

肺炎克雷伯菌 *bla*_{CARB-2} 基因的分布及结构分析

祝力骋^{1,2}, 卢俊婉^{2,3}, 王建^{3,4}, 许腾³, 徐娟华¹

1. 浙江大学药学院, 杭州 310000
2. 丽水学院医学与健康学院, 丽水 323000
3. 温州医科大学检验医学院, 生命科学学院, 温州 325000
4. 宁波市第一医院检验科, 宁波 315000

摘要: 为探讨 β -内酰胺酶基因在临床分离肺炎克雷伯菌的分布及其相关可移动遗传元件的结构, 本文利用基因组测序、PCR、分子克隆、接合转移和基因组学分析等方法, 在对 240 株临床分离的肺炎克雷伯菌进行混合基因组测序的基础上, 着重研究了 *bla*_{CARB-2} 等耐药性基因相关可移动遗传元件的结构及其在肺炎克雷伯菌基因组的定位, 克隆获得耐药性质粒携带的若干耐药性基因并测定了它们的功能。结果显示, 在 240 株肺炎克雷伯菌中检出 11 种 β -内酰胺酶基因, 其中 1 株肺炎克雷伯菌(KP1276)被检出 *bla*_{CARB-2} 基因, 阳性率为 0.42% (1/240); *bla*_{CARB-2} 位于一个大小为 182,450 bp 的可接合转移质粒(pKP1276-182), pKP1276-182 共编码 222 个基因, 包含 7 个耐药性基因, 分别是 *bla*_{CARB-2}、*bla*_{KLUC}、*aadA1*、*aadA2*、*cmlA1*、*dfrA1* 和 *sul2*。*bla*_{CARB-2} 是首次在肺炎克雷伯菌中被检出, 且 *bla*_{CARB-2} 与其他 3 个耐药性基因一起构成一个新型结构的 1 型整合子 (*int-bla*_{CARB-2}-*aadA2*-*cmlA1*-*aadA1*); 对其中的 3 个耐药性基因 *bla*_{CARB-2}、*aadA2* 和 *CmlA1* 进行了分子克隆和耐药性测定, 结果显示它们对相应药物都具有一定的耐药性, 其中 *bla*_{CARB-2} 对青霉素类 β -内酰胺药物具有较高的耐药性。本研究结果表明, *bla*_{CARB-2} 基因已经在肺炎克雷伯菌中出现, 其由 1 型整合子携带编码位于一个可接合转移的质粒上, *bla*_{CARB-2} 基因有可能在相同及不同种属肠杆菌之间进行水平转移, 引起耐药性播散。

关键词: 肺炎克雷伯菌; *bla*_{CARB-2}; 1 类整合子; 克隆; 耐药性

Analyses on distribution and structure of *bla*_{CARB-2} in *Klebsiella pneumoniae*

Licheng Zhu^{1,2}, Junwan Lu^{2,3}, Jian Wang^{3,4}, Teng Xu³, Juanhua Xu¹

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China
2. College of Medicine and Health, Lishui University, Lishui 323000, China
3. School of Laboratory and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China
4. Department of Laboratory Sciences, Ningbo First Hospital, Ningbo 315000, China

Abstract: In order to characterize the structure of the beta-lactamase gene and its corresponding mobile genetic ele-

收稿日期: 2018-03-27; 修回日期: 2018-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 80215049) [Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 80215049)]

作者简介: 祝力骋, 大学, 实验师, 研究方向: 基础医学。E-mail: 10594311@qq.com

通讯作者: 徐娟华, 研究生, 副教授, 研究方向: 药学。E-mail: phnosy@zju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-034

网络出版时间: 2018/6/6 11:29:09

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180606.1129.002.html>

ments in *Klebsiella pneumoniae*, the beta-lactamase genes from 240 clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates were studied. *bla*_{CARB-2}, a newly characterized gene, was extensively investigated utilizing next-generation sequencing, PCR, molecular cloning, conjugation, and comparative genomics analysis. We identified 11 beta-lactamase genes among the 240 clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates; the *bla*_{CARB-2} gene exists only in one specific isolate (*Klebsiella pneumoniae* KP1276) (1/240, 0.42%). The *bla*_{CARB-2} gene lies on a conjugative plasmid pKP1276-82, a 182,450-bp plasmid, which encodes 222 open reading frames. The plasmid has seven resistance genes, termed *bla*_{CARB-2}, *bla*_{KLUC}, *aadA1*, *aadA2*, *cmlA1*, *dfrA1*, and *sul2*. Among these genes, *bla*_{CARB-2} was identified for the first time in *Klebsiella pneumoniae*. Four of these resistance genes and an *int* gene form a class 1 integron (*int-bla*_{CARB-2}-*aadA2*-*cmlA1*-*aadA1*). Further studies show that the *bla*_{CARB-2}, *aadA2*, and *cmlA1* genes are resistant to their corresponding antibiotics and the *bla*_{CARB-2} exhibits higher resistance activities to penicillin beta-lactams. These results reveal the possibility of horizontal transfer of the resistance genes and dissemination of resistance among bacteria of different genera or species of *Enterobacteriaceae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; *bla*_{CARB-2}; class 1 integron; cloning; antibiotics resistance

