

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.09.002

· 论 著 ·

## 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制与分子流行病学特征

张志军<sup>1</sup>, 鹿 麟<sup>2</sup>, 牛法霞<sup>3</sup>, 赵 珂<sup>4</sup>, 姜梅杰<sup>1</sup>, 赵书平<sup>1</sup>

(1 泰安市中心医院, 山东 泰安 271000; 2 同济大学附属东方医院, 上海 200120; 3 胜利油田中心医院, 山东 东营 257000; 4 泰山医学院, 山东 泰安 271016)

**[摘要]** 目的 了解耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的碳青霉烯酶基因携带情况及分子流行病学特点,为医院感染控制和临床治疗提供实验室依据。**方法** 收集山东省泰安市中心医院 2014 年 1—11 月临床分离的 CRKP 13 株,采用 WalkAway 96 PLUS 型全自动细菌分析仪进行细菌鉴定和药敏试验;改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验进行碳青霉烯酶表型的确认;采用多聚酶链反应(PCR)方法扩增相关碳青霉烯类耐药基因(*bla*KPC、*bla*IMP、*bla*VIM、*bla*GIM 及 *bla*NDM-1)并测序;采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列分型(MLST)调查菌株的克隆相关性并进行流行病学比较。**结果** 13 株 CRKP 主要来源于痰(7 株,53.85%)及尿(4 株,30.77%),对复方磺胺甲噁唑、四环素的耐药率较低(均<40%),对其他抗菌药物(除阿米卡星)的耐药率均>70%,对碳青霉烯类药物的耐药率均为 100%;13 株细菌改良 Hodge 试验均为阳性,5 株细菌 EDTA 协同试验阳性;经 PCR 测序确认,碳青霉烯酶基因中,*bla*KPC 基因最常见(13/13),其次为 *bla*NDM-1 基因(5/13),未发现其基因 *bla*IMP、*bla*VIM 和 *bla*GIM;PFGE 聚类结果显示,13 株肺炎克雷伯菌被分为 5 型,主要为 C 型(9/13),且均属于 ST11,其他分别为 ST37、ST626、ST628 和 ST668 型。**结论** 碳青霉烯酶基因 *bla*KPC 与 *bla*NDM-1 是引起该院肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因,ST11 是主要的克隆类型,医院需尽快强化医院感染预防控制措施。

**[关键词]** 肺炎克雷伯菌;分子流行病学;耐药机制;碳青霉烯酶;脉冲场凝胶电泳;多位点序列分型;同源性

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2 R378.99<sup>+</sup>6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)09-0759-05

Antimicrobial resistance mechanism and molecular epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*ZHANG Zhi-jun<sup>1</sup>, LU Lin<sup>2</sup>, NIU Fa-xia<sup>3</sup>, ZHAO Ke<sup>4</sup>, JIANG Mei-jie<sup>1</sup>, ZHAO Shu-ping<sup>1</sup>

(1 Taian City Central Hospital, Taian 271000, China; 2 Dongfang Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China; 3 Shengli Oilfield Central Hospital, Dongying 257000, China; 4 Taishan Medical University, Taian 271016, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate carbapenemase genes and molecular epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), so as to provide laboratory basis for healthcare-associated infection (HAI) control and clinical treatment. **Methods** 13 strains of CRKP isolated from Taian City Central Hospital between January and November 2014 were collected, bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing were performed by WalkAway 96 PLUS automatic bacterial analyzer; carbapenemase phenotypes were confirmed by modified Hodge test and EDTA-disk synergy test; carbapenem resistance genes (*bla*KPC, *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*GIM, and *bla*NDM-1) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), then sequenced; clone correlation of strains was investigated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST), epidemiology comparison was performed. **Results** 13 strains of CRKP were mainly isolated from sputum ( $n = 7$ , 53.85%) and urine ( $n = 4$ , 30.77%), resistance rates to compound sulfamethoxazole and tetracycline were all low

[收稿日期] 2017-12-30

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2016HL44)

