

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.03.013

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对抗菌药物的耐药研究

李翔,张利芳[△]

(江苏省苏州市第九人民医院,江苏 苏州 215200)

摘要:目的 探讨耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)对抗菌药物的敏感性及耐药方式。方法 选取医院2017年1月至2020年12月收治的非重复性CRKP感染患者的耐药菌株97株,参考美国临床和实验室标准协会发布的《抗菌药物敏感试验执行标准第27版信息增刊》,采用VITEK2-Compact型全自动微生物分析仪和Kirby-Bauer法测定抗菌药物的敏感性;采用琼脂稀释法筛选菌株外排表型;采用改良Hodge试验与Carba NP试验筛选碳青霉烯酶;采用聚合酶链式反应(PCR)扩增碳青霉烯酶[KPC)、AmpC β -内酰胺酶(AmpC)类、新德里金属 β -内酰胺酶1(NDM-1)、超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)类]基因,并进行序列分析;采用肠道细菌基因组重复序列(ERIC)-PCR法进行同源性分析。结果 分离出97株CRKP,对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率均为100.00%。9株CRKP菌株有细菌外排泵机制。93株CRKP的改良Hodge试验与Carba NP试验结果均为阳性,表现为产碳青霉烯酶;3株CRKP的改良Hodge试验与Carba NP试验结果均为阴性,表现为不产碳青霉烯酶。KPC基因(blaKPC)的阳性检出率为89.69%(89/97),且均为blaKPC-2型酶;blaNDM-1的阳性检出率为71.13%(69/97)。ERIC-PCR同源性分析发现9种类型CRKP,1型为主要流行菌株(42株)。结论 CRKP的耐药机制可能与耐药基因积聚共存及主动外排泵系统异常活跃有关。

关键词:肺炎克雷伯菌;耐碳青霉烯类;碳青霉烯酶;抗菌药物;耐药;敏感性

中图分类号:R95;R978.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)03-0049-04

Antimicrobial Resistance of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae*

LI Xiang,ZHANG Lifang

(Suzhou Ninth People's Hospital,Suzhou,Jiangsu,China 215200)

Abstract: Objective To investigate antimicrobial susceptibility and the resistance mode of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP). **Methods** A total of 97 drug-resistant strains from patients with non-repetitive CRKP infection treated in the hospital from January 2017 to December 2020 were selected. Referring to the *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 27th Informational Supplement* issued by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the antimicrobial susceptibility was measured by VITEK2-Compact automatic microbiological analyzer and Kirby-Bauer method, the efflux phenotype of strains was screened by the Agar dilution method, the carbapenemase was screened by the modified Hodge test and Carba NP test. The genes of carbapenemase [*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), AmpC β -lactamases (AmpC), NewDelhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1) and extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)] were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) and they were sequenced. The homology was analyzed by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Results** A total of 97 strains of CRKP were isolated, and the resistance rates to carbapenems were 100.00%. Nine CRKP strains had the mechanism of bacterial efflux pump. The results of the modified Hodge test and Carba NP test of 93 CRKP

第一作者:李翔,男,硕士,主管中药师,研究方向为临床药学与抗感染药学,(电子信箱)165342740@qq.com。

[△]通信作者:张利芳,女,大学本科,副主任药师,研究方向为抗感染药学与临床药学,(电子信箱)4577256@qq.com。

- 2014;409-419.
- 2018;26(4):12-17.
- [46] 吴地尧,章新友,甘宇汾,等.数据挖掘算法在中药研究中的应用[J].中国药房,2018,29(19):2717-2722.
- [52] 杨焱,税丕先,陈滢,等.中药大黄在临床应用中的功效以及对其药理作用[J].基因组学与应用生物学,2017,36(3):1226-1231.
- [47] 唐仕欢,陈建新,杨洪军,等.基于复杂系统熵聚类方法的中药新药处方发现研究思路[J].世界科学技术(中医药现代化),2009,11(2):225-228.
- [53] 周瑞,项昌培,张晶晶,等.黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(19):4561-4573.
- [48] 王和鸣,黄桂成.中医骨伤科学[M].北京:中国中医药出版社,2012:271-274.
- [54] 高超,杜贵琴,许永劫,等.海马神经元原代细胞培养方法的改良[J].贵州医科大学学报,2020,45(8):894-898.
- [49] 蔡奇文,邱德华,石仰山.石氏伤科外用膏药英与拾遗[J].中国中医骨伤科杂志,2013,21(3):68-69.
- [55] 杨颖,田景振,陈智.炮制对黄芩药理作用与化学成分影响研究进展[J].中华中医药学刊,2020,38(10):230-235.
- [50] 严寅杰,张震,许金海,等.石氏伤科外用方之三色膏应用浅悟[J].中医学报,2019,34(2):310-312.
- [56] 李晓峰,王拥军,莫文,等.耕耘杏林济世春秋——施杞教授与石筱山伤科学术经验继承创新[J].上海中医药杂志,2017,51(1):1-4.
- [51] 季伟,赵咏芳,郭海玲,等.石氏针药结合治疗急性踝关节扭伤中期疗效的临床研究[J].中国中医骨伤科杂志,
- (收稿日期:2021-02-22;修回日期:2021-06-21)

