

某院2015—2019年肺炎克雷伯菌的耐药性及耐药基因分析

胡小骞 王琴*

(安徽医科大学第二附属医院, 合肥 230601)

摘要: **目的** 分析某院临床分离的肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)耐药情况及耐药基因, 指导临床规范使用抗菌药物。**方法** 收集该院2015—2019年临床分离的2416株肺炎克雷伯菌, 使用VITEK-2 Compact系统对临床分离株进行细菌鉴定, 药敏试验采用MIC法和K-B纸片扩散法, 采用WHONET 5.6软件对菌株的标本来源、科室分布、检出率及耐药率进行统计, 采用SPSS 26.0软件对5年期间菌株的检出率、耐药率进行比较及趋势分析, 选取2019年内科重症监护病房(Intensive care unit, ICU)的19株耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CR-KP), 通过二代测序平台对其进行全基因组测序(whole genome sequencing, WGS), 运用丹麦技术大学(DTU)基因组流行病学中心(CGE)(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)的ResFinder 4.0工具进行耐药基因筛查, 运用MORPHEUS(<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>)在线制作耐药基因热图。**结果** 2015—2019年临床标本共分离出2416株KP, 主要来自痰液、尿液, 分别占51.7%(1249/2416)、11.3%(273/2416), 科室主要分布于内科ICU、外科ICU, 分别占23.2%(561/2416)、19.1%(461/2416)。每年KP的分离率呈上升趋势($\chi^2_{趋势}=18.190$, $P<0.001$), 其对常用抗菌药物的耐药率呈逐年升高趋势, 除对替加环素的耐药率无法统计外, 对其他各类抗菌药物的耐药率差异均有统计学意义($P<0.001$), 对亚胺培南、美罗培南耐药率分别从2015年的2.9%、3.0%上升至2019年的16.0%、13.7%。5年间共检出354株CR-KP, 主要来自痰液、尿液, 分别占43.8%(155/354)、10.7%(38/354), 分布较高的科室为外科ICU、内科ICU, 分别占14.4%(51/354)、10.2%(36/354), 每年的检出率呈上升趋势($\chi^2_{趋势}=46.176$, $P<0.001$), 其对各类抗菌药物的耐药率呈逐年升高趋势, 除对庆大霉素的耐药率差异无统计学意义($P=0.105$)、对替加环素的耐药率差异无法统计外, 对其他各类抗菌药物的耐药率差异均有统计学意义($P<0.05$)。采用WGS技术对19株CR-KP进行分析, 共筛查出15种耐药基因, 主要包括 β -内酰胺酶耐药基因(*bla*_{KPC-2})、喹诺酮类耐药基因(*qnrS1*)、磷霉素耐药基因(*fosA*)、四环素耐药基因(*tetA*)、氯霉素耐药基因(*catA2*)以及氨基糖苷类耐药基因(*aadA2b*、*rmtB*)等。**结论** 该院KP、CR-KP的耐药情况日趋严重, CR-KP同时携带多种耐药基因, 耐药表型多样化。运用WGS结合生物信息学分析技术研究细菌耐药机制, 有助于耐药菌防控措施的精准实施, 未来将成为耐药菌研究的主流技术之一。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 抗菌药物; 全基因组测序; 耐药基因

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Analysis of antibiotics resistance and resistance genes of *Klebsiella pneumoniae* in a hospital from 2015 to 2019

Hu Xiao-qian and Wang Qin

(The Second Hospital of Anhui Medical University, Anhui 230601)

Abstract Objective To analyze the antibiotic resistance and drug resistance genes of *Klebsiella pneumoniae* (KP) isolated from clinical departments in the second hospital of Anhui Medical University, so as to guide the rational

收稿日期: 2021-09-01

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目资助(No. KJ2019A0253)

作者简介: 胡小骞, 女, 生于1990年, 在读硕士研究生, 主管技师, 研究方向为医院感染管理、多重耐药菌防控, E-mail: m15256987262@163.com

