

DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233395

## 论著·临床微生物与感染监测专题

耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌耐药性、临床感染特征及 *mcr* 基因分析

肖 晓, 杭修兵, 王 梦, 刘莉娟, 储雯雯, 周 强, 刘 周

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 安徽 合肥 230601)

**[摘要]** 目的 分析耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌(CRE)临床感染特征及耐药机制,为临床防治 CRE 感染提供参考。方法 收集 2021 年 7 月—2022 年 6 月某三甲医院临床分离的 CRE 菌株及患者资料,采用聚合酶链反应(PCR)检测菌株耐药基因,诱导试验验证 *mcr-9* 阳性菌株的诱导耐药性。结果 共纳入 167 株 CRE,以肺炎克雷伯菌(38.9%)和阴沟肠杆菌(35.3%)为主,呈现多重耐药表型,3 株(1.8%)对多粘菌素 B 耐药。CRE 以携带 *bla<sub>NDM</sub>*(52.1%, 87 株)为主,其次为 *bla<sub>KPC</sub>*(34.7%, 58 株)。根据碳青霉烯酶将 CRE 感染患者分为 NDM 组和 KPC 组。单因素分析结果显示,在入住 ICU 日数 $\geq 7$  d、行气管插管、感染前使用碳青霉烯类药物等影响因素方面,KPC 组高于 NDM 组,治愈率低于 NDM 组(均  $P < 0.05$ )。多因素 logistic 回归分析结果显示,置入胃管、肺部疾病及恶性肿瘤为影响携带不同碳青霉烯酶基因 CRE 感染患者预后的独立危险因素( $P < 0.05$ )。多粘菌素 B 耐药菌株均为 *mgrB* 点突变,7 株(4.2%)CRE 携带 *mcr-9*,且多数同时携带 *bla<sub>NDM</sub>*。经多粘菌素 B 诱导后,4 株 *mcr-9* 阳性 CRE 的 MIC 值较诱导前升高。结论 该地区 CRE 以携带 *bla<sub>NDM</sub>*、*bla<sub>KPC</sub>* 为主,少数同时携带 *mcr-9* 和 *bla<sub>NDM</sub>*,呈现多重耐药。临床应加强防控,预防其临床传播。

**[关键词]** 肠杆菌目细菌;碳青霉烯类耐药;碳青霉烯酶;多粘菌素 B; *mcr* 基因

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2

## Antimicrobial resistance, clinical infection characteristics and *mcr* genes of carbapenem-resistant *Enterobacterales*

XIAO Xiao, HANG Xiu-bing, WANG Meng, LIU Li-juan, CHU Wen-wen, ZHOU Qiang, LIU Zhou (Department of Laboratory Medicine, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the clinical infection characteristics and resistance mechanisms of carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), provide reference for clinical prevention and treatment of CRE infection. **Methods** Clinically isolated CRE strains and patients information in a tertiary first-class hospital from July 2021 to June 2022 were collected. Antimicrobial resistance genes were detected by polymerase chain reaction. Induced antimicrobial resistance of *mcr-9* positive strains was detected by inducing test. **Results** A total of 167 CRE strains were collected, mainly *Klebsiella pneumoniae* (38.9%) and *Enterobacter cloacae* (35.3%). CRE strains demonstrated multiple drug resistance phenotype, with 3 strains (1.8%) exhibiting polymyxin B resistance. Most CRE strains harboured *bla<sub>NDM</sub>* (52.1%,  $n = 87$ ) and *bla<sub>KPC</sub>* (34.7%,  $n = 58$ ). Patients with CRE infection were divided into NDM group and KPC group according to carbapenemase. Univariate analysis showed that in terms of influencing factors as stay in ICU  $\geq 7$  days, endotracheal intubation, and use of carbapenems before infection, KPC group was higher than NDM group, however, curing rate was lower than NDM group ( $P < 0.05$ ). Multivariate logistic regression analysis showed that gastric intubation, pulmonary diseases and malignant tumor were independent influencing factors for

**[收稿日期]** 2022-09-21

**[基金项目]** 安徽省自然科学基金项目(1908085QH366);安徽省转化医学研究院科研基金项目(2021zhyx-C47);安徽省高等学校自然科学基金项目(KJ2021ZD0029);安徽医科大学校基金项目(2022xkj172)

