

· 论 著 ·

碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的耐药机制研究及其在医院感染控制中的应用

李虹, 黄家遂, 王洁, 兰玉
(四川省遂宁市中心医院院感科 629000)

摘要:目的 探讨碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(CRE)的耐药机制及其在医院感染控制中的作用。方法 选取 2012 年 1 月至 2013 年 12 月某院分离得到的肠杆菌科细菌 5 604 株, 美罗培南抑菌环直径小于或等于 20 mm 的细菌 100 株, 经抗菌药物试验鉴定证实 CRE 共 11 株, 进行耐药试验; 使用微量肉汤法、改良 Hodge 试验、亚胺培南-乙二胺四乙酸(IPM-EDTA)复合纸片试验、IPM-EDTA 双纸片试验、超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)确证试验及 AmpC 试验来筛选耐药基因, 应用 PCR 检测碳青霉烯酶的基因及阳性产物测序。结果 CRE 菌株对头孢菌素类、青霉素类、碳青霉烯类及头孢西丁类等抗菌药物都表现出一定程度的耐药性, 差异无统计学意义($P > 0.05$); PCR 测序结果显示, bla_{IMP} 阳性菌株 6 株, 均属于 IMP-4 型; bla_{KPC} 阳性菌株 3 株, 均为 KPC-2 型; 细菌耐药基因检测结果方面, 筛查出 1 株携带 2 种碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌 Kpn6617, 其余筛查结果为阴性。结论 产生碳青霉烯酶是细菌耐药的主要原因, IMP-4 是主要酶型; 应重视医院感染细菌耐药性特点, 从而为临床合理用药提供参考。

关键词:碳青霉烯类抗菌药物; 肠杆菌科细菌; 耐药机制; 医院感染

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.23.028 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)23-3503-03

Resistance mechanism of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and its effect in the controlling of hospital infection

LI Hong, HUANG Jiasui, WANG Jie, LAN Yu

(Department of Nosocomial Infection, Central Hospital of Suining, Suining, Sichuan 629000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance mechanism of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in nosocomial infection control. **Methods** From January 2012 to December 2013, a total of 5 604 strains of *Enterobacteriaceae* isolated from our hospital, and 100 strains of bacteria were also isolated, which meropenem antibacterial ring diameter were less than or equal to 20 mm. And the antimicrobial test identified CRE were 11 strains by resistance test. Using the broth microdilution method, the modified Hodge test, IPM-EDTA composite susceptibility test, IPM-EDTA double disk test, ESBLs confirmatory test and AmpC test, multidrug resistance gene was screened out, and PCR was used to detect carbapenemase gene sequencing. **Results** CRE strains were resistant to penicillins, cephalosporins, carbapenems and ceftioxin, the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). PCR sequencing results showed that there were 6 bla_{IMP} positive strains, which were all belong to IMP-4 type. And there were 3 bla_{KPC} positive strains, which were all belonging to KPC-2 type. Bacterial resistance gene detection results showed that there was one strain carrying two carbapenemase gene of *Klebsiella pneumoniae*, Kpn6617, the rest strains were all negative. **Conclusion** Producing IMP-4 is the most common reason that bacteria resistant to carbapenem. Attention should be paid to the characteristics of bacterial resistance of drug-resistant infections in hospital, and thus to provide clinical reference.

Key words: carbapenem antibiotics; *Enterobacteriaceae*; resistance mechanism; nosocomial infection

肠杆菌科细菌主要包括肺炎克雷伯菌(Kpn)、大肠埃希菌(Eco)及阴沟肠杆菌(Ecl)等, 是医院感染最为主要的病原菌。碳青霉烯类抗菌药物包括美罗培南、亚胺培南(IPM)及厄他培南等, 是临床上治疗肠杆菌科细菌感染的重要抗菌药物^[1]。随着临床上该类药物的广泛使用, 耐药肠杆菌科细菌越来越多, 部分菌属的耐药率接近 10%, 部分非发酵菌属的耐药率超过 20%。目前部分碳青霉烯类耐药细菌也对其他抗菌药物耐药, 因此容易发展成为泛耐药菌株而带来医院感染的风险^[2]。本文分析碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(CRE)耐药机制, 旨在为控制医院感染提供参考, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2013 年 12 月某院分离得到的 CRE 5 604 株, 美罗培南抑菌环直径小于或等于 20 mm 的细菌 100 株, 经抗菌药物试验鉴定证实 CRE 共 11 株。