*通讯作者, E-mail: qinwang1025@163.com

use of antibacterial drugs in clinical departments. **Methods** 2,416 strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical in the hospital from 2015 to 2019 were collected, and the VITEK-2 compact automated microorganism system was used for bacterial identification. The MIC and K-B methods were used for drug susceptibility testing. The WHONET 5.6 software was used to perform statistical analysis on the source of strains, the distribution of departments, the detection rate, and the drug resistance rate. The SPSS 26.0 software was used to compare the detection rate and drug resistance rate of strains during the five-year period and analyze the trend. The 19 strains of carbapenem-type *Klebsiella pneumoniae* (CR-KP) in the internal medicine Intensive Care Unit (ICU) in 2019 were selected to perform whole genome sequencing (WGS) on the next-generation sequencing platform. The ResFinder 4.0 of the Danish Technical University (DTU) Center for Genomic Epidemiology (CGE) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) was used to select resistance genes, and the MORPHEUS (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) was used to make a heat map of resistance genes online. **Results** A total of 2,416 KP strains were isolated from clinical specimens from 2015 to 2019, mainly from sputum and urine, accounting for 51.7% (1,249/2,416) and 11.3% (273/2,416) respectively. The departments were mainly distributed in internal medicine ICU and surgical ICU, and respectively accounted for 23.2% (561/2,416) and 19.1% (461/2,416). The annual separation rate of KP strains was increasing (χ^2 trend=18.190, $P<0.001$), and the resistance rate to commonly used antibiotics was increasing year by year. Except that the resistance rate to tigecycline cannot be counted, other differences in the resistance rates of various antibiotics were statistically significant ($P<0.001$). The resistance rates to imipenem and meropenem increased from 2.9% and 3.0% in 2015 to 16.0% and 13.7% in 2019 respectively. A total of 354 CR-KP strains were detected in five years, mainly from sputum and urine, which accounted for 43.8% (155/354) and 10.7% (38/354) respectively. The departments with higher distribution were surgical ICU and internal medicine ICU, and respectively accounted for 14.4% (51/354) and 10.2% (36/354). The annual detection rate was increasing (χ^2 trend=46.176, $P<0.001$), and the resistance rate to various drugs was increasing year by year. Except for the difference in the resistance rate to gentamicin which was not statistically significant ($P=0.105$), and the difference in the resistance rate to tigecycline cannot be counted, other differences in the resistance rates of various antibiotics were statistically significant ($P<0.001$). WGS technology was used to analyze 19 CR-KP strains. A total of 15 kinds of resistance genes were detected, including β -lactamase resistance gene (bla_{KPC-2}), quinolone resistance gene ($qnrS1$), fosfomycin resistance gene ($fosA$), tetracycline resistance gene ($tetA$), chloramphenicol resistance gene ($catA2$), and aminoglycoside resistance gene ($aadA2b$ and $rmtB$). **Conclusion** The drug resistance of KP and CR-KP strains in this hospital was becoming more and more serious. CR-KP strains carried multiple drug resistance genes, and their drug resistance phenotype were diverse. The use of WGS combined with bioinformatics analysis technology to research the mechanism of bacterial resistance will help the precise implementation of prevention and control measures for resistant bacteria, and will become one of the mainstream technologies for the research of resistant bacteria in the future.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; Antibiotics; Whole-genome sequencing; Drug resistance gene

肺炎克雷伯菌(KP)最初于1882年由Friedlander^[1]发现,其广泛存在于自然界中,包括土壤、水质及动物体内。KP是人体内的常见病原菌,当机体免疫力低下或定植部位发生变化时,可引起呼吸道、泌尿道、血液感染,甚至是败血症^[2]。近年来,由于第三代头孢菌素及碳青霉烯类抗生素的不合理使用,产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)及耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌逐年增加^[3-4]。CR-KP的泛耐药性、强致病性、高传染性,增大了临床抗感染治疗及耐药菌防控的难度^[5-6]。本研究通过分析安徽医科大学第二附属医院2015—2019年2416株KP的临床分布及对常用抗菌药物的耐药情况,研究5年来KP耐药性的变迁,分析CR-KP的耐药基因型,为临床抗感染治疗及合理

用药提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

回顾性分析安徽医科大学第二附属医院2015年1月—2019年12月临床分离的肺炎克雷伯菌,剔除同一患者的重复菌株,共计2416株。选取2019年内科重症监护病区(ICU)的19株CR-KP进行全基因组测序。

1.1.2 试剂与仪器

采用法国VITEK-2 Compat全自动细菌分析系统和配套试剂GN/GN13,进行革兰阴性菌的鉴定及药敏试验,药敏试验采用微量稀释法(MIC法)和K-B纸

片扩散法,药敏纸片及M-H培养基购自Oxoid公司,质控菌株肺炎克雷伯菌ATCC700603购自国家卫健委临床检验中心,使用天根生化科技有限公司的试剂盒进行细菌基因组DNA的提取,DNA Marker D、4S Red plus核酸染色剂、上样缓冲液均购于上海生工生物工程股份有限公司,DNA产物浓度及纯度测定使用英国Biochrom公司的超微量分光光度计,运用上海一恒科学仪器有限公司恒温培养摇床进行细菌液体培养,使用美国Bio-Rad公司的电泳仪进行琼脂糖凝胶电泳,采用美国Bio-Rad凝胶成像系统进行琼脂糖凝胶的成像。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养、鉴定及药敏实验

