

DOI:10.13350/j.cjpb.220517

• 临床研究 •

ICU 患者耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药及传播机制的分析

南超¹, 黄一凤¹, 马娜¹, 王金海¹, 张京辉^{2*}

(1. 南京医科大学附属常州第二人民医院急诊科, 江苏常州 213000; 2. 南京医科大学附属常州第二人民医院重症医学科)

【摘要】 目的 探讨 ICU 患者耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制, 并分析其传播特征。方法 收集 2017 年 4 月-2021 年 4 月分离自 ICU 患者的 59 株碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP), K-B 法进行药敏试验; 改良 Hodge 试验和改良碳青霉烯灭活试验(m CIM)检测碳青霉烯酶表型; EDTA 协同试验检测金属 β -内酰胺酶; qPCR 法检测碳青霉烯酶、超广谱 β 内酰胺酶(ESBL)、Amp C 酶基因; 接合试验初步探讨其传播机制。结果 59 株 CRKP 对米诺环素、复方新诺明、阿米卡星、庆大霉素的耐药率较低(均 $<32.20\%$), 对其他抗生素具有较高的耐药率。改良 Hodge 试验和 mCIM 试验结果均表明, 有 58 株(98.31%)CRKP 产碳青霉烯酶。EDTA 协同试验检出 5 株(8.47%)CRKP 产金属酶。qPCR 检测结果显示, 碳青霉烯酶基因检出 58 株(98.31%), ESBL 基因检出 59 株(100%), Amp C 酶基因检出 5 株(8.47%)。58 株 CRKP 发生接合转移的有 32 株, 转移发生率为 55.17%, KPC-2 亚型为主。结论 本院 CRKP 呈多重耐药性, 其耐药机制以产 KPC-2 酶为主, 且易通过质粒在菌株间相互传递。

【关键词】 ICU; 碳青霉烯酶基因; 肺炎克雷伯菌; 耐药机制; 传播机制; 多重耐药

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)05-0578-07

[Journal of Pathogen Biology. 2022 May;17(5):578-581.]

Antibiotic resistance and transmission mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in ICU patient

NAN Chao¹, HUANG Yi-feng¹, MA Na¹, WANG Jin-hai¹, ZHANG Jing-hui² (1. Department of Emergency, Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, China; 2. Department of Critical Care Medicine, Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University) *

【Abstract】 **Objective** To analysis of antibiotic resistance and transmission mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit (ICU) in our hospital. **Methods** Collect 59 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) strains isolated from ICU patients from April 2017 to April 2021. Drug susceptibility was detected by K-B method; Modified Hodge test and modified carbapenem inactivation (m CIM) test were carried out to detect carbapenemase phenotype. Imipenem-EDTA disk method was used to detect whether the strain produced metallo- β -lactamase. PCR method was used to detect the genes encoding carbapenemases, ESBLs, Amp C enzyme genes. The joint experiment explores the propagation mechanism. **Results** All 59 CRKP strains had low resistance rates to minocycline, compound trimethoprim, amikacin, and gentamicin (all $<32.20\%$), and high resistance rates to other antibiotics. Among them, the resistance rate of piperacillin, aztreonam, and cephalosporin antibiotics was 100%. Both the modified Hodge test and the mCIM test showed that 58 strains (98.31%) of CRKP produced carbapenemase. Imipenem-EDTA disk method results showed that 5 strains (8.47%) of CRKP produced metalloenzymes. The qPCR test results showed that 58 strains (98.31%) of carbapenemase gene were detected, 5 strains (8.47%) of the metal β -lactamase gene were detected. In addition, 59 strains (100%) of ESBL gene were detected, and 5 strains (8.47%) of Amp C enzyme gene were detected. There were 32 of 58 CRKP strains undergoing conjugative metastasis, with a metastasis rate of 55.17%. Among them, one strain obtained the NDM-1 enzyme gene, and 31 strains obtained the KPC-2 enzyme gene. **Conclusion** CRKP in our hospital is multi-drug resistant, and its resistance mechanism is mainly KPC-2 enzyme production, and it is easily transmitted between strains through plasmids.