[作者简介] 张志军(1987-),男(汉族),山东省泰安市人,主管技师,主要从事细菌耐药机制与分子流行病学研究。

[通信作者] 赵书平 E-mail:dczhshp8@126.com

(all <40%), to the other antimicrobial agents (except amikacin) were all >70%, resistance rates to carbapenems were all 100%; 13 strains were all positive for modified Hodge test, 5 strains were positive for EDTA-disk synergy test; sequencing of PCR confirmed that *blaKPC* gene was most common among carbapenemase genes (13/13), followed by *blaNDM-1* gene (5/13), while *blaIMP*, *blaVIM*, and *blaGIM* gene were not found; clustering analysis of PFGE showed that 13 strains of *Klebsiella pneumoniae* were divided into 5 types, mainly type C (9/13), all belonged to ST11, others were ST37, ST626, ST628, and ST668 respectively. **Conclusion** Carbapenemase genes *blaKPC* and *blaNDM-1* are the main causes of the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to carbapenems in this hospital, ST11 is the main clone type, hospital should strengthen the prevention and control of HAI as soon as possible.

**[Key words]** *Klebsiella pneumoniae*; molecular epidemiology; drug resistance mechanism; carbapenemase; pulsed-field gel electrophoresis; multilocus sequence typing; homology

[Chin J Infect Control, 2018, 17(9): 759-763]

碳青霉烯类抗生素作为治疗产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶及多重耐药肺炎克雷伯菌感染的首选药物受到广泛关注,近年来随着临床上对该类药物应用的增加,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)已呈全球性播散,对临床感染的治疗造成极大的威胁<sup>[1]</sup>。产碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药的主要机制,碳青霉烯酶可广泛水解包括碳青霉烯类在内的所有  $\beta$ -内酰胺类抗生素,并可随着质粒播散而导致大范围的流行<sup>[2]</sup>。美国疾病控制与预防中心将 CRKP 列入了目前“最棘手的细菌”<sup>[3]</sup>。为此,本研究对 2014 年泰安市中心医院临床感染标本中分离获得的 13 株 CRKP 的耐药基因携带情况及分子流行病学特点进行了分析,旨在为临床治疗此种细菌引起的感染提供实验室依据,同时有助于及时有效的控制其流行。

## 1 资料与方法

1.1 资料来源 2014 年 1—11 月医院临床各类标本中分离的所有 CRKP 菌株(剔出同一患者相同部位检出的重复菌株),共计 13 株。

1.2 菌株鉴定与药敏试验 细菌的分离、培养严格按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)进行,使用 WalkAway 96 PLUS 型全自动细菌分析仪进行鉴定和药敏试验,替加环素的敏感性使用 Etest 法。

1.3 改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验 参照文献<sup>[3]</sup>报道的方法进行检测。

1.4 耐药基因检测 采用多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法检测碳青霉烯酶基因 *blaKPC*、*blaIMP*、*blaVIM*、*blaGIM*、*blaNDM-1*等,

引物序列参照文献<sup>[4-5]</sup>,对阳性基因进行测序,PCR 产物送上海桑尼生物科技有限公司进行检测,结果进行 BLAST 序列比对分析。

1.5 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST) PFGE 参照文献<sup>[6]</sup>的方法进行,参考菌株为沙门菌 H9812,应用 Gel Doc 系统对图像(Bio-Rad, 美国)进行拍照。MLST 中肺炎克雷伯菌 7 个管家基因的引物序列、反应体系及反应条件参见 MLST 网站,测序结果通过 MLST 数据库进行比对,获得该菌株相应的序列型别(sequence type, ST),使用 eBURST 软件分析 STs 之间的进化关系。

## 2 结果

2.1 菌株检出情况 13 株 CRKP 的标本来源主要是痰及尿,分别为 7 株(53.85%)和 4 株(30.77%),1 株(7.69%)分离自血标本,1 株(7.69%)分离自分泌物。CRKP 主要来源于各重症监护病房(ICU),其中神经外科 ICU、老年一科病房、急诊科 ICU、综合 ICU 各检出 2 株,血液内科病房、口腔科门诊、儿内二科病房、新生儿 ICU、泌尿外科病房各检出 1 株。分离出 CRKP 菌株的患者多数有基础性疾病、外伤或免疫力低下,病情较为严重,如脑出血、多器官损伤等,13 株 CRKP 来源情况见表 1。