依据《临床微生物样本采集规范》采集标本,参照《全国临床检验操作规程(第4版)》,在血琼脂平皿、麦康凯琼脂平皿上按照四区划线原则进行接种,于CO₂恒温培养箱(36℃±1℃)培养24~48 h,采用法国VITEK-2 Compat全自动细菌分析系统进行革兰阴性菌的鉴定及药敏试验。参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)当年标准判定细菌的药敏结果,使用微量稀释法(MIC法)和K-B纸片扩散法对CR-KP菌株进行表型确认,CR-KP药敏结果判定标准为对任一种碳青霉烯类药物(亚胺培南、美罗培南、多尼培南或厄他培南)耐药的肺炎克雷伯菌。

1.2.2 细菌基因组DNA提取

复苏CR-KP菌株于LB固体培养基上,37℃培养24 h后,挑取单克隆CR-KP菌株于LB液体培养基中,37℃、220 r/min摇菌过夜。取细菌培养液1 mL,10000 r/min离心1 min,吸净上清液,保留菌体沉淀,使用DNA提取试剂盒提取菌株DNA。

1.2.3 基因组DNA提取物质量控制标准

将DNA提取产物进行琼脂糖凝胶电泳,并用超微量分光光度计检测纯度和浓度。纯度要求菌株DNA产物的A₂₆₀:A₂₈₀在1.8~2.0范围之内,避免RNA污染;DNA浓度≥20 ng/μL,条带清晰无杂带,总量在1.0~2.0 μg范围内。

1.2.4 细菌全基因组测序

运用上海生工生物有限公司Illumina Hiseq2500测序平台对菌株进行全基因组测序,基于Illumina平台的测序,是对核酸提取样本进行建库、扩增测序、质控的3个主要步骤。

1.2.5 测序结果组装

在Linux或Centos系统中运行SPAdes-2.0软件将

测序原始FASTQ结果拼接为FASTA文件,运行命令参考SPAdes-2.0软件网址<https://github.com/ablab/spades>。

1.2.6 耐药基因检测

运用丹麦技术大学(DTU)基因组流行病学中心(CGE)网站(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)的ResFinder 4.0工具,对19株CR-KP的contigs进行耐药基因型筛选,获得其携带的耐药基因。运用MORPHEUS网站(<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>)在线制作19株CR-KP的耐药基因热图,实现耐药基因分布可视化。

1.2.7 统计学分析

采用WHONET5.6软件对菌株的标本来源、科室分布、检出率及耐药率进行数据收集,运用SPSS 20.0软件对5年期间菌株的检出率、耐药率进行比较及趋势统计分析。计数资料以百分比表示,率的比较采用χ²检验或Fisher确切概率法,趋势性分析采用趋势χ²检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌分布

2015—2019年期间,肺炎克雷伯菌的分离率分别为8.61%(378/4392)、9.84%(448/4555)、8.66%(381/4401)、10.51%(622/5916)、11.09%(587/5294),5年分离率之间的差异有统计学意义(χ²=26.800,P<0.001),呈上升趋势(χ²_{趋势}=18.190,P<0.001),见表1。2015—2019年肺炎克雷伯菌构成比较高的科室为内科ICU23.2%(561/2416)、外科ICU 19.1%(461/2416)、呼吸内科18.8%(454/2416)、神经内科10.9%(263/2416)。2015—2019年肺炎克雷伯菌构成比较高的标本为痰液51.7%(1249/2416)、尿液11.3%(273/2416)、血液7.5%(181/2416)、分泌物5.8%(140/2416)。

2.2 肺炎克雷伯菌抗菌活性

2015—2019年期间,肺炎克雷伯菌对18种抗菌

表1 2015—2019年肺炎克雷伯菌在全部临床分离株中的分离情况

Tab. 1 Isolation of *Klebsiella pneumoniae* in all clinical isolates from 2015 to 2019

年份/年	肺炎克雷伯菌数目/株	临床分离株总数目/株	分离率/%
2015	378	4392	8.61
2016	448	4555	9.84
2017	381	4401	8.66
2018	622	5916	10.51
2019	587	5294	11.09

