

文章编号: 1001-8689(2121)01-0068-04

耐亚胺培南的肺炎克雷伯菌中碳青霉烯酶的表达情况

刘景双¹ 李翠平¹ 刘向群^{2,*}

(1 青岛大学附属医院, 青岛 266000; 2 徐州市第一人民医院, 徐州 221000)

摘要: **目的** 检测临床分离的耐亚胺培南肺炎克雷伯菌临床分布、耐药情况及碳青霉烯酶的表达情况, 为临床合理使用抗生素提供依据。**方法** 收集徐州3家三级医院微生物室培养出的非重复肺炎克雷伯菌, 并根据药敏结果筛选对亚胺培南耐药的菌株, 对耐药菌株采用改良Hodge实验检测碳青霉烯酶、IPM/EDTA组合纸片法检测金属酶表现型, 采用PCR实验检测耐药菌株中 bla_{KPC-2} 、 $bla_{CTX-M-15}$ 、 bla_{VIM-1} 、 bla_{IMP-4} 、 bla_{NDM-1} 和 bla_{OXA-48} 的表达情况。**结果** 共收集107株非重复肺炎克雷伯菌, 其中26株耐亚胺培南, 耐亚胺培南菌株均为多重耐药菌株, 对常见抗菌药物均为耐药; 表现型结果26株耐亚胺培南菌株有23株改良Hodge实验阳性, 阳性率为88.5%; 6株组合纸片法阳性, 阳性率为23.1%; PCR扩增具有碳青霉烯酶活性的相关基因: 26株均检测到KPC-2酶基因, 25株检测到CTX-M-15酶基因, 8株检测到IMP-4酶基因, 1株检测到NDM-1酶基因, 1株检测到VIM-1酶基因, 暂未扩增出OXA-48酶基因。**结论** 本地区肺炎克雷伯菌耐亚胺培南形势严峻, 产生 β -内酰胺酶为其主要的耐药机制, KPC-2、CTX-M-15产生率较高, 占主导地位, 已经存在产NDM-1菌株, 相关部门应注意预防其流行和传播。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 亚胺培南; 碳青霉烯酶; 耐药

中图分类号: R378.99+6 **文献标志码:** A

Expression of carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae* resistant to imipenem

Liu Jing-shuang¹, Li Cui-ping¹ and Liu Xiang-qun²

(1 The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000; 2 Xuzhou First People's Hospital, Xuzhou 221000)

Abstract Objective To detect the clinical distribution, drug resistance, and carbapenemase expression of clinically isolated imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to provide a basis for the rational use of antibiotics. **Methods** The non-repetitive *Klebsiella pneumoniae* cultured in the microbiology room of three tertiary hospitals in Xuzhou was collected, and the strains resistant to imipenem were screened based on the drug sensitivity results. The modified Hodge test was used to detect the carbapenems. The IPM/EDTA combined paper method was used to detect the metalloenzyme phenotype, and the expression of bla_{KPC-2} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} , bla_{IMP} , bla_{CTX-M} and bla_{NDM-1} in drug-resistant strains was detected by PCR experiments. **Results** A total of 107 non-repeated *Klebsiella pneumoniae* isolates were collected, of which 26 were imipenem-resistant. The imipenem-resistant strains were multi-drug resistant strains, which were resistant to common antibacterial drugs. 23 imipenem-resistant strains were positive for the modified Hodge test, with a positive rate of 88.5%; 6 strains were positive for the combined disc method, with a positive rate of 23.1%; PCR-related genes with carbapenemase activity were identified: 26 strains with the KPC-2 encoding gene was detected, the CTX-M-15 encoding gene was detected in 25 strains, the IMP-4 -encoding gene was detected in eight strains, the NDM-1 encoding gene was detected in one strain, and the VIM-1 encoding gene was detected in one strain. The OXA-48 gene was not detected. **Conclusion** The imipenem-resistant form of

收稿日期: 2020-02-19

作者简介: 刘景双, 女, 生于1990年, 硕士, 住院医师, 研究方向: 呼吸系统感染及耐药机制研究。E-mail: dzjingshuang@163.com

*通讯作者, E-mail: hxlxq68@sina.com

Klebsiella pneumoniae in this area is severe, and β -lactamase production is the main mechanism of resistance. KPC-2 and CTX-M-15 have high production rates, and they dominate. There are NDM-1 producing strains, and relevant departments should pay attention to preventing their epidemic and spread.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; Imipenem; Carbapenemase; Drug resistance

