

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20195329

· 论 著 ·

## CRKP 碳青霉烯酶基因检测及同源性分析

陈 娅<sup>1</sup>, 邱隆敏<sup>2</sup>

(遵义医科大学附属医院 1. 感染科; 2. 感染管理科, 贵州 遵义 563003)

**[摘要]** **目的** 了解某院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)碳青霉烯酶基因携带状况,以及菌株间的同源性,为预防和控制 CRKP 的克隆传播提供实验室依据。**方法** 收集 2017 年 1—12 月该院分离自临床各科室的 CRKP 22 株(K1~K22),用药敏纸片扩散法和微量肉汤稀释法对药敏结果进行复核,采用改良 Hodge 试验和 Carba NP 试验检测菌株是否产碳青霉烯酶,应用 PCR 技术扩增产酶菌株常见的碳青霉烯酶基因并测序,运用多位点序列分型(MLST)和肠杆菌科基因间一致重复序列 PCR(ERIC-PCR)进行同源性分析。**结果** 22 株 CRKP 对厄他培南、亚胺培南、美罗培南的耐药率均为 100%,对临床其他常见抗菌药物也高度耐药;13 株改良 Hodge 试验阳性,14 株 Carba NP 试验阳性。14 株产酶菌株均携带 KPC-2 基因,K12 菌株同时携带 NDM-1 基因。按 MLST 法可分为 ST11(14 株)、ST875(6 株)、ST1964 和 ST571(各 1 株),按 ERIC-PCR 法分型可分为 A 型(15 株)、B 型(6 株)及 C 型(1 株)。分型结果相同的菌株中 K1~K6 同属 ICU,K7~K10 同属脑血管外科,K15~K21 同属新生儿科,对应患者有共同住院时间,且患者存在转科情况(K2、K8 患者均由脑血管外科转入 ICU,K13、K14 分别从 ICU 转入血液内科、肾内科)。**结论** 该院 2017 年存在 ST11 型和 ST875 型 CRKP 的克隆流行,需加强医院感染预防与控制措施。

**[关键词]** 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;肺炎克雷伯菌;碳青霉烯酶基因;同源性

**[中图分类号]** R181.3<sup>†</sup>2

## Carbapenemase gene detection and homology analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

CHEN Ya<sup>1</sup>, QIU Long-min<sup>2</sup> (1. Department of Infectious Diseases; 2. Department of Health-care-associated Infection Management, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

**[Abstract]** **Objective** To understand the carrying status of carbapenemase gene and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) in a hospital, so as to provide laboratory basis for preventing and controlling transmission of CRKP clone strain. **Methods** 22 strains of CRKP (K1-K22) isolated from clinical departments in a hospital from January to December 2017 were collected, antimicrobial susceptibility testing results were re-checked by Kirby-Bauer disk diffusion and broth microdilution method, carbapenemase production was detected by modified Hodge test and Carba NP test, common carbapenemase genes of enzyme-producing strains were amplified and sequenced by polymerase chain reaction (PCR), homology analysis was performed by multilocus sequence typing (MLST) and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR). **Results** Resistance rates of 22 CRKP to ertapenem, imipenem and meropenem were all 100%, resistance to other common clinical antimicrobial agents were also high; 13 strains of CRKP were positive for modified Hodge test and 14 were positive for Carba NP test. KPC-2 gene was carried by 14 enzyme-producing strains, NDM-1 gene was also carried by K12 strain. According to MLST method, CRKP strains were divided into ST11 ( $n=14$ ), ST875 ( $n=6$ ), ST1964 ( $n=1$ ), and ST571 ( $n=1$ ). According to ERIC-PCR method, CRKP strains were divided into type A ( $n=15$ ), type B ( $n=6$ )

[收稿日期] 2019-04-05

[作者简介] 陈娅(1992-),女(汉族),贵州省遵义市人,住院医师,主要从事感染性疾病的研究。

[通信作者] 邱隆敏 E-mail: qiulm128@163.com

and type C ( $n=1$ ). K1-K6 strains with the same typing results were from intensive care unit (ICU), K7-K10 were from cerebrovascular surgery, and K15-K21 were from neonatology, corresponding patients had the same hospital stay, and they had been transferred (patients K2 and K8 were transferred from cerebrovascular surgery to ICU, K13 and K14 from ICU to departments of hematology and nephrology respectively). **Conclusion** Cloning epidemics of ST11 and ST875 CRKP existed in this hospital in 2017, it is necessary to strengthen the prevention and control measures of healthcare-associated infection.

