3 整合子检测及分类结果

在 81 株肺炎克雷伯杆菌中,整合子检测的阳性率为 92.6%,2009~2011 年整合子阳性率相似,分别为 100.0%、91.7%、92.0% ( $P > 0.05$ ,图 3A)。均为 I 类整合子,未检测到 II 类及 III 类整合子(图 4A)。

### 2.4 整合子可变区的检测及测序结果

整合酶基因扩增阴性的菌株可变区扩增亦为阴性。75 株 I 类整合子扩增阳性的菌株中,78.7%(59/75)的可变区阳性,各年间可变区阳性率无统计学差异 ( $P > 0.05$ ,图 3B)。可变区扩增出 61 个片段,分别为 2 200 bp (17 例)、1 000 bp (38 例)、1 000 + 700 bp (2 例)及 150 bp (2 例)(图 4B)。2 200 bp 片段中含有 aacA4-catB8-aadA1,1 000 bp 片段含 aadA2,1 000 + 700 bp 片段含 aadA2 + dfrA25,150 bp 片段中无耐药基因,但含有整合子 5'保守区和 3'保守区的骨架结构。aacA4、aadA1、aadA2 均编码对氨

表 2 81 株 CRKP 对 16 种抗生素的药敏结果

Table 2 Resistance to 16 antibiotics for 81 strains of CRKP

[n(%)]

抗菌药物	敏感率	中介率	耐药率
氨苄西林/舒巴坦	0	0	81(100)
阿米卡星	7(8.6)	2(2.5)	72(88.9)
氨基糖苷	0	0	81(100)
米诺环素	52(64.3)	18(22.2)	11(13.6)
新斯的明	44(54.3)	8(9.9)	29(35.8)
亚胺培南	0	0	81(100)
美罗培南	0	0	81(100)
哌拉西林/他唑巴坦	0	0	81(100)
头孢噻肟	0	0	81(100)
头孢吡肟	0	0	81(100)
头孢呋辛	0	0	81(100)
头孢哌酮/舒巴坦	2	0	79(97.5)
头孢他啶	1(1.2)	0	80(98.9)
头孢西丁	1(1.2)	0	80(98.9)
头孢唑啉	0	0	81(100)
左氧氟沙星	1(1.2)	5(6.2)	75(92.6)

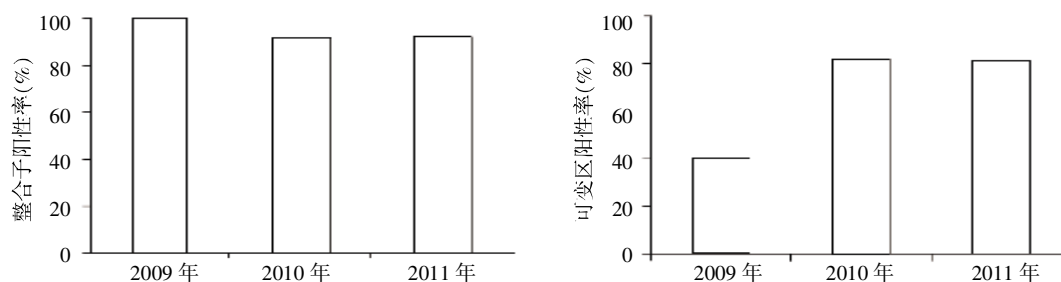
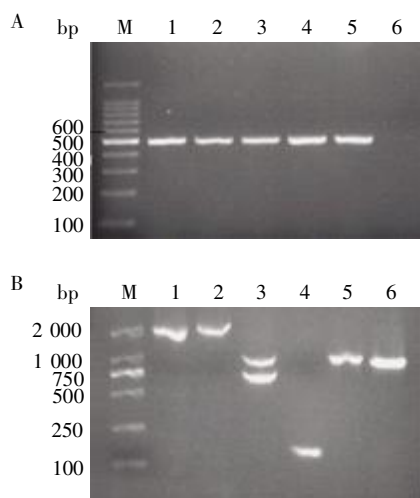