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)为一种无自主运动能力、有荚膜、兼性厌氧、乳糖发酵的革兰阴性条件致病菌,环境中可到处存在,是人类肠道菌群的一部分,可定植健康人群的皮肤,常常存在于人类的皮肤和鼻咽部^[1]。KP可引起各种感染性疾病,如肺炎、尿路感染、脑脊膜炎、败血症、菌血症、腹泻等^[2]。碳青霉烯类抗菌药物因其对革兰阴性杆菌有较为广谱的效力及较强的抗菌活性,成为 β -内酰胺类中对抗难治性感染的最后一道防线^[3]。但随着耐碳青霉烯类肠杆菌(CRE),尤其是耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的出现,其实用性受到威胁^[4]。KP产生碳青霉烯类耐药的机制主要由产碳青霉烯酶、外排泵的表达增加及外膜孔蛋白的突变介导,但是单纯的外排泵表达增加及外膜孔蛋白的突变往往不会导致多重耐药的产生,需与产酶联合才能产生耐药,因此产碳青霉烯酶成为其耐药的主要机制^[5]。

细菌耐药具有地域性,同种细菌在不同地域间的耐药特性不同,随着KP在临床中的检出率不断增加,了解本地区KP的耐药特性,从而指导临床医师正确选用敏感抗菌药物,避免抗菌药物的滥用,从而减少多重耐药菌株的出现,降低医院获得性感染患者的发病率及死亡率,改善患者预后。此项研究的目的是了解本地区KP对碳青霉烯类的耐药情况,并以此研究耐碳青霉烯类菌株中碳青霉烯酶及金属酶表达情况,从而了解本地区KP的耐药机制。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

收集2016年9月—2016年11月期间徐州地区三家三级医院微生物室培养出的KP菌株共107株,剔除同一患者同一部位的重复菌株。以大肠埃希菌ATCC25922为质控菌株,应用VITEK 2微生物自动鉴定系统进行细菌鉴定并行药敏分析,根据药敏实验结果筛选耐亚胺培南肺炎克雷伯菌(imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, IRKP)。

1.2 对耐亚胺培南菌株应用

应用改良Hodge实验检测碳青霉烯酶、IPM/EDTA组合纸片法^[6]检测金属酶,表现型标准菌株

ATCC BAA1705 为阳性对照菌株,ATCC BAA1706 为阴性对照菌株(由徐州市疾病预防控制中心馈赠)。

1.3 PCR法检测

PCR法检测碳青霉烯酶及金属酶相关基因(*bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-4}, *bla*_{NDM-1}和*bla*_{OXA-48})。

2 结果

2.1 菌株分布

收集的107株KP菌株均来自三所医院的住院患者,主要分布在ICU、神经外科、呼吸内科;根据药敏结果筛选出26株耐亚胺培南菌株,主要来源于ICU(6株)、神经外科(4株)、老年医学科(3株)、康复科(2株)、呼吸科(2株)等,标本主要来源于痰液(18株)、尿液(4株)、引流液(2株)、伤口分泌物(1株)。所有菌株科室分布及IRKP菌株科室分布见图1~2。

2.2 药敏结果

收集107株非重复肺炎克雷伯菌,对临床常用的13种抗菌药物的具体药敏结果见表1。其中对亚胺培南耐药菌株26株,且有22株为MDR菌株,IRKP与对亚胺培南敏感肺炎克雷伯菌(imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae*, ISKP)组菌株对其他抗菌药物的耐药率进行比较,经 χ^2 检验分析两组菌株对多种抗菌药物的耐药率差异有统计学意义, $P<0.05$, IRKP组菌株对其他多种抗菌药物的耐药率均明显高于ISKP组菌株,见表1~2。

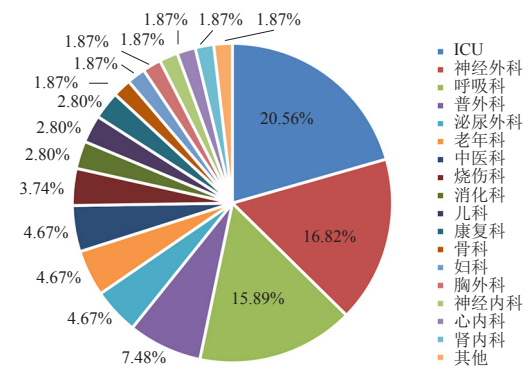


图1 107株肺炎克雷伯菌科室分布及构成比
Fig. 1 Distribution and composition ratio of 107 strains of *Klebsiella pneumoniae*