【Key words】 ICU; carbapenemase gene; *Klebsiella pneumoniae*; resistance mechanism; transmission mechanism; multi-drug resistant

* **【通讯作者】** 张京辉, E-mail: jinghuizhang@163.com

【作者简介】 南超(1987-), 女, 山东日照人, 硕士, 主治医师, 主要从事急诊医学与危重症感染等方面的研究。
E-mail: zhangjinghui11130@163.com

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是临床上检出率较高的条件致病菌之一,常导致尿路、血流、肺部、伤口、腹膜以及脑膜的感染,流行于重症监护室(ICU)、新生儿科和泌尿科等^[1]。目前,随着广谱抗菌素,尤其是 β -内酰胺类及氨基糖苷类的广泛使用,导致碳青霉烯类抗生素耐药的肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的检测率日益增加。研究表明,CRKP产生耐药的主要原因是产碳青霉烯酶^[2]。该酶不仅能水解碳青霉烯类药物,而且对头孢菌素类、青霉素类、喹诺酮类、氨基糖苷类和单环 β -内酰胺类等抗生素也存在交叉耐药,给临床抗感染治疗带来了极大的挑战。因此,加强ICU CRKP菌株监测并深入探讨其耐药机制尤为重要。为此,本研究调查了本院ICU 2017年4月-2021年4月临床分离的CRKP耐药及传播机制,为指导院内感染预防控制及临床治疗提供理论依据。

材料与方 法

1 菌株来源及鉴定

收集2017年4月-2021年4月分离自本院ICU患者的59株CRKP,全部菌株均经法国Bio Merieux公司VITEK-2全自动微生物分析仪和药敏试验的鉴定(对亚胺培南、美罗培南以及厄他培南3种抗生素中的任何1种表现耐药均为碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌)。质控菌株肺炎克雷伯菌ATCC 700603购自国家卫健委临床检验中心。

2 CRKP菌株药物敏感性试验

选择17种头孢吡肟、阿米卡星、环丙沙星、妥布霉素、庆大霉素、哌拉西林/他唑巴坦、头孢呋辛、氨曲南、头孢他啶、哌拉西林、左氧氟沙星、头孢噻肟、头孢哌酮/舒巴坦、复方新诺明、米诺环素、呋喃妥因、多粘菌素B常用抗生素进行药敏试验;按照纸片扩散(Kindly-Bauer, KB)法进行试验,并按照美国临床实验室标准化委员会NCCLS标准进行结果判读。质控菌株为大肠埃希菌敏感株(ATCC25922),购自国家卫健委临床检验中心。药敏纸片及药敏培养基(mueller-hinton, M-H)均为英国Oxoid公司产品。

3 CRKP碳青霉烯酶耐药表型筛查试验

3.1 改良Hodge试验 将0.5麦氏浊度新鲜培养的大肠埃希菌ATCC 25922菌悬液涂布M-H平板,平板中央贴10 μ g/片美罗培南纸片。将测试菌用接种环以美罗培南纸片为中心向平板边缘划一接种线。35 $^{\circ}$ C培养18~24h后观察结果。凡能使美罗培南纸片对大肠埃希菌产生的抑菌环变形者即为阳性,提示待测菌株产生碳青霉烯酶。质控菌株为大肠埃希菌敏感株ATCC25922。

3.2 改良m CIM试验 将待测菌株涂布在M-H平板上,过夜培养后取1 μ l满环菌落接种到含有2 ml TSB肉汤的EP管中,在旋涡器上震荡混匀10-15 s,向EP管放入1张10 μ g/片美罗培南纸片,置于35 $^{\circ}$ C培养箱孵育4 h。孵育时,配0.5麦氏浊度新鲜培养的大肠埃希菌ATCC 25922菌悬液并涂布M-H平板。用无菌镊子从EP管中取出美罗培南纸片,去多余液体,再将其贴于含有大肠埃希菌ATCC 25922菌悬液的M-H平板上。35 $^{\circ}$ C培养18~24 h后测量抑菌圈直径,美罗培南纸片抑菌圈直径为6~15 mm或16~18 mm(但抑菌圈内有散在菌落)即为阳性,提示待测菌株产生碳青霉烯酶。