图 3 2009~2011 年整合子与可变区阳性率

Figure 3 The integrons and variable regions positive rate in 2009~2011



A: 整合酶基因 PCR 产物电泳图;M:Marker;1~6:临床菌株整合酶基因扩增产物;B: I 类整合子可变区 PCR 产物电泳图;M:Marker;1~6:临床菌株可变区扩增产物。

图 4 整合子检测与可变区扩增电泳图

Figure 4 The integrase gene and variable regions amplified by PCR

基糖甙类的耐药性, catB8 编码对氯霉素的耐药性, dfrA25 编码对甲氧苄氨嘧啶的耐药性。

### 3 讨论

自从 1997 年 MacKenzie 等发现首例 CRKP 以来,CRKP 陆续在世界各地出现报道。据有关文献报道,近年来欧洲各国 CRKP 总检出率为 0.4%<sup>[9]</sup>,美国 31 家医疗中心 CRKP 的检出率为 5.6%<sup>[2]</sup>,印度一家三级医院 2009 年 CRKP 的检出率高达 52.0%<sup>[1]</sup>。在我国,根据 Mohanarain 全国细菌耐药监测结果显示<sup>[10-12]</sup>,2008~2010 年我国 CRKP 的检出率分别为 1.0%、1.8%、2.7%;在上海华山医院,2005、2009 年 CRKP 的分离率分别为 0.9%、12.9%<sup>[3]</sup>。本研究中本院 2009 年的检出率为 1.6%,2011 年则迅速增至 11.2%。各地 CRKP 检出率存在差异可能与当地医

疗卫生状况、临床用药及其他侵入性治疗情况及医院感染控制的有效性有关。虽然各地 CRKP 的检出率不同,但普遍表现出快速增长的趋势,这说明目前还未能采取有效措施阻止 CRKP 的传播扩散,CRKP 在院内感染中危害性越来越大。在分离到的 81 株 CRKP 中,患者主要来自老年科、ICU、急诊科、脑外科,占 77.8%,且平均年龄在 79 岁,提示重症及老年体弱患者是其主要易感人群。菌株主要分离自痰液,占 72.8%(59/81),其次为血液及导管,表明 CRKP 主要定植在呼吸道,故应加强可疑感染 CRKP 的重症患者的呼吸道细菌学检查,及时发现 CRKP 有助于临床的用药及治疗,提高患者的生存率。

从药敏表型上看,本研究中 81 株菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素的耐药率均高于 95.0%,而对米诺环素、复方新诺明的耐药率分别为 13.6%及 35.8%,这之前文献报道较一致<sup>[3]</sup>。原因可能为  $\beta$ -内酰胺类是临床治疗革兰阴性杆菌感染的一线药物,药物选择压力较大,而相比较来说,米诺环素和复方新诺明在临床应用较少,药物选择压力相对较低。虽然米诺环素对 CRKP 有较好的体外灭菌活性,但目前尚未有确切的临床疗效报道。有研究表明黏菌素对 CRKP 有较高的抑制活性,但因其体内毒性较高而限制了它的临床使用。

整合子是一种新的可移动基因元件,在细菌耐药性的水平传播中有重要作用。它能携带位点特异性重组系统组分,可将许多耐药基因盒整合在一起,从而介导多重耐药。根据整合子 5'保守区整合酶基因的同源性差异,整合子被分为 4 类: I、II、III、IV 类,前 3 类在细菌耐药中有重要作用。本研究中检出的 81 株肺炎克雷伯杆菌的整合子阳性率为 92.6%,与之前文献报道的数据较一致<sup>[13]</sup>。检测到的整合子均为 I 类整合子,说明 I 类整合子在 CRKP 中普遍存在。2009~2011 年各年的整合子的阳性率无统计学意义差别,均 > 90.0%,无差别原因可能为 CRKP 内

