

# 携带 bla<sub>KPC-2</sub> 基因泛耐药肺炎克雷伯菌 16S rRNA 甲基化酶基因和氨基糖苷类修饰酶基因分析

黄支密 单 浩 夏守慧 盛以泉 杨海燕 沈 娟 糜祖煌 朱健铭

**摘 要** 目的 了解临床分离的携带 bla<sub>KPC-2</sub> 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌中 16S rRNA 甲基化酶基因和氨基糖苷类修饰酶 (AMEs) 基因的分布。方法 在 2008 年 11 月 ~ 2009 年 7 月从笔者医院住院患者中分离 19 株携带 bla<sub>KPC-2</sub> 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌, 采用 PCR 及序列分析的方法分析 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因 (armA、rmtA、rmtB、rmtC、rmtD 和 npmA) 和 14 种 AMEs 基因 [ant(3'') - I、ant(2'') - I、ant(4') - I a/b、aadA4/5、aadA6/16、aac(3) - I、aac(3) - II、aac(3) - III、aac(3) - IV、aac(6') - I b、aac(6') - II、aph(3') - I、aph(3') - II b 和 aph(3') - VI a]。结果 19 株中, 5 种基因 aac(3) - II、aac(6') - I b、aac(6') - II、ant(3'') - I 和 aph(3') - I 的阳性株数 [阳性率 (%) ] 分别为 2 (10.5%)、1 (5.3%)、19 (100.0%)、19 (100.0%) 和 2 (10.5%), 其余 15 种基因均阴性; AMEs 基因总阳性率为 100.0% (19/19)。对 1 株 (6 号菌株) aac(6') - I b 基因 PCR 阳性产物进行测序, 证实为 aac(6') - I b - cr 双功能酶基因。结论 氨基糖苷类修饰酶基因 aac(6') - II 和 ant(3'') - I 在携带 bla<sub>KPC-2</sub> 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌中广泛分布。

**关键词** 肺炎克雷伯菌 bla<sub>KPC-2</sub> 16S rRNA 甲基化酶 氨基糖苷类修饰酶 基因

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

**Distribution of 16S rRNA Methylase Genes and Aminoglycoside Modifying Enzymes Genes in Pandrug-resistant *Klebsiella Pneumoniae* Harboring bla<sub>KPC-2</sub> Type Carbapenemase Gene.** Huang Zhimi, Shan Hao, Xia Shouhui, et al. Microbiology Laboratory, The 98th Hospital of People's Liberation Army, Zhejiang 313000, China

**Abstract Objective** To investigate the distribution of 16S rRNA methylase genes and Aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) genes in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring bla<sub>KPC-2</sub> type carbapenemase gene. **Methods** Nineteen strains of pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring bla<sub>KPC-2</sub> type carbapenemase gene were isolated from the inpatients between November, 2008 and July, 2009. Six kinds of 16S rRNA methylase gene (including armA, rmtA, rmtB, rmtC, rmtD and npmA) and 14 kinds of AMEs gene [including ant(3'') - I, ant(2'') - I, ant(4') - I a/b, aadA4/5, aadA6/16, aac(3) - I, aac(3) - II, aac(3) - III, aac(3) - IV, aac(6') - I b, aac(6') - II, aph(3') - I, aph(3') - II b and aph(3') - VI a] were analyzed by PCR and verified by DNA sequencing. **Results** Of the 19 strains tested, the positive rate of genes of aac(3) - II, aac(6') - I b, aac(6') - II, ant(3'') - I and aph(3') - I were 10.5% (2/19), 5.3% (1/19), 100.0%, 100.0% and 10.5% (2/19), respectively. The 15 kinds of rest genes were all tested negative. To the No. 6 strain of *Klebsiella pneumoniae* that the aac(6') - I b gene was positive, analysed by PCR and verification by DNA sequencing, was confirmed to take the aac(6') - I b - cr. **Conclusion** AMEs genes aac(6') - II and ant(3'') - I are prevalent in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring bla<sub>KPC-2</sub> type carbapenemase gene isolated from the inpatients.

