

· 临床研究 ·

ICU 病区耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药及同源性特点分析

王媛媛^{1*}, 胡红霞¹, 梁建红², 简雪峰¹, 王 启³

¹河南科技大学第一附属医院检验科, ²感染控制科, 河南 洛阳 471003; ³北京大学人民医院检验科, 北京 100044

[摘要] 目的:分析ICU病房耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的耐药状况和同源性。方法:收集河南科技大学第一附属医院2018年3—9月肺炎克雷伯菌临床分离株171株。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)进行菌株鉴定,琼脂稀释和微量肉汤稀释法检测药物最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值,多位点序列分型(MLST)进行同源性测定, mCIM 和 eCIM 实验进行碳青霉烯酶初筛, β -内酰胺酶、血清荚膜分型基因进行PCR扩增后测序。结果:全院共检出CRKP 68株(39.8%, 68/171),其中ICU病区46株(67.6%, 46/68)。46株CRKP对头孢他啶阿维巴坦、替加环素、多黏菌素、米诺环素的耐药率分别为0、0、4.3%、41.7%;菌株在美罗培南、亚胺培南、头孢他啶、氯霉素、磷霉素、氨曲南、环丙沙星 MIC₉₀>128; 93.5%(43/46)CRKP为ST11型; 60.9%(28/46)荚膜血清分型为K47, 23.9%(11/46)为K64; 46(100%)株均携带 bla_{KPC-2}、bla_{SHV} 和 bla_{TEM}, 40株(86.96%)携带 bla_{CTX-M}, 6株(13.04%)携带 bla_{DHA}。结论:该院流行于ICU病区的CRKP菌株以ST11型为主,大多数菌株同时携带 bla_{KPC-2}、bla_{SHV}、bla_{TEM} 和 bla_{CTX-M}。细菌耐药程度高,感染控制部门应重视ICU病区的CRKP传播问题。

[关键词] 重症监护室;耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;多位点序列分型;最小抑菌浓度

[中图分类号] R378.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)10-1529-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20201023

Homology and susceptibility of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Unit

WANG Yuanyuan^{1*}, HU Hongxia¹, LIANG Jianhong², JIAN Xuefeng¹, WANG Qi³

¹Department of Clinical Laboratory, ²Hospital Infection Management Department, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003; ³Department of Clinical Laboratory, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to analyze susceptibility and homology of clinically isolated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) from ICU ward. **Methods:** A total of 171 independent CRKP isolates were collected between March 2018 and September 2018 from the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology. The isolates were identified by MALDI-TOF MS, characterized by agar dilution, microdilution methods and multilocus sequence typing (MLST). Carbapenemase phenotype was confirmed by mCIM and eCIM test. β -lactamases and serotype were detected by polymerase chain reaction and DNA sequencing. **Results:** There were 68 (39.8%, 68/171) CRKP isolates in the hospital and 46 (67.6%, 46/68) isolates of CRKP in ICU. The resistant rate of the 46 isolates to ceftazidime/avibactam, tigecycline, colistin, and minocycline were 0, 0, 4.3%, and 41.7%. MIC₉₀ of meropenem, imipenem, ceftazidime, chloramphenicol, fosfomicin, and aztreonam were over 128. Sequence type (ST) 11 (43/46, 93.5%) were predominant. K47 (60.9%, 28/46) was the most common serotype, followed by K64 (23.9%, 11/46). The isolates all harbored β -lactamases of bla_{KPC-2}, bla_{SHV}, and bla_{TEM}, and harbored bla_{CTX-M} (40/46, 86.96%), bla_{DHA} (6/46, 13.04%). **Conclusion:** Most CRKP in ICU are ST11, which co-carried bla_{KPC-2}, bla_{SHV}, bla_{TEM}, and bla_{CTX-M}. All isolates showed serious antimicrobial resistance. Nosocomial infection control may be should focus on preventing CRKP transfer in ICU.