[**Key words**] carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase gene; homology

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KPN)是革兰阴性( $G^-$ )杆菌,需氧或兼性厌氧,属于机会性病原体,广泛分布于医院的各种环境中,可引起患者多种组织器官的感染,常见的有血液系统、呼吸系统、泌尿系统等。 $\beta$ -内酰胺类抗生素中,抗菌活性最强、抗菌谱最广的是碳青霉烯类抗生素,因其只对细菌有杀伤作用,故对宿主毒性小,对头孢菌素酶(AmpC 酶)及超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)作用效果稳固,是治疗大多数革兰阳性( $G^+$ )菌、 $G^-$ 菌及耐药菌感染的极佳药物。但近年来,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的检出率逐步攀升,并已在全球多个国家散发和(或)流行<sup>[1-2]</sup>。CRKP 的耐药机制极其复杂,结合各个国家和地区的研究报道<sup>[3-4]</sup>,主要包括以下四个方面:(1)产碳青霉烯酶;(2)高产 AmpC 酶或 ESBLs,且外膜孔蛋白(outer membrane porin, OMP)缺失或者 OMP 表达量减少;(3)青霉素结合位点缺失;(4)外排泵系统作用等,其中以产碳青霉烯酶最常见和重要。本研究收集 2017 年 1—12 月某大型三甲医院分离自临床各科室的 CRKP,检测碳青霉烯酶基因,并进行同源性分析,发现该院 2017 年存在 ST11 型和 ST875 型 CRKP 的克隆流行,现报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集某三甲医院 2017 年 1—12 月临床各科室分离的 CRKP 22 株。菌株入选标准:(1)为 CRKP;(2)少数患者住院期间多次培养出 CRKP,则纳入该患者首次培养的 CRKP;(3)CRKP 感染患者住院资料完整。质控菌株为大肠杆菌 ATCC 25922(购于大连宝公司),阳性对照菌为该院 2016 年发现的并经测序确证的产 KPC-2 型

CRKP 和产 NDM-1 型 CRKP。

1.2 主要仪器和试剂 VITEK 2 Compact 分析系统(生物梅里埃公司),高速离心机(德国 Sigma 公司),PCR 扩增仪、PowerPac Basic 电泳仪、Gel-DocXR 凝胶成像系统均为美国伯乐 Bio-Rad 公司产品,厄他培南(ETP)、亚胺培南(IPM)及美罗培南(MEM)三种  $10 \mu\text{g}$ /片的药敏纸片均为 Oxoid 公司产品,IPM 粉剂及 ETP 粉剂购自杭州默沙东公司, MEM 粉剂购自深圳市海滨公司,细菌蛋白提取试剂盒、M-H 培养基、酚红、EDTA、琼脂糖 Agarose、硼酸、Tris 碱、GoldView I 型核酸染色剂均为北京索来宝产品,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (上海拜力公司),引物合成(上海生工),  $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ (北京派拓公司),DNA Marker(2 000 bp)(宝日医公司)等。

### 1.3 试验方法

1.3.1 药敏试验 试验结果判断参照 2018 版美国临床实验室标准化协会标准(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)<sup>[5]</sup>。

1.3.1.1 药敏纸片扩散法(K-B 法) 采用 K-B 法测定菌株对 IPM、MEM 及 ETP 三种药敏纸片的抑菌圈直径。

1.3.1.2 微量肉汤稀释法 通过微量肉汤稀释法测定菌株对 IPM、MEM 和 ETP 的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