**[作者简介]** 肖晓(1995-),女(汉族),安徽省芜湖市人,硕士研究生,主要从事细菌耐药机制及分子流行病学研究。

**[通信作者]** 刘周 E-mail: liuzhou0112@ahmu.edu.cn

the prognosis of patients with CRE infection of different carbapenemase genes ( $P < 0.05$ ). Polymyxin B resistant strains all carried *mgrB* point mutation. 7 (4.2%) CRE strains harboured *mcr-9*, most of which also harboured *bla<sub>NDM</sub>*. MIC values of 4 *mcr-9* positive CRE strains after polymyxin B induction were higher than those before induction. **Conclusion** CRE in this area mainly harbour *bla<sub>NDM</sub>* and *bla<sub>KPC</sub>*, and a few also harbour *mcr-9* and *bla<sub>NDM</sub>*, showing multiple drug resistance. Clinical prevention and control should be strengthened to prevent its clinical transmission.

[Key words] *Enterobacteriales*; carbapenem resistance; carbapenemase; polymyxin B; *mcr* gene

耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriales, CRE)因其与死亡率和发病率高度相关而被世界卫生组织(WHO)列为高度优先病原体。CRE 最普遍存在的耐药因子为碳青霉烯酶。依据 Ambler 分类,碳青霉烯酶可分为 A、B、D 三类,目前临床分离的 CRE 以产 A 类肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC)为主<sup>[1]</sup>。由于 CRE 感染治疗可选用的抗菌药物有限,致死率高,导致临床用药选择困难,多粘菌素类抗生素越来越多的被用作 CRE 感染治疗的最后选择。既往发现多粘菌素耐药机制大多数为染色体上基因突变(如 *PmrA/PmrB*、*PhoP/PhoQ* 和 *mgrB/mgrR* 突变),这种基因突变不会在细菌间相互传播。然而,2015 年中国率先报道<sup>[2]</sup>质粒介导的多粘菌素耐药基因(mobile colistin resistance genes-1, *mcr-1*),该基因可在不同菌种之间相互传播,并且介导低浓度的多粘菌素耐药性,导致携带 *mcr-1* 的 CRE 感染治疗无药可用。此后,世界范围内陆续发现数十种多粘菌素耐药基因(*mcr-1* ~ *mcr-9*)<sup>[3]</sup>,其中 *mcr-9* 在肠杆菌中往往为沉默表达,可在低浓度多粘菌素诱导下呈现表型耐药,使体外药敏试验结果产生偏差。故研究某地区省级综合性三甲医院 CRE 临床分离株,回顾性分析 CRE 耐药性、患者临床感染特征、碳青霉烯酶表型及基因型分布情况,分析该地区多粘菌素耐药基因特征,可为临床防治 CRE 感染提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 菌株来源及临床资料收集 收集 2021 年 7 月—2022 年 6 月安徽省某省级综合性三级甲等医院住院患者临床分离的非重复 CRE 菌株。同时收集相应患者年龄、性别、入住重症监护病房(ICU)日数、侵袭性操作、抗菌药物使用情况、基础疾病及预后等临床资料。判定标准为对任意一种碳青霉烯类

抗生素耐药,或为产碳青霉烯酶的肠杆菌。该院伦理委员会审核同意此研究(伦理号 SZR 2021048)。

1.1.2 主要仪器和试剂 Microflex-LT/SH 型质谱分析仪(德国 BRUKER 公司),VITEK 2 Compact 全自动细菌分析仪(法国 BioMérieux 公司),生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),Biometra 型梯度 PCR 扩增仪(德国 Analytik Jena 公司),凝胶成像仪 Tanon 1600 型(上海天能科技有限公司),药敏纸片(英国 Oxoid 公司),多粘菌素 B(PB)标准药物(上海源叶公司)药敏检测(MIC 法)试剂(温州康泰公司),琼脂糖、染料和 PCR 引物(均为上海生工生物公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 菌种鉴定及药敏试验 使用基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对所有菌株进行鉴定。使用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统检测菌株药物敏感性,结果判定参照美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)2020 年版<sup>[4]</sup>标准。采用 PB 药敏检测试剂检测多粘菌素最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),替加环素及 PB 的耐药折点参考欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)2020 版<sup>[5]</sup>标准判断。质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)和肺炎克雷伯菌(ATCC 700603),菌株来源于安徽省细菌耐药监控中心。