[Key words] ICU; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; MLST; MIC

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(10): 1529-1533]

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(2018020279)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 43708015@qq.com

肺炎克雷伯菌是社区获得性和医院获得性感染的重要病原体,研究发现耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)患者病死率明显高于抗菌药物敏感的肺炎克雷伯菌感染患者^[1-2]。全国耐药监测数据显示2016年河南省CRKP检出率为23.2%^[3],到2018年这一数据达到32.5%^[4],位居全国耐药率之首。在ICU住院患者中,这一数据会更高^[5]。CRKP的高耐药性与菌株携带的各种耐药基因息息相关,在临床治疗上也面临着抗生素的选择性难题,本院在临床用药的选择上仍缺乏有效的理论支撑。本研究对河南科技大学第一附属医院ICU病房中分离出的CRKP进行抗菌药物最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值测定、分子流行病学及同源性的研究,为临床抗感染治疗与院内感染防控提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料

收集河南科技大学第一附属医院2018年3—9月检出的非重复肺炎克雷伯菌171株。质控菌株为大肠埃希菌ATCC 25922(国家卫计委临检中心),阳性对照菌株为实验室前期通过测序获得的已知KPC、NDM、SHV等酶基因阳性的菌株。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪VITEK MS(生物梅里埃公司,法国),PCR扩增仪及脉冲场凝胶电泳仪(伯乐公司,美国),凝胶成像仪(UVP公司,美国),PCR反应试剂盒(TaKaRa公司,日本),M-H琼脂、抗生素(Oxoid公司,英国)。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定

使用质谱仪VITEK MS对所有纳入筛选的菌株进行复核鉴定,质控菌株采用大肠埃希菌ATCC 25922。

1.2.2 药物敏感性实验

采用琼脂稀释法测定0.125~256.00范围内的MIC值,操作方法参考临床实验室标准化协会(CLSI)(M07,2015)标准^[6],多黏菌素药物参照欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)标准^[7],其他药物参照CLSI(M100,2019)标准^[8]进行判读。替加环素采用微量肉汤稀释法测定MIC值,参照美国食品和药物管理局(FDA)标准^[9]进行判读。

1.2.3 mCIM和eCIM实验

改良碳青霉烯类灭活实验,实验步骤参照CLSI

(M100,2019)。

1.2.4 PCR扩增及测序

经mCIM和eCIM实验筛选为阳性的菌株,采用PCR的方法检测其碳青霉烯酶(*bla*_{KPC}、*bla*_{NDM}、*bla*_{IMP})和其他β-内酰胺酶基因(*bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{DHA}、*bla*_{CMY}、*bla*_{ACT}、*bla*_{ACC}和*bla*_{VIM})。PCR产物电泳后送北京擎科生物技术有限公司进行测序。PCR引物序列、扩增体系,反应条件参考文献[10]。

1.2.5 多位点序列分型(MLST)及荚膜分型实验

肺炎克雷伯菌的MLST实验方法参考MLST分型网站(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>)。我们对网站提供的7个管家基因(*gapA*、*infB*、*mdn*、*pgi*、*phoE*、*rpoB*、*tonB*)分别行PCR后测序,测序结果与网站中MLST库进行比对,查询菌株的ST型。荚膜分型检测参考文献[11]所述设计引物,采用多重PCR方法进行K47和K64的快速筛查。

2 结果

2.1 菌株资料统计结果

采用VITEK MS复核鉴定,共收集2018年3—9月间的171株肺炎克雷伯菌。mCIM和eCIM实验显示有68株为CRKP,检出率为39.8%;其中46株来自ICU病房,占全院CRKP的67.6%。标本类型以呼吸道标本为主,少量为血液标本、脑脊液标本和导管标本(表1)。

表1 46株CRKP来源资料表

Table 1 The distribution of CRKP by clinical setting (n)

科室	菌株数	感染部位			
		痰	血	脑脊液	导管
呼吸内科ICU	14	11	2	0	1
外科ICU	17	15	0	1	1
急诊ICU	8	8	0	0	0
神经内科ICU	4	3	0	0	1
心外科ICU	3	2	1	0	0

2.2 药物敏感性实验结果

46株CRKP药物敏感性实验显示,头孢他啶阿维巴坦、氨曲南阿维巴坦、替加环素、多黏菌素、米诺环素、氯霉素、阿米卡星耐药率分别为0、0、0、4.3%、41.7%、76.0%和95.7%;对碳青霉烯类抗生素、磷霉素、加酶抑制剂的β-内酰胺类抗生素及三代或四代头孢菌素耐药率均达到100%(表2)。