### 1.3.2 碳青霉烯酶检测

1.3.2.1 改良 Hodge 试验(modified Hodge testing, MHT) 取适量大肠埃希菌 ATCC 25922 的菌落置于生理盐水中,用比浊仪配制成 0.5 麦氏单位,  $1:10$  稀释后分别均匀涂布于 3 个 M-H 琼脂平板,干燥 3~10 min 后,3 个平板中央分别贴 IPM、MEM 及 ETP 药敏纸片,从平板边缘向纸片边缘依次划线接种待测菌株、阳性对照及阴性对照菌,直线至少长 20~25 mm,需氧( $35 \pm 2$ ) $^\circ\text{C}$  培养 16~20 h 后观察结果。判断标准:待测菌株若产生碳青霉烯

酶(MHT 阳性),则大肠埃希菌 ATCC 25922 的抑菌环周边和待测菌株接种线交汇处有菌株增强生长的情况,呈苹果蒂现象。

1.3.2.2 Carba NP 试验 Carba NP A 液为取 2 mL 0.5% 的酚红溶液加入到 16.6 mL 的实验室试剂用水中,再加入 180  $\mu$ L 10 mmol/L 的  $ZnSO_4$  溶液,使每毫升的 5 g/L 酚红中含 0.1 mmol/L 的  $ZnSO_4$ ,使将 A 液 pH 值调至  $7.8 \pm 0.1$ ,Carba NP B 液为 A 液 + 6 mg/mL 亚胺培南,A、B 液的颜色均为红色或橘红色。分别在 2 支离心管(a 管、b 管)中加入 100  $\mu$ L 细菌蛋白提取试剂,2 支管中分别加入 1~2 个菌落的待测菌(空白对照组只含细菌蛋白提取试剂,不含待测菌),涡旋振荡 5 s 后在 a 管中加入 100  $\mu$ L A 液,b 管中加入 100  $\mu$ L B 液,将 a 管和 b 管均置入  $(35 \pm 2)^\circ C$  的恒温培养箱中培养 2 h,每 30 min 观察一次溶液颜色是否变化。判断结果参照 2018 版 CLSI 标准<sup>[5]</sup>。

1.3.3 PCR 扩增耐药基因 运用煮沸法提取菌株 DNA 模板,PCR 扩增以下耐药基因:KPC、SME、IMI、NDM-1、IMP、SIM、VIM、OXA-48,引物序列参照相关文献<sup>[6-8]</sup>,由上海生工公司合成。扩增体系为 25  $\mu$ L 体积,包括 2  $\times$  PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L、DNA 模板 2  $\mu$ L、100  $\mu$ mol/L 上游引物 0.1  $\mu$ L、100  $\mu$ mol/L 下游引物 0.1  $\mu$ L、加 PCR 超纯水至 25  $\mu$ L。PCR 扩增条件:94 $^\circ C$  3 min 预变性,94 $^\circ C$  30 s 变性,退火温度(KPC、SME、IMI、NDM-1、IMP、SIM、VIM、OXA-48 59、45、47、58、50、53、54、56 $^\circ C$ ) 30 s 退火,72 $^\circ C$  1 min 延伸,35 个循环,72 $^\circ C$  10 min 再延伸。取 5  $\mu$ L 的 PCR 产物加入 1.2% 的琼脂糖凝胶孔中,在 0.5  $\times$  TBE 电泳液中电泳,在凝胶成像系统中观察结果。将 PCR 扩增阳性的产物送上海生工纯化并测序,测序结果用 MegAlign 软件与基因库中的序列进行比对。

#### 1.3.4 同源性分析

1.3.4.1 多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST) 参照 MLST 官方网站(<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>)上提供的 KPN 的 7 个管家基因(*gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*rpoB*、*tonB*)序列合成引物,扩增体系同 1.3.3,

扩增条件为 94 $^\circ C$  5 min 预变性,94 $^\circ C$  50 s 变性,50 $^\circ C$  30 s 退火,72 $^\circ C$  50 s 延伸,30 个循环,72 $^\circ C$  10 min 再延伸。PCR 产物送上海生工公司测序,将测序结果与 MLST 数据库比对,得到等位基因编码,将所得编码按照 *gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*rpoB*、*tonB* 管家基因顺序组合,在 MLST 数据库中对查找完全符合的 ST 型。