1.2.2 碳青霉烯酶表型及耐药基因检测 采用改良碳青霉烯灭活(mCIM)试验和改良 EDTA 碳青霉烯灭活(eCIM)试验检测碳青霉烯酶表型<sup>[4]</sup>。高温煮沸提取细菌 DNA 模版,应用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测常见碳青霉烯酶基因(*bla<sub>KPC</sub>*、*bla<sub>IMP</sub>*、*bla<sub>VIM</sub>*、*bla<sub>NDM</sub>* 和 *bla<sub>OXA-48</sub>* 基因)、染色体上突变基因 *mgrB* 和质粒介导的多粘菌素耐药基因(*mcr-1* ~ *mcr-9*),引物及反应条件参考

文献[6-8],采用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。选取阳性结果送上海生工生物技术有限公司测序,结果上传至 BLAST 网站进行分析。阴性对照为大肠埃希菌(ATCC 25922),阳性对照为试验前期测序验证通过的临床菌株。

表 1 耐药基因 PCR 检测引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR detection of drug resistance genes

目标基因	引物名称	引物序列(5'—3')	产物大小(bp)
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	KPC-F	TGTCACTGTATCGCCGTC	1 009
	KPC-R	CAGTGCTCTACAGAAAACC	
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	IMP-F	GAAGGCGTTTATGTTCATAC	587
	IMP-R	GTACGTTTCAAGAGTGATGC	
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	VIM-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	389
	VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	NDM-F	GCAGCTTGTTCGGCCATGCGGGC	782
	NDM-R	GGTCGCGAAGCTGAGCACCG-CAT	
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
	OXA-R	CATCAAGTTCAACCAACCG	
<i>mcr-1</i>	mcr-1-F	AGTCCGTTTGTCTCTGTGGC	320
	mcr-1-R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	
<i>mcr-2</i>	mcr-2-F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715
	mcr-2-R	TCTAGCCCGACAAGCATACC	
<i>mcr-3</i>	mcr-3-F	AAATAAAAAATTGTTCCGCT-TATG	929
	mcr-3-R	AATGGAGATCCCCGTTTTT	
<i>mcr-4</i>	mcr-4-F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1 116
	mcr-4-R	TTGGTCCATGACTACCAATG	
<i>mcr-5</i>	mcr-5-F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1 644
	mcr-5-R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	
<i>mcr-6</i>	mcr-6-F	AGCTATGTCAATCCCGTGAT	252
	mcr-6-R	ATTGGCTAGGTTGTCAATC	
<i>mcr-7</i>	mcr-7-F	GCCCTTCTTTTCGTTGTT	551
	mcr-7-R	GGTTGGTCTCTTCTCTCGT	
<i>mcr-8</i>	mcr-8-F	TCAACAATTCTACAAAGCGTG	856
	mcr-8-R	AATGCTGCGGAATGAAG	
<i>mcr-9</i>	mcr-9-F	TTCCCTTGTCTCGGTTG	1 011
	mcr-9-R	GCAGGTAATAAGTCGGTC	
<i>mgrB</i>	mgrB-F	ACCACCTCAAAGAGAAGGCGTT	347
	mgrB-R	GGCGTGATTTTGACACGAACAC	

1.2.3 多粘菌素诱导试验 采用 Akata 等<sup>[9]</sup>方法改良后进行诱导试验。将上述携带 *mcr-9* 的菌株过夜

培养,取单个菌落,配 0.5 麦氏单位菌液,取 0.3 mL 接种到 10 mL MHB 肉汤中,37℃ 150 r/min 的轨道振荡培养 1 h,加入 PB 至药物终浓度为 0.125 μg/mL,再培养 3 h。用 PB 药敏检测试剂(MIC 法)测定诱导前后菌株 PB 的 MIC 值。

1.3 统计分析 应用 WHONET 2021 软件分析药敏试验数据。应用 GraphPad Prism 8.0 及 SPSS 25.0 软件进行统计。采用例数或率表示计数资料,平均数或标准差表示计量资料,比较组间样本采用卡方检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。多因素分析采用多项 logistic 回归分析, $P \leq 0.05$  为携带不同碳青霉烯耐药基因(KPC 和 NDM)CRE 感染患者预后的独立影响因素。