**Key words** *Klebsiella pneumoniae*; bla<sub>KPC-2</sub>; 16S rRNA methylase; Aminoglycoside modifying enzymes; Genes

近年来,携带 bla<sub>KPC-2</sub> 型碳青霉烯酶基因肺炎克雷伯菌引起的医院感染在世界各地有较多报道,并且呈现流行趋势<sup>[1-10]</sup>。由于这类细菌往往表现为泛耐

药,甚至极端耐药,对氨基糖苷类抗生素耐药率往往很高,已成为临床抗菌感染治疗的难点之一,但有关其对氨基糖苷类抗生素耐药机制研究资料却较少<sup>[2,3,10]</sup>。为了解笔者医院临床分离的 1 组 19 株携带 bla<sub>KPC-2</sub> 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌 16S rRNA 甲基化酶 (16S rRNA methylase) 基因和氨基糖苷类修饰酶 (aminoglycoside modifying enzymes, AMEs) 基因分布情况,笔者采用分子生物学等技术进行了分析,报道如下。

基金项目:杭州市科技局科技计划项目 (20110833B48)

作者单位:313000 湖州,解放军第九八医院检验科 (黄支密、单浩、夏守慧、盛以泉、杨海燕、沈娟);214026 江苏省无锡市无锡新区虎马生物信息工作室、无锡市克隆遗传技术研究所 (糜祖煌);311106 浙江省杭州市余杭区中医院检验科 (朱健铭)

通讯作者:黄支密,副主任技师,电子信箱:hzmccfhy@163.com

## 材料与方法

1. 菌株来源及常规鉴定:本组 19 株携带 bla<sub>KPC-2</sub> 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌均分离自笔者医院 2008 年 11 月 19 日~2009 年 7 月 4 日住院患者送检的各种标本,采用法国 BioMérieux 公司 API 20 E 系统先进行常规菌种鉴定,详见文献[1]。

2. 菌株分子鉴定:通过对 gyrA、parC 及 mdx 基因测序进行鉴定,见文献[11]。

3. 药敏试验:受试的抗菌药物共计 27 种,其中 26 种药敏试验资料详见文献[1],其余一种替加环素药敏纸片系英国 OXOID 公司产品,采用纸片扩散法(K-B 法),具体参照文献[12]进行。

4. 耐药基因检测:均采用 PCR 技术。共检测 20 种基因,分别为:6 种 16S rRNA 甲基化酶基因(armA、rmtA、rmtB、rmtC、rmtD 和 npmA)和 14 种 AMEs 基因[ant(3'')-I、ant(2'')-I、ant(4'')-I a/b、aadA4/5、aadA6/16、aac(3)-I、aac(3)-II、aac(3)-III、aac(3)-IV、aac(6')-I b、aac(6')-II、aph(3')-I、aph(3')-II b 和 aph(3')-VI a]。其中 rmtB 基因 PCR 扩增引物序列为:P1: 5'-ATGAACATCAACGATGCCCTC-3',P2: 5'-TTATCCATCTTTTTTATCAAGTATAT-3',产物长度为 756 bp。其他 19 种靶基因引物及产物情况、PCR 扩增及产物分析见文献[13]。

5. 序列分析:见文献[13]。

## 结 果

1. 菌株分子鉴定结果:经分子鉴定确认,本组 19 株均为肺炎克雷伯菌肺炎亚种,见文献[11]。

2. 药敏试验结果:本组 19 株对替加环素和黏菌素均敏感,对 4 种氨基糖苷类抗生素(阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素和奈替米星)、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星和复方新诺明等 25 种抗菌药物均耐药<sup>[1]</sup>。

3. 耐药基因检测结果:本组 19 株中,5 种基因 aac(3)-II、aac(6')-I b、aac(6')-II、ant(3'')-I 和 aph(3')-I 的阳性株数[n(%)]分别为 2(10.5)、1(5.3)、19(100.0)、19(100.0)和 2(10.5),其余 15 种基因均阴性;AMEs 基因总阳性率为 100.0%(19/19)。有 1 株(3 号菌株)同时检出 4 种 AMEs 基因 aac(3)-II、aac(6')-II、ant(3'')-I 和 aph(3')-I,另有 1 株(6 号菌株,实验室原始编号 HZ10460)同时检出 5 种 AMEs 基因 aac(3)-II、aac(6')-I b、aac(6')-II、ant(3'')-I 和 aph(3')-I。图 1 为 ant(3'')-I 基因 PCR 产物电泳图。