2.3 耐药基因检测结果

46株CRKP经PCR检测后发现均扩增出KPC

表2 CRKP的抗生素敏感性实验结果

Table 2 Antimicrobial susceptibility testing results of CRKP isolates

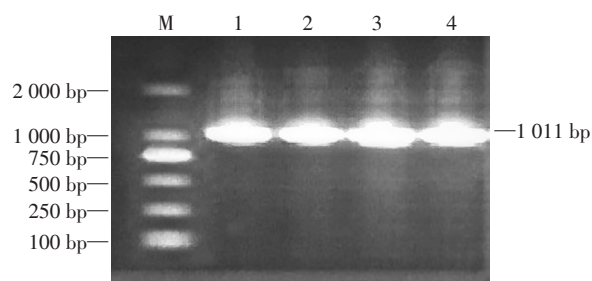
抗生素名称	肺炎克雷伯菌株(n=46)			
	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	S(%)	R(%)
头孢他啶阿维巴坦	2.0	2.0	100.0	0
氨曲南阿维巴坦	0.25	0.50	100.0	0
氯霉素	256	>256	8.7	76.0
磷霉素	256	>256	0	100.0
替加环素	0.5	1.0	95.7	0
多黏菌素	0.125	0.500	95.7	4.3
氨曲南	>256	>256	0	100.0
头孢西丁	256	>256	0	100.0
头孢吡肟	256	>256	0	100.0
头孢他啶	256	>256	0	100.0
亚胺培南	128	>256	0	100.0
美罗培南	128	>256	0	100.0
厄他培南	128	>256	0	100.0
头孢哌酮舒巴坦	256	>256	0	100.0
哌拉西林他唑巴坦	>256	>256	0	100.0
阿米卡星	>256	>256	4.3	95.7
环丙沙星	64	128	0	100.0
左氧氟沙星	32	128	0	100.0
米诺环素	8	32	37.0	41.3
头孢噻肟	256	>256	0	100.0
头孢噻肟克拉维酸	64	128	0	100.0

S: 敏感率; R: 耐药率。

基因条带(图1),未发现NDM、IMP碳青霉烯酶(电泳图未示出)。PCR产物测序后确认全部为KPC-2碳青霉烯酶。对其他β-内酰胺酶基因扩增并测序后发现46株携带bla_{SHV-11}和bla_{TEM-1},40株携带bla_{CTX-M},6株携带bla_{DHA-1}(表3);bla_{CMY}、bla_{ACT}、bla_{ACC}和bla_{VIM}等基因均未检出。

2.4 MLST及其荚膜分型结果

MLST分型显示ST11型CRKP占93.5%(43/46),除呼吸内科重症监护室外,其他科室全部为



M: DL2000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2~4: 检测样本KPC基因片段,长度为1011 bp。

图1 部分菌株KPC基因PCR电泳图

Figure 1 PCR electrophoresis map of KPC gene of some stains

ST11型。荚膜血清分型中K47型占60.9%(28/46),K64型占23.9%(11/46)(表4)。

3 讨论

由于ICU病区主要接收急重症患者,多数患者涉及转院、转科、侵入性治疗、手术治疗等等,该病区成为院内感染的高发区域,也是CRKP主要流行的区域^[5]。河南省2018年32.5%的CRKP检出率更是达到全国首位。有研究表明河南省ICU病房CRKP检出率已经达到48.1%^[9],远远高于中国细菌监测系统13.4%的平均比率^[5]。本院ICU病房CRKP的检出率为42.6%(46/108),与国内研究数据相近。如此高的感染率和CRKP的泛耐药性给临床诊治和公共卫生安全带来巨大压力和负担,因此迫切需要针对性地了解医院感染CRKP的微生物和临床特征,为全院的感染控制、ICU病房合理的用药选择提供理论依据。

CRKP感染的处理在用药选择上一直颇有难度,临床上常常采用联合用药的方式进行治疗,然而最佳联合方案和效果仍待研究。国内多中心研究发现,碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌在阿米卡星、磷霉素、氯霉素耐药率分别为45.5%、60.0%和

表3 46株ICU病区CRKP耐药基因携带情况表

Table 3 Carbapenemase genes identified in 46 strains of CRKP

[n(%)]