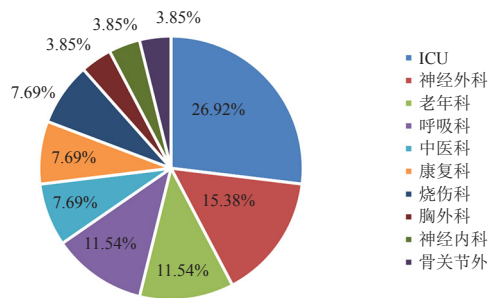


图2 26株IRKP菌株科室分布及构成比

Fig. 2 Distribution and composition ratio of 26 IRKP strains

表1 肺炎克雷伯菌分离菌株对临床常用抗菌药物的耐药率

Tab. 1 Resistance rate of the isolated strains of KP to clinical commonly used antibacterial drugs		
抗菌药物	耐药菌株数/n	耐药率/%
氨苄西林	107	100.00
阿莫西林克拉维酸钾	59	55.14
哌拉西林/三唑巴坦	36	33.64
头孢曲松	63	58.88
头孢吡肟	44	41.12
氨曲南	40	37.38
庆大霉素	51	47.66
妥布霉素	52	48.60
环丙沙星	44	41.12
左氧氟沙星	44	41.12
呋喃妥因	81	75.70
复方磺胺甲噁唑	49	45.79
亚胺培南	26	24.30

2.3 表现型结果

26株耐亚胺培南菌株有23株改良Hodge实验阳性，阳性率为88.5%；6株组合纸片法阳性，阳性率

为23.1%。

2.4 PCR法检测相关基因

PCR扩增具有碳青霉烯酶活性的相关基因26株均检测到KPC-2酶基因，25株检测到CTX-M-15酶基因，8株检测到IMP-4酶基因，1株检测到NDM-1酶基因，1株检测到VIM-1酶基因，暂未扩增出OXA-48酶基因。

3 讨论

KP是临床常见的机会性感染致病菌，尤其是在ICU、神经外科等住院时间相对较长、创伤较大、应用广谱抗菌药物较多等的住院患者，感染机率相对增加。而KP所致院内感染，尤其是多重耐药肺炎克雷伯菌所致感染，以高发病率、高死亡率为特征，而碳青霉烯类抗菌药物为治疗多重耐药菌所致感染的最后一道防线，但近几年出现的越来越多的IRKP，本研究中IRKP菌株大多为多重耐药菌株，对临床常用抗菌药物耐药率均明显高于ISKP菌株，使临床医师面对更大的选择压力，这给临床医师带来了极大的挑战。

KP对碳青霉烯类产生耐药的机制包括产碳青霉烯酶、外膜孔蛋白突变导致的外膜通透性的下降以及外排泵的表达增加导致的药物外排增加，而产碳青霉烯酶在其中发挥重要作用。本研究中有23株改良Hodge实验阳性，说明在IRKP菌株中大多数产碳青霉烯酶，5株组合纸片法阳性，说明部分菌株产金属酶，改良Hodge实验、组合纸片法在酶的检测中保持较高的敏感性，可以作为临床对产酶菌株的初筛手段。目前具有碳青霉烯酶活性的酶按照Ambler

表2 亚胺培南耐药组(ISKP)与亚胺培南敏感组肺炎克雷伯菌(IRKP)耐药率比较

Tab. 2 Comparison of drug resistance rate of IRKP group and ISKP group						
抗菌药物	ISKP(n=81)		IRKP(n=26)		χ^2 值	P
	菌株数/n	耐药率/%	菌株数/n	耐药率/%		
阿莫西林克拉维酸钾	33	40.74	26	100.00	27.942	<0.001*
哌拉西林/三唑巴坦	10	12.35	26	100.00	67.737	<0.001*
头孢曲松	37	45.68	26	100.00	23.987	<0.001*
头孢吡肟	19	23.46	25	96.15	42.962	<0.001*
氨曲南	19	23.46	21	80.77	27.619	<0.001*
庆大霉素	29	35.80	22	84.62	18.800	<0.001*
妥布霉素	33	40.74	19	73.08	8.239	0.004*
环丙沙星	24	29.63	25	96.15	35.090	<0.001*
左氧氟沙星	19	23.46	25	96.15	42.962	<0.001*
呋喃妥因	57	70.37	24	92.31	5.149	0.023*
复方磺胺甲噁唑	36	44.44	13	50.00	0.245	0.621