1.2 仪器与试剂 头孢西丁、美罗培南及亚胺培南等药物购自南京市药品生物检定所, 药敏纸片及 M-H 琼脂为 Oxoid 公

司生产, S1 核酸酶为 Takara 公司生产, 凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂为武汉谷歌生物公司生产。菌种鉴定使用法国梅里埃公司生产的 Vitek-2 Compact 鉴定系统^[3]。

1.3 方法 通过微量肉汤法, 检测细菌对抗菌药物的敏感性, 并且结果根据美国实验室标准化组织(CLSI)相关标准判读。最低抑菌浓度(MIC)应用 Etest 法检测, 并且根据欧洲抗菌灵敏度标准判读^[4]。耐药表型及耐药基因检测使用改良 Hodge 试验、IPM-乙二胺四乙酸(EDTA)复合纸片试验、IPM-EDTA 双纸片试验、超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)确证试验及 AmpC 试验来进行筛选, 应用 PCR 检测碳青霉烯酶的基因及阳性产物测序^[5]。应用 PCR 法来筛查菌株插入序列, 阳性扩增分析携带耐药基因与否。使用 PCR 来分析基因附属结构。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 对数据进行分析, 并对资料进行汇总。

2 结果

2.1 不同种类 CRE 对抗菌药物的 MIC 值 灵敏度方面不同

种类 CRE 对抗菌药物的 MIC 值具体见表 1。CRE 菌株对头孢菌素类、青霉素类、碳青霉烯类及头孢西丁类等抗菌药物都表现出一定程度的耐药性,耐药率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 CRE 耐药表型试验结果 PCR 测序结果显示,bla_{IMP}的

阳性菌株是 6 株,都属于 IMP-4 型;bla_{KPC}的阳性菌株是 3 株,都是 KPC-2 型,见表 2。

2.3 CRE 耐药基因检验结果 细菌耐药基因检测结果显示,筛查出 1 株携带 2 种碳青霉烯酶基因的 Kpn6617,其余筛查结果为阴性,见表 3。

表 1 CRE 抗菌药物 MIC 值(mg/L)

抗菌药物	Kpn 3059	Kpn 5669	Kpn 370	Kpn 6099	Kpn 6617	Kox 5865	Kox 656	Kox 8393	Cfr 8393	Cfr 9742	Cfr 241	Ecl 6146
青霉素	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00
头孢他啶	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	16.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00
头孢西丁	256.00	256.00	64.00	256.00	256.00	128.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00	256.00
美罗培南	0.25	128.00	32.00	32.00	256.00	64.00	0.25	64.00	32.00	32.00	32.00	32.00
亚胺培南	128.00	256.00	32.00	256.00	256.00	256.00	256.00	64.00	256.00	256.00	128.00	128.00
厄他培南	0.25	64.00	16.00	0.25	0.25	0.25	0.25	1.00	4.00	32.00	16.00	16.00

注:Kox 为产酸克雷伯菌;Cfr 为弗劳地枸橼酸杆菌

表 2 CRE 耐药表型试验结果

菌株号	改良 Hodge 试验	IPM-EDTA 双纸片试验	IPM-EDTA 复合纸片试验	ESBLs 试验	AmpC 头孢西丁试验	AmpC 氯唑西林试验
Kpn3059	+	+	+	-	+	-
Kpn5669	-	-	-	-	-	-
Kpn370	-	+	+	+	-	-
Kpn6099	-	-	-	+	+	-
Kpn6617	+	+	-	-	+	-
Kox5865	+	-	-	+	+	-
Kox656	+	-	+	-	+	-
Cfr8393	+	+	-	+	+	-
Cfr8742	+	+	+	-	+	-
Cfr241	+	+	+	-	+	-
Ecl6146	+	+	+	-	+	-

注: + 表示试验阳性; - 表示试验阴性

表 3 CRE 耐药基因检验结果

菌株号	IMP	KPC	TEM	SHV	CTX-M	DHA
Kpn3059	IMP-4	-	TEM-1	SHV-11/75	CTX-M3	-
Kpn5669	-	-	-	SHV-1	-	DHA-1
Kpn370	-	-	TEM-1	SHV-12	-	DHA-1
Kpn6099	-	KPC-2	TEM-1	SHV-B	CTX-M15	-
Kpn6617	IMP-4	KPC-2	TEM-1	OKP-B	-	-
Kox5865	-	KPC-2	TEM-1	OKP-B	CTX-M3	DHA-1
Kox656	-	-	-	-	-	-
Cfr8393	IMP-4	-	TEM-1	-	-	-
Cfr8742	IMP-4	-	TEM-1	-	-	-
Cfr241	IMP-4	-	TEM-1	-	-	-
Ecl6146	IMP-4	-	TEM-1	-	-	-