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是重要的引起医源性感染的条件致病菌,可引起典型的原发性肺炎,是糖尿病人、慢性阻塞性肺部疾病病人及酒精中毒者并发肺部感染的潜在危险因素。该菌在正常人口咽部带菌率约为 6%,在住院病人中带菌率高达 20%。近十几年来,肺炎克雷伯菌引起的免疫力低下病人感染或医院内感染的病例不断增多^[1-3]。

随着抗菌药物的广泛应用、不同药物相关的耐药基因在各种病原菌间广泛传播,肠杆菌科细菌的耐药性更是不断增加,在医院感染中占到了 50% 以上,且对大部分抗菌药物的敏感率呈下降趋势,有些肠杆菌科的细菌多重耐药问题,已成为当今医疗机构面临的重大难题之一,严重威胁着人类的生命健康^[4]。肠杆菌科细菌耐药监测结果显示克雷伯菌属是仅次于大肠埃希菌属的最多见者,除头孢西丁、头孢他啶和头孢吡肟之外,对其他头孢类抗生素的耐药性均在 30%~50% 以上,尤其是近年来肠杆菌对碳青霉烯类药物的耐药性日趋严重^[5,6]。为深入开展细菌耐药性形成机制的研究,本文对 240 株临床分离肺炎克雷伯菌进行混合基因组测序,并着重研究了 *bla*_{CARB-2} 等耐药性基因相关可移动遗传元件的结构及其在肺炎克雷伯菌基因组的定位,克隆获得耐药性质粒携带的若干耐药性基因并测定了它们的功能。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

收集 2009~2011 年间温州医科大学附属第一医院临床送检的体液(如血液、腹水等)、分泌物(如痰液、脓液等)中分离得到的 240 株随机留取的肺炎克雷伯菌。所有菌株都经过法国生物梅里埃公司 VITEK-32 全自动微生物分析鉴定系统鉴定。药物敏感性实验使用的质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 购自卫生部临床检验中心。接合转移受体菌大肠埃希菌 C600,克隆受体菌大肠埃希菌 JM109、BL21 均来自实验室保存菌株。

1.2 试剂和仪器

M-H 琼脂和肉汤培养基购自美国 DIFCO 公司; *Taq* DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶(pfu)、1kb DNA Ladder、pMD18-T、pET28a 等购自大连宝生物工程(有限公司);引物合成及 PCR 产物测序均由上海桑尼生物科技有限公司完成。

PCR 扩增仪(型号: Universal HoodIII, 美国 BIO-RAD 公司产品),电泳仪(型号: DYY-5 型,北京市六一仪器厂产品),凝胶成像分析系统(型号: GeneGenius, 美国 SynGene 公司产品)。

1.3 药物敏感性试验

采用临床和实验室标准研究所(clinical and laboratory standards institute)的抗菌药物敏感性检验操作标准(performance standards for antimicrobial testing) (CLSI document M100-S27, 2017)^[7]推荐的平板稀释法测定细菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)及其标准判定结果。将不同药物按要求用无菌水等溶剂稀释后,用冷却至 55~60 的 M-H 培养基配制系列倍比浓度的含药平板;将待测菌用无菌生理盐水配制成 0.5 麦氏单位的菌悬液,取 2 μ L 点种于含抗菌药物平板,以不含药的 M-H 平板为对照,大肠埃希菌 ATCC25922 为质控菌株。将 M-H 平板倒置放入 35 \pm 2 孵箱孵育 20~24 h,观察结果,实验以平板上无细菌生长的药物浓度为 MIC 的终点。

1.4 肺炎克雷伯菌混合基因组 DNA 测序

肺炎克雷伯菌接种于 5 mL LB 液体培养基,在 37 培养 16~18 h 至菌浓度约 $OD_{600}=1.5\pm0.2$,然后将细菌等量混合,用 AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep kit (axygen scientific, Union City, CA, 美国)^[8]提取混合细菌的 DNA,以 Illumina HiSeq-2000 (北京华大基因研究中心)进行基因组测序。用 Phrap 软件拼接后筛选长度大于 150 bp 的片段,用 Glimmer 软件预测开放阅读框^[9],用 BLASTX 比对蛋白质数据库已知蛋白质序列进行开放阅读框的功能注释。