注：*表示差异有统计学意义(P<0.05)，R为耐药菌株数

分类法包括A类、B类和D类^[5], 其中A类中较为常见的为KPC酶和CTX-M型酶, 这类酶是病原体中最常见的 β -内酰胺酶, 人们也最早开始研究。此类酶以丝氨酸为结合位点, 初始对碳青霉烯类水解能力较弱, 尤其是对亚胺培南无水解能力, 而随着碳青霉烯类在临床的大量应用, 病原体的各种突变, 出现了酶的各种亚型, 对碳青霉烯类的水解作用也逐渐增加, 在国内的研究中, KPC酶中以KPC-2型、CTX-M型以CTX-M-15在肠杆菌科中最为常见^[7]。在本研究中PCR结果显示在26株IRKP菌株中均扩增出KPC-2, 25株扩增出CTX-M-15, 说明产A类 β -内酰胺酶在KP的耐药机制中占主导地位。B类为金属 β -内酰胺酶, 包括IMP和VIM及近几年新发现的NDM等, 此类酶以金属锌离子为活性位点, 具有较为广泛的底物范围。NDM-1为2009年发现的新型金属酶, 其可通过质粒在不同菌种间发生水平传播, 因其可对除了氨基糖苷外的所有 β -内酰胺类抗菌药物均有抗菌活性, 因此可导致感染的暴发^[8]。本项研究中8株IMP-4阳性, 说明在KP中以产IMP型金属酶为主, 但有1株扩增出NDM-1, 此菌株来源于入住ICU的患者, 考虑可能与此患者住院时间较长及应用较多抗菌药物相关。NDM-1酶基因的检出, 说明携带NDM-1酶基因的菌株已在本地区出现, 由于携带NDM-1酶基因的质粒可在同种及异种间传播, 如不加强感染预防与控制的管理, 有可能造成此类菌株的进一步扩散乃至流行, 需引起相关部门的重视。D类 β -内酰胺酶为OXA, 同样以丝氨酸为活性位点, 临床上发现的具有碳青霉烯酶活性的OXA变种越来越多, 此类酶也越来越引人注目, OXA-48对KP产生碳青霉烯类耐药发挥作用^[9]。本研究中未扩增出OXA-48酶基因, 说明本地区尚无OXA-48的流行, 但本实验仅收集了本地区三家医院分离的肺炎克雷伯菌菌株, 收集菌株较少, 需要医务工作者加强对监督, 警惕OXA-48的流行。本实验中除1株菌株外, 其余25株均同时表达KPC-2、CTX-M-15, 且这些菌株往往与金属酶的某一种表型联合, 如IMP-4、VIM和NDM-1, 本实验中尚未发现多种金属酶在同一菌株中表达的情况。耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的产生需引起临床工作者的高度重视, 因一旦耐药基因产生, 其消除需一较漫长的过程^[10], 且针对耐药菌株可用的多黏菌素、磷霉素等抗菌药物因其副作用较大, 限制其在临床应用, 因此, 应高度警惕耐药菌株的产生, 避免耐药菌株的暴发流行。

参考文献

- [1] Ferrari C, Corbella M, Gaiarsa S, *et al.* Multiple *Klebsiella pneumoniae* KPC clones contribute to an extended hospital outbreak[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2767. doi: 10.3389/fmicb.2019.02767.
- [2] Bina M, Pournajaf A, Mirkalantari S, *et al.* Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in *K. pneumoniae* isolated from the clinical samples by the phenotypic and genotypic methods[J]. *Iranian J Pathol*, 2015, 10(3): 199-205.
- [3] Chang H, Wei J, Zhou W, *et al.* Risk factors and mortality for patients with Bloodstream infections of *Klebsiella pneumoniae* during 2014-2018: Clinical impact of carbapenem resistance in a large tertiary hospital of China[J]. *J Infect Public Health*, 2019, doi: 10.1016/j.jiph.2019.11.014.
- [4] Hudson C M, Bent Z W, Meagher R J, *et al.* Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99209. doi: 10.1371/journal.pone.0099209.
- [5] Suay-García B, Pérez-Gracia M T. Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2019, 8(3), doi: 10.3390/antibiotics8030122.
- [6] Jamal W Y, Albert M J, Rotimi V O. High prevalence of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1) producers among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Kuwait[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152638. doi: 10.1371/journal.pone.0152638
- [7] Gu B, Bi R, Cao X, *et al.* Clonal dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST48 clone among multiple departments in a tertiary teaching hospital in Jiangsu Province, China[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(23): 716. doi: 10.21037/atm.2019.12.01.
- [8] Weber R E, Pietsch M, Frühauf A, *et al.* IS26-mediated transfer of bla_{NDM-1} as the main route of resistance transmission during a polyclonal, multispecies outbreak in a German hospital[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2817. doi: 10.3389/fmicb.2019.02817.
- [9] Fursova N K, Astashkin E I, Knyazeva A I, *et al.* The spread of bla_{OXA-48} and $bla_{OXA-244}$ carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2015, 14: 46. doi: 10.1186/s12941-015-0108-y.
- [10] Fuster B, Tormo N, Salvador C, *et al.* Detection of two simultaneous outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* coproducing OXA-48 and NDM-1 carbapenemases in a tertiary-care hospital in Valencia, Spain[J]. *New Microbes New Infect*, 2020, 34: 100660. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100660.