4. 序列分析结果:经对 6 号菌株 aac(6')-I b 基因 PCR 阳性产物进行测序比对,确认为 aac(6')-I b-cr 双功能酶基因。

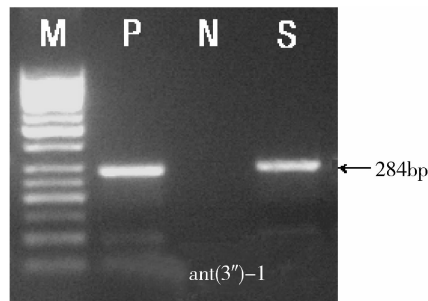


图 1 ant(3'')-I 基因 PCR 产物电泳图

M. 分子质量标记,由下而上分别为 50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000bp;P. 阳性对照;N. 阴性对照;S. 阳性标本

## 讨 论

链霉素是第一种用于临床的氨基糖苷类抗生素。除链霉素外,常用的氨基糖苷类抗生素主要有庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星和妥布霉素等,为临床抗菌感染治疗发挥了重大作用。然而,从近年来报道情况看,临床上常见的分离菌株如肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、鲍曼不动杆菌以及大肠杆菌等革兰阴性杆菌对氨基糖苷类抗生素耐药性在不断增强,究其原因还是不合理使用所致。已知革兰阴性杆菌对氨基糖苷类抗生素产生耐药往往是多种耐药机制在共同发挥作用,但主要机制有两种,一是细菌产生针对抗生素的 AMEs,AMEs 种类较多,具有相对底物特异性,二是细菌产生 16S rRNA 甲基化酶。已发现的 16S rRNA 甲基化酶包括 ArmA、RmtA、RmtB、RmtC、RmtD、RmtE、RmtF、RmtG、RmtH 和 NpmA,分别由 armA、rmtA、rmtB、rmtC、rmtD、rmtE、rmtF、rmtG、rmtH 和 npmA 基因编码,通过保护抗生素的主要作用靶位 16S rRNA,导致耐药<sup>[14~16]</sup>。AMEs 基因和 16S rRNA 甲基化酶基因均可通过质粒、整合子进行水平传播。从耐药机制上看,相对于产 AMEs 导致耐药而言,细菌产 16S rRNA 甲基化酶所致的耐药水平更高、范围更广,危害性也更大,因此必须高度重视,加强监测。

已在波兰等地产 KPC-2 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌中发现了 armA 基因<sup>[2,3]</sup>,在我国浙江省杭州市此类细菌中发现了 armA 和 rmtB 基因,但有关此类细菌 AMEs 基因和 16S rRNA 甲基化酶基因分布情况报道很少。本组 19 株细菌对本研究所测试的 4 种氨基糖苷类抗生素均耐药,仅检出 5 种 AMEs 基因 aac(3)-II、aac(6')-Ib、aac(6')-II、ant(3'')-I 和 aph(3')-I,未检出其他 9 种 AMEs 基因和 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因。但全部 19 株 aac(6')-II 和 ant(3'')-I 均阳性,有 1 株(3 号菌株)同时检出 4 种 AMEs 基因 aac

(3) - II、aac(6') - II、ant(3'') - I 和 aph(3') - I, 另有 1 株(6 号菌株, 实验室原始编号 HZ10460) 同时检出 5 种 AMEs 基因 aac(3) - II、aac(6') - Ib - cr、aac(6') - II、ant(3'') - I 和 aph(3') - I, 此现象值得注意。ant(3'') - I 基因编码产物为 ANT(3'') - I, 其抗性谱为链霉素和大观霉素。aac(6') - Ib - cr 为双功能酶基因。笔者曾报道阴沟肠杆菌为 aac(6') - Ib - cr 亚型新宿主, 且有较高的阳性率。朱健铭等<sup>[17]</sup> 在 1 组 47 株多重耐药肺炎克雷伯菌中发现有 2 株(4.3%) aac(6') - Ib - cr 基因阳性。尽管本组仅 1 株 aac(6') - Ib - cr 基因阳性, 阳性率不高, 但由于其位于质粒上, 不仅能介导氨基糖苷类抗生素耐药, 同时还可介导喹诺酮类耐药, 因此, 有必要加以关注。