1.5 肺炎克雷伯菌质粒的全基因组测序

肺炎克雷伯菌接种于 5 mL LB 液体培养基在 37 培养 16~18 h 至菌浓度约 $OD_{600}=1.5\pm0.2$,用碱裂解法^[8]提取细菌的质粒 DNA,以 Illumina HiSeq-2000 和 Pacific Bioscience RS 单分子实时测序平台(北京华大基因研究中心)进行质粒基因组测序。对 Illumina HiSeq-2000 测序得到的读长用 Phrap 软件拼接,得到框架序列,再用 Pacific Bioscience 测序得到的读长(10~20 kb)进行框架序列的定位,用 PCR 测序方法进行填补空缺,最后得到完整的质粒基因组序列。用 Glimmer 软件预测开放阅读框^[9],用 BLASTX 比对蛋白质数据库已知蛋白质序列进行开放阅读框的功能注释。

1.6 细菌基因组编码的 β -内酰胺酶基因分析

将所获得的 11 条 β -内酰胺酶基因序列作为参考序列,将高通量测序获得的细菌所有短序列通过比对,定位(mapping)到选取的 β -内酰胺酶基因参考序列上,提取并计算比对结果中的参考序列的覆盖度和平均丰度。短序列比对采用软件是 SOAPaligner/soap2^[10]将平均覆盖度 ≥ 0.9 且平均丰度 ≥ 2 的基因定义为阳性结果(即该混合基因组中极有可能含有该 *bla* 基因序列),由 Python3 语言编写的脚本提取和计算覆盖度、平均丰度。

1.7 PCR 扩增筛选携带耐药性基因的菌株

用 AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep kit (axygen scientific, Union City, CA, 美国)提取基因组 DNA,用 Primer Premier 5 设计引物,PCR 反应体系:10 \times Buffer 5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L)3 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 3 μ L, 上、下游引物(5 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 3 μ L, 用 ddH₂O 补足至 50 μ L。扩增整合子循环参数:95 变性 5 min;95 50 s,55 40 s,72 1 min,连续 35 个循环;再 72 延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳、EB 染色后用凝胶成像系统拍照分析。

1.8 耐药性基因的功能分析

将 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体,PCR 和双酶切鉴定后测序。测序正确的片段用相应的限制性核酸内切酶(大连宝生物工程有限公司)酶切,纯化后克隆到表达载体 pET-28a,转化到宿主菌 *E.coli* BL21,在 LB 平板(含 Km)上筛选阳性克隆,具体操作参考分子克隆实验指南^[8]进行。提取质粒双酶切验证后,阳性重组子用 IPTG 进行诱导表达。以 *E.coli* BL21-pET28a 为对照,将经 IPTG 诱导后的重组菌液及对照菌液适当稀释后,进行平板稀释法测定对抗菌药物的最低抑菌浓度。

1.9 质粒的接合转移实验

采用滤膜接合转移实验^[11]。以临床分离耐药菌为供体菌,以利福平耐药的大肠埃希菌 C600 为受体菌,并在含 1200 μ g/mL 利福平和 100 μ g/mL 的氨苄西林的 Mueller-Hinton 平板上筛选接合子^[12]。提取

接合子质粒, 用已知耐药性基因的筛选引物进行 PCR 反应扩增, 测序验证 PCR 产物。

2 结果与分析

2.1 肺炎克雷伯菌混合基因组测序分析结果

将 240 株临床分离肺炎克雷伯菌混合基因组进行 HiSeq-2000 测序, 共得到长度为 100 bp 以上的读长 182 032 468 条, 总测序量为 18.2 Gb, 拼接后得到长度大于 200 bp 片段 49 949 条, 总长度为 87.99 Mb。基因组注释后得到长度大于 50 个氨基酸的多肽片段 83444 个, 其中 β -内酰胺酶基因 11 个。然后, 以 11 个 β -内酰胺酶基因的 ORF 序列对原始测序读长进行定位, 得到这些基因的覆盖度和冗余度结果(表 1)。冗余度较高的是 bla_{SHV} (652.6)、 bla_{TEM} (408.9)、 $bla_{CTX-M-9}$ (276.4)和 $bla_{CTX-M-1}$ (198.6), 冗余度较低的是 bla_{CARB-2} (8.5)和 bla_{KLUC} (7.9)等。