2.2 药敏试验结果 CRKP 对替加环素均敏感,对复方磺胺甲噁唑、四环素的耐药率较低(均 <40%),其次为阿米卡星(69.23%),对其他抗菌药物的耐药率均 >70%,对碳青霉烯类药物的耐药率均为 100%。见表 2。

表 1 13 株 CRKP 标本来源、科室分布及患者情况

Table 1 Specimen sources, department distribution, and patients' condition of 13 CRKP strains

编号	标本类型	科室分布	采集日期	临床诊断
Kp-01	痰	神经外科 ICU	2014. 01. 05	脑出血
Kp-02	痰	新生儿 ICU	2014. 01. 11	早产
Kp-03	痰	老年一科病房	2014. 03. 15	肺部占位性病变
Kp-04	尿	血液内科病房	2014. 04. 17	贫血
Kp-05	痰	急诊科 ICU	2014. 06. 02	慢性阻塞性肺疾病
Kp-06	血	综合 ICU	2014. 08. 06	肺部感染
Kp-07	痰	综合 ICU	2014. 09. 02	多器官外伤
Kp-08	尿	急诊科 ICU	2014. 10. 18	窦性心动过速
Kp-09	尿	口腔科门诊	2014. 10. 20	牙龈炎
Kp-10	痰	老年一科病房	2014. 10. 28	慢性阻塞性肺疾病
Kp-11	分泌物	儿内二科病房	2014. 11. 01	急性髓系白血病
Kp-12	尿	泌尿外科病房	2014. 11. 08	泌尿系统感染
Kp-13	痰	神经外科 ICU	2014. 11. 24	脑出血

表 2 CRKP 对主要抗菌药物的药敏试验结果[株数(%)]

Table 2 Antimicrobial susceptibility testing results of CRKP(No. of isolates [%])

抗菌药物	敏感	中介	耐药
哌拉西林/他唑巴坦	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
阿莫西林/克拉维酸	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
头孢唑林	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
头孢呋辛	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
头孢噻肟	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
头孢他啶	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
头孢吡肟	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
头孢西丁	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
氨曲南	1(7.69)	0(0.00)	12(92.31)
亚胺培南	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
美罗培南	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
厄他培南	0(0.00)	0(0.00)	13(100.00)
阿米卡星	4(30.77)	0(0.00)	9(69.23)
庆大霉素	1(7.69)	2(15.38)	10(76.93)
妥布霉素	1(7.69)	2(15.38)	10(76.93)
四环素	7(53.85)	4(30.77)	2(15.38)
替加环素	13(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
左氧氟沙星	2(15.38)	1(7.69)	10(76.93)
环丙沙星	2(15.38)	0(0.00)	11(84.62)
复方磺胺甲噁唑	9(69.23)	0(0.00)	4(30.77)

2.3 改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验结果

13 株 CRKP 改良 Hodge 试验均为阳性;5 株菌 EDTA 协同试验阳性,分别为 Kp4、Kp8、Kp9、Kp10 与 Kp12,其余为阴性。见图 1 和图 2。

2.4 耐药基因检测结果 取 KPC 阳性基因 PCR 扩增产物进行测序,结果均为 KPC-2 基因,与编码 CP028790.1 序列 100% 同源,碳青霉烯酶基因中 KPC-2 型最常见(13/13),见图 3。取 NDM-1 阳性基因 PCR 扩增产物进行测序,结果均为 NDM-1 基因,与编码 CP028786.1 序列 100% 同源,有 5 株细