药物的耐药率呈上升趋势，除替加环素的耐药率差异无法统计外，对其他各类抗菌药物的耐药率差异均有统计学意义($P<0.001$)。对亚胺培南、美罗培南耐药率分别从2015年的2.9%和3.0%上升至2019年的16.0%和13.7%，头孢他啶和头孢吡肟耐药率分别从12.7%和10.1%上升至24.2%和21.1%，头孢哌酮/舒巴

坦、哌拉西林/他唑巴坦耐药率分别从2015年的3.2%和4.2%上升至2019年的16.8%和16.5%，环丙沙星、左氧氟沙星耐药率分别从18.3%和14.8%上升至29.1%和26.6%，阿米卡星和庆大霉素耐药率分别从4.2%和18.5%上升至12.8%和28.3%。本院自2017年开始对替加环素的MIC值进行监测，2017—2019年肺炎克雷伯

表2 2015—2019年各年份肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的抗菌活性比较

Tab. 2 Comparison of the antibacterial activity of *Klebsiella pneumoniae* against commonly used antibiotics in various years from 2015 to 2019

药物名称	2015(<i>n</i> =378)		2016(<i>n</i> =448)		2017(<i>n</i> =381)		2018(<i>n</i> =622)		2019(<i>n</i> =587)		χ^2 值	<i>P</i> 值
	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%		
头孢唑林	31	69	41.5	58.5	30.1	69.9	42.6	57.4	34.2	65.8	27.699	<0.001
头孢曲松	26.5	45	35.7	63.4	24.6	0.4	40.4	59.6	38.3	61.3	1342.917	<0.001
头孢他啶	12.7	85.9	23.9	75	14.2	83.6	25.2	72.8	24.2	73.6	41.927	<0.001
头孢替坦	2.9	96.6	8	88.8	6.4	93.6	14.4	84.5	15.3	84	64.025(F)	<0.001
头孢吡肟	10.1	58.4	13.4	83.3	19.2	80	20.5	76.5	21.1	76.5	427.000	<0.001
头孢哌酮/舒巴坦	3.2	90.4	13.9	80.5	4.4	94.3	13.4	76.9	16.8	74.9	102.367	<0.001
哌拉西林/他唑巴坦	4.2	92.9	10.7	87.7	5.4	91.8	16.7	81.5	16.5	81.3	65.010	<0.001
氨曲南	18.5	52.6	20.8	78.3	18.8	1.1	30.4	69	29.3	70	1440.366	<0.001
亚胺培南	2.9	91.8	9.8	87.5	2.2	97.2	16.1	82	16	81.6	108.912	<0.001
美罗培南	3	94.1	11.2	87.4	1.8	98	13.4	85.3	13.7	85.8	82.816(F)	<0.001
阿米卡星	4.2	95.8	6	93.5	2.6	97.2	13	86.7	12.8	86.4	62.178(F)	<0.001
庆大霉素	18.5	81.5	20.3	78.8	15.7	84.1	27.2	72	28.3	70.7	33.105(F)	<0.001
妥布霉素	11.1	79.1	14.5	74.3	13.4	81.9	18.8	70.3	20.8	67	42.732	<0.001
环丙沙星	18.3	79.1	18.8	78.8	14.2	81	31.4	66.2	29.1	68.3	65.110	<0.001
左氧氟沙星	14.8	83.3	17.2	81.7	9.5	86.6	27.5	69.6	26.6	72.1	81.482	<0.001
复方磺胺甲恶唑	25.1	74.9	31.8	68.2	21.8	78.2	34.1	65.9	27	73	22.987	<0.001
替加环素	-	-	-	-	0	100	0	100	0	100	-	-

R、S分别为耐药率、敏感率；耐药率和敏感率合计不足100%的值为中介值；“-”表示未开展监测；F为Fisher确切概率法

菌对替加环素的耐药率均为0，见表2。

2.3 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌分布

2015—2019年各年度检出CR-KP占肺炎克雷伯菌比例分别为3.70%(14/378)、10.04%(45/448)、18.90%(72/381)、19.29%(120/622)、17.55%(103/587)，5年检出率之间的差异有统计学意义($\chi^2=63.973$ ， $P<0.001$)，呈上升趋势($\chi^2_{趋势}=46.176$ ， $P<0.001$)，见表3。2015—2019年CR-KP构成比较高的科室为外科ICU 14.4%(51/354)、内科ICU 10.2%(36/354)、呼吸ICU 8.5%(30/354)、急诊ICU 2.0%(7/354)。2015—2019年CR-KP构成比较高的标本为痰液 43.8%(155/354)、尿液10.7%(38/354)、分泌物 7.1%(25/354)、血液6.5%(23/354)。

