

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 09. 006

耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药机制研究^{*}

程 莉, 谭婷婷, 魏红霞, 张 葵[△]

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

摘 要:目的 探讨 2014 年该院收集的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)的耐药机制。方法 采用纸片扩散法或者 Vitek 2 Compact 全自动药敏分析系统初筛亚胺培南非敏感菌株, 琼脂稀释法确证亚胺培南非敏感肺炎克雷伯菌; 通过 Carba NP 确证试验检测碳青霉烯酶表型; 通过 PCR 扩增及测序检测碳青霉烯酶基因、超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)基因、质粒携带的 AmpC 基因在菌株中携带情况; 外膜蛋白 SDS-PAGE 分析菌株外膜蛋白的改变; 外排泵抑制剂羧苄氧氟氯苯脒(CCCP)抑制试验检测不产碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌中是否存在针对碳青霉烯类抗菌药物的外排泵。**结果** 琼脂稀释法验证 30 株为碳青霉烯非敏感菌株, 其中 19 株为 Carba NP 表型试验阳性, 其中 18 株产 KPC-2, 1 株产 NDM-1。11 株 Carba NP 表型试验阴性的不产碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌的 ESBLs、AmpC 酶的携带率为 blaCTX-M 72. 7%, blaSHV 27. 3%, blaTEM 72. 7%, blaDHA 27. 3%。SDS-PAGE 结果显示编号 2368、2875、3050 的菌株 OmpK36 缺失, 其余菌株未发现外膜蛋白缺失。CCCp 存在时, 11 株不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌对亚胺培南、美罗培南和厄他培南的最小抑菌浓度值均明显降低。**结论** 碳青霉烯酶产生, 尤其是产 KPC-2 是该院 CRKP 的主要耐药机制, 外排泵的高表达, 外膜蛋白的缺失合并产 AmpC 酶也发挥了重要作用。

关键词:肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶基因; SDS-PAGE; 羧苄氧氟氯苯脒抑制试验

中图分类号: R446. 5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)09-1235-04

Mechanisms of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*^{*}

CHENG Li, TAN Tingting, WEI Hongxia, ZHANG Kui[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) isolated from our hospital in 2014. **Methods** Imipenem non-sensitive strains were screened by disk diffusion method or Vitek 2 Compact automatic susceptibility analysis system and confirmed by agar dilution method. Carbapenemases phenotypes was confirmed by Carba NP test. Carbapenem resistance genes, superwide-spectrum β lactamase (ESBLs) genes and plasmid-carrying AmpC gene were amplified by PCR and sequenced. The changing of outer membrane protein of the strain was analysed by SDS-PAGE methods. Efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCp) inhibition test was used to detected the role of efflux pump in carbapenem-resistance *Klebsiella pneumoniae*. **Results** A total of strains of carbapenem-resistant strains were confirmed by agar dilution method, and 19 strains producing KPC-2 carbapenemase strain of which were Carba NP phenotype positive 18 strains producing KPC-2, 1 strain producing NOM-1. The rate of blaCTX-M, blaSHV, blaDHA blaTEM in the strains which producing no carbapenemase were 72. 7%, 27. 3%, 27. 3% and 72. 7%. The results of SDS-PAGE showed that only the OmpK36 protein of strain No. 2368, No. 2875, No. 3050 were lost. In the presence of CCCp, the minimum inhibitory concentration (MIC) of Imipenem, Meropenem and Ertapenem in the 11 KPC2-producing strains was significantly descend. **Conclusion** The production of carbapenemase, especially KPC-2 is CRKP to carbapenem antibiotics in *Klebsiella pneumoniae*, followed by high expression of efflux pump and the production of AmpC.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase gene; SDS-PAGE; efflux pump carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone inhibition test

^{*} 基金项目: 江苏省南京市医学科技发展资金资助项目(ZKX13028)。

作者简介: 程莉, 女, 技师, 主要从事临床微生物学及耐药机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: 13505151066@163. com。