## 2 结果

2.1 菌种及临床患者基本分布 共纳入 CRE 167 株,以肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌和大肠埃希菌为主。见表 2。标本来源主要为痰、尿、腹腔积液、分泌物及血,分别为 74、26、19、15、14 株。CRE 感染的临床患者年龄 16~92 岁,平均年龄  $63.5 \pm 16.4$  岁,男性占 63.5%,女性占 36.5%。患者住院科室以 ICU(41.32%)、普通外科(8.38%)和呼吸科(8.38%)为主,广泛分布于各临床科室。

表 2 CRE 感染患者菌种分布情况

Table 2 Distribution of bacterial species in patients infected with CRE

病原菌	株数	构成比(%)
肺炎克雷伯菌	65	38.9
阴沟肠杆菌	59	35.3
大肠埃希菌	25	15.0
黏质沙雷菌	6	3.6
产气克雷伯菌	4	2.4
产酸克雷伯菌	3	1.8
弗劳地氏柠檬酸杆菌	2	1.2
雷极普罗威登氏菌	1	0.6
植生拉乌尔菌	1	0.6
解鸟氨酸拉乌尔菌	1	0.6
合计	167	100

2.2 药敏结果 CRE 菌株对头孢菌素类以及 β-内酰胺 + 酶抑制剂类药物的耐药率  $\geq 95.8\%$ ,对单环 β-内酰胺类药物的耐药率为 80.8%,对氟喹诺酮类

药物的耐药率为 84.4%~99.4%，对氨基糖苷类药物的耐药率为 32.9%~63.5%，对替加环素的耐药率为 21.0%。3 株 CRE(1.8%)对 PB 耐药，且均为肺炎克雷伯菌。肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、大肠埃

希菌对阿米卡星、妥布霉素及氨曲南的耐药率各组比较，差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )，肺炎克雷伯菌对于 3 种抗菌药物的耐药率均高于阴沟肠杆菌和大肠埃希菌(均  $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 CRE 对抗菌药物的耐药率(%)

Table 3 Antimicrobial resistance rates of CRE (%)

抗菌药物	全部(n=167)	肺炎克雷伯菌(n=65)	阴沟肠杆菌(n=59)	大肠埃希菌(n=25)	$\chi^2$	P
哌拉西林/他唑巴坦	98.8	98.5	100	100	1.301	1.000
阿莫西林/克拉维酸	99.4	98.5	100	100	1.301	1.000
头孢呋辛	100	100	100	100	-	-
头孢他啶	98.2	98.5	100	100	1.301	1.000
头孢曲松	100	100	100	100	-	-
头孢吡肟	95.8	98.5	96.6	96.0	0.605	0.664
头孢哌酮/舒巴坦	97.6	96.9	98.3	100	0.917	1.000
头孢西丁	99.4	98.5	100	100	1.301	1.000
氨曲南	80.8	95.4	84.7	56.0	21.458	<0.001
亚胺培南	100	100	100	100	-	-
美罗培南	100	100	100	100	-	-
厄他培南	100	100	100	100	-	-
阿米卡星	32.9	72.3	0	28.0	70.862	<0.001
妥布霉素	63.5	81.5	57.6	56.0	10.008	0.007
替加环素	21.0	27.7	22.0	8.0	4.061	0.131
左氧氟沙星	84.4	90.8	78.0	84.0	3.891	0.137
环丙沙星	99.4	100	100	100	-	-
PB	1.8	4.6	0	0	3.957	0.293

注：- 表示无法进行统计学检验。

2.3 碳青霉烯酶表型及耐药基因分布 mCIM 和 eCIM 试验结果显示,145 株菌(86.8%)产碳青霉烯酶。mCIM 试验检出 58 株阳性菌株,eCIM 试验检出 89 株阳性菌株。PCR 及测序结果显示,58 株(34.7%)*bla*<sub>KPC-2</sub> 阳性,与 mCIM 试验结果一致;87 株(52.1%)*bla*<sub>NDM</sub> 阳性(包括 *bla*<sub>NDM-1</sub> 52 株、*bla*<sub>NDM-5</sub> 27 株、*bla*<sub>NDM-7</sub> 5 株、*bla*<sub>NDM-13</sub> 2 株、*bla*<sub>NDM-4</sub> 1 株),2 株(1.2%)*bla*<sub>IMP-4</sub> 阳性,与 eCIM 试验结果一致。其中,2 株菌同时携带 2 种碳青霉烯酶耐药基因(*bla*<sub>NDM-5</sub> + *bla*<sub>KPC-2</sub> 或 *bla*<sub>KPC-2</sub> + *bla*<sub>IMP-4</sub>)。58 株产 KPC 型碳青霉烯酶菌株主要为肺炎克雷伯菌(51 株,87.9%),87 株产 NDM 型碳青霉烯酶菌株以阴沟肠杆菌(55 株,63.2%)和大肠埃希菌(20 株,23.0%)为主。见图 1。产 KPC 型酶的肺炎克雷伯菌主要来源于痰(30 株,40.5%),产 NDM 型酶的大肠埃希菌和阴沟肠杆菌主要来源于尿及分泌物(25 株,53.2%)。