菌该基因阳性(5/13),见图 4。未检测到 *bla*IMP、*bla*VIM、*bla*GIM 基因。

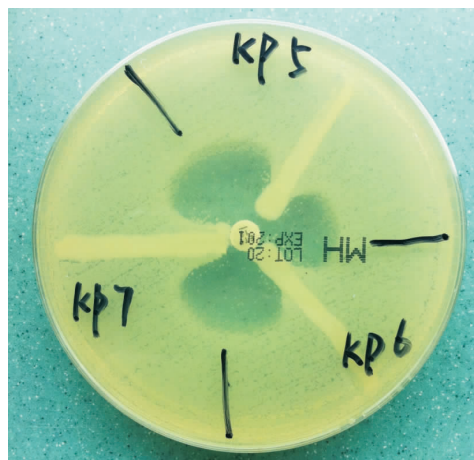


图 1 部分改良 Hodge 试验结果

Figure 1 Modified Hodge test results of partial strains

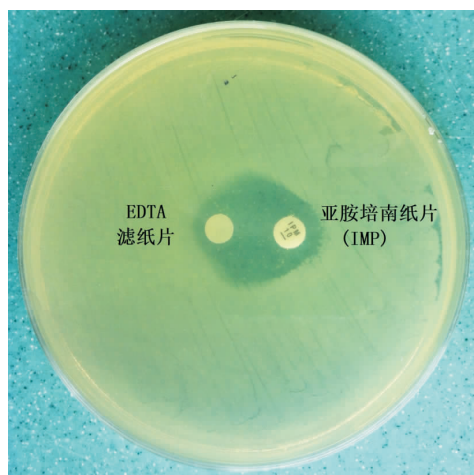
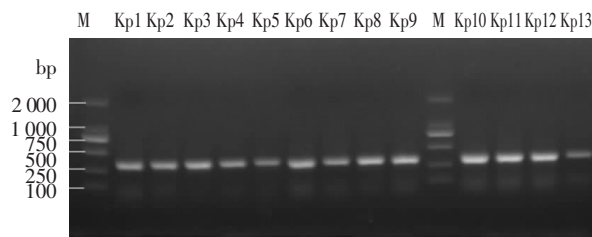


图 2 部分 EDTA 协同试验阳性结果

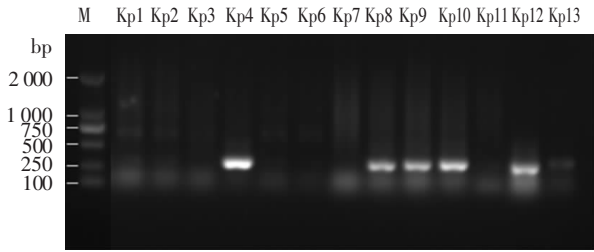
Figure 2 Positive results of EDTA-disk synergy test of partial strains



注:M 为 DNA 标志物;Kp1—Kp13 均为 *bla*KPC 基因阳性

图 3 *bla*KPC 基因 PCR 产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis map of PCR amplification products of *bla*KPC gene



注: M 为 DNA 标志物; Kp4、Kp8、Kp9、Kp10、Kp12 为 *bla*NDM-1 基因阳性; Kp1—Kp3、Kp5—Kp7、Kp11、Kp13 均为 *bla*NDM-1 基因阴性

图 4 *bla*NDM-1 基因的 PCR 产物电泳图

Figure 4 Electrophoresis map of PCR amplification products of *bla*NDM-1 gene

2.5 PFGE 分型及 MLST 结果 PFGE 聚类结果显示,以 85% 作为界值可将 13 株 CRKP 分为 5 种型别,分别为 A、B、C、D、E 型,主要为 C 型(9/13),且均属于 ST11,其他型别为 ST37、ST626、ST628 和 ST668,见图 5。eBURST 软件分析结果显示检出的 ST11、ST37 均属于克隆复合体 CC258 群,见图 6。

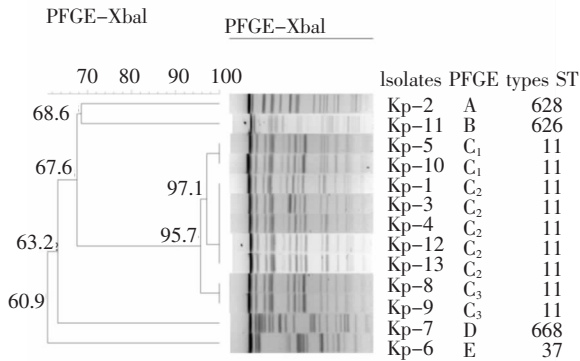
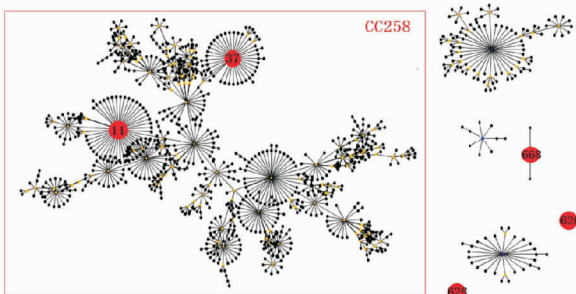


