

• 论 著 •

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的整合子分布及 MLST 分析^{*}

何倩君, 陈祖阳, 张中文, 李玉珍, 徐令清[△]

广州医科大学附属第六医院/广东省清远市人民医院检验医学部, 广东清远 511500

摘要:目的 收集该院临床分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP),通过研究 CRKP I、II、III 类整合子分布情况,碳青霉烯类耐药基因携带情况,以及多位点序列分型(MLST),了解 CRKP 的耐药情况与流行病学特征。**方法** 收集、保存临床送检标本中分离的 CRKP 45 株,采用 BD phoenix M50 全自动细菌鉴定仪进行药敏试验,并用质谱仪再次进行细菌鉴定。整合子及可变区测定采用 PCR 扩增,并对阳性菌株可变区进行测序分析及比对;采用改良碳青霉烯灭活试验(mCIM 试验)进行表型确认,采用 PCR 扩增碳青霉烯类耐药基因,以及 MLST 方法分析其同源性。**结果** 45 株 CRKP 中检测出 I 类整合子阳性菌株共 44 株,未检出 II 类及 III 类整合子。有 36 株菌株成功扩增出可变区。检出 3 种耐药基因盒,分别为 aadA2(34/36)、dfrA1(1/36)、aac(6′)-Ib-cr(1/36)。45 株 CRKP 扩增耐药基因测序结果显示,44 株检测到 bla_{KPC} 基因,未检出 bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{GES}、bla_{OXA-48}、bla_{SME} 基因。45 株 CRKP 的优势序列分型(ST)主要为 ST11 型(43 株),其余为 ST15 型(2 株)。**结论** 该院 CRKP 以 I 类整合子为主,尚未发现 II 类及 III 类整合子,CRKP 对碳青霉烯类药物耐药的主要机制是携带 bla_{KPC} 基因,应及时采取防控措施,防止 CRKP 在院内的克隆传播。

关键词:耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 整合子; 耐药基因; 多位点序列分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.004 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2022)18-2192-04 **文献标志码:**A

Integron distribution and MLST analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*^{*}

HE Qianjun, CHEN Zuyang, ZHANG Zhongwen, LI Yuzhen, XU Lingqing[△]

Department of Laboratory Medicine, Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College/
Qingyuan Municipal People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511500, China

Abstract: **Objective** To collect clinically isolated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), and to understand the drug resistant situation and epidemiological characteristics of CRKP by study the integron distribution situation of CRKP type I, II, and III, drug-resistant gene carrying and multilocus sequence typing (MLST). **Methods** Forty-five strains of CRKP isolated from clinical specimens were collected and preserved. The BD phoenix M50 automatic bacterial identification instrument was used for conducting the bacterial drug sensitivity identification, and the mass spectrometer was used to conduct the bacterial identification again. The integrons and variable regions were measured by polymerase chain reaction (PCR) amplification and the variable region of positive pathogenic bacterial strain conducted the sequencing analysis and comparison. The phenotype was confirmed by adopting the modified carbapenase inactivation test (mCIM test). The carbapenem-resistant gene was amplified by PCR. The homology was analyzed by using the MLST. **Results** A total of 45 strains of class I integron positive bacteria were detected among 45 strains of CRKP, no class II and class III integrons were detected. The variable regions were successfully amplified from 36 strains of bacteria. Three kinds of drug resistance gene cassettes were detected, which were aadA2(34/36), dfrA1(1/36) and aac(6′)-Ib-cr(1/36). The sequencing results of 45 strains of CRKP by amplified resistance genes showed that bla_{KPC} gene was detected in 44 strains, but bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{GES}, bla_{OXA-48} and bla_{SME} genes were not detected. Among 45 strains of CRKP, the advantages sequence types were mainly the type ST11 (43 strains) and the other were the type ST15 (2 strains). **Conclusion** CRKP in this hospital is dominated by the type I integrons, and the type II and III integrons have not been found. The main mechanism of CRKP resistance to carbapenems is to carry the bla_{KPC} gene. The prevention and control measures should be taken in time to prevent

^{*} 基金项目: 广东省中医药局基金项目(20201407); 广东省清远市人民医院医学科研基金项目(20190209)。

作者简介: 何倩君, 女, 技师, 主要从事临床微生物检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: lingqing_xu@126.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220720.1806.004.html\(2022-07-21\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220720.1806.004.html(2022-07-21))

the cloning and spread of CRKP in the hospital.