表 1 β -内酰胺酶基因在肺炎克雷伯菌中的覆盖度和丰度

Table 1 Coverage and redundancy of the beta-lactamase genes in the *Klebsiella pneumoniae* genomes

基因型	参考序列 ^a	覆盖度 ^b	平均丰度 ^c
bla_{CARB}	GU188441.1	1	8.51
bla_{OKP-A}	FJ534513.1	0.99	13.24
bla_{KPC}	KU176944.1	1	40.39
bla_{LEN}	AJ635425.1	1	21.33
bla_{KLUC}	NG_041577.1	1	7.92
bla_{DHA}	JX495964.1	1	98.72
bla_{SHV}	KF585134.1	1	652.56
bla_{TEM}	NG_039599.1	1	408.85
bla_{OXA}	CP013657.1	1	24.31
$bla_{CTX-M-9}$	KP975077.1	1	276.43
$bla_{CTX-M-1}$	KT779550.1	1	198.61
bla_{OXY}	JX559323.1	1	22.77
$ampH$	CP000647.1	1	611.95

a: 指被测序读长定位(mapping)的已知 β -内酰胺酶基因的 ORF 序列; b: 参考序列被测序读长覆盖的总长度/参考序列总长度; c: 参考序列的每一个核苷酸被测序读长覆盖的平均次数, 也指参考序列的平均测序深度。

2.2 bla_{CARB-2} 基因阳性菌株的筛选与接合转移实验

从测序分析结果可知, bla_{CARB-2} 基因在肺炎克雷伯菌中少见。为研究 bla_{CARB-2} 的来源及其进化, 本文以 240 株肺炎克雷伯菌基因组为模板, 用 bla_{CARB-2} 基因的筛选引物(CARB_SF 和 CARB_SR)(表 2)进行 PCR 反应, 筛选 bla_{CARB-2} 阳性菌株, 结果仅在 1 株命名为肺炎克雷伯菌 KP1276 中扩增到 bla_{CARB-2} 基因, 阳性率为 0.42% (1/240)。为检测 bla_{CARB-2} 基因是否编码于可接合转移的耐药性质粒, 以耐利福平的大肠埃希菌 EC600 为受体, 进行接合转移实验。结果显示, 接合子携带一个大质粒, 与供体菌携带的 3 个质粒中的中等大小质粒相似。提取接合子的质粒, 用 bla_{CARB-2} 基因的筛选引物进行 PCR 扩增, 结果为阳性; 对接合子与供、受体菌同时进行耐药性(MIC)测定, 发现接合子对所检测的药物的抗性都介于供体菌与受体菌之间(表 3), 因此认为 bla_{CARB-2} 基因定位于这个可接合转移的质粒中。

2.3 肺炎克雷伯菌 KP1276 可接合转移质粒的基因组测序

提取接合子质粒, 通过新一代基因组测序(HiSeq-2000 和 Pacific Bioscience RS 单分子实时测序平台), 拼接后得到接合子质粒的全序列, 其为一个环状 DNA 分子, 大小为 182 450 bp, 命名为 pKP1276-182, 共编码 222 个基因, 其中包括 7 个耐药性基因, 分别是 bla_{CARB-2} 、 bla_{KLUC} 、 $aadA1$ 、 $aadA2$ 、 $cmlA1$ 、 $dfrA1$ 和 $sul2$ 。这些基因与已知相应耐药性基因的核苷酸水平的相似性都在 100% (表 4)。

2.4 bla_{CARB-2} 相关序列的比较基因组分析

pKP1276-182 基因组序列的注释结果显示, 7 个已知的耐药性基因中的 4 个(bla_{CARB-2} 、 $aadA2$ 、 $cmlA1$ 和 $aadA1$ 等)组成一个基因簇, 在这个耐药基因簇的上游为一个整合酶基因(*int*), 在它们的下游为 Tn7 转座酶基因。对耐药基因簇及其进上下游序列的结构分析发现, 耐药基因簇与整合酶(*int*)一起构成一