图 5 13 株 CRKP 的 PFGE 分型结果和 MLST 型别

Figure 5 PFGE typing results and MLST of 13 strains of CRKP



注:红色圆圈内数值表示本次实验中检测到的 ST 类型;红色方框内表示克隆复合体 CC258

图 6 CRKP 的 eBURST 软件分析结果

Figure 6 eBURST software analysis result of CRKP

### 3 讨论

该院 2011—2015 年肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的平均耐药率由 0.92% 逐渐上升至 6.20%<sup>[7]</sup>,但一直低于 CHINET 监测网近几年的统计结果<sup>[8]</sup>。本研究资料显示,CRKP 对临床上常用的多种抗菌药物高度耐药,对头孢菌素类、酶抑制剂复合剂、头霉素类及亚胺培南等 11 种药物的耐药率均为 100%,对替加环素均敏感,对复方磺胺甲噁唑、四环素的耐药率较低(均<40%),其次为阿米卡星,有研究<sup>[9]</sup>建议:可根据药敏结果联合用药(氨基糖苷类+替加环素)治疗此种细菌引起的感染。

本研究中 CRKP 主要分离自各 ICU 及老年科病房,提示病情严重、体弱患者是主要的易感人群;这些菌株主要分离自痰,其次为尿,表明其主要定植在呼吸道,故应加强可疑感染 CRKP 重症患者的呼吸道细菌学检查,及时发现 CRKP 有助于临床用药及治疗,提高患者生存率。

大量研究<sup>[4-6, 10]</sup>表明,肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药的机制主要有以下几点:膜孔蛋白丢失,外排机制活跃,以及碳青霉烯酶的产生等,其中碳青霉烯酶(主要为 KPC-2 型碳青霉烯酶以及金属 β-内酰胺酶)的产生是最主要的原因。然而,各地区间因抗菌药物使用不同,耐药基因的流行情况也存在一定差异。如张顺等<sup>[11]</sup>对宁波地区分离的 CRKP 菌株进行检测,发现 KPC-2 与 IMP-4 是该地区此类菌株中分离出的主要碳青霉烯酶基因,未发现 NDM-1 基因。王建友等<sup>[12]</sup>报道,乐清市地区 3 年间分离的 CRKP 菌株中,69.2% 的菌株携带 KPC-2 型碳青霉烯酶,12.5% 携带 NDM-1 基因,28.3% 的菌株同时携带 KPC-2 和 IMP-4,耐药基因呈多态性。而在北美地区<sup>[13]</sup>,除 KPC-2 和 NDM-1 碳青霉烯酶基因的检出率占绝对主导外,OXA-48 型碳青霉烯酶的检出率也逐渐增高,但与国内不同。

13 株 CRKP 均产 KPC-2 型碳青霉烯酶,说明 KPC-2 是该院肺炎克雷伯菌对亚胺培南等药物耐药的主要原因;5 株(38.46%)细菌产 NDM-1,且该 5 株菌 EDTA 协同试验阳性,说明该试验对金属酶检测的高度特异性;部分菌株同时携带两种碳青霉烯酶基因(KPC-2 与 NDM-1),说明该院碳青霉烯酶在肺炎克雷伯菌中呈现多态性,这是造成该院 CRKP 广泛流行的根本原因,但同时携带两种碳青霉烯酶基因的菌株其耐药性与其他菌株并无明显差别,可能是因为部

分基因并未表达或仅存在低水平表达。

近年来,相关研究<sup>[3, 14-15]</sup>显示,全球产 KPC 肺炎克雷伯菌的序列型主要为 ST258,在美国、以色列和意大利流行。而国内学者俞云松等<sup>[16]</sup>研究发现 ST11 是我国的优势序列类型,ST11 与 ST258 间只有一个管家基因(*tonB*)存在差别,同属于克隆复合体 CC258。