strains were positive, which were carbapenemase - producing bacteria, while the results of the modified Hodge test and Carba NP test of three CRKP strains were negative, which were non - carbapenemase - producing bacteria. The positive rate of KPC gene (blaKPC) was 89.69% (89 / 97), and all were the blaKPC - 2 type enzyme. The positive rate of blaNDM - 1 was 71.13% (69 / 97). ERIC - PCR homology analysis showed that there were nine types of CRKP, and type 1 was the main epidemic strain (42 strains).

Conclusion The drug resistance mechanism of CRKP may be related to the accumulation and coexistence of drug resistance genes and the abnormal activity of active efflux pump system.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenem - resistant; carbapenemase; antibiotics; drug resistance; susceptibility

肺炎克雷伯菌(KP)是常见于人体呼吸道、消化道的革兰阴性杆菌,也是医院或社区获得性感染的常见病原体^[1-2]。碳青霉烯类抗菌药物为治疗KP的有效药物,但临床的不合理应用使耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的检出率逐年递增^[3]。本研究中探讨了CRKP的耐药方式,以提高碳青霉烯类抗菌药物的临床合理用药水平。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:VITEK2 - Compact型全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司),配有药物敏感性(简称药敏)试验卡片;抗菌药物纸片(英国Oxoid公司);ABI7500型基因扩增仪(美国ABI公司);HYDRASYS型蛋白电泳分析仪,C - 880V型CO₂孵箱,均购自美国Sebia公司;HC - 2062型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);HulaMixer™ Sample Mixe型涡旋混匀器(美国赛默飞世尔科技有限公司)。

试剂:外排泵抑制剂PAβN(美国Sigma公司,批号为0001429016);琼脂糖(批号为D31018),引物(批号为B01019),均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Mueller - Hinton琼脂(MHA)药敏试验培养基(青岛日本水生物技术有限公司,批号为071123);标志物DL 2000(批号为A1901B),Ex Taq DNA聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(批号为191148),均购自北京基尼亚生物技术有限公司;细菌蛋白抽提液(美国赛默飞世尔科技有限公司,批号为2191785);肺炎克雷伯菌ATCC BAA1706(批号为491227),大肠埃希菌ATCC 25922(批号为561229),铜绿假单胞菌ATCC 27853(批号为550106),均购自上海北诺生物科技有限公司;注射用美罗培南(日本住友商事株式会社,批号为201701023);注射用亚胺培南(默沙东<中国>有限公司,批号为S012103)。

1.2 菌株来源

选取我院2017年1月至2020年12月收治的非重复性CRKP感染患者的耐药菌株97株,分别编号为1 - 97号,均经VITEK2 - Compact型全自动微生物分析仪分析确定对碳青霉烯类抗菌药物耐药。

1.3 药敏试验与细菌测定

采用VITEK2 - Compact型全自动微生物分析仪对

细菌进行鉴定和分类,并对抗菌药物的敏感性进行初始检测,操作步骤按仪器说明书进行。部分抗菌药物无药敏试验卡片,参考美国临床和实验室标准协会(CLSI)发布的《抗菌药物敏感试验执行标准第27版信息增刊》(简称《标准》)中Kirby - Bauer(K - B)法进行补充试验,质控菌株为肺炎克雷伯菌ATCC BAA1706、大肠埃希菌ATCC 25922与铜绿假单胞菌ATCC 27853^[4]。

1.4 外排泵抑制试验

参考《标准》中琼脂稀释法测定分离菌的最低抑菌浓度(MIC),分别测定添加及未添加外排泵抑制剂PAβN(终质量浓度为20 mg / L)的美罗培南和亚胺培南的MIC,两者的测定质量浓度均为0.06 ~ 128.00 mg / L,每个质量浓度均接种10 000 cfu细菌。与未添加外排泵抑制剂PAβN相比,添加后的MIC提高4倍以上,即为细菌有外排泵机制^[5]。