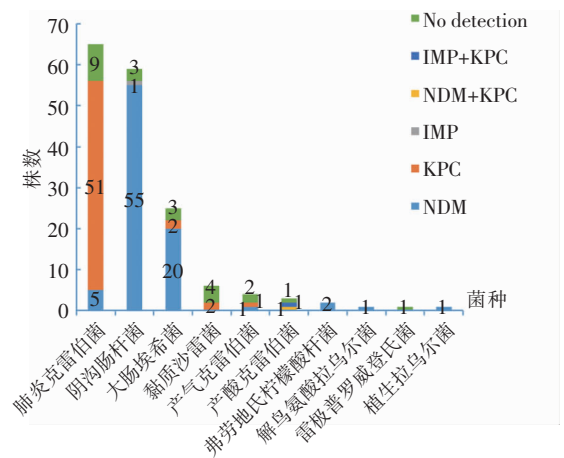


图 1 菌种及碳青霉烯耐药基因分布

Figure 1 Distribution of bacterial species and carbapenem-resistance genes

2.4 临床特征 根据主要碳青霉烯酶基因,将菌株分为 KPC 组(56 株)和 NDM 组(86 株),排除同

时携带 2 种碳青霉烯酶耐药基因的 2 株菌。KPC 组患者入住 ICU 日数  $\geq 7$  d 的比例高于 NDM 组, KPC 组患者行气管插管比例高于 NDM 组, 留置导尿管及手术比例低于 NDM 组, CRE 感染前 KPC 组患者单独使用碳青霉烯类药物比例高于 NDM

组, KPC 组患者伴有呼吸系统疾病比例高于 NDM 组, 伴有恶性肿瘤、心血管系统疾病、泌尿生殖系统疾病比例均低于 NDM 组(均  $P < 0.05$ )。比较两组患者临床预后, KPC 组患者临床治愈或好转比例低于 NDM 组( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 KPC 组和 NDM 组 CRE 患者临床特征[例(%)]

Table 4 Clinical characteristics of patients in KPC and NDM groups (No. of cases[%])

研究指标	KPC 组 (n = 56)	NDM 组 (n = 86)	$\chi^2$	P
年龄 $\geq 60$ 岁	36(64.3)	55(64.0)	0.002	0.968
性别			0.536	0.464
男性	36(64.3)	50(58.1)		
女性	20(35.7)	36(41.9)		
感染类别			2.089	0.148
社区感染	17(30.4)	17(19.8)		
医院感染	39(69.6)	69(80.2)		
入住 ICU 日数 $\geq 7$ d	30(53.6)	30(34.9)	4.854	0.028
CRE 感染前行侵袭性操作				
动静脉导管	48(85.7)	74(86.0)	0.003	0.956
留置导尿管	31(55.4)	62(72.1)	4.203	0.040
留置胃管	25(44.6)	38(44.2)	0.003	0.957
气管插管	32(57.1)	34(39.5)	5.362	0.040
手术	17(30.4)	43(50.0)	5.281	0.021

研究指标	KPC 组 (n = 56)	NDM 组 (n = 86)	$\chi^2$	P
CRE 感染前使用抗菌药物				
头孢菌素	21(37.5)	46(53.5)	3.479	0.062
碳青霉烯	12(21.4)	2(2.3)	13.926	$< 0.001$
头孢菌素及碳青霉烯 联用	16(28.6)	28(32.6)	0.252	0.616
基础疾病				
呼吸系统疾病	41(73.2)	46(53.5)	5.561	0.018
糖尿病	13(23.2)	18(20.9)	0.104	0.747
恶性肿瘤	5(8.9)	22(25.6)	6.108	0.013
心血管系统疾病	27(48.2)	57(66.3)	4.581	0.032
泌尿系统疾病	17(30.4)	41(47.7)	4.209	0.040
临床预后			4.070	0.044
治愈或好转	29(51.8)	59(68.6)		
死亡或放弃治疗	27(48.2)	27(31.4)		