本次研究结果显示该院流行的 CRKP 也以克隆类型 ST11 为主,同时也发现了 ST37 与 ST628 等,与国内的相关报道<sup>[6-7, 17]</sup>一致。PFGE 结果显示,分离自不同病房的 CRKP 菌株(如 Kp5 与 Kp10)具有 100% 的同源性(均为 ST11),提示该院的此类菌株在一段时间内存在暴发流行现象,由于菌株采集时间不同,来源科室也不同,可能由于医护人员的流通或患者住院科室的流转,滞留在物体表面或空气中的病原菌感染了其他患者,因此,临床医生应注意手卫生与医院感染防控,应对该院碳青霉烯酶基因进行调查追踪及分子流行病学的分析,有效掌控产不同碳青霉烯酶菌株的流行情况,为医院感染进一步的防控提供坚实的实验室基础。

CRKP 在中国、希腊、美国的检出率较高<sup>[1, 3, 18]</sup>,在曾经分离率很低的欧洲国家也逐渐出现流行,对此类细菌的监测在相关感染预防控制中仍是一项重要措施。尽管各国的医疗机构、科研中心甚至包括政府部门都对 CRKP 予以高度关注,但其整体流行趋势尚未得到有效控制,因此,深入分析本地区分离的 CRKP 对碳青霉烯类抗生素的耐药机制及流行病学特点,有助于进一步实施有针对性的预防控制措施。

## [参考文献]

[1] Ma L, Lu PL, Siu LK, et al. Molecular typing and resistance mechanisms of imipenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: results from the Taiwan surveillance of antibiotic resistance (TSAR) study, 2002–2009[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(Pt 1): 101–107.

[2] Markovska R, Stoeva T, Schneider I, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type ST15 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulgaria[J]. APMIS, 2015, 123(10): 887–894.

[3] Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, et al. Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* pandemic[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e01133727.

[4] 杨金辉,吕媛.中国肺炎克雷伯菌碳青霉烯类抗生素耐药现状和流行病学分析[J].中国临床药理学杂志,2012,28(5):323–326.

[5] 沈继录,朱德妹,吴卫红,等.革兰阴性杆菌碳青霉烯酶产生与细菌耐药性关系的研究[J].中华检验医学杂志,2008,31(4):408–414.

[6] Sun K, Chen X, Li C, et al. Clonal dissemination of multilocus sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in a Chinese teaching hospital[J]. APMIS, 2015, 123(2): 123–127.

[7] 赵书平,张志军.院内不同时间段肺炎克雷伯菌的耐药性及分布[J].中华实验和临床感染病杂志,2014,8(5):651–653.

[8] 徐安,卓超,苏丹虹,等.2005—2014年CHINET克雷伯菌属细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(3):267–274.

[9] Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(6): 1119–1125.

[10] 胡付品,朱德妹,汪复,等.2012年中国CHINET碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的分布特点和耐药性分析[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(5):382–386.

[11] 张顺,黄左安,胡珊珊,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药元件分析研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(1):4–6.

[12] 王建友,周阿旺,陈丹.碳青霉烯酶在碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯杆菌的分布及分子流行病学[J].中国微生物学杂志,2015,27(5):517–520,526.

[13] Lascols C, Peirano G, Hackel M, et al. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(1): 130–136.

[14] Castanheira M, Deshpande LM, Mills JC, et al. *Klebsiella pneumoniae* isolate from a New York City Hospital belonging to sequence type 258 and carrying *bla*KPC-2 and *bla*VIM-4[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(3): 1924–1927.

[15] Barria-Loaiza C, Pincheira A, Quezada M, et al. Molecular typing and genetic environment of the *bla*KPC gene in Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2016, 4: 28–34.

[16] Yang Q, Zhang H, Wang Y, et al. A 10 year surveillance for antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community- and hospital-associated intra-abdominal infections in China[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(Pt 9): 1343–1349.

[17] Ho PL, Cheung YY, Wang Y, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a healthcare region in Hong Kong[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(3): 379–385.

[18] Lee CR, Lee JH, Park KS, et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 895.