3.3 EDTA协同试验检测金属酶 将0.5麦氏浊度新鲜培养的大肠埃希菌ATCC 25922菌悬液涂布M-H平板,将亚胺培南/亚胺培南-EDTA(IP/IPI E-test)纸条贴于平板中央。35 $^{\circ}$ C培养18~24h后读取抑菌圈与纸条边缘交界处的数值。若IP侧数值/IPI侧数值 ≥ 8 ,即为阳性,提示待测菌株产金属酶。

4 qPCR法检测CRKP耐药基因的表达

采用细菌基因组DNA快速抽提试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)提取CRKP的DNA作为qPCR反应的模板,-20 $^{\circ}$ C冻存待用。用ABI 7500实时荧光定量PCR仪进行扩增,采用SGExcelUltraSYBR Master试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司)配置体系。反应体系:2 \times SGExcelUltraSYBR Mixture 25 μ l、Forward Primer 10 μ mol/L 1 μ l、Reverse Primer 10 μ mol/L 1 μ l、Template DNA 2 μ l,用ddH₂O补足反应体积为50 μ l。反应程序:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,58 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 25 s,共40个循环。qPCR引物见表1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。按照仪器说明进行溶解曲线分析。

5 质粒接合转移试验测定耐药基因水平转移

将供体菌株CRKP和受体菌株叠氮钠耐药J53分别涂布于LB平板上37 $^{\circ}$ C过夜培养,各挑取1个单菌落接种于2 ml的LB肉汤中,37 $^{\circ}$ C培养2 h。各取500 μ l涂布于100 μ g/ml叠氮钠和4 μ g/ml的亚胺培南的LB平板上,观察有无细菌生长。挑取单个菌落在100 μ g/ml叠氮钠4 μ g/ml的亚胺培南的LB平板上进行3次传代后,并通过质粒提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)制备收集质粒,按照方法4检测接合子的基因型。

6 统计学分析

应用WHONET 5.6软件对CRKP菌株的耐药情况进行分析,且采用SPSS17.0进行数据统计分析,计数资料用(%)表示。

表 1 qPCR 扩增引物序列
Table 1 Primers Sequences for qPCR Amplify

基因类型 Gene types	引物序列 Primer sequence	扩增片段 长度 Length of amplified fragment
碳青霉 烯酶基因	KPC-2 F:GCGGCTCCATCGGTGTGTA R:TGGCGGCGCGTTATCA	282 bp
	IMP-4 F:GCAGAGCCTTTGCCAGATT R:CGTGGGGATGGATTGAGA	288 bp
	NDM-1 F:ATGTCTGGCAGCACACTTCC R:CCGCAACCATCCCCTCT	300 bp
	VIM F:GTTTGGTGCATATCGCAAC R:AATGCGCAGCACCAGGATAG	382 bp
	SIM F:GTACAAGGGATTCCGGCATCG R:TGGCCTGTTCCCATGTGAG	569 bp
	OXA-48 F:CCATAAGGCAACCACCACA R:CCATAACCAACACGCTTAC	183 bp
	TEM F:ATGCGTTATTATTCCTGTG R:TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	747 bp
	ESBL 基因 SHV F:TCGCCGCATACACTATCTCAGAATGA R:ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	445 bp
	CTX-M F:AGGAAGTGTGCCGCTGTAT R:AGATTCCGGTTCGCTTTCAC	216 bp
	Amp C 酶基因 DHA-1 F:AACTTTACAGGTGTGCTGGGT R:CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405 bp
内参基因 recA F:TTTCACAACCCGACAACG R:GCCTGGCTCATAAGACG	176 bp	

结 果

1 CRKP 的耐药情况

59 株 CRKP 对多粘菌素 B、米诺环素、复方新诺明、阿米卡星、庆大霉素的耐药率较低(均<32.20%),对其他抗生素具有较高的耐药率(均>70%),其中哌拉西林、氨基糖苷类、头孢类抗生素耐药率为 100%(表 2)。