肺炎克雷伯菌是临床分离及医院感染重要的条件致病菌之一,常引起重症肺炎,还可引起泌尿道感染、胆道感染、败血症和化脓性脑膜炎等严重疾病^[1],其发病率和病死率较高。目前研究数据表明其对第 3 代头孢菌素的耐药率高达 40.0%~70.0%,由于多重耐药细菌的出现,作为治疗肠杆菌科细菌感染“最后一道”防线的碳青霉烯类抗菌药物正被广泛应用于治疗此类细菌引起的感染,从而引起耐碳青霉烯肠杆菌科细菌,尤其是耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)的大量出现,并在全球范围内的广泛播散,对公共卫生造成了极大的威胁。本研究探讨了本院 2014 年临床分离的 CRKP 的耐药机制,旨在为临床预防及控制 CRKP 的进一步产生及播散提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集本院 2014 年 1—12 月临床分离的肺炎克雷伯菌,剔除同一患者相同部位分离的重复菌株,所有菌株均经法国生物梅里埃 ATB 细菌鉴定仪或 Vitek 2 Compact 全自动细菌鉴定仪鉴定菌株。

1.2 仪器与试剂 药敏纸片为 Oxoid 公司产品;PCR 引物由 Invitrogen 公司合成;2×PCRMix、PCR 产物纯化试剂盒均购自北京天根公司;ATB 细菌鉴定仪和 Vitek 2 Compact 全自动细菌鉴定仪购自法国生物梅里埃公司。PCR 扩增仪购于爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司,羧苄酰氯苯胺(CCCP)试剂购于 Sigma aldrich 公司,SDS-PAGE 所用分离胶和浓缩胶为碧云天公司产品。

1.3 药敏试验 采用纸片扩散法(K-B 法)或者 Vitek 2 Compact 全自动药敏分析系统[最小抑菌浓度(MIC)法]初筛亚胺培南不敏感菌株,琼脂稀释法确证亚胺培南不敏感肺炎克雷伯菌。结果判读参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI) 2015 年推荐的标准。药敏试验使用的质控菌株大肠杆菌 ATCC25922 购自国家卫生和计划生育委员会临床检验中心。

1.4 Carba NP 确证试验 用接种环挑取一接种环的待测细菌(琼脂稀释法确定为亚胺培南不敏感的肺炎克雷伯菌),分别在加入含有 100 mL 细菌总蛋白抽提试剂的“a”和“b”离心管中乳化,震荡 5 s。在两管中分别加入 100 mL 的 A 液和 B 液,混匀,(35±2)℃ 孵育 2 h,结果根据 2015 年 CLSI 的规定标准进行判断。

1.5 耐药基因检测 对所收集菌株进行碳青霉烯酶基因(blaKPC、blaNDM、blaVIM、blaOXA、blaIMP、blaSPM、blaAIM、blaGIM、blaSIM、blaDIM、blaBIC)检测,不产碳青霉烯酶基因的菌株进行超广谱β-内酰胺酶基因(ESBLs)(blaTEM、blaCTX-M、blaSHV),质粒携带的 AmpC 基因(blaGES、blaPER、blaVEB、

blaACC、blaFOX、blaMOX、blaCIT、blaEBC、blaDHA)检测。水煮法提取细菌基因组 DNA,取 2 μL 上清液作为 PCR 模板。PCR 反应体系为 50 μL,其中,2×PCR 混合标记物为 25 μL,模板 DNA 2 μL,上下游引物各 2 μL。引物序列参照文献产物^[2-3]。经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后紫外成像观察结果,收集可疑 PCR 阳性产物送上海美吉有限公司进行测序,所得到的测序结果通过 NCBI 数据库进行在线 BLAST 比对以确定。

1.6 外膜蛋白 SDS-PAGE 采用超速破壁法制备 11 株不产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌外膜蛋白,其中不溶于月桂酰基氨基酸钠的蛋白组分即为外膜蛋白样品,将其加入 10%聚丙烯酰胺分离胶中进行 SDS-PAGE 电泳分析,最后用考马斯亮蓝染色。其中标准菌株为 ATCC 13883。