1.3.4.2 肠杆菌科基因间一致重复序列 PCR(enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR,ERIC-PCR) 基因引物序列为:ERIC-1: 5'-ATG-TAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; ERIC-2: 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'。扩增体系同 1.3.3,扩增条件为 94 $^\circ C$  3 min 预变性,94 $^\circ C$  30 s 变性,55 $^\circ C$  30 s 退火,72 $^\circ C$  1 min 延伸,35 个循环,72 $^\circ C$  10 min 再延伸。PCR 产物电泳结果判断标准为:如果菌株属于同一类型,则电泳条带的数量和位置相同<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

2.1 菌株资料 22 株 CRKP 主要分离自新生儿科及 ICU,分别占 31.81%、27.27%,其余为脑血管科(18.18%)、其他科室(呼吸内科、胸外科、全科病房、血液内科、肾内科各占 4.55%)。22 例 CRKP 感染患者中,11 例年龄  $\geq 60$  岁,6 例年龄  $< 28$  d;呼吸道感染者 13 例;所有患者均患 2 种或以上基础疾病;20 例患者住院期间有过  $\geq 2$  项的侵入性操作或治疗;20 例患者住院期间使用抗菌药物种类  $\geq 2$  种。见表 1。

2.2 药敏结果 22 株 CRKP 对 ETP、IPM 和 MEM 耐药率均为 100%,对临床其他常见抗菌药物也保持高度耐药,对氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、氨曲南 100% 耐药,对头孢吡肟、呋喃妥因、头孢替坦、环丙沙星、左氧氟沙星耐药率  $> 60\%$ ,对复方磺胺甲噁唑、米诺环素、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星耐药率为 36%~50%,对多粘菌素尚有较好的敏感性(敏感率 75%)。

表 1 22 例 CRKP 感染患者的基本资料

Table 1 Basic data of 22 patients with CRKP infection

编号	性别	年龄	感染部位	基础疾病	侵入性操作或治疗	感染前使用抗菌药物种类
K1	男	85 岁	呼吸道	1、2、12、13、23、25、28、29、31	A、B、C、D、E	o、p、u
K2	男	82 岁	呼吸道	1、2、13、20、28、36	A、B、C、D、E、I	c、d、e、h、n、p、r
K3	男	93 岁	血液	1、13、21、28、29、30、33、34、35	A、B、C、D、E、G、H、M、O、P、Q	h、m、n、o、p、s、u、v
K4	女	76 岁	呼吸道	1、7、9、26、27、28、31	A、B、C、D、E、K、O	h、p、r、u
K5	男	44 岁	泌尿道	1、2、5、7、16、24、28	A、B、C、D、E、F、H、I、Q	b、h、o、p、u
K6	男	69 岁	泌尿道	1、3、4、5、6、9、24、31	A、B、C、D、E、F、J	a、l、p
K7	男	63 岁	血液	1、12、13、28、29	E、I	b、d、e
K8	女	68 岁	呼吸道	1、8、14	A、B、D、E、F	b、d
K9	男	39 岁	呼吸道	1、12、14、15、17、28、29	A、B、C、D、E、H	d
K10	男	48 岁	呼吸道	1、10、12、13、14、19	A、B、D、E、F、H	d、m
K11	男	62 岁	血液	1、2、3、4、8、28	B、D、E、F、H、N、Q	b、l、q、s、v
K12	男	76 岁	呼吸道	3、47、48、49	C、D、E	g
K13	女	18 岁	呼吸道	1、28、29、32	C、D、E、M、Q	d、h、n、p、u
K14	男	85 岁	泌尿道	1、10、12、13、22、25、28、31、32	A、B、C、D、E、O、P、Q	h、o、p、r
K15	男	117 d	呼吸道	1、28、29、37、38、42、43、44	A、B、C、D、E、G、H、Q	d、j、k、p、t
K16	女	13 d	血液	28、29、37、38、42、44	B、D、E、G、H、Q	d、j、k、t
K17	男	9 d	呼吸道	1、29、37、38、42	A、B、D、E、F、H、Q	d、j、k、t
K18	男	11 d	泌尿道	1、18	E、L	d、i、r
K19	男	18 d	呼吸道	1、37、38、39、40、41	A、B、C、E、Q	d、j、k
K20	男	7 d	呼吸道	1、28、37、38、41	A、B、E、G	d、j、k
K21	男	4 d	血液	18、24、45、46	...	c、j
K22	男	91 岁	呼吸道	1、10、11	...	f、g