表 2 耐药性基因相关的引物序列及克隆载体

Table 2 Primers for the resistance genes and the cloning vectors

引物名称(限制性核酸内切酶)	引物序列(5' 3')	片段大小(bp)	克隆载体
CARB_SF	ACTCGTATAGGTGTTCCGTTCT	314	
CARB_SR	CCAATTTGTCTTAAAAAATCAGTAA		
CREB-FF (<i>EcoR</i> I)	CGGAATTCATGCTTTTATATAAAAATGTG	932	pET28a
CREB-FR (<i>Sal</i> I)	ACGCGTCGACTCAGCGCGACTGTGATGTAT		
AadA2-FF (<i>EcoR</i> I)	CGGAATTCATGGCGGCGTTAGACATCAT	822	pUCP20
AadA2-FR (<i>Hind</i> III)	CCAAGCTTTCATTACCAACTGACTTGA		
CmlA1-FF (<i>EcoR</i> I)	CGGAATTCGTGAGCTCAAAAACTTTAG	1276	pUCP24
CmlA1-FR (<i>Hind</i> III)	CCAAGCTTTCACGATTGGGATTTGATG		

带下划线处为引入的限制性核酸内切酶位点及保护性碱基序列

表 3 相关菌株的耐药性(MIC)测定结果($\mu\text{g/mL}$)Table 3 MIC results of the strains ($\mu\text{g/mL}$)

菌株	CTX	CAZ	CRO	FEP	ATM	PIP	TZP	AMP	CL	STR	CB	CBTB
KP1276	64	8	128	32	64	>512	8	>512	16	>64	>512	>64
pKP1276-182/EC600	4	1	8	2	4	128	4	>512	8	>64	>512	>64
EC600	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	2	2	2	2	2	8	8

CTX: 头孢噻肟; CAZ: 头孢他啶; CRO: 头孢曲松; FEP: 头孢吡肟; ATM: 氨曲南; PIP: 哌拉西林; TZP: 哌拉西林-他唑巴坦; AMP: 氨苄西林; CL: 氯霉素; STR: 链霉素; CB: 羧苄西林; CBTB: 羧苄西林-他唑巴坦。

表 4 pKP1276-182 编码的预测耐药性基因与数据库已知耐药性基因的相似性比较结果

Table 4 Comparison of the predicted resistance genes encoded on pKP1276-182 with the homologous genes in public databases

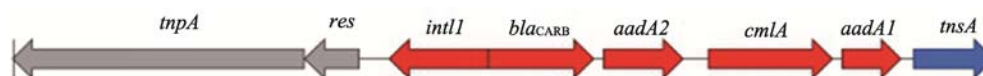
耐药基因	参考序列	ORF 长度(bp)	核苷酸序列相似性(%)	氨基酸序列相似性(%)
<i>bla</i> _{CARB-2}	KP345882	1074	100	100
<i>bla</i> _{KLUC}	NG_041577	876	100	100
<i>aadA1</i>	KT316807	596	100	100
<i>aadA2</i>	CP011317	810	100	100
<i>cmlA1</i>	KT334335	1260	100	100
<i>dfrA1</i>	CP013690	474	100	100
<i>sul2</i>	CP013690	816	100	100

个 1 型整合子。为研究整合子的起源及水平转移引起耐药性播散的分子遗传学机制, 对其进行比较基因组学分析, 通过与 NCBI GenBank 数据库现有的数据比较分析, 发现该 1 型整合子结构(包含 4 个耐药性基因盒)在数据库里并不存在, 与它最接近的 1 型整合子只包含其中 3 个耐药性基因盒(*int-bla*_{CARB-2}-*aadA2-cmlA1*, KP345882.1 和 CP010391.1 等)(图 1)。

2.5 耐药性基因的克隆与功能测定

对 3 个基因的 ORF (分别是 β -内酰胺酶基因

*bla*_{CARB-2}、氨基糖苷类药物抗性基因 *aadA2* 和氯霉素类药物抗性基因 *cmlA1*)进行了克隆和耐药性功能测定。PCR 扩增这些耐药性基因的开放阅读框(ORF)(引物见表 2), 并将 *bla*_{CARB-2} 和 *cmlA1* 基因的 PCR 产物分别克隆至表达载体 pET28a 和 pUCP24(卡那霉素抗性), 将 *aadA2* 基因的 PCR 产物克隆至表达载体 pUCP20(氨苄青霉素抗性), 将连接产物转化至大肠埃希菌 BL21(利福平抗性), 得到含有重组质粒的转化子(pUCP24-*bla*_{CARB-2}/BL21、pUCP24-*cmlA1*/BL21 和 pUCP20-*aadA2*/BL21)。克隆片段经测序验

图 1 *bla*_{CARB-2} 相关 1 型整合子的结构Fig. 1 Structure of the *bla*_{CARB-2} related class 1 integron