表 2 CRKP 对 17 种抗菌药物的耐药率
Table 2 The resistance of CRKP to 17 antibacterial drugs

抗生素 Antibacterials	耐药株数 No. of bacteria	百分率(%) Percentage
头孢噻肟	59	100.00
头孢他啶	59	100.00
头孢吡肟	54	91.53
哌拉西林/他唑巴坦	59	100.00
头孢哌酮/舒巴坦	45	76.27
头孢呋辛	59	100.00
复方新诺明	15	25.42
米诺环素	1	1.69
氨基糖苷类	59	100.00
妥布霉素	44	74.58
庆大霉素	19	32.20
阿米卡星	16	27.12
环丙沙星	56	94.92
左氧氟沙星	55	93.22
哌拉西林	59	100.00
呋喃妥因	50	84.75
多粘菌素 B	0	0.00

2 CRKP 耐药表型检测

改良 Hodge 试验和 mCIM 试验结果一致,有 58 株(98.31%)CRKP 产碳青霉烯酶,EDTA 协同试验检出 5 株(8.47%)CRKP 产金属酶。

3 CRKP 耐药基因检测

qPCR 检测结果显示,58 株(98.31%)CRKP 携带碳青霉烯酶基因和 1 株(1.69%)CRKP 未携带碳青霉烯酶基因,金属 β-内酰胺酶基因检出 5 株(8.47%),与上述耐药表型检测结果一致。ESBL 基因检出率为 100%,Amp C 酶基因检出 5 株(8.47%)(表 3)。

表 3 59 株 CRKP 所携带的耐药基因表达情况
Table 3 Antibiotic resistance genes expression of 59 CRKP Strains

类型 Type	阳性株数 No. of positive strains
KPC-2+CTX-M+TEM	21
KPC-2+CTX-M+SHV	16
KPC-2+CTX-M+TEM+SHV	14
KPC-2+TEM+SHV	2
IMP-4+DHA-1+CTX-M+TEM	2
IMP-4+CTX-M+TEM+SHV	1
NDM-1+DHA-1+TEM	2
DHA-1+CTX-M+SHV	1
合计 Total	59

4 质粒转移接合试验

对 58 株 CRKP 进行质粒转移接合试验,共 32 株细菌成功发生了转移接合,转移发生率为 55.17%。qPCR 基因检测结果显示,获得 1 株产 NDM-1 酶基因,31 株产 KPC-2 酶基因。

讨 论

近几年来,CRKP 在 ICU 的检出率上升迅速,且已有研究表明 ICU 感染 CRKP 患者病死率高达 50.0%^[3,4]。本院 ICU 59 株 CRKP 药敏结果显示,对多粘菌素 B、米诺环素、复方新诺明、阿米卡星、庆大霉素的耐药率较低,对其他抗菌药物均高度耐药。这与董大光等^[5]报道相似。提示本院 ICU CRKP 菌株已形成多重耐药。分析可能原因为,本院大多 ICU 患者一般有较重的基础疾病以及严重感染,存在长期头孢菌素与碳青霉烯类抗菌药物治疗史,免疫抑制病史,糖皮质激素治疗史以及行医源性侵袭性操作较频繁,极易导致多重耐药条件致病菌感染^[3]。

肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类耐药机制主要包括:碳青霉烯酶的产生,高产 Amp C 酶或 ESBLs 酶同时伴有外膜蛋白缺失或突变,外排泵过度表达,作用靶位的改造等^[6]。本研究结果表明,58 株(98.31%)CRKP 产碳青霉烯酶,且其中 53 株(91.38%)携带 KPC-2 基因,与国外流行趋势相符,提示 KPC-2 是 CRKP 中检出率最高的碳青霉烯酶^[7,8]。本研究还发现 3 株