2.4 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌抗菌活性

2015—2019年CR-KP对各类抗菌药物呈现出不同

表3 2015—2019年耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的检出情况

Tab. 3 Detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from 2015 to 2019

年份	CR-KP数目/株	肺炎克雷伯菌数目/株	检出率/%
2015	14	378	3.70
2016	45	448	10.04
2017	72	381	18.90
2018	120	622	19.29
2019	103	587	17.55

程度的耐药，总体呈现上升趋势。除对庆大霉素的耐药率差异无统计学意义($P=0.105$)、替加环素的耐药率差异无法统计外，对其他各类抗菌药物的耐药率差异均有统计学意义($P<0.05$)。其中对亚胺培南、美罗培南的耐药率分别从2015年的92.9%和77.8%上升至2019年的100.0%和98.8%，对头孢菌素的耐药率呈上升趋势，对头孢他啶和头孢曲松的耐药率分别从2015年的64.3%和78.6%上升至2019年的98.1%

和99.0%，对环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别从50.0%和42.9%上升至91.3%和91.3%，对阿米卡星和庆大霉素的耐药率分别从42.9%和71.4%上升至68.0%和83.5%。对替加环素的耐药率均为0(表4)。

表4 2015—2019年各年份耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的抗菌活性比较
Tab. 4 Comparison of antibacterial activities of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* against commonly used antibiotics in various years from 2015 to 2019

药物名称	2015(n=14)		2016(n=45)		2017(n=72)		2018(n=120)		2019(n=103)		χ^2 值	P值
	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%	R/%	S/%		
头孢唑林	78.6	21.4	100	0	88.6	4.3	97.1	2.9	98.8	1.2	18.304(F)	<0.001
头孢曲松	78.6	7.1	97.8	0	90.1	3	94.1	5.9	99	1	13.147(F)	0.006
头孢他啶	64.3	35.7	97.8	2.2	92.2	2.4	94.1	5.9	98.1	1	17.155(F)	<0.001
头孢替坦	66.7	33.3	64.4	15.6	82.4	11.7	84.8	9.1	93.2	4.9	21.858(F)	<0.001
头孢吡肟	71.4	21.4	84.4	8.9	89.3	10.7	94.1	5.9	95.1	3.9	11.804(F)	0.013
头孢哌酮/舒巴坦	57.1	35.7	90.9	4.5	95.8	2.4	73.5	5.9	91	2	30.161(F)	<0.001
哌拉西林/他唑巴坦	64.3	21.4	88.9	4.4	91.3	3.8	94.1	5.9	94.2	2.9	11.650(F)	0.014
氨曲南	92.9	0	40	57.8	91.6	6	94.1	5.9	95.1	4.9	69.500(F)	<0.001
亚胺培南	92.9	7.1	100	0	100	0	100	0	100	0	8.322(F)	0.01
美罗培南	77.8	22.2	97.7	2.3	95.2	4.8	91.7	8.3	98.8	1.2	12.683(F)	0.007
阿米卡星	42.9	57.1	20	77.8	50.4	49.6	61.8	38.2	68	28.2	33.616(F)	<0.001
庆大霉素	71.4	28.6	68.9	28.9	76.1	21.9	85.3	11.8	83.5	14.6	7.483(F)	0.105
妥布霉素	64.3	28.6	64.4	24.4	70	18.6	73.5	11.8	85.4	8.7	11.439(F)	0.02
环丙沙星	50	42.9	64.4	33.3	83.8	13.7	91.2	8.8	91.3	5.8	28.731(F)	<0.001
左氧氟沙星	42.9	50	66.7	33.3	79.3	20.7	91.2	8.8	91.3	8.7	31.368(F)	<0.001
复方磺胺甲恶唑	57.1	42.9	73.3	26.7	75.9	24.1	82.4	17.6	58.3	41.7	18.286(F)	<0.001
替加环素	-	-	-	-	0	100	0	100	0	100	-	-