各年的整合子阳性率普遍较高且 2009、2010 年收集的菌株例数相对较少。

81 株 CRKP 整合子可变区的阳性率为 78.7% (59/75), 检测到了多种基因盒, 以 aadA2 最为常见, 占 64.4% (38/59), 其次为 aacA4-catB8-aadA1 占 28.8% (17/59) 及 aadA2 + dfrA25 占 3.4% (2/59)。检测到的基因盒主要编码对氨基糖甙类、氯霉素及甲氧苄氨嘧啶的耐药, 说明整合子携带的耐药基因在 CRKP 的耐药中有重要作用。氯霉素和甲氧苄氨嘧啶曾在临床上广泛使用, 耐药基因的传播可能是之前的药物选择压力产生的。

监测 CRKP 的流行有重要意义: ①CRKP 感染有较高病死率, 一些研究中感染 CRKP 的患者病死率甚至 >50%; ②除了对碳青霉烯类及  $\beta$ -内酰胺类耐药外, CRKP 常携带对其他抗生素耐药的基因, 产生多重耐药细菌甚至泛耐药细菌; ③CRKP 在世界范围传播越来越广泛且所占比例迅速增加。目前国际上还未出现治疗 CRKP 这种多重耐药甚至泛耐药菌感染的有效药物, 而一些研究显示抗生素的滥用是 CRKP 感染的独立危险因素<sup>[14]</sup>, 故要想控制 CRKP 的产生及传播, 除了应建立对 CRKP 的监测外, 还应该加强抗生素的合理使用, 提高 CRKP 检测的技术并深入研究临床菌株中 CRKP 耐药的产生及传播机制。

本研究分析了 2009~2011 年本院 CRKP 的流行情况, 并对 CRKP 的耐药及耐药机制做了初步的研究。目前认为 CRKP 的耐碳青霉烯类的机制主要有两点<sup>[15]</sup>: AmpC 的过度表达联合孔蛋白的丢失和碳青霉烯酶的产生, 其中碳青霉烯酶的产生是最主要的原因。本课题组将在接下来的工作中研究编码碳青霉烯的基因(如 KPC、OXA 等)在 CRKP 中的分布情况, 并检测孔蛋白的表达情况, 对 CRKP 的耐药机制做更深入的研究。

#### [参考文献]

- [1] Datta S, Watal C, Goel N, et al. A ten year analysis of multi-drug resistant blood stream infections caused by *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital[J]. Indian J Med Res, 2012, 135(6): 907-912
- [2] Sader HS, Farrell DJ, Jones RN. Tigecycline activity tested against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter spp.* isolated in US medical centers (2005-2009) [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 69(2): 223-227
- [3] Hu F, Chen S, Xu X, et al. Emergence of carbapenem-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolates from a teaching hospital in Shanghai, China [J]. J Med Microbiol, 2012, 61(1): 132-136
- [4] Lee CM, Liao CH, Lee WS, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae* sequence type 11 in Taiwan, 2011 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(10): 5016-5022
- [5] Lu PL, Liu YC, Toh HS, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(Suppl): S37-43
- [6] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Twenty-Second Informational Supplement In M100-S22 USA, 2012
- [7] Gu B, Tong M, Zhao W, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 241-243
- [8] Gu B, Pan S, Wang T, et al. Novel cassette arrays of integrons in clinical strains of *Enterobacteriaceae* in China [J]. Int J Intimicrob Agents, 2008, 32(6): 529-533
- [9] Norskov-Lauritsen N, Marchandin H, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004-2007) [J]. Int J Intimicrob Agents, 2009, 34(2): 121-130
- [10] 肖永红, 王进, 薛峰. Mohnarin 2008 年度全国细菌耐药监测 [J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(16): 2377-2383
- [11] 吴缘, 郑波, 马序竹. Mohnarin 2009 年度报告: 肠杆菌科细菌耐药监测 [J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(5): 340-346
- [12] 肖永红, 沈萍, 李兰娟. Mohnarin 2010 年度全国细菌耐药监测 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(23): 4896-4902
- [13] 吴秀萍, 魏取好, 周永列. 耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌中整合子及相关基因盒的分布 [J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(7): 1329-1332
- [14] Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, et al. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009, 30(7): 666-671
- [15] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*; here is the storm! [J]. Trends Mol Med, 2012, 18(5): 263-272

[收稿日期] 2012-11-21