Key words: carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; integron; drug resistance gene; multilocus sequence typing

肺炎克雷伯菌是引起院内感染的常见条件致病菌,主要引起呼吸系统、泌尿系统、创口及血流的感染。碳青霉烯类抗菌药物抗菌活性强、抗菌谱广、对宿主毒性小,而且对头孢菌素酶(AmpC 酶)和超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)的作用效果较好,因此广泛地应用于重症感染患者的临床治疗。但是,随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛应用,耐碳青霉烯类细菌检出率不断增加,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的检出率也在不断增加,CRKP 在多个国家和地区出现散发和(或)流行病例^[1-2]。整合子作为一种可移动的基因元件,不仅可利用位点特异性重组系统在细菌之间传播,而且具有捕获耐药基因盒的功能^[3]。本研究对 45 株 CRKP 应用多位点序列分型(MLST)技术进行分子分型,再通过基因扩增和测序技术研究整合子在 CRKP 中的分布、整合子携带耐药基因盒的种类及碳青霉烯类耐药基因的携带情况。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2019 年 11 月至 2021 年 3 月临床各科室分离的 CRKP 共 46 株,其中 1 株(12 号标本)多次测序不成功,故剔除。菌株入选标准:(1) CRKP,至少对 3 种碳青霉烯类药物(亚胺培南、美罗培南、厄他培南)中的一种耐药。(2)若多次培养出 CRKP,则纳入首次培养的信息。45 株菌株的标本来源以呼吸道为主,其中痰液 30 株,占 66.7%,尿液 6 株,占 13.3%,血液 5 株,占 11.1%,分泌物、灌洗液、CVC 导管、腹腔引流液各 1 株,各占 2.2%。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

1.2 仪器与试剂 BD phoenix M50(美国 BD)全自动细菌鉴定仪及配套鉴定药敏卡,哥伦比亚血琼脂平板(安图),M-H 琼脂平板(江門凱林),S1000™ PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD),Power Pac™ Basic 电泳仪(美国 BIO-RAD),Gel Dox™ XR+紫外凝胶成像系统(美国 BIO-RAD),高速离心机(赛默飞),CO₂ 培养箱(日本松下),布鲁克质谱仪,药敏纸片(Oxoid)。试剂选用天根生化科技有限公司(TIANGEN)生产的 Taq PCR Master Mix、GelRed 核酸染料,以及标志物Ⅱ、Ⅲ DNA Ladder 成品,引物由天根生化科技有限公司(TIANGEN)合成。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 菌株复苏后,分区划线接种于血平板 18~24 h,用质谱仪重新鉴定。采用 BD phoenix M50 全自动细菌鉴定仪对菌株进行药敏试验,药敏试验结果判断参照 2020 版美国临床实验室标准协会

(CLSI)标准进行。

1.3.2 细菌 DNA 提取 95 ℃ 金属浴 15 min, 12 000 r/min 离心 5 min,提取核酸,取适量上清液(DNA 提取产物)于灭菌的 1.5 mL EP 管中。使用核酸蛋白检测仪检测 DNA 的水平 and 纯度, A₂₆₀/A₂₈₀ 应为 1.7~1.9,待测细菌 DNA 提取物水平调整为 50 ng/μL,合格后于-80 ℃ 保存。

1.3.3 碳青霉烯酶耐药表型检测 采用改良碳青霉烯灭活试验(mCIM 试验)筛查菌株的碳青霉烯酶。用接种环挑取培养 18~24 h 的待测菌落,接种至 EP 管的生理盐水中,旋涡振荡 10~15 s 使其呈均匀菌悬液,用无菌镊子将 10 μg 美罗培南纸片浸入菌悬液中, 35 ℃ 孵育 4 h,取出后贴于已经涂布 0.5 麦氏浊度的大肠埃希菌 ATCC25922 的 M-H 平板中,再次置于 35 ℃ 培养箱,孵育 18~24 h 后观察结果。结果判断参照 CLSI M100-S27 文件要求。

1.3.4 PCR 扩增 参照文献[4],采用 PCR 扩增Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类整合子的整合酶基因和可变区,所用的引物序列见表 1,反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。扩增 6 种主要的碳青霉烯类耐药基因,包括 bla_{KPC}、bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{GES}、bla_{OXA-48}、bla_{SME},碳青霉烯类耐药基因引物序列见表 2。MLST 分型:MLST 引物序列和反应条件可参照 <http://bigsdB.Pasteur.fr>,再将测序结果提交于 MLST 数据库网站(<http://bigsdB.Pasteur.fr>)比对,得到等位基因编码,再将得到的等位基因编码按照 gapA、infB、mdH、pgi、phoE、rpoB、tonB 的顺序组合,在 MLST 数据库中比对查找出符合的优势序列分型(ST)。所有的引物设计与 PCR 产物的纯化与分析均由生工生物工程(广州)股份有限公司完成,测得的序列提交 NCBI 与已知序列比对确定其基因型。