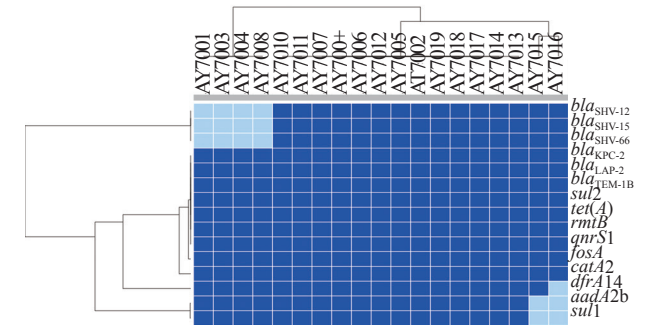
R、S分别为耐药率、敏感率；耐药率和敏感率合计不足100%的值为中介值；“-”表示未开展监测；F为Fisher确切概率法

2.5 ICU耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药基因检测结果

选取2019年内科ICU的19株CR-KP进行WGS检测及耐药基因分析，检测出15种耐药基因，绘制耐药基因热图，见图1。其中，携带喹诺酮类耐药基因(*qnrS1*)、磷霉素耐药基因(*fosA*)、四环素耐药基因(*tetA*)、氯霉素耐药基因(*catA2*)均有19株(100%)；氨基糖苷类耐药基因为*aadA2b*和*rmtB*，同时携带两者的菌株有17株(89.5%)；磺胺类药物耐药基因为*sulI*和*sul2*，同时携带两者的菌株有17株(89.5%)；携带甲氧苄啶耐药基因(*dhfrA14*)有18株(94.7%)；β-内酰胺酶耐药基因为*bla_{LAP-2}*、*bla_{TEM-1B}*、*bla_{KPC-2}*、*bla_{SHV-12}*、*bla_{SHV-15}*和*bla_{SHV-66}*，同时携带此6种耐药基因的菌株有15株(78.9%)。

3 讨论

KP是院内感染的常见致病菌之一，易造成创面、肺部、泌尿系统和血液系统感染^[7]。本研究期间，本院KP的分离率呈逐年上升趋势($\chi^2_{趋势}=18.190$, $P<0.001$)，差异有统计学意义($\chi^2=26.800$, $P<0.001$)。2416株KP有51.7%分离自痰液，表明KP主要感染部位为呼吸道，与其他监测报道一致^[8-10]。



横坐标AY7001~AY7019表示19株CR-KP的编号，纵坐标表示15种耐药基因名称；色阶表示横坐标对应的菌株不携带相应纵坐标指示的耐药基因，色阶表示横坐标对应的菌株携带相应纵坐标指示的耐药基因

图1 19株ICU的CR-KP耐药基因热图
Fig. 1 Heat map of resistance genes of 19 CR-KP strains in ICU

KP主要分布于ICU、呼吸内科，可能由于住院患者病情危重且抵抗力低下，接受呼吸道侵入性治疗多，抗菌药物的使用较为频繁^[11]，易诱导引起细菌耐药。

本研究中，由于近几年临床广泛使用抗生素，KP的耐药率总体呈升高趋势。耐药率较高的抗生素有头孢唑林、头孢他啶、头孢曲松、氨曲南、庆大

霉素、环丙沙星、复方磺胺甲恶唑,结果显示KP对头孢菌素的耐药率呈逐年攀升趋势。对碳青霉烯类药物(如亚胺培南、美罗培南)的耐药率相比较低,但有持续增高的趋势^[12],对亚胺培南、美罗培南耐药率分别从2015年的2.9%、3.0%上升至2019年的16.0%、13.7%,2019年CHINET中国细菌耐药监测结果报道,36所三级医院的KP对亚胺培南、美罗培南的耐药率分别从2005年的3.0%、2.9%增至2019年的25.3%、26.8%^[13],耐药率高于本研究结果。提示临床应强化碳青霉烯类药物的管理,防止药物对多重耐药菌及泛耐药菌的选择。本研究中KP对常用抗生素的耐药率偏高,未发现替加环素耐药的KP,其原因与KPC能够水解青霉素类、 β -内酰胺酶抑制剂、碳青霉烯类等抗菌药物有关^[8]。

近年来,CR-KP呈现全球蔓延趋势,引起了国内外的广泛关注^[14]。本研究显示2015—2019年本院的CR-KP的检出率呈上升趋势($\chi^2_{趋势}=46.176$, $P<0.001$),差异有统计学意义($\chi^2=63.973$, $P<0.001$)。标本主要来源于痰液(43.8%),表明CR-KP的感染部位以呼吸系统居多,与Li等^[15]的报道一致。分布科室主要集中于ICU,考虑与ICU患者常接受侵入性操作(如气管插管、呼吸机辅助通气)、气道黏膜屏障易受损等因素相关,提示临床和感控部门应加强重点部位三管的感染防控管理,以降低呼吸道CR-KP的感染率。