根据预后不同将携带 KPC 或 NDM 基因患者分为预后良好和预后不佳两组, 进行多因素 logistic 回归分析, 结果显示置入胃管、肺部疾病及恶性肿瘤为影响携带不同碳青霉烯酶基因 CRE 感染患者预后的独立危险因素( $P < 0.05$ )。见表 5。

表 5 CRE 感染患者预后的多因素分析结果

Table 5 Multivariate analysis on the prognosis of patients with CRE infection

影响因素	$\beta$	Wald $\chi^2$	OR	95%CI	P
置入胃管	1.044	4.411	2.842	1.072~7.531	0.036
肺部疾病	1.443	7.745	4.231	1.532~11.686	0.005
恶性肿瘤	1.248	5.338	3.485	1.208~10.049	0.021

2.5 多粘菌素耐药基因及诱导试验 药敏结果显示, 3 株 CRE 菌株 PB 耐药; PCR 及测序结果显示, 其均未携带 *mcr-1*~*mcr-9* 基因, 而染色体上存在 *mgrB* 点突变, 与药敏结果一致。共 7 株 *mcr-9* 阳性 CRE 菌株。使用 1/8 MIC 的 PB 处理 7 株携带

*mcr-9* 基因的 CRE 菌株 3 h 后, 4 株菌的 PB MIC 值升高: CRE113 号、CRE127 号、CRE129 号、CRE167 号菌株原始 MIC 值为分别为 1、4、0.5、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 诱导后分别为 8、64、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。见表 6。

表 6 7 株 *mcr-9* 阳性 CRE 菌株特征及 PB 诱导试验结果

Table 6 Characteristics of 7 *mcr-9*-positive CRE strains and results of polymyxin B induction test

编号	菌种	分离标本	碳青霉烯 耐药基因	PB MIC 值 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
				诱导前	诱导后
CRE025	大肠埃希菌	腹腔积液	<i>bla</i> <sub>NDM-5</sub>	1	1
CRE055	阴沟肠杆菌	痰	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	2	2
CRE060	大肠埃希菌	腹腔积液	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	1	1
CRE113	阴沟肠杆菌	腹腔积液	<i>bla</i> <sub>NDM-5</sub>	1	8
CRE127	阴沟肠杆菌	痰	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	4	64
CRE129	产酸克雷伯菌	全血	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> 、 <i>bla</i> <sub>IMP-4</sub>	0.5	4
CRE167	阴沟肠杆菌	尿	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	0.5	8

### 3 讨论

肠杆菌目细菌是一类致社区和医院感染的常见机会致病菌,主要导致肺炎、尿路感染、腹腔感染及血流感染等。碳青霉烯类抗生素是目前临床上治疗肠杆菌目细菌感染的主要抗菌药物。近年来全球相继报道 CRE 菌株,且其耐药性问题日趋严重。基于此,研究收集临床 CRE 菌株并探究其耐药机制。

本研究中,肺炎克雷伯菌检出率最高,阴沟肠杆菌次之,可能是因为纳入呼吸道来源的临床标本居多,而肺炎克雷伯菌为呼吸道常见机会致病菌。2020 年 CHINET<sup>[10]</sup> 数据显示,近年来肺炎克雷伯菌的检出率稳居第一,耐药率缓慢上升,阴沟肠杆菌碳青霉烯类耐药检出率有所上升,大肠埃希菌对碳青霉烯类耐药检出率有所下降。本研究发现肺炎克雷伯菌的检出率第一,阴沟肠杆菌检出率高于大肠埃希菌,是大肠埃希菌的 2 倍左右,值得重点关注本地区阴沟肠杆菌检出率,预防暴发流行的可能。阴沟肠杆菌是一类肠道条件致病菌,临床侵入性操作、免疫力下降及抗菌药物的使用可增加其感染风险。阴沟肠杆菌检出率高可能是医院感染所致,可对检出菌株科室环境及物品进行检测,预防病原菌传播。药敏结果显示,所有 CRE 菌株对头孢菌素类以及  $\beta$ -内酰胺 + 酶抑制剂类抗生素均有高耐药率,氨基糖苷类药物耐药率较氟喹诺酮类低,对替加环素敏感性较高,对 PB 具有高敏感性,耐药率仅为 1.8%。多粘菌素是半世纪前发现的阳离子脂肽类抗生素,主要通过破坏细菌细胞膜而杀菌,为 CRE 重症感染的最后治疗选择。然而,多粘菌素耐药基因 *mcr* 的出现打破了此局面,需要重点关注。