近年来有一些关于多重耐药肺炎克雷伯菌 AMEs 基因和 16S rRNA 甲基化酶基因研究的报道<sup>[13, 18-20]</sup>, 但基因检出情况有所不同。笔者曾对 1 组 25 株对亚胺培南和美罗培南均敏感肺炎克雷伯菌(菌株均分离自笔者医院 2005 年 9 月~2006 年 4 月住院患者送检的各种标本) 进行了 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因和 6 种 AMEs 基因分析, 发现在所检测的 6 种 16S rRNA 甲基化酶基因 armA、rmtA、rmtB、rmtC、rmtD 和 npmA 中, 仅 rmtB 基因阳性, 但阳性率较高, 为 60.0% (15/25), 而 aac(6') - II 基因阴性, 与本研究结果完全不同。笔者还曾在从笔者医院临床分离的 40 株阴沟肠杆菌中(分离时间为 2003 年 9 月~2004 年 11 月) 检出 rmtB 基因 5 株(12.5%)、60 株鲍曼不动杆菌中(分离时间为 2000 年 7 月~2002 年 12 月) 检出 armA 基因 15 株(25.0%)。但本组 19 株分离时间较晚, 且未检出 armA 和 rmtB 基因, 推测导致结果差异原因, 除了菌种不同之外, 还应该与菌株分离时间不同有关。结果表明, AMEs 基因 aac(6') - II 和 ant(3'') - I 在本组菌株中广泛分布, 但不排除存在本研究未检测的其他 AMEs 基因和 16S rRNA 甲基化酶基因如 rmtE、rmtF、rmtG 和 rmtH 可能, 有等进一步分析。

#### 参考文献

- 1 黄支密, 糜家睿, 盛以泉, 等. 携带 bla<sub>KPC-2</sub> 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌医院内感染暴发的病原学分析[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(5): 559-562
- 2 Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(1): 443-446
- 3 Jiang Y, Yu D, Wei Z, et al. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>DHA-1</sub>, qnrB4, and armA [J]. Antimicrob Agents Che-

- mother, 2010, 54(9): 3967-3969
- 4 Hong SK, Yong D, Kim K, et al. First outbreak of KPC-2 - producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in a hospital in South Korea [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3877-3879
- 5 Kassis - Chikhani N, Decré D, Ichai P, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(7): 1539-1540
- 6 黄金伟, 黄建胜, 陈海泉, 等. 浙江省丽水地区发现 1 株泛耐药产 KPC-2 碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌[J]. 疾病监测, 2011, 26(1): 58-60
- 7 Papagiannitsis CC, Miriagou V, Giakkoupi P, et al. Characterization of pKP1433, a novel KPC-2 - encoding plasmid from *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(7): 3427-3429
- 8 张丽, 张小兵, 杨维青, 等. 广东省东莞地区发现 1 株泛耐药产 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(6): 465-468
- 9 Bueno MFC, Francisco GR, O'Hara JA, et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended - spectrum  $\beta$  - lactamases in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(5): 2397-2400
- 10 陆理英, 张伟丽, 杨青, 等. 16S rRNA 甲基化酶在产 KPC 酶肺炎克雷伯菌中的分布[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(2): 71-73
- 11 黄支密, 糜家睿, 单浩, 等. gyrA、parC 及 mdxI 基因测序鉴定肺炎克雷伯菌中感[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(18): 4348-4350
- 12 王辉, 倪语星, 陈民钧, 等. 新型甘氨酸环素类抗菌药物替加环素的体外药敏试验操作规程[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(11): 1208-1213
- 13 朱健铭, 肖丹宇, 姜如金, 等. 多药耐药肺炎克雷伯菌氨基糖苷类修饰酶与 16S rRNA 甲基化酶基因研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(17): 3690-3693
- 14 O'Hara JA, McGann P, Sniesrud EC, et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* Associated with war-related Trauma [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(5): 2413-2416
- 15 Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family [J]. Antimicrob. Agents Chemother, 2012, 56(7): 3960-3962
- 16 Poirer L, Labarca J, Bello H, et al. Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended - spectrum -  $\beta$  - lactamase - producing and Colistin - resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate in Chile [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(1): 616-619
- 17 朱健铭, 姜如金, 孔海深, 等. 多重耐药肺炎克雷伯菌发现一组 gyrA、parC、qnrS 基因新变异型 [J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(1): 61-66
- 18 陈磊, 汪丽, 马红映, 等. 植生克雷伯菌与肺炎克雷伯菌氨基糖苷类修饰酶及 16S rRNA 甲基化酶基因研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(23): 5189-5192
- 19 Lee CH, Liu JW, Li CC, et al. Spread of ISCR1 elements containing bla<sub>DHA-1</sub> and multiple antimicrobial resistance genes leading to increase of flomoxef resistance in extended - spectrum -  $\beta$  - lactamase - producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(9): 4058-4063
- 20 梁彩倩, 张永标, 杨晓燕, 等. 肺炎克雷伯菌中氨基糖苷类修饰酶基因流行特征的研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(14): 3308-3310, 3313

(收稿日期: 2014-03-25)

(修回日期: 2014-04-04)