注: - 表示检测结果为阴性

3 讨 论

碳青霉烯酶是可以水解碳青霉烯类药物的 β-内酰胺酶,根据分子结构的不同可以分成 A、B、D 类。B 类是金属 β-内酰胺酶,包括 IMP、NDM、VIM,主要见于不动杆菌、铜绿假单胞菌、肠杆菌科细菌,而 A、D 类是丝氨酸酶^[6]。A 类酶主要存在于肠杆菌科各种细菌,大部分的 D 类存在于各种不动杆菌属细菌。试验结果显示,肠杆菌科细菌生成的碳青霉烯酶是主要的耐药机制,比较常见的酶型是 KPC-2 及 IMP-4^[7]。其中儿科分离得到的 CRE 菌株数量往往比较多,同时存在碳青霉烯酶基因。林琳等^[8]发现从儿科分离的 bla_{IMP-4}肺炎克雷伯菌均为 ST476 型,并且细菌同时携带 bla_{KPC-2}。同一菌株同时存在两

种不同的碳青霉烯酶基因需要引起人们的重视。CRE 对大部分的抗菌药物耐药,只有部分抗菌药物,例如氟喹诺酮类、替加环素及黏菌素可以发挥抗菌效果。研究表明部分 Cfr 能够对替加环素耐药。碳青霉烯类的抗菌药物广泛使用是 CRE 感染的重要风险因素。临床研究的结果显示,CRE 感染患者当中往往存在应用碳青霉烯类药物的记录^[8]。当前在临床上还缺乏特效药物治疗 CRE 感染,因此 CRE 感染的治疗难度较大,患者的病死率往往比较高。相关统计资料表明,ICU 患者出现 CRE 感染的病死率约为 60%,并且菌血症患者的病死率更是高达 80%^[9]。本研究结果显示,CRE 菌株对头孢菌素类、青霉素类、碳青霉烯类及头孢西丁类等抗菌药物都表现出一定程度的耐药性,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

CER 感染患者一方面病死率比较高,另一方面还容易诱发广泛的院内感染。获得性碳青霉烯酶基因能够在各种种属之间的细菌进行传播,从而诱发广泛的流行。获得性的 bla_{KPC}往往集中在转座子上,所以分析检测基因附属的结构对于了解耐药基因出现转移的具体机制有不容忽视的重要价值。相关研究的结果表明,bla_{KPC}位于 Tn3 转座子的 TM401 当中。除 bla_{KPC}基因之外,还包含解离酶基因、转座酶基因及两个插入序列^[10]。在最新研究结果显示,我国发现的 bla_{KPC-2}基因位于 Tn3 转座子及 Yn4401 片段组成的结构当中,同时拥有两种变异体。分析 bla_{KPC-2}的基因附属结构的结果显示,存在 bla_{KPC-2}转座子的结构比较符合我国常见的转座子结构^[11]。李渊婷等^[12]通过接合试验,结果显示部分 bla_{KPC-2}质粒的转移性比较

强,转座子结构及转移性质的存在使得 bla_{KPC-2} 基因能够借助于各种方式实现转移,从而导致细菌之间的互相传播。

外膜孔道菌株获得 ESBLs 基因或者编码 AmpC 之后能够进一步增强对碳青霉烯类抗菌药物的耐药水平。当前情况下, Kpn 的外膜孔道主要存在 3 种不同的蛋白,也就是 OmpK35 蛋白、OmpK36 蛋白及 OmpK37。其中 OmpK35 蛋白及 OmpK36 蛋白在渗透抗菌药物到细胞的环节有着不容忽视的价值^[13]。本文的结果显示, Knx5865 携带 bla_{KPC-2} 并且缺失 OmpK35 蛋白,集中特征就是对碳青霉烯类药物的耐药性。Kpn370 一方面含有 ESBLs 基因及 AmpC 酶基因,测序结果显示 OmpK36 基因中含有假基因,无法表达外膜孔道蛋白,同时体现出对碳青霉烯类药物的耐药性。除此之外,本研究还发现肺炎克雷伯菌 Kox656 缺失外膜孔道蛋白当中的 OmpK35 蛋白及 OmpK36 蛋白。表型试验结果表明可能同时出现抗菌药物的水解酶,不过还缺少携带酶基因的可靠证据。不过需要指出的是,PCR 法受引物设计等因素的影响可能诱发外膜孔道蛋白基因的漏检,因此无法全面体现基因表达情况,应当结合使用其他的检测方法,例如 SDS-PAGE 展开分析^[14]。