CRE 的耐药机制有:(1)产生碳青霉烯酶;(2)孔蛋白编码基因表达缺失,染色体编码孔蛋白基因突变;(3)外排泵编码基因过表达;(4)细菌生物膜系统等。其中产碳青霉烯酶是分布最广泛的耐药机制。研究<sup>[11-12]</sup>表明,我国目前 CRE 临床分离株中存在最广泛的碳青霉烯酶为 KPC(A 类)。本组 CRE 主要以产 NDM 和产 KPC 菌株为主,可能与菌种地区分布差异有关。研究<sup>[10]</sup>发现,CRE 以大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌为主,阴沟肠杆菌次之。本研究中阴沟肠杆菌检出率高于大肠埃希菌,可能与菌种地域分布有关,尚需进一步研究。本研究显示产 KPC 菌种以肺炎克雷伯菌为主,产 NDM 菌种以阴沟肠杆菌和大肠埃希菌居多,与研究<sup>[11-15]</sup>结论基本一致,

浙江地区及皖南地区肺炎克雷伯菌以产 KPC 型酶为主,大肠埃希菌和阴沟肠杆菌以产 NDM 型酶为主。多粘菌素的耐药机制包括<sup>[16]</sup>:(1)通过活化双组分调控系统改善细菌细胞膜上脂多糖功能,从而降低多粘菌素吸收;(2)通过广谱外排泵功能,使药物迅速排出细胞,从而减少细胞内含量;(3)调节染色体基因突变;(4)酶解蛋白;(5)生物膜保护;(6)质粒介导的 *mcr* 等。近年来,*mcr* 家族基因(*mcr-1*~*mcr-9*)在世界各地陆续发现,以 *mcr-1* 和 *mcr-9* 基因分布最广泛<sup>[3]</sup>。与其他基因不同,携带 *mcr-9* 的菌株多粘菌素体外表型敏感,但在低浓度 PB 诱导下,*mcr-9* 表达量升高,进而表型耐药<sup>[17]</sup>。本研究检出 3 株 PB 表型耐药的肺炎克雷伯菌,其染色体上存在 *mgrB* 点突变,且未发现 *mcr-1*~*mcr-8* 阳性菌株;7 株 PB 敏感菌株携带 *mcr-9*,其中 6 株同时携带 *bla*<sub>NDM</sub> 基因,1 株携带 2 种碳青霉烯酶(*bla*<sub>KPC-2</sub> 和 *bla*<sub>IMP-4</sub>)。在低浓度 PB 诱导下,有 4 株菌 PB 的 MIC 值出现了升高,证实 *mcr-9* 可被诱导表达。

本研究结果显示,延长入住 ICU 时间可能会增加产 KPC 型 CRE 感染概率;CRE 感染前 KPC 组患者行气管插管比例高于 NDM 组,留置导尿管及手术比例低于 NDM 组,表明气管插管更易引起产 KPC 酶的 CRE 感染,而留置导尿管及手术更易引起产 NDM 型 CRE 感染;KPC 组患者伴有呼吸系统疾病比例高于 NDM 组,伴有恶性肿瘤、心血管系统疾病、泌尿生殖系统疾病比例均低于 NDM 组。通过标本来源分析不同组患者感染菌种分布,结合临床特征推测 KPC 组患者呼吸系统基础疾病占比高可能因为肺炎克雷伯菌为呼吸道常驻菌群,而肺炎克雷伯菌中以产 KPC 为主;而 NDM 组患者泌尿生殖系统疾病占比高,主要由于阴沟肠杆菌和大肠埃希菌为泌尿道及皮肤感染致病菌株,二者以产 NDM 型酶为主,且侵入性操作作为感染危险因素也增加了感染概率。根据感染前抗菌药物使用及治愈情况推断,感染前合理使用抗菌药物可能会提高治愈率,故可根据患者基础疾病情况及侵入性操作针对性预防和治疗感染,治疗过程中要增强无菌意识,及时拔管,防止操作导致医院感染。