表 1 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ类整合子的整合酶基因和可变区的引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
INT1	F:GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG	493
	R:ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	
INT2	F:CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	789
	R:GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	
INT3	F:AGT GGG TGG CGA ATG AGT G	922
	R:TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG	
可变区	5'-CS :GGC ATC CAA GCA GCA AG-3'	不定
	3'-CS :AAG CAG ACT TGA CCT GA-5'	

表 2 碳青霉烯类耐药基因引物序列

基因	引物序列(5′-3′)	产物长度 (bp)
bla _{KPC}	F:GAT TCG CCG TCT AGT TCT GC	638
	R:GGT CGT GTT TCC CTT TAG CC	
bla _{SME}	F:ACT TTG ATG GGA GGA TTG GC	551
	R:ACG AAT TCG AGC ATC ACC AG	
bla _{GES}	F:GCT TCA TTC ACG CAC TAT T	323
	R:CGA TGC TAG AAA CCG CTC	
bla _{VIM}	F:GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390
	R:CGA ATG CGC AGC ACC AG	
bla _{IMP}	F:CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	587
	R:AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	
bla _{OXA-48}	F:GCT TGA TCG CCC TCG ATT	281
	R:GAT TTG CTC CGT GGC CGA AA	

2 结 果

2.1 基本情况 45 株 CRKP 菌株中,分离自危重症医学科的有 22 株;其次是脑科 17 株,呼吸内科 4 株,肾内科和胸心外科各 1 株。45 例 CRKP 感染患者入住重症监护室≥5 d 的有 39 例,占 86.7%。患者中执行深静置管 39 例,占 86.7%;气管插管或气管切开 36 例,占 80.0%;留置引流管 41 例,占 91.1%;≥3 项侵入性操作的有 36 例,占 80.0%。使用抗菌药物≥3 种有 26 例,占 57.8%。45 例患者中,年龄≥60 岁 38 例,占 84.4%,平均年龄(62.7±16.1)岁。

2.2 CRKP 对常见抗菌药物的耐药情况 45 株 CRKP 对美罗培南耐药率为 100.0%,对亚胺培南耐药率为 97.8%,对其他临床常见抗菌药物也呈现高度耐药,对氨苄西林、头孢呋辛、头孢曲松、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林/克拉维酸、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、氨基糖苷类为 100.0% 耐药,对庆大霉素、阿米卡星的耐药率为 95.6%,对多黏菌素尚有 100.0% 的敏感率。

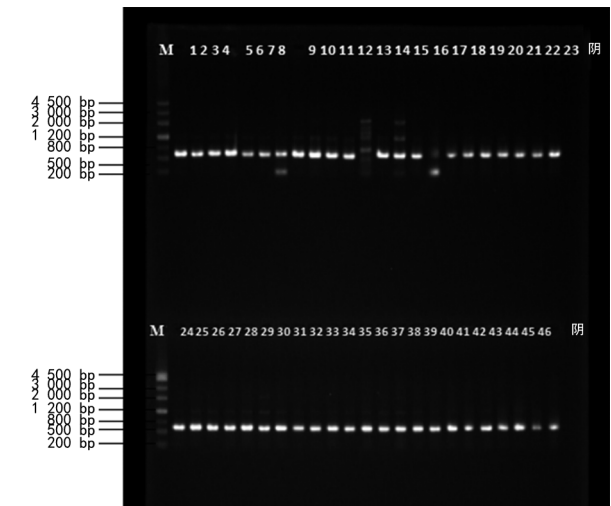
2.3 整合酶基因分布及基因盒测序结果 45 株 CRKP 共检出中 I 类整合子阳性菌株 44 株,检出率为 97.8%;未检出 II 类和 III 类整合子。有 36 株成功扩增出可变区。检出 3 种耐药基因盒:aadA2 共检出 34 株(94.4%);dfrA1 检出 1 株(2.8%),并同时携带 aadA2;aac(6′)-Ib-cr 检出 1 株(2.8%)。

2.4 碳青霉烯酶耐药表型检测结果 mCIM 试验检测阳性 43 株,5、16 号菌株 mCIM 试验阴性,阳性率为 95.6%。但 5 号菌株检测出携带 bla_{KPC} 基因,16 号菌株均未携带 bla_{KPC}、bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{GES}、bla_{OXA-48}、bla_{SME} 基因。