基础疾病包括:1 肺部感染,2 呼吸衰竭,3 AECOPD,4 气胸,5 肺挫伤,6 肋骨骨折,7 双侧胸腔积液,8 胸腔闭式引流术后,9 急性呼吸窘迫综合征,10 冠状动脉粥样硬化性心脏病,11 陈旧性心肌梗死,12 高血压,13 脑梗死,14 脑出血,15 脑疝,16 重度颅脑损伤,17 继发性癫痫,18 化脓性脑膜炎,19 梗阻性脑积水,20 帕金森综合征,21 阿尔茨海默病,22 慢性肾脏病,23 急性肾衰竭,24 泌尿系统感染,25 糖尿病,26 重症急性胰腺炎,27 急性梗阻性化脓性胆管炎,28 低蛋白血症,29 贫血,30 失血性休克,31 感染性休克,32 脓毒血症,33 MODS,34 右股骨粗隆间骨折,35 左髋关节置换,36 压疮,37 早产儿,38 低出生体重儿,39 新生儿呼吸窘迫综合征,40 先天性心脏病,41 新生儿窒息,42 新生儿坏死性小肠结肠炎,43 小肠穿孔,44 弥漫性腹膜炎,45 新生儿高胆红素血症,46 新生儿败血症,47 慢性肺心病,48 慢性心力衰竭,49 心律失常;侵入性操作或治疗包括:A 气管插管/切开,B 机械通气,C 深静脉置管,D 留置尿管,E 留置胃管,F 留置引流管,G 使用肛管,H 手术,I 针灸,J 胸腔穿刺术,K 腹腔穿刺术,L 腰椎穿刺术,M 骨髓穿刺术,N 使用纤维支气管镜,O 血液透析,P 血浆置换,Q 输血;抗菌药物包括:a 头孢唑辛钠,b 头孢孟多酯钠,c 头孢噻肟钠,d 头孢他啶,e 拉氧头孢,f 头孢米诺钠,g 头孢曲松钠/他唑巴坦钠,h 头孢哌酮钠/他唑巴坦钠,i 青霉素钠,j 氟氯西林钠,k 阿莫西林钠/克拉维酸钾,l 哌拉西林钠/舒巴坦,m 哌拉西林/他唑巴坦,n 左氧氟沙星,o 莫西沙星,p 美罗培南,q 亚胺培南/西司他丁,r 万古霉素,s 替加环素,t 甲硝唑,u 伏立康唑,v 醋酸卡泊芬净

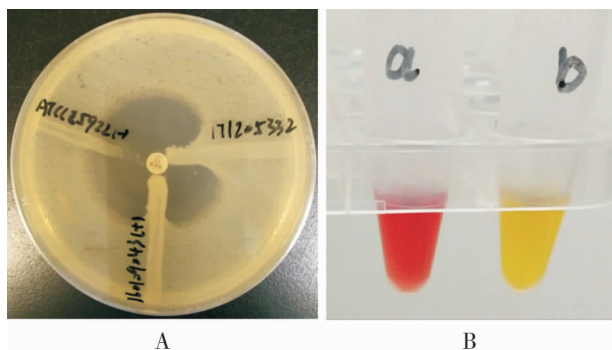
2.3 药敏试验结果 K-B 法和微量肉汤稀释法结果显示,22 株 CRKP 对 IPM、MEM 及 ETP 均耐药。抑菌圈直径和 MIC 值见表 2。

2.4 碳青霉烯酶检测结果 采用 MHT 和 Carba NP 试验检测 CRKP 碳青霉烯酶,结果 MHT 阳性 13 株(K1-K9,K11-K14),Carba NP 试验阳性 14 株(K1-K14)。见图 1。