1.7 外排泵抑制剂 CCCP 抑制试验 用 CCCP 抑制试验分析 11 株不产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌是否存在对碳青霉烯类抗菌药物主动外排现象。同时制备不含 CCCP 和含有 50 μmol/L CCCP 的亚胺培南、美罗培南、厄他培南梯度浓度(0.125~64.000 μg/mL 倍比稀释)的 M-H 琼脂平板,测定细菌 MIC。以加入泵抑制剂后 MIC 值比不加泵抑制剂降低至≤1/4 作为外排泵表型阳性的判定标准。

2 结果

2.1 药敏试验及 Carba NP 确证试验结果 K-B 法或者 MIC 法初筛亚胺培南不敏感性菌株为 35 株,经琼脂稀释法确证亚胺培南不敏感肺炎克雷伯菌为 30 株。其中 19 株为 Carba NP 试验阳性,11 株为 Carba NP 试验阴性。

2.2 耐药基因检测结果 19 株 Carba NP 确证实验阳性的肺炎克雷伯菌中 18 株为 KPC-2 阳性,1 株为 NDM-1 阳性;ESBLs 和 AmpC 酶的携带率为:blaCTX-M 63.2%(12/19),blaSHV 15.8%(3/19) blaTEM 47.4%(9/19);无 AmpC 酶的检出。Carba NP 试验阴性的肺炎克雷伯菌未检测到碳青霉烯酶基因,ESBLs 和 AmpC 酶的携带率为:blaCTX-M 72.7%(8/11),blaSHV 27.3%(3/11),blaDHA 27.3%(3/11),blaTEM 72.7%(8/11)。未检测到其他 ESBLs 基因。见表 1。

2.3 外膜蛋白 SDS-PAGE 结果 不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌外膜蛋白经 SDS-PAGE 检测表明:编号 2368、2875、3050 的菌株 OmpK36 缺失,其他菌株未见外膜蛋白缺失。见表 2。

2.4 CCCP 抑制试验结果 加入 CCCP 时 11 株不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌对亚胺培南、美罗培南和厄他培南的最小抑菌浓度值与 CCCP 不存在时的 MIC 值有明显变化,均降低 4 倍及以上。

表 1 19 株产碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌

菌株编号	分离日期	标本来源	病区	耐药基因
2711	2014-5-13	痰液	心胸外科	KPC-2、CTX-M-14
2975	2014-7-19	痰液	心胸外科	KPC-2、CTX-M-14
2660	2014-4-28	痰液	ICU	KPC-2、TEM-1
2505	2014-3-10	痰液	ICU	KPC-2、TEM-1
2658	2014-4-28	痰液	神经外科	KPC-2、TEM-1
2713	2014-5-12	痰液	ICU	KPC-2、CTX-M-14
2509	2014-3-11	痰液	老年科	KPC-2、TEM-1
3204	2012-4-21	痰液	急诊	KPC-2、CTX-M-14、SHV-160、TEM-1
3198	2014-9-28	尿液	ICU	KPC-2、CTX-M-14、TEM-1
2357	2014-1-7	分泌物	男科	KPC-2、TEM-1
2736	2014-5-17	痰液	心胸外科	KPC-2、CTX-M-14
2785	2014-5-27	血液	心胸外科	KPC-2、CTX-M-14
3213	2014-10-10	腹水	消化内科	KPC-2
2726	2014-5-15	痰液	呼吸内科	KPC-2、CTX-M-38
2732	2014-5-16	痰液	神经内科	KPC-2、CTX-M-14
2630	2014-4-21	痰液	烧伤整形外科	KPC-2、CTX-M-15、TEM-1
3019	2014-8-1	痰液	心脏内科	KPC-2、CTX-M-14、SHV-28
3110	2014-8-27	血液	ICU	KPC-2、SHV-31
2744	2014-5-19	分泌物	烧伤外科	NDM-1、TEM-1、CTX-M-15