1.5 碳青霉烯酶筛选试验

改良Hodge试验:参考《标准》,将0.5麦氏浊度的致泻性大肠埃希菌ATCC 25922用无菌生理盐水稀释10倍,均匀涂抹于琼脂平板上,于中间位置贴放10 μg厄他培南纸片,接种环从纸片边缘至平板外缘划线接种待检菌株,置35℃环境过夜培养。若次日厄他培南抑菌圈长出矢状生长物,则视为待检菌产碳青霉烯酶。

Carba NP试验:取0.5%酚红溶液2 mL,纯水16.6 mL,10 mmol / L硫酸锌溶液180 mL,置25 ~ 50 mL烧杯中,用10%盐酸溶液或0.1 mol / L氢氧化钠溶液调pH至7.7 ~ 7.9,作为A液;在A液中加入质量浓度为6 mg / mL的亚胺培南溶液(无菌注射用水配制),作为B液。取2支微量离心管,分别标记为a管和b管,均加入100 μL细菌蛋白抽提液与1 μL过夜培养的琼脂平板接种环待测物,涡旋振荡5 s,在a管中加入100 μL A液,在b管中加入100 μL B液,涡旋,混匀,置35℃CO₂孵箱中孵育2 h,每30 min查看并记录颜色变化^[6-7]。

1.6 PCR扩增和序列分析

采用煮沸法提取与纯化细菌基因组DNA,以此为模板,采用PCR法扩增碳青霉烯酶[肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶(KPC)、AmpC β - 内酰胺酶(AmpC)类、新德里金属β - 内酰胺酶1(NDM - 1)、超广谱β - 内酰胺酶(ESBLs)类]基因,即分别为blaKPC、blaAmpC类和

blaNDM-1、blaESBLs类。以1.2%琼脂糖凝胶电泳检测产物,经凝胶成像系统分析,由生工生物工程(上海)股份有限公司专业人员测定扩增产物的序列,并同GenBank数据库中的序列进行比对,以确认扩增的产物为靶基因片段及基因型^[8]。

1.7 肠道细菌基因组重复序列(ERIC)-PCR 同源性分析

引物序列:ERIC1为5'-ATGTAAGCTCCT-GGGGATTCAC-3',ERIC2为5'-AAGTAAGTGACT-GGGGTGAGCG-3'。扩增条件:95℃下预变性7 min,94℃下变性1 min,45℃下退火1 min,65℃下延伸4 min,30个循环;65℃下延伸16 min,1个循环;将扩增的产物放入1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,电泳条件为电压100 V,时间100 min,Tris 硼酸电泳缓冲液(20倍稀释)^[9]。

2 结果

2.1 药敏试验

共分离出97株CRKP,且对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率均为100.00%;对氨基苄类、头孢类、喹诺酮类抗菌药物的耐药率均超过85.00%;对四环素类抗菌药物的耐药率均低于25.00%。详见图1。

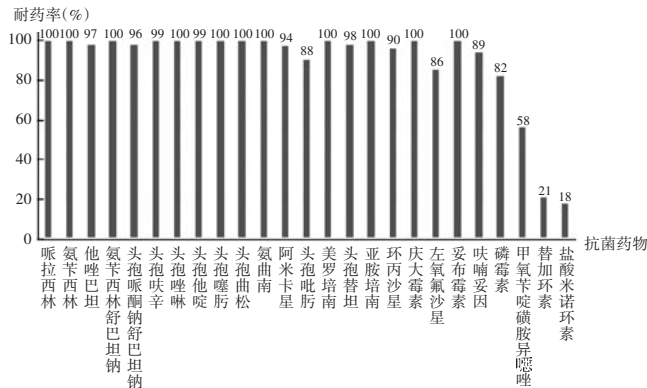


图1 97株CRKP对临床常用抗菌药物的耐药率

Fig. 1 Drug resistance rate of 97 CRKP strains to commonly used antibiotics in the clinic