**表 2** K-B 法和微量稀释法对 22 株 CRKP 药敏检测结果

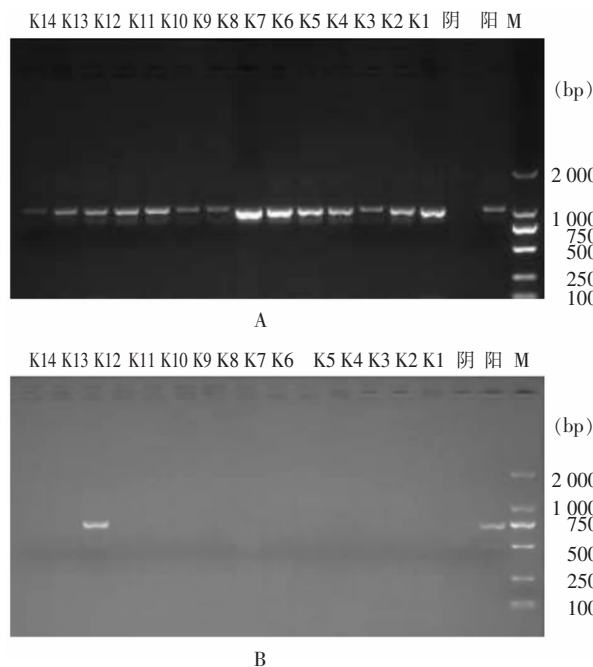
**Table 2** Antimicrobial susceptibility testing results of 22 strains of CRKP detected by Kirby-Bauer disk diffusion and broth microdilution method

菌株编号	抑菌圈直径(mm)			MIC( $\mu\text{g/mL}$ )		
	IPM	MEM	ETP	IPM	MEM	ETP
K1	8	6	6	512	256	256
K2	13	6	6	>512	>512	>512
K3	16	6	6	256	128	256
K4	12	6	6	512	512	>512
K5	13	6	6	64	32	32
K6	8	6	6	16	8	8
K7	11	6	6	256	64	256
K8	13	6	6	>512	>512	>512
K9	16	6	6	>512	>512	>512
K10	13	6	6	32	128	128
K11	19	19	15	256	16	32
K12	6	6	6	>512	256	128
K13	11	6	6	256	128	256
K14	15	6	6	256	256	512
K15	6	6	6	64	32	16
K16	15	14	13	256	32	32
K17	16	16	14	512	64	128
K18	13	11	10	512	128	256
K19	17	16	14	256	16	32
K20	16	15	12	512	16	16
K21	17	14	12	512	32	32
K22	18	12	10	512	32	128



**图 1** CRKP 碳青霉烯酶检测结果  
**Figure 1** CRKP carbapenemase detection results

**2.5 PCR 扩增耐药基因及测序结果** PCR 扩增碳青霉烯酶检测阳性菌株,经测序结果显示,14 株产酶菌株均携带 KPC-2 基因,K12 菌株同时携带 NDM-1 基因。PCR 扩增产物电泳结果见图 2。所有菌株均未扩增出 SME、IMI、IMP、SIM、VIM 及 OXA-48 基因。



**图 2** KPC 基因和 NDM-1 基因 PCR 扩增产物电泳图  
**Figure 2** Electrophoresis map of PCR amplification products of KPC gene and NDM-1 gene

**2.6 同源性分析** 按 MLST 法 22 株 CRKP 可分为 ST11、ST875、ST1964 和 ST571 四种序列型,其中 K1~K14 为 ST11 型,K15~K17 和 K19~K21 为 ST875 型,K18 为 ST1964 型,K22 为 ST571 型,MLST 结果详见表 3。按 ERIC-PCR 法分型可分为 A、B、C 三种类型,其中 K1~K14 及 K18 为 A 型,K15~K17 和 K19~K21 为 B 型,K22 为 C 型,见图 3。