分析 CRE 的耐药机制,能够为医院感染的控制提供参考。第一,在 CRE 的治疗原则方面,依据临床上患者的微生物检验相关结果,选择使用相应的抗菌药物。应当进一步扩大微生物室抗菌药物的灵敏度检测范围,尤其是治疗范围较广的 β -内酰胺类抗菌药物,如替加环素、磷霉素及米诺环素等,从而为合理用药提供可靠的依据。在去除感染风险因素的过程中,需要最大限度降低对患者进行的各种侵袭性操作,同时要及时拔出导管并且进行脓肿引流,同时医护人员需要积极治疗患者的原发疾病。第二,在治疗方案方面,对于轻度感染患者及中度感染患者,可以采用敏感药物,例如氨基糖苷类药物、磷霉素或氟喹诺酮类药物,同时联合使用氨基糖苷类药物及环丙沙星等,或者联合使用环丙沙星及酶抑制剂等。如果患者的治疗效果不够理想,可以进一步使用替加环素或多粘菌素等^[15]。如果患者属于重度感染,需要根据患者的药物测定结果而选择敏感药物或者中介药物联合用药,如联合使用替加环素及多粘菌素,或联合使用磷霉素药物及氟喹诺酮类药物。在用药的过程中,医务人员需要密切监测患者的治疗反应,同时根据灵敏度的测定结果和患者的治疗反应来合理调整用药的方案。第三,在 CRE 感染的控制方面,首先,医院需要高度重视 CRE 监测工作。在发现 CRE 之后需要在第一时间确认,同时积极反馈到相关的科室,在指导治疗并且控制感染的基础上,按照规定进行报告。医院需要定期回顾分析耐药监测的结果,是否存在 CRE 遗漏的问题,需要采取补救干预措施;其次,要合理应用抗菌药物。医院需要严格按照合理应用抗菌药物的相关规定,把碳青霉烯类药物当作特殊使用类的药物加以管理。再次,做好医院感染的控制及预防工作。对医务人员提供感染控制方面的培训及教育,提高对 CRE 等耐药菌感染控制及预防的重视程度。

综上所述,产生碳青霉烯酶是 CRE 耐药的主要原因,IMP-4 是主要酶型;应重视医院感染细菌耐药性特点,从而为临床合理用药提供参考。

参考文献

[1] 钟桥,陆文香,高晶晶,等.碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌

耐药基因调查[J].临床检验杂志,2016,34(6):474-476.

- [2] 何清雯,李彬,曹颖平,等. VITEK-2Compact 细菌自动化鉴定与药敏仪器检测碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的性能评价[J].福建医科大学学报,2016,50(2):133-135.
- [3] Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang WC, et al. High-level carbapenem resistance in a Klebsiella pneumoniae clinical isolate is due to the combination of blaACT-I lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 50(10): 3396-3406.
- [4] 吴多荣,彭健,黄增光.碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌分子生物学研究[J].中国现代医学杂志,2015,25(21):26-30.
- [5] Woodford N, Zhang JC, Warner M, et al. Arrival of Klebsiella pneumoniae producing KPC carbapenemase in the United Kingdom [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(6): 1261-1264.
- [6] 吴伟清,油丽萍,徐茶,等.碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的 β -内酰胺酶耐药基因的研究[J].中国卫生检验杂志,2015,25(11):1856-1859.
- [7] 刘萍,闫雪雷,张坚磊,等.23株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分析[J].山东医药,2016,56(24):91-93.
- [8] 林琳,申洁心,肖晓光,等.碳青霉烯类药物耐药肠杆菌科细菌传播机制的研究[J].中国微生物学杂志,2016,28(5):555-557.
- [9] Woodford N, Tierno PM JR, Young K, et al. Outbreak of Klebsiella pneumoniae producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 48(12): 4793-4799.
- [10] 张艳君,秦琴,李虎,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的分布特点与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(2):245-247.
- [11] 杨勇文,李从荣.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因研究进展[J].山东医药,2016,56(2):96-98.
- [12] 李渊婷,金凤玲.肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物的耐药机制及临床治疗进展[J].中国感染控制杂志,2015,14(9):644-648.
- [13] Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, et al. The spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing pneumoniae to upstate New York [J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(3): 26-28.
- [14] 厉世笑,周鹏,余素飞,等.碳青霉烯类抗菌药物灵敏度下降肠杆菌科细菌耐药基因型研究[J].中国现代应用药学,2015,32(7):850-853.
- [15] 冯旭慧,袁春儿,陈捷.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床分布及耐药性[J].中国微生物学杂志,2016,28(3):312-315.

(收稿日期:2017-04-29 修回日期:2017-07-28)