2.5 耐药基因检测结果 45 株 CRKP 扩增耐药基因测序结果显示,44 株检测到 bla_{KPC} 基因,PCR 扩增产物电泳结果见图 1,未检出 bla_{VIM}、bla_{IMP}、bla_{SME}、bla_{GES}、bla_{OXA-48} 耐药基因。

2.6 MLST 结果 45 株 CRKP 检测出两种 ST 型,

分别为 ST11 型 43 株、ST15 型 2 株。



注:M 为标志物Ⅲ;阴为阴性对照;1~46 均为实验菌株,其中 12 号菌株多次测序失败故剔除。

图 1 PCR 扩增产物电泳结果

3 讨 论

近年来越来越多的抗菌药物在临床广泛应用,导致我国多重耐药菌检出率逐年升高。根据中国细菌耐药监测网(CHINET)监测结果(2021 年 1—6 月),肺炎克雷伯菌在革兰阴性杆菌中检出率为 19.8%,而肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物的耐药率比 2020 年有所上升,对亚胺培南的耐药率由 23.2% 上升至 25.5%,对美罗培南的耐药率由 24.2% 上升至 27.1%。CRKP 检出率的逐年上升,给抗感染治疗带来了巨大的挑战,控制 CRKP 的院内传播已成为医务人员及科研人员的难点和研究热点。

本研究中 CRKP 菌株对多黏菌素的耐药率为 0,对美罗培南的耐药率为 100.0%,对亚胺培南的耐药率为 97.8%,对其他临床常见抗菌药物也呈现高度耐药。45 例 CRKP 感染患者入住重症监护室≥5 d 的有 39 例,占 86.7%。45 例患者中执行≥3 项侵入性操作的有 36 例,占 80.0%;使用抗菌药物≥3 种的有 26 例,占 57.8%;45 例患者中,年龄≥60 岁的有 38 例,占 84.4%。这表明长期入住 ICU、病情危重、高龄、执行侵入性操作、抗菌药物的不合理使用都可能是 CRKP 的易感因素,与 KIDDEE 等^[5] 研究结果一致。本研究中菌株标本来源为痰液 30 株,占 66.7%,表明 CRKP 可能主要定植于呼吸道,而患者频繁地使用呼吸机辅助通气可使 CRKP 侵入呼吸道并造成进一步的感染^[6]。

整合子是一种重要的耐药基因捕获及传播元件,可位于染色体、质粒或转座子上,携带一个或多个与抗菌药物和消毒剂抗性有关的基因盒的遗传单位;其可变区中含有不同类型的耐药基因盒,可同时插入一个或多个碱基,所携带的耐药基因盒编码的产物能对抗临床上大多数抗菌药物^[7-9]。本研究只检测到 I 类整合子(I 类整合子阳性菌株 44 株,检出率为

97.8%),未检出Ⅱ类和Ⅲ类整合子。有 36 株菌株成功扩增出可变区。检出 3 种耐药基因盒:aadA2 共检出 34 株(94.4%);dfrA1 检出 1 株(2.8%),并同时携带 aadA2;aac(6′)-Ib-cr(1/36)检出 1 株(2.8%)。aadA2 基因是Ⅰ类整合子基因盒中较常见的基因之一,编码产物的相对分子质量为 29×10^3 的氨基糖苷-3′-腺苷酰基转移酶[AAD(3′)],赋予细菌对链霉素和大观霉素耐药的功能。aac(6′)-Ib-cr 基因表达的氨基糖苷乙酰转移酶通过质粒介导的方式对喹诺酮类药物乙酰化,使其抗菌生物活性降低。dfrA1 基因编码二氢叶酸还原酶,使甲氧苄啶无法完全抑制二氢叶酸还原酶的产生,使药物的抗菌生物活性降低。本研究中检出整合子均为Ⅰ类整合子,主要携带 aadA2 基因,可以认为Ⅰ类整合子使 CRKP 在院内传播更为迅速,并导致 CRKP 对多种抗菌药物,尤其是对氨基糖苷类药物耐药^[10]。