碳青霉烯类抗菌药物是耐药肠杆菌科细菌治疗的最后一道防线^[16],CR-KP的检出率和耐药率逐年增高,给临床抗感染治疗带来了巨大挑战。引起这种结果的主要原因为临床抗菌药物滥用、患者使用抗菌药物时未遵照医嘱执行,以及抗生素在农牧业中的超量使用等^[17]。目前,我国临床针对CRE的有效用药为替加环素、多黏菌素,也可同其他种类抗生素联合使用^[18]。本研究结果显示,2015—2019年CR-KP对各类抗菌药物的耐药率总体呈升高趋势,除庆大霉素、替加环素以外,其对各类药物不同年份间的耐药率差异均有统计学意义($P<0.05$)。CR-KP除了对替加环素的耐药率较低以外,对绝大部分抗菌药物的耐药率均偏高,对亚胺培南和美罗培南的耐药率高达100%和98.8%。提示临床应重视抗菌药物使用的科学化管理,改善抗菌药物应用策略,重点关注替加环素、碳青霉烯类等抗菌药物使用的监督管理。

CR-KP耐药机制较为复杂,主要有产碳青霉烯酶、高产AmpC酶、外膜孔蛋白的缺失或低通透性、外排泵的过表达、药物作用位点的改变等分子生物学机制导致^[19]。其中,产碳青霉烯酶最为重要。A、B、D类 β -内酰胺酶为产碳青霉烯酶的主要分类,主要为KPC、VIM、IMP、NDM、OXA-48^[20]。位于质粒上的耐药基因可在不同菌株间水平或垂直传播,引起耐药菌的播散,甚至是院感暴发的发生^[21]。细菌耐药性研究主要包括耐药表型和耐药基因型研究。耐药表型常用药敏试验检测,但常局限于药物种类的不全面和少数菌株培养的严格环境;聚合酶链反应(PCR)为目前主要的基因研究方法,但仅局限于已知的基因型,分辨率较低^[22]。随着测序技术的快速发展,WGS与生物学信息学结合的方法已逐渐成为精准研究细菌耐药性的主流方法^[23]。

本研究选取CR-KP检出率较高的内科ICU,收集其2019年检出的19株CR-KP进行WGS及耐药基因检测。结果显示,19株CR-KP呈现出多种耐药基因型。其中,*bla*_{KPC-2}是引起耐碳青霉烯的重要机制,已广泛存在于19株CR-KP中,其他 β -内酰胺酶耐药基因可能导致头孢菌素耐药。本研究中的菌株均携带喹诺酮类耐药基因(*qnrS1*),Qnr蛋白是一种五肽重复蛋白家族,可以保护细菌DNA螺旋酶和拓扑异构酶IV免受喹诺酮类药物的抑制,*qnrS1*是质粒介导的7大*qnr*耐药基因家族之一,Monarrez等^[24]报道证实环丙沙星可诱导细菌质粒上*qnrS1*的表达。17株CR-KP携带的*aadA2b*和*aadA2b*是*aadA*耐药基因中最常见的一种类型^[25],*aadA*基因最初于1985年发现,有研究表明I类整合素中存在*aadA*基因,该基因编码氨基糖苷3'-9-腺苷酸转移酶,对链霉素和壮观霉素具有抗性^[26]。*rmtB*耐药基因位于质粒上,其通过水平转移和克隆传播进行传播^[27],*rmtB*通过促进16S RMTA酶编码基因的激活和转移,实现16S RMTA酶诱导细菌对氨基糖苷类的高水平耐药,影响了氨基糖苷类药物在CR-KP感染治疗中的作用^[28],本研究中的19株CR-KP均携带*rmtB*基因。本研究中的药敏试验未检测磷霉素,WGS耐药基因检测到19株CR-KP均携带磷霉素耐药基因(*fosA*),磷霉素可能对于CR-KP的治疗无效。本研究中CR-KP对替加环素均敏感,其携带的四环素耐药基因均为*tetA*,属于MFS型外排泵,此型不产生替加环素耐药。本研究未检测出多黏菌素耐药基因。同时,本研究中的耐药基因结果

显示, 19株CR-KP的同源相关性较高, 说明CR-KP在该病区存在院内传播的可能, 但由于检测菌株数目较少、代表性不强, 在预测院内传播路径方面的研究仍具有一定的局限性。