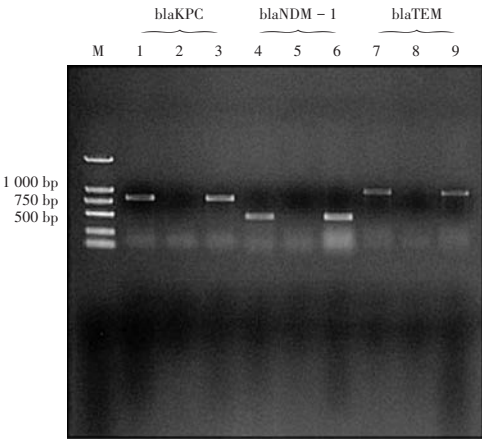
2.2 碳青霉烯酶筛选试验

93株CRKP的改良Hodge试验和CarbaNP试验结果均为阳性,阳性检出率为95.88%;4株(编号分别为24,31,68,72号)CRKP的CarbaNP试验结果为阳性,而改良的Hodge试验结果为阴性;3株(编号分别为6,13,93号)CRKP的改良Hodge试验及CarbaNP试验结果均为阴性。

2.3 耐药基因检测结果

97株CRKP中,blaKPC的检出率为89.69%(89/97),且均为blaKPC-2型酶;blaNDM-1的检出率为71.13%(69/97)。blaESBLs类耐药基因中,blaSHV,blaTEM,blaCTX-M的检出率分别为96.00%,77.00%,61.00%;blaAmpC类耐药基因中,blaDHA,blaFOX,blaCTT的检出率分别为100.00%,87.00%,61.00%;未检出blaAAC,blaEBC,blaGES,blaMOX,blaOXA-48,

blaSME,blaVEB,blaVIM。blaKPC,blaNDM-1,blaTEM在CRKP耐药基因中更具代表性^[10],其PCR扩增产物电泳图见图2。



M. Marker 1,4,7. 阳性菌株 2,5,8. 阴性对照 3,6,9. 阳性对照

图2 CRKP部分耐药基因PCR扩增产物电泳结果

M. Marker 1,4,7. Positive strains 2,5,8. Negative control 3,6,9. Positive control

Fig. 2 Electrophoretogram of PCR amplification products of partial drug resistance genes of CRKP

2.4 外排泵抑制试验

9株CRKP(编号分别为3,18,25,30,39,58,75,86,94号)有细菌外排泵机制,提示主动外排泵参与了部分KP对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制,9株菌株耐药基因的检出率均大于85%。

2.5 ERIC-PCR 基因分型

共发现9种类型的CRKP,参考文献^[11-12],判断各菌株的基因分型,其中1型42株,4型15株,5型14株,6型、8型各6株,2型、7型各4株,3型、9型各3株。部分耐药菌株的ERIC-PCR基因分型见图3。

3 讨论

碳青霉烯类抗菌药物在体内外均对革兰阴性杆菌有抑制作用,是临床治疗KP的首选药物,但随着应用的增多,KP属细菌对其耐药的比例越来越高,部分治疗多重耐药KP感染有效的药物(如亚胺培南、美罗培南等)已陆续出现耐药现象,且呈不断上升趋势^[7]。

本研究中从非重复性CRKP感染患者体内分离出97株CRKP,其在对碳青霉烯类抗菌药物耐药的同时,对氨基苄类等其他抗菌药物亦有不同程度的耐药。虽对四环素类抗菌药物耐药率较低,但该类抗菌药物毒副作用较大,长期应用可对患者的消化、泌尿、血液、中枢神经等系统造成严重损害,并非为针对CRKP感染患者的首选药物^[13]。可见,CRKP作为一种高耐药、高毒力的多重耐药菌,其有效抗菌药物的选择范围较窄。

CRKP最主要的耐药机制为产生碳青霉烯酶^[14],水

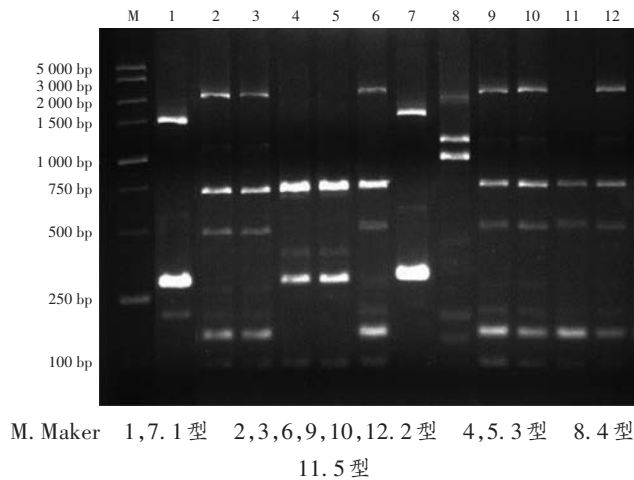


图3 CRKP部分耐药菌株ERIC-PCR基因分型电泳结果

M. Maker 1, 7. Type 1 2, 3, 6, 9, 10, 12. Type 2 4, 5. Type 3
8. Type 4 11. Type 5

Fig. 3 Electrophoretogram of genotypes of ERIC-PCR of partial drug resistance strains of CRKP