该 1 型整合子携带 4 个包括 *bla*_{CARB-2} 在内的耐药性基因盒，在其上下游各编码一个转座酶基因。

证正确，并对转化子进行了有关药物的耐药性测定，结果显示克隆的耐药性基因都对相应的药物具有一定的耐药性，耐药水平较对照菌上升了 3 个以上的稀释度，其中 *bla*_{CARB-2} 基因对青霉素类药物如羧苄西林和哌拉西林具有较高的耐药性，耐药水平较对照菌上升了 6 个稀释度(64 倍)，且它的耐药性(对药物的水解活性)能被他唑巴坦抑制，而对其它类型的 β-内酰胺类药物(如头孢类药物等)没有抗性(表 5)。

3 讨 论

本研究发现的肺炎克雷伯菌携带的耐药性质粒 pKP1276-182 携带有 7 个耐药性基因，包括 1 型整合子的 4 个耐药性基因(*bla*_{CARB-2}、*aadA2*、*cmlA1* 和 *aadA1*)以及 *bla*_{KLUC}、*dfrA1* 和 *sul2*。其中 *aadA2*、*cmlA1*、*aadA1*、*dfrA1* 和 *sul2* 在肺炎克雷伯菌中比较常见^[13]，但 β-内酰胺类耐药性基因 *bla*_{CARB-2} 目前还未见在肺炎克雷伯菌中有过报道。本文对由整合子携带的 3 个耐药性基因(*bla*_{CARB-2}、*cmlA1* 和 *aadA2*)进行了克隆与耐药性测定，结果发现这些耐药性基因都具有耐药功能。接合转移实验证明 pKP1276-182 为可接

合转移质粒，因此推测 pKP1276-182 可能在同种不同菌株或同属不同菌种中进行水平转移，引起耐药性播散^[14]。

肺炎克雷伯菌等肠杆菌对 β-内酰胺类药物的耐药机制主要是获得对 β-内酰胺类药物起降解作用而使抗菌药物失去活性的酶类。根据 Bush-Jacoby-Medeiros 1995 年提出的 β-内酰胺酶分类方法^[15]，所有的 β-内酰胺酶可分为 4 组(Bush-Jacoby-Medeiros 1、2、3 和 4 组)和 4 个分子类别(Ambler A、B、C 和 D 分子分类)。第 2 组 β-内酰胺酶对 β-内酰胺类药物的水解活性可被克拉维酸抑制，根据对青霉素、头孢菌素类 β-内酰胺抗生素、氯唑西林、羧苄西林、碳青霉烯类抗生素的水解活性的差别，第 2 组 β-内酰胺酶又分为 2a、2b、2be、2c、2d、2e 共 6 个亚组。除 2d 的分子类别为 D 类外，其余各亚组分子类别均为 A 类^[16]。*bla*_{CARB} 基因编码产生的 β-内酰胺酶属于 Bush-Jacoby-Medeiros 分组的第二组和 Ambler 分子分类的 A 类。该酶能高效率地水解羧苄青霉素，其水解活性能被它唑巴坦、舒巴坦和克拉维酸等抑制^[17]。本研究克隆获得的 *bla*_{CARB} 基因同样表现出对羧苄西林的高度耐药性，与受体菌比较，耐药性上

表 5 相关菌株的耐药性(MIC)测定结果(μg/mL)

Table 5 MIC results of the strains (μg/mL)

菌株	CTX	CAZ	CRO	FEP	ATM	PIP	TZP	AMP	CL	STR	CB	CBTB
pET28a- <i>bla</i> _{CARB} /BL21	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	64	0.5	4	2	2	256	4
pET28a/BL21	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	1	2	2	4	4
BL21	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	1	2	2	4	4
pUCP20- <i>aadA2</i> /DH5a	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	>512	2	>64	—	—
pUCP20/DH5a	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	>512	2	2	—	—
pUCP24- <i>cmlA1</i> /DH5a	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	1	16	2	—	—
pUCP24/DH5a	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	1	2	2	—	—
DH5a	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	1	2	2	—	—
ATCC25922	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1	0.5	2	4	2	16	16

CTX: 头孢噻肟, CAZ: 头孢他啶, CRO: 头孢曲松, FEP: 头孢吡肟, ATM: 氮曲南, PIP: 哌拉西林, TZP: 哌拉西林-他唑巴坦, AMP: 氨苄西林, CL: 氯霉素, STR: 链霉素, CB: 羧苄西林, CBTB: 羧苄西林-他唑巴坦, —: 未检测。