mCIM 试验是 CLSI 推荐的应用于检测肠杆菌科细菌和铜绿假单胞菌中碳青霉烯酶的方法,乙二醇四乙酸-碳青霉烯类失活试验(eCIM)与 mCIM 试验联合使用可以区分产金属酶或丝氨酸碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌。mCIM 试验操作较为简便,在基层医院也容易开展。本研究中 43 株 CRKP mCIM 试验阳性,阳性率为 95.6%,5 号菌株、16 号菌株 mCIM 试验阴性,但该 5 号菌株检测出携带 bla_{KPC} 基因,16 号菌株均未携带 bla_{KPC}、bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{GES}、bla_{OXA-48}、bla_{SME} 基因。mCIM 试验与 PCR 耐药基因检测结果不一致,可能存在菌株突变现象,或本实验未涵盖所有耐药基因。有研究表明,bla_{KPC} 是我国 CRKP 最常携带的碳青霉烯类耐药基因^[11]。MLST 结果表明,共检出 ST11 型 43 株,占 95.6%,ST15 型 2 株,占 4.4%。本院 CRKP 以 ST11 型为主。多项研究表明,我国主要以 ST11 型为主,西方国家以 ST258 型为主,ST258 与 ST11 均只有一个等位基因 tonB 发生突变,二者都属于克隆复合群 CC258 家族^[12-14]。

综上所述,本研究中 CRKP 的主要耐药机制为携带 bla_{KPC} 基因,优势 ST 型为 ST11,Ⅰ类整合子与 aadA2 基因的携带使 CRKP 在院内传播更容易,提示可能存在 CRKP 的流行传播可能。应采取及时有效的措施,对感染 CRKP 的患者进行有效的接触隔离,加强手卫生、环境消毒,同时加强抗菌药物的规范使用。

参考文献

- [1] TANG Y, SHEN P, LIANG W, et al. A putative muti-replicon plasmid co-harboring beta-lactamase genes bla_{KPC-2}, bla_{CTX-M-14} and bla_{tem-1} and trimethoprim resistance gene dfrA25 from a Klebsiella pneumoniae sequence type(ST)11 strain in China[J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0171339.
- [2] SATLIN M J, CHEN L, PATEL G, et al. Multicenter clinical and molecular epidemiological analysis of bacteremia due to carbapenem-resistant enterobacteriaceae(CRE) in the

- CRE epicenter of the United States[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(4):2349-2365.
- [3] 黄娟,王欣,吴志毅,等.多重耐药铜绿假单胞菌Ⅰ类整合子:基因盒的检测与分析[J].微生物学免疫学进展, 2017, 45(5):21-24.
- [4] MACHADO E, RAFAEL C, BAQUERO F, et al. Integron content of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli strains over 12 years in a single hospital in Madrid[J]. Am Socie Microbiol, 2005, 49(5):1129-1823.
- [5] KIDDEE A, ASSAWATHEPTAWEE K, NA-UDOM A, et al. Risk factors for gastrointestinal colonization and acquisition of carbapenem-risistant Gram-negative among patients in intensive care unites in Thailand[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(8):e00341-e00348.
- [6] MAGIORAKOS A P, BURNS K, BORG M, et al. Infection prevention and control measure and tools for the prevention of entry of carbapenem-resiatant Enterobacteriaceae into healthcare settings:guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2017, 6(1):113-130.
- [7] GARNACHO-MONTERO J, AMAYA-VILLAR R. Multirresistant Acinetobacter baumannii infections: epidemiology and management[J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23(4):332-339.
- [8] PARTRIDGE S R, KWONG S M, FIRTH N, et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4):e00088.
- [9] CECCARELLI D, SALVIA A M, SAMI T, et al. New cluster of plasmid-located class I integrons in vibrio cholera 01 and dfrA15 cassette-containing integron in vibrio paraemolyticus isolated in Angola[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 50(7):2493-2499.
- [10] 杨维青,石磊,尹晓琳,等.不同地区铜绿假单胞菌第一类整合子和整合子相关基因盒分布[J].中国抗生素杂志, 2017, 31(1):15-18.
- [11] YAO B, XIA X M, WANG F, et al. Clinical and molecular characteristics of muti-clone carbapenem-resistant hyper-virulent(hypermucoviscous)Klebsiella pneumonia isolates in a tertiary hospital in Beijing, China[J]. Int J Infect Dis, 2015, 37:107-112.
- [12] GU D X, DONG N, ZHENG Z W, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumonia in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18:37-46.
- [13] RAMIREZ M S, XIE G, TRAGLIA G M, et al. Whole-genome comparative analysis of two carbapenem-resistant st-258 Klebsiella pneumonia strains isolated during a north-eastern ohio outbreak; differences within the high heterogeneity zones[J]. Genome Biol Evol, 2016, 8(6):2036-2043.
- [14] LIAO W J, LIU Y, ZHANG W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia in China; a review over the last 10 years[J]. Glob Antimicrob Resist, 2020, 23:174-180.