综上所述, 近年来本院KP及CR-KP耐药形势严峻, 耐药基因多样化, 医务部、医院感染管理办公室、药学部、感染性疾病科、微生物室、医学信息科等多学科抗菌药物管理组, 应持续加强耐药菌监测, 规范管理抗菌药物, 有效开展抗菌药物知识培训, 落实精准的感染预防控制措施, 预防耐药菌的流行播散。WGS结合生物信息学分析技术在细菌耐药性研究方面表现出较好的应用前景^[29], 未来将会成为耐药菌研究最主流的方法之一。

参考文献

- [1] Friedlander C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrosen Pneumonie[J]. *Archiv F Pathol Anat*, 1882, 87: 319-324.
- [2] Bengoechea J A, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2019, 43(2): 123-144.
- [3] 詹玲玲, 黄海霞, 陈约慧, 等. 2013年至2015年1830株肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药性分析[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(24): 2575-2579.
- [4] 黄汉莲, 黄婷婷, 马雯, 等. 深圳某综合医院2016-2019年肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性变迁分析[J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(7): 924-927.
- [5] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3): 318-327.
- [6] 宋晓超, 乔美珍, 赵丽娜, 等. 重症监护室与普通病房耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌感染与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(22): 3372-3377.
- [7] 肖启国, 汤美华. 肺炎克雷伯菌在某院医院内感染中的分布及耐药性分析[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(12): 1754-1757.
- [8] 程科萍, 孔庆芳, 王长嫻, 等. 2017-2018年分离肺炎克雷伯菌的临床分布与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(20): 3068-3072.
- [9] 符小芳, 蔡木发, 王柔升. 2169株肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性变化分析[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(14): 2020-2026.
- [10] 黄汉莲, 黄婷婷, 马雯, 等. 深圳某综合医院2016—2019年肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性变迁分析[J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(7): 924-927.
- [11] Hayden M K, Lin M Y, Lolans K, *et al.* Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in long-term acute-care hospitals[J]. *Clin Infect Dis*, 2015, 60(8): 1153-1161.
- [12] Becker L, Kaase M, Pfeifer Y, *et al.* Genome-based analysis of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008—2014[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018, 7: 62.
- [13] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019年CHINET三级医院细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(3): 233-243.
- [14] Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2017, 16(1): 18.
- [15] Li Y, Shen H, Zhu C, Yu Y. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections among ICU admission patients in central China: Prevalence and prediction model[J]. *Biomed Res Int*, 2019. doi: 10.1155/2019/9767313.
- [16] Brink A J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2019, 32(6): 609-616.
- [17] 徐英春, 肖永红, 卓超, 等. 中国耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的流行病学和防控策略[J]. *中国执业药师*, 2013, 10(4): 3-8.
- [18] 胡必杰. 中国碳青霉烯耐药革兰阴性杆菌(CRO)感染预防与控制技术指引[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(13): 2075-2080.
- [19] Solgi H, Badmasti F, Giske CG, *et al.* Molecular epidemiology of NDM-1- and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in an Iranian hospital: Clonal dissemination of ST11 and ST893[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(6): 1517-1524.
- [20] 王珊珊, 吴忠伟, 赵建平. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌医院感染、耐药性及治疗的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(5): 428-432.
- [21] Zhan L, Wang S, Guo Y, *et al.* Outbreak by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates with carbapenem resistance in a tertiary hospital in China[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 182.
- [22] 丁月平, 陆军, 李曦, 等. 基于全基因组测序对耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药基因分析[J]. *中华临床感染病杂志*, 2019, (2): 122-126.
- [23] Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(9): 803-813.

- [24] Monárrez R, Wang Y, Fu Y, *et al.* Genes and proteins involved in *qnrS1* induction[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(9): e00806-18.
- [25] Firoozeh F, Mahluji Z, Khorshidi A, *et al.* Molecular characterization of class 1, 2 and 3 integrons in clinical multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2019, 8: 59.
- [26] Shahcheraghi F, Rahmati Ghezelgeh F, Nobari S, *et al.* Identification and characterization of class 1 integrons among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from children under 5 years of age[J]. *Iran J Microbiol*, 2014, 6(3): 156-162.
- [27] Yu F, Wang L, Pan J, *et al.* Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Chinese teaching hospital: Coexistence of *rmtB* and *armA* genes in the same isolate[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 64(1): 57-63.
- [28] Cassu-Corsi D, Martins W M, Nicoletti A G, *et al.* Characterisation of plasmid-mediated *rmtB-1* in Enterobacteriaceae clinical isolates from São Paulo, Brazil[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2018, 113(12): e180392.
- [29] Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(9): 803-813.