升了6个倍比稀释度(64倍),且其耐药性也被他唑巴坦所抑制,在他唑巴坦存在下,它对羧苄西林的MIC值从256 µg/mL下降至4 µg/mL。根据*bla*_{CARB}酶蛋白氨基酸序列的不同,GenBank数据库已经收集了40个左右的亚型。其中大多数来自于副溶血性弧菌,也有相当一部分来自于假单胞菌和不动杆菌属细菌。本研究检测到的*bla*_{CARB}基因与该数据库中已有的*bla*_{CARB}比较,与属于*bla*_{CARB-2}型的序列(KP345882)相似性达100%,为*bla*_{CARB-2}。根据本文的研究结果,*bla*_{CARB}基因除对青霉素类药物(羧苄西林和哌拉西林等)具有较高的耐药性外,对其他种类的β-内酰胺类药物如头孢类、碳青霉烯类、单环内酰胺类等药物不耐药。因此认为,对于由携带*bla*_{CARB}基因细菌引起的感染,应选用除青霉素类药物之外的β-内酰胺类药物进行抗菌治疗。

*bla*_{CARB}主要存在于革兰氏阴性菌,如弧菌^[18]、假单胞菌^[17]、不动杆菌属细菌^[19]及肠杆菌科细菌^[20]。从现有的文献报道来看,*bla*_{CARB}基因通常由整合子或转座子携带,定位于耐药性质粒。整合子(常见的是1型整合子)和转座子是可携带多种功能基因(如耐药性相关基因)的可移动遗传元件^[17,21]。在整合酶或转座酶的作用下,它们可捕获耐药性相关基因(如耐β-内酰胺类、氯霉素类和氨基糖苷类等抗菌药物基因)。一方面不同的整合子/转座子由于携带的外源性基因的数量和种类的不同,而表现出结构的多样性,另一方面,它可通过原核生物的遗传重组机制(接合、转化、转导等)在不同种属或同种不同株细菌之间进行水平转移,引起耐药性的播散^[17,21]。早在1980年,在法国临床标本中分离得到的铜绿假单胞菌P83372,在其携带的质粒pUD12上就发现了一个存在于转座子结构中的*bla*_{CARB-4}基因^[22]。Fonseca等^[17]报道在巴西临床分离的铜绿假单胞菌中也发现由1类整合子携带的*bla*_{CARB-4}基因;后来在南美洲的阿根廷报道了超级整合子携带的*bla*_{CARB-7}^[23]和*bla*_{CARB-9}^[24]。本文报道了在临床分离的肺炎克雷伯菌耐药性质粒上同样存在于1型整合子的*bla*_{CARB-2}基因。对耐药性质粒的全基因组序列分析发现,该整合子除包含*bla*_{CARB-2}基因外,还包含3个其他耐药性基因,它们组成的基因盒结构(*bla*_{CARB-2}-*aadA2*-*cmlA1*-*aadA1*)是一种新的基因盒结构,在已经发表

的文献中没有类似的整合子基因盒结构的报道。曾有几篇文章报道了有关携带*bla*_{CARB}基因的整合子基因盒结构的文章,如在对我国临床分离的300株嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)进行耐药性基因调查时,检出由1型整合子携带的*aadB*-*aac*(6')-II-*bla*_{CARB-8}基因盒结构^[25],而最近的另外一个研究发现,在对743株分离自我国8个省市鸡肉的细菌进行研究时,发现有15.2% (113/743)的细菌检出1型整合子,共有10种基因盒结构,其中一种携带*bla*_{CARB}基因[*aacA4*-*catB8*-*aadA1*-*dfrA1*-(*aac6*-II)-(*bla*_{CARB-8})]^[26]。

β-内酰胺类药物是治疗感染性疾病的主要药物,由于抗生素在临床、农业、水产养殖业的大量应用,多重耐药甚至泛耐药细菌的不断增加,给临床治疗造成极大困难。研究细菌耐药性基因的分布及其与可移动遗传元件的关系,有助于揭示细菌耐药性形成及播散的分子机制,可为合理使用抗菌药物和控制细菌耐药性发展提供依据。

参考文献(References):

- [1] Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*, 2014, 9(9): 1071-1081. [DOI]
- [2] Swathi CH, Chikala R, Ratnakar KS, Sriharan V. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). *Indian J Med Res*, 2016, 144(1): 21-31. [DOI]
- [3] Papadimitriou-Oliveris M, Marangos M, Christofidou M, Fligou F, Bartzavali C, Panteli ES, Vamvakopoulou S, Filos KS, Anastassiou ED. Risk factors for infection and predictors of mortality among patients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in the intensive care unit. *Scand J Infect Dis*, 2014, 46(9): 642-648. [DOI]
- [4] Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother*, 2014, 15(10): 1351-1370. [DOI]
- [5] Tangdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*, 2015, 277(5): 501-512. [DOI]
- [6] Robilotti E, Deresinski S. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *F1000Prime Rep*, 2014, 6: 80. [DOI]

- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. Standard: CLSI-M100-S27. [DOI]
- [8] J. 萨姆布鲁克 (Sambrook J.), D.W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南 (第三版). 黄培堂等译, 2002, 北京: 科学出版社. [DOI]
- [9] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, 2007, 23(6): 673–679. [DOI]
- [10] Posada D. Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2003, Chapter 6: Unit 6.5. [DOI]
- [11] Xu T, Ying J, Yao XD, Song YL, Ma P, Bao BK, Jiang WY, Wu XM, Tou HF, Li PZ, Ren P, Fei JX, Yang L, Liu Q, Xu ZY, Zhou TL, Ni LY, Bao QY. Identification and characterization of two novel bla(KLUC) resistance genes through large-scale resistance plasmids sequencing. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47197. [DOI]
- [12] Rice LB, Carias LL, Bonomo RA, Shlaes DM. Molecular genetics of resistance to both ceftazidime and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations in *Klebsiella pneumoniae* and *in vivo* response to beta-lactam therapy. *J Infect Dis*, 1996, 173(1): 151–158. [DOI]
- [13] Zhang YJ, Chang QL, Wang Q, Lu JW, Wang H, Li PZ, Ying J, Bao QY, Hu YL. Structure and function of class I integron in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(6): 603–610.
张跃进, 常清利, 汪倩, 卢俊婉, 王欢, 李佩珍, 应俊, 包其郁, 胡云良. 临床分离肺炎克雷伯菌 I 类整合子的结构与功能. *遗传*, 2014, 36(6): 603–610. [DOI]
- [14] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3): 565–591. [DOI]
- [15] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(6): 1211–1233. [DOI]
- [16] Chen X, Fan XJ, Lv XJ. Progress of the classification of β -lactamases and its relationship between structure and function. *J Chin Pharm Univ*, 2003, 34(4): 380–384.
陈炫, 范昕建, 吕晓菊. β -内酰胺酶的分类及构效关系研究进展. *中国药科大学学报*. 2003, 34(4): 380–384. [DOI]
- [17] Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente AC. Emergence of dhfrXVb and blaCARB-4 gene cassettes in class I integrons from clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006, 101(1): 81–84. [DOI]
- [18] Li R, Chiou J, Chan EW, Chen S. A novel PCR-based approach for accurate identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol*, 2016, 7: 44. [DOI]
- [19] Kamolovit W, Derrington P, Paterson DL, Sidjabat HE. A case of IMP-4-, OXA-421-, OXA-96-, and CARB-2-producing *Acinetobacter pittii* sequence type 119 in Australia. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2): 727–730. [DOI]
- [20] Zhang RQ, Ying GG, Su HC, Zhou LJ, Liu YS. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from traditional and integrated aquaculture in South China. *J Environ Sci Health B*, 2013, 48(11): 999–1013. [DOI]
- [21] Schultz E, Barraud O, Madec JY, Haenni M, Cloeckaert A, Ploy MC, Doublet B. Multidrug resistance salmonella genomic island 1 in a *Morganella morganii* subsp. *morganii* human clinical isolate from France. *mSphere*, 2017, 2(2): pii: e00118–17. [DOI]
- [22] Philippon AM, Paul GC, Thabaut AP, Jacoby GA. Properties of a novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-4) specified by an IncP-2 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986, 29(3): 519–520. [DOI]
- [23] Melano R, Petroni A, Garutti A, Saka HA, Mange L, Pasteran F, Rapoport M, Rossi A, Galas M. New carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(7): 2162–2168. [DOI]
- [24] Petroni A, Melano RG, Saka HA, Garutti A, Mange L, Pasteran F, Rapoport M, Miranda M, Faccone D, Rossi A, Hoffman PS, Galas MF. CARB-9, a carbenicillinase encoded in the VCR region of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 belongs to a family of cassette-encoded beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(10): 4042–4046. [DOI]
- [25] Hu LF, Chen GS, Kong QX, Gao LP, Chen X, Ye Y, Li JB. Increase in the prevalence of resistance determinants to Trimethoprim/Sulfamethoxazole in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates in China. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157693. [DOI]
- [26] Meng XF, Zhang ZF, Li KT, Wang Y, Xia XD, Wang X, Xi ML, Meng JH, Cui SH, Yang BW. Antibiotic susceptibility and molecular screening of class I integronin *Salmonella* isolates recovered from retail raw chicken carcasses in China. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(2): 230–235. [DOI]