注:ICU 为重症监护室

表 2 11 株不产碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌

菌株编号	分离日期	标本来源	病区	耐药基因	MEM	MEM+CCCP	ETP	ETP+CCCP	IPM	IPM+CCCP
2368	2014-1-8	胆汁	消化内科	DHA-1、SHV-33、CTX-M-14	8	<0.5	>64	<0.5	16	2.0
2462	2014-2-20	腹水	ICU	SHV-11、TEM-1、CTX-M-14	>64	<0.5	>64	<0.5	64	<0.5
2533	2014-3-18	痰液	神经外科	SHV-12、TEM-1	>64	<0.5	>64	<0.5	32	4.0
2672	2014-5-3	分泌物	ICU	TEM-1、CTX-M-142	4	<0.5	32	<0.5	4	<0.5
2753	2014-5-20	血液	普通外科	TEM-1、CTX-M-14	64	<0.5	>64	<0.5	32	<0.5
2847	2014-6-13	分泌物	呼吸内科	TEM-1、CTX-M-14	16	<0.5	64	<0.5	8	<0.5
2875	2014-6-22	胆汁	消化内科	DHA-1、TEM-1、CTX-M-14	4	<0.5	64	<0.5	16	<0.5
2903	2014-7-1	尿液	老年科	TEM-1、CTX-M-15	>64	<0.5	>64	<0.5	32	<0.5
3050	2014-8-6	咽拭子	老年科	DHA-1、TEM-1	>64	<0.5	>64	<0.5	16	<0.5
3295	2014-11-8	痰液	老年科	CTX-M-14	4	<0.5	8	<0.5	2	<0.5
3333	2014-11-20	胆汁	普通外科	—	16	<0.5	>64	<0.5	32	<0.5

注:—为无数据;ICU 为重症监护室

3 讨 论

CRKP 的出现及播散,对医院的患者及医护人员的安全造成了极大的威胁,可用于治疗此类细菌感染的药物非常有限。明确此类细菌的耐药机制,对于及时有效地采取控制措施有很大的指导作用。目前研究发现碳青霉烯酶的产生,尤其是 KPC-2 的产生是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因^[4-5];其次为 ESBLs 或 AmpC 基因过度表达合并外膜孔蛋白的丢失;外排泵的高表达导致的耐药在肺

炎克雷伯菌中极少见,主要见于非发酵菌^[6-8]。

本研究证实碳青霉烯酶的产生,尤其是 KPC 酶的产生是本院肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因。进一步探究 11 株不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌具体耐药机制发现:对不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌进行 ESBLs 检测时,72.7% (8/11)的菌株检测到 TEM-1,其属于广谱内酰胺酶,而非 ESBLs。CCCP 抑制试验显示 CCCP 的存在使得 11 株菌株的 MIC 降低 4 倍及以上,因此推断这 11

株菌中可能存在针对碳青霉烯类抗菌药物的外排泵从而导致菌株耐药。

LEE 等^[9]研究发现对于产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌只缺失一种膜孔蛋白不会引起碳青霉烯耐药,而产 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌缺失一种或者两种膜孔蛋白均可导致碳青霉烯耐药或者中介。编号 2368、2875、3050 的菌株 SDS-PAGE 结果显示 OmpK36 缺失,且同时表达 AmpC 酶,提示这 3 株菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药是由 AmpC 酶过度表达合并外膜孔蛋白 OmpK36 的丢失,以及外排泵高表达共同作用导致的。其余 8 株不产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌的耐药机制主要为外排泵的高表达所致。

综上所述,碳青霉烯酶尤其是肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶的产生是本院肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因,其次为外排泵高表达。同时也发现,2014 年分离 CRKP 菌株中存在多种耐药机制的协同作用:高产 AmpC 酶,外排泵高表达,外膜蛋白缺失。

参考文献

- [1] GIANNELLA M, TRECARCHI E M, GIACOBBE D R, et al. Effect of combination therapy containing a high dose carbapenem on mortality in patients with carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae bloodstream infection[J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 51(2): 244-248.
- [2] POIREL L, DORTET L, BERNABEU S, et al. Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(11): 5403-5407.
- [3] DALLENNÉ C, DA COSTA A, DECRÉ D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacte-

riaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 490-495.