科室分类	碳青霉烯酶检出率		β-内酰胺酶检出率			
	KPC-2	NDM	CTX-M [*]	TEM-1	SHV-11	DHA-1
呼吸内科ICU(n=14)	14(100.0)	0	11(78.6)	14(100.0)	14(100.0)	3(21.4)
外科ICU(n=17)	17(100.0)	0	17(100.0)	17(100.0)	17(100.0)	0
急诊ICU(n=8)	8(100.0)	0	6(75.0)	8(100.0)	8(100.0)	2(25.0)
神经内科ICU(n=4)	4(100.0)	0	3(75.0)	4(100.0)	4(100.0)	1(25.0)
心外科ICU(n=3)	3(100.0)	0	3(100.0)	3(100.0)	3(100.0)	0

*: 此处CTX-M仅代表CTX-M 9组群(包含CTX-M-9、CTX-M-14等),其他群组未检出。

表4 46株ICU病区CRKP的MLST和荚膜分型分布

Table 4 Distribution of MLST and serotype in 46 strains of CRKP [n(%)]

科室分类	ST型		荚膜分型		
	ST11	其他	K47	K64	其他
呼吸内科ICU(n=14)	11(78.6)	3(21.4)	6(42.8)	4(28.6)	4(28.6)
外科ICU(n=17)	17(100.0)	0	11(64.7)	5(29.4)	1(5.9)
急诊科ICU(n=8)	8(100.0)	0	6(75.0)	0	2(25.0)
神经内科ICU(n=4)	4(100.0)	0	3(75.0)	1(25.0)	0
心外科ICU(n=3)	3(100.0)	0	2(66.7)	1(33.3)	0
合计(n=46)	43(93.5)	3(6.5)	28(60.9)	11(23.9)	7(15.2)

73.1%^[13];本研究中这些药物在ST11型CRKP中的耐药率更高,分别为95.7%、100.0%和76.0%,多黏菌素和替加环素似乎是仅有的选择。在新药阿维巴坦上市后,CRKP治疗有了新的选择。为了深入了解阿维巴坦的应用效果,本研究检测了头孢他啶阿维巴坦酶和氨曲南阿维巴坦对CRKP的MIC值,其耐药情况少见。鉴于多黏菌素对呼吸道感染的使用限制和多种不良反应,替加环素和阿维巴坦的复合抗生素可能是ICU病房在面临CRKP感染时的最佳选择。

CRKP的耐药性常常与它所携带的碳青霉烯酶相关,本研究中的CRKP对绝大多数药物表现出了相当高的耐药性。通常临床检出CRKP后不再推荐使用高MIC值药物,包括增大剂量或是延长输注时间。为进一步探讨它们高度耐药的原因,我们检测多种β-内酰胺酶基因,发现CRKP同时携带的耐药基因有KPC-2、TEM-1和SHV-11,部分菌株携带CTX-M(86.96%)和DHA(13.04%)。同时药物敏感性实验中加入了头孢噻肟和头孢噻肟克拉维酸的超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)确证实验,阳性结果仅有3例。由此可见,该院CRKP的高度耐药并非只是碳青霉烯酶的产生造成,菌株中还叠加了多种ESBLs和头孢菌素酶(AmpC酶)的耐药作用。多种酶存在条件下,ESBLs检测确证实验由于其他酶基因的作用掩盖其阳性反应而并不能真实反映菌株对酶的携带情况。

MLST分型结果中,本院以93.5%的ST11占绝对优势,且高于中国中部区域ST11占比的平均水平(65.8%)^[13],因此ICU病区的CRKP不仅有较高的发生率,也有较高的同源性。本研究中标本主要来源于呼吸道,呼吸道是ICU病房环境菌人体定植的重要方式^[14]。前期我们已有研究发现本院ICU病区的CRKP与病房环境中CRKP同源性呈高度一致^[15]。因而作为同源性较单一的流行株,重视环境监测和有效隔离会是减少本院ICU病区发生院内感染的重要方式。随着近几年人们对CRKP高毒力认识的不断加深,高毒株的传统定义^[16]遭遇挑战。Zhang等^[17]

研究显示80%的K64型ST11-CRKP成为高毒力CRKP的代表,河南省高毒力株的检出比例(25.4%)居全国前列。这与本研究23.9%的K64型检出率接近。受限于参与研究的菌株数量,我们没有更高级别的证据来判定该院高毒力株的流行状况,未来需要加强检测更多的菌株来进一步验证本结论。