综上所述,本研究对该地区 CRE 耐药性、临床感染特征、碳青霉烯酶表型及基因型进行分析,并对 *mcr* 家族基因进行初步筛查。发现以产 NDM 菌株检出率最高,阴沟肠杆菌占比较高。98.2% 的菌株 PB 表型敏感,且未携带 *mcr* 基因,仅 4.2% 的 CRE 携带 *mcr-9* 基因。但考虑到本研究时间跨度较短,

菌株为单中心来源,结果存在一定局限性。后续将继续收集 CRE,扩大样本量,丰富样本来源,同时对检出的 *mcr-9* 阳性菌株进行全基因组测序,更加深入了解该地区 *mcr-9* 阳性 CRE 的分子生物学特征,为临床防治 CRE 感染提供参考。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] Zhang YW, Wang Q, Yin YY, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections: report from the China CRE network [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(2): e01882 - 17.
- [2] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 161 - 168.
- [3] Ling ZR, Yin WJ, Shen ZQ, et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(11): 3087 - 3095.
- [4] Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, et al. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100, 31st edition[J]. *J Clin Microbiol*, 2021, 59(12): e0021321.
- [5] Li J, Huang ZY, Tang ML, et al. Clonal dissemination of multiple carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Enterobacteriales* mediated by multiple plasmids in China[J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 3287 - 3295.
- [6] Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives[J]. *Ther Adv Infect Dis*, 2016, 3(1): 15 - 21.
- [7] Satlin MJ, Lewis JS, Weinstein MP, et al. Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Position statements on polymyxin B and colistin clinical breakpoints[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(9): e523 - e529.
- [8] Ali S, Hussain W, Ahmed F, et al. Chromagar<sup>TM</sup> Col-Apse for detection of colistin resistance in clinical isolates of multi-drug resistant Gram negative bacilli[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2022, 32(2): 177 - 180.
- [9] Akata K, Muratani T, Yatera K, et al. Induction of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase DHA-1 by piperacillin/tazobactam and other  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae* [J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0218589.
- [10] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2021, 21(4): 377 - 387. Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance: results of 2020[J]. *Chinese Journal of Infec-*

*tion and Chemotherapy*, 2021, 21(4): 377 - 387.

- [11] Han RR, Shi QY, Wu S, et al. 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.
- [12] 黄家祥, 王中新, 潘亚萍, 等. 耐碳青霉烯类大肠埃希菌分子特征和同源性分析[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(4): 574 - 578. Huang JX, Wang ZX, Pan YP, et al. Molecular characteristics and homology analysis of carbapenem-resistant *Escherichia coli*[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2022, 57(4): 574 - 578.
- [13] 龙华婧, 邱芳华, 刘道利, 等. 中国 2017—2019 年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及流行克隆特征[J]. *中国感染控制杂志*, 2021, 20(11): 1008 - 1015. Long HJ, Qiu FH, Liu DL, et al. Resistance genes and prevalence clone characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China from 2017 to 2019[J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2021, 20(11): 1008 - 1015.
- [14] 黄建胜, 余璟璐, 朱艳, 等. 浙江省丽水地区 NDM 菌株的耐药特征及基因背景研究[J]. *中华临床感染病杂志*, 2018, 11(4): 287 - 293. Huang JS, Yu JL, Zhu Y, et al. Drug resistance and genetic background of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)-producing bacterial strains in Lishui area of Zhejiang Province[J]. *Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2018, 11(4): 287 - 293.
- [15] 张鹏, 李婕, 单泳源, 等. 产 KPC 酶肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类药物的分子机制研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2022, 47(9): 946 - 950. Zhang P, Li J, Shan YY, et al. Molecular mechanism of carbapenem resistance in KPC producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2022, 47(9): 946 - 950.
- [16] Silva KED, Rossato L, Leite AF, et al. Overview of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae* [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2022, 55: e0349.
- [17] Kieffer N, Royer G, Decousser JW, et al. *mcr-9*, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(9): e00965 - 19.

(本文编辑:翟若南、左双燕)

本文引用格式:肖晓,杭修兵,王梦,等.耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌耐药性、临床感染特征及 *mcr* 基因分析[J].*中国感染控制杂志*, 2023, 22(1): 31 - 37. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233395.

Cite this article as: XIAO Xiao, HANG Xiu-bing, WANG Meng, et al. Antimicrobial resistance, clinical infection characteristics and *mcr* genes of carbapenem-resistant *Enterobacteriales*[J]. *Chin J Infect Control*, 2023, 22(1): 31 - 37. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233395.