- [4] WEI Z Q, DU X X, YU Y S, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 763-765.
- [5] YU W, ZHOU K, GUO L, et al. In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics evaluation of fosfomycin combined with amikacin or colistin against KPC2-producing Klebsiella pneumoniae[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 16(7): 246.
- [6] PAVEZ M, VIEIRA C, DE ARAUJO M R, et al. Molecular mechanisms of membrane impermeability in clinical isolates of Enterobacteriaceae exposed to imipenem selective pressure[J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 48(1): 78-85.
- [7] LIN M F, LIN Y Y, TU C C, et al. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and their correlation with antimicrobial resistance. [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2017, 50(2): 224-231.
- [8] DIAS V C, RESENDE J A, BASTOS A N, et al. Epidemiological, physiological, and molecular characteristics of a brazilian collection of carbapenem-resistant acinetobacter baumannii and pseudomonas aeruginosa[J]. Microb Drug Resist, 2017, 22: 13753-13763.
- [9] LEE K, YONG D, CHOI Y S, et al. Reduced imipenem susceptibility in Klebsiella pneumoniae clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 beta-lactamases co-mediated by porin loss[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 29(2): 201-206.

(收稿日期: 2017-12-06 修回日期: 2018-01-28)

(上接第 1234 页)

- 治疗指南[J]. 中华神经科杂志, 2012, 45(11): 818-823.
- [5] FERRO J M, CANHÃO P. Cerebral venous sinus thrombosis: update on diagnosis and management[J]. Curr Cardiol Rep, 2014, 16(9): 523.
- [6] 黄启涛, 钟梅, 王晨虹, 等. 广东省不同地域孕产妇围生期栓塞性疾病流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(4): 413-417.
- [7] 孟利军, 孟胜君, 黄捷, 等. 孕产妇颅内静脉窦血栓形成的临床特点及治疗变化[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(20): 2249-2250.
- [8] NIE Q, GUO P, GE J, et al. Cerebral venous sinus thrombosis with cerebral hemorrhage during early pregnancy [J]. Neurosciences (Riyadh), 2015, 20(1): 48-51.
- [9] 孙成梅, 孙华娟, 居克举, 等. 孕产妇颅内静脉窦血栓形成的危险因素及预防[J]. 江苏医药, 2014, 40(4): 468-470.
- [10] 迪丽努尔, 卡米拉, 阿尔孜古丽·木塔力甫. 分娩前孕妇产浆 D 二聚体与 FDP 联合检测的临床意义[J]. 血栓与止血学, 2016, 22(4): 424-425.

- [11] 袁恩武, 张玉璐, 娄小凤, 等. 正常孕妇不同孕期 D-二聚体和纤维蛋白降解产物参考区间调查[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(18): 2934-2936.
- [12] 邓群英, 张宏. 妊娠期女性血浆抗凝血酶Ⅲ和 D-二聚体参考区间的建立[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(3): 341-343.
- [13] 许燕京, 朱然, 孙旖旎, 等. 抗凝血酶Ⅲ对脓毒症 DIC 的早期诊断价值: 附 445 例患者的回顾性分析[J]. 中华危重病急救医学, 2017, 29(2): 127-132.
- [14] KIM K A, LIM Y Y, KIM S H, et al. Bioequivalence of two intravenous formulations of antithrombin Ⅲ: a two-way crossover study in healthy Korean subjects[J]. Clin Ther, 2013, 35(11): 1752-1761.
- [15] 白琳, 代允义, 李志强, 等. 孕产妇合并颅内静脉窦血栓形成的临床特征及治疗对策[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(7): 12-15.

(收稿日期: 2017-12-04 修回日期: 2018-01-26)