解青霉素类、头孢类、碳青霉烯类等抗菌药物。碳青霉烯酶在国内以KPC常见,也有耐亚胺培南(IPM)等。本研究中发现,CRKP感染患者存在多重耐药基因积聚共存及外排泵抑制现象,与文献[15-16]中提出的高产碳青霉烯酶(以KPC-2型酶为主),产AmpC酶伴外膜孔蛋白缺失或表达下调,主动外排泵系统异常活跃等导致革兰阴性菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的论点类似。

本研究中采用改良的Hodge试验与CarbaNP试验检测碳青霉烯酶表型,结果KPC-2型酶为CRKP产碳青霉烯酶的最主要亚型,这可能是导致CRKP对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制。KPC-2型酶具有单独致碳青霉烯类抗菌药物耐药形成,而不依赖于外膜孔蛋白缺失的作用,加之其基因位于质粒转座子上,经可转移的70 kb质粒编码,传播高效^[17]。ERIC-PCR同源性分析发现9种CRKP,其中1型为主要流行菌株,提示1型克隆株可能更易在本院流行传播,医务人员在严格规范使用抗菌药物的基础上,还应加大医院感染防控力度。

参考文献

- [1] 蒯守刚,邵海枫,王卫萍,等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(22): 3441-3444.
- [2] YU X, ZHANG W, ZHAO Z, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates with focus on antimicrobial resistance [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 822.
- [3] 孔子艳,沈俊,李心愿,等. 患儿分离的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药基因分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(20): 3124-3127.
- [4] GHEITANI L, FAZELI H, MOGHIM S, et al. Frequency Deter-

mination of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* (CRKP) Isolated from hospitals in Isfahan of Iran and Evaluation of Synergistic Effect of Colistin and Meropenem on them [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand), 2018, 64(1): 70-74.

- [5] 王健,潘亚萍,徐元宏,等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌药物敏感性和耐药基因研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(8): 1231-1235.
- [6] 何红,黄紫嫣,李军,等. 改良Hodge试验、CNPt及mCIM筛选肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶的价值[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(5): 375-379.
- [7] 姚欣,冯莉,朱良苗. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学及耐药机制[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(1): 85-90.
- [8] WIJAYA YOS, NIBA ETE, ROCHMAH MA, et al. Nested PCR Amplification Secures DNA Template Quality and Quantity in Real-time mCOP-PCR Screening for SMA [J]. Kobe J Med Sci, 2019, 65(2): E54-E58.
- [9] 李睿,辛力华,张青,等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌ERIC-PCR指纹图谱分型的研究[J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(11): 102-105.
- [10] 刘萍,张坚磊,刘晔华,等. 耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌的基因分型研究[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(9): 701-704.
- [11] M'ZALI FH, HERITAGE J, GASCOYNE-BINZI DM, et al. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum beta-lactamase and to identify different SHV genes within the same strain [J]. J Antimicrob Chemother, 1998, 41(1): 123-125.
- [12] SHARPLES GJ, LLOYD RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6503-6508.
- [13] RUDRA P, HURST-HESS K, LAPIERRE P, et al. High Levels of Intrinsic Tetracycline Resistance in *Mycobacterium abscessus* Are Conferred by a Tetracycline-Modifying Monooxygenase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(6): 1-25.
- [14] 樊慧丽,朱迎,康海全,等. 产碳青霉烯酶高毒力肺炎克雷伯菌分子特征研究及临床护理策略[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(8): 1126-1130.
- [15] ZHANEL GG, GOLDEN AR, ZELENITSKY S, et al. Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli [J]. Drugs, 2019, 79(3): 271-289.
- [16] 杨柳,张智洁,秦晓松. 肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类的耐药机制与危险因素[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(2): 163-168.
- [17] 郝敏,秦晓华. 亚胺培南联合8种抗菌药物对产KPC-2酶肺炎克雷伯菌的体外联合药敏试验[J]. 中国感染与化疗杂志, 2019, 19(4): 410-416.

(收稿日期: 2021-03-05; 修回日期: 2021-07-15)