作为CRKP的高发生区域,研究CRKP相关流行特征,积极寻找临床证据,尽可能地遏制感染率显得尤为重要。本研究所展现出的流行病学数据给感控工作提供了理论依据,也为进一步的研究工作打下了基础。

[参考文献]

- [1] BASSETTI M, POULAKOU G, RUPPE E, et al. Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(10):1464-1475
- [2] TEERAWATTANAPONG N, KENGKLA K, DILOKTHORNSAKUL P, et al. Prevention and control of multi-drug-resistant gram-negative bacteria in adult intensive care units: a systematic review and network meta-analysis[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(suppl2):S51-S60
- [3] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 2016全国细菌耐药监测报告[EB/OL]. (2017-12-20) [2020-03-07]. <http://www.carss.cn/Report/Details?aId=403>
- [4] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 2018全国细菌耐药监测报告[EB/OL]. (2019-11-19) [2020-03-07]. <http://www.carss.cn/Report/Details?aId=648>
- [5] HU F P, GUO Y, ZHU D M, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005-2014[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, Suppl 1:S9-S14
- [6] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—tenth edition: M07[S]. 2015
- [7] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibil-

- ity testing-twenty-ninth edition: M100[S]. 2019
- [8] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing-twenty-sixth edition: M100[S]. 2018
- [9] LI Y, SHEN H, ZHU C, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistant infections among ICU admission patients in central China: prevalence and prediction model [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 9767313
- [10] WANG Q, WANG XJ, WANG J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: data from a longitudinal large-scale CRE study in China (2012-2016) [J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67 (S2): S196-205
- [11] 谭善娟,李玲,邱蔓,等. 多学科协作联合集束化管理对ICU多重耐药菌感染预防的效果[J]. *中国感染控制杂志*, 2018, 17(2): 156-159
- [12] 程国平,简雪峰,许德英,等. MALDI-TOF MS在碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌流行病学分析中的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(1): 62-66
- [13] ZHANG Y W, ZENG J, LIU W N, et al. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China [J]. *J Infect*, 2015, 71: 553-560
- [14] ZHANG Y W, JIN L Y, OUYANG P W, et al. Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75: 327-336
- [收稿日期] 2020-03-07

(上接第1528页)

- [7] 余韬,吕飒丽,李岩. 二代测序技术分析SNP在法医学上的应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(11): 1686-1691
- [8] 刘健楠. 半乳糖凝集素-1病理生理作用的研究进展[J]. *南方农业*, 2016, 10(3): 164-165
- [9] THIEMANN S, BAUM L G. Galectins and immune responses-Just how do they do those things they do? [J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34: 243-264
- [10] NITA-LAZAR M, BANERJEE A, FENG C, et al. Desialylation of airway epithelial cells during influenza virus infection enhances pneumococcal adhesion via galectin binding [J]. *Mol Immunol*, 2015, 65(1): 1-16
- [11] 康晓蕾,林海洋,张剑琿. 流感基因多态性的研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(12): 2121-2123
- [12] BERTLEFF-ZIESCHANN N, BECHOLD J, GRIMM C, et al. exploring the structural space of the galectin-1-ligand interaction [J]. *Chem Bio Chem*, 2017, 18(15): 1477-1481
- [13] 刘健楠. 半乳糖凝集素-1病理生理作用的研究进展[J]. *南方农业*, 2016, 10(3): 164-165
- [14] NITA-LAZAR M, BANERJEE A, FENG C, et al. Galectins regulate the inflammatory response in airway epithelial cells exposed to microbial neuraminidase by modulating the expression of SOCS1 and RIG1 [J]. *Mol Immunol*, 2015, 68(2 Pt A): 194-202
- [15] YANG M L, CHEN Y H, WANG S W, et al. Galectin-1 binds to influenza virus and ameliorates influenza virus pathogenesis [J]. *J Virol*, 2011, 85(19): 10010-10020
- [16] 陈永坤. 影响流感临床严重程度的病毒及宿主相关因素研究[D]. 中国疾病预防控制中心, 2017
- [17] CHEN Y, ZHOU J, CHENG Z, et al. Functional variants regulating LGALS1 (Galectin 1) expression affect human susceptibility to influenza A (H7N9) [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8517
- [18] 宋玥,杜国平,颜文娟,等. 甲型流感易感基因单核苷酸多态性的研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(9): 1326-1330
- [收稿日期] 2019-11-10