CRKP 携带 IMP-4 基因和 2 株 CRKP 携带 NDM-1 基因, NDM-1 基因和 IMP-4 基因编码均是金属 β -内酰胺酶, 具有比产 KPC 酶 CRKP 更强的耐药性, 称为超级细菌^[9]。提示本院 ICU CRKP 感染的临床治疗难度较大。结合药敏实验, 本院针对携带 IMP-4 基因 NDM-1 基因 CRKP 感染患者可以选用多粘菌素 B、复方新诺明和四环素类抗生素进行联合治疗。值得注意的是, 本研究发现 59 株 CRKP 菌株 ESBL 基因和 Amp C 酶基因检出率为 100% 和 8.47%, 推测 CRKP 菌株可能最初只是产 ESBLs 和/或 Amp C 酶菌株, 但是在高浓度抗生素长期压力下发生过度表达 ESBLs 和/或 Amp C 酶以及外膜蛋白变异, 从而获得能够轻度水解碳青霉烯类抗生素同时阻止其渗透进入菌体, 而获得耐药性^[10,11]。

大量研究表明, 编码碳青霉烯水解酶的基因主要定位于可转移基因元件上, 如结合性质粒、插入序列、转座子等, 具有可转移性, 可以在不同菌种间相互传播^[12,13]。本研究对 CRKP 进行了质粒转移接合试验, 接合成功率可达 55.17%, 其中产 KPC-2 酶菌株为 31 (96.88%), 说明本院所流行的 CRKP 易通过质粒将 KPC-2 基因直接转移到其他种属的细菌中, 这与文献报道相符^[5,14]。值得注意的是, 本院 CRKP 菌株接合成功率较低, 提示本院 ICU 容易造成 CRKP 的流行, 可能的原因是: (1) 不同地域研究结果有所差别; (2) 样本量大小差别较大。

综上所述, 本院 ICU CRKP 耐药情况严重, 产 KPC-2 型碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素最主要的耐药机制, 可通过质粒在细菌间进行水平转移传播, 极易导致医院内感染流行。应加强对肺炎克雷伯菌多重耐药性的监测, 规范应用抗菌药物, 尤其是联合使用的适应症和禁忌症, 非必要情况下应减少侵袭性治疗, 阻断肺炎克雷伯菌传播渠道。加强病房环境卫生管理, 及时消毒, 减少医护人员与患者之间相互传播途径, 防止肺炎克雷伯菌引起的交叉感染。

【参考文献】

[1] Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018(8):4.

- [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] 杨晓丽, 张丽, 魏艳萍. 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌感染患者死亡因素分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(14): 2086-2089.
- [4] 苏珊珊, 宫雪, 张吉生, 等. 重症监护室流行耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及同源性分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(5): 508-514.
- [5] 董大光, 王健, 潘亚萍, 等. 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶的检测及基因型分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(11): 1721-1725.
- [6] Zhang P, Shi Q, Hu H, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China [J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(1): 124. e1-124. e4.
- [7] Hu Y, Liu C, Shen Z, et al. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients from Zhejiang, China, 2008-2018 [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 1771-1779.
- [8] Wang B, Pan F, Wang C, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a paediatric hospital in China [J]. Int J Infect Dis, 2020(93): 311-319.
- [9] Liu L, Feng Y, Long H, et al. Sequence type 273 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Carrying blaNDM-1 and blaIMP-4 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(6): e00160-18.
- [10] Han R, Shi Q, Wu S, et al. China antimicrobial surveillance network (CHINET) study group: dissemination of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) among carbapenem-resistant enterobacteriaceae isolated from adult and children patients in China [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020(10): 314.
- [11] 刘婧娴, 俞静, 李媛睿, 等. 肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制研究 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(1): 93-99.
- [12] Gao H, Liu Y, Wang R, et al. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings [J]. EBio Medicine, 2020(51): 102599.
- [13] 李雪娇, 马炜, 郭杰, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的流行病学特征及分子生物学研究 [J]. 第二军医大学学报, 2020, 41(10): 1109-1114.
- [14] 文佩佩, 郭小兵, 李爽, 等. 血标本碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的分子特征及危险因素分析 [J]. 现代预防医学, 2020, 47(3): 479-483.

【收稿日期】 2022-02-13 【修回日期】 2022-04-14