**2.7 菌株来源科室、住院时间及其同源性检测结果** 分型结果相同的菌株中 K1~K6 同属 ICU,K7~K10 同属脑血管外科,其中 K1 与 K2,K2 与 K3,K3 与 K5,K8 与 K9,K9 与 K10 均有共同住院时间,K8 与 K9 病床相连,且患者存在转科情况,K2、K8 均由脑血管外科转入 ICU,K13、K14 分别从 ICU 转入血液内科、肾内科。新生儿科 K15 与 K16 及 K17 均有共同住院时间,K19、K20 和 K21 均有共同住院时间,K20 与 K21 有共同住院时间,见表 4。

表 3 22 株 CRKP MLST 结果

Table 3 MLST results of 22 strains of CRKP

试验编号	等位基因编码							ST 型	试验编号	等位基因编码							ST 型
	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>			<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	
K1	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K12	3	3	1	1	1	1	4	ST11
K2	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K13	3	3	1	1	1	1	4	ST11
K3	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K14	3	3	1	1	1	1	4	ST11
K4	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K15	2	1	2	1	10	4	19	ST875
K5	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K16	2	1	2	1	10	4	19	ST875
K6	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K17	2	1	2	1	10	4	19	ST875
K7	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K18	2	3	1	147	4	4	4	ST1964
K8	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K19	2	1	2	1	10	4	19	ST875
K9	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K20	2	1	2	1	10	4	19	ST875
K10	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K21	2	1	2	1	10	4	19	ST875
K11	3	3	1	1	1	1	4	ST11	K22	17	19	79	20	108	55	142	ST571

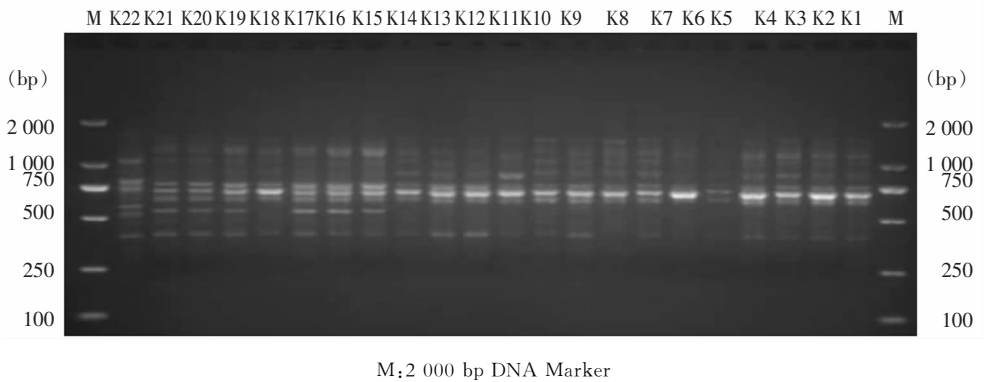


图 3 22 株 CRKP ERIC-PCR 扩增产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis map of ERIC-PCR amplification products of 22 strains of CRKP

表 4 22 株 CRKP 菌株来源科室与同源性检测结果

Table 4 Source departments and homology detection results of 22 strains of CRKP

试验编号	科室	患者住院时间*	耐药基因	MLST 型	ERIC-PCR 分型
K1	ICU	12 月 1 日—2 月 27 日	KPC-2	ST11	A
K2	ICU	2 月 5 日—7 月 3 日	KPC-2	ST11	A
K3	ICU	4 月 5 日—10 月 9 日	KPC-2	ST11	A
K4	ICU	10 月 8 日—20 日	KPC-2	ST11	A
K5	ICU	9 月 21 日—12 月 11 日	KPC-2	ST11	A
K6	ICU	10 月 30 日—12 月 9 日	KPC-2	ST11	A
K7	脑血管科	1 月 24 日—2 月 25 日	KPC-2	ST11	A
K8	脑血管科	4 月 1 日—5 月 15 日	KPC-2	ST11	A
K9	脑血管科	4 月 20 日—5 月 9 日	KPC-2	ST11	A
K10	脑血管科	5 月 8 日—6 月 22 日	KPC-2	ST11	A
K11	胸外科	1 月 31 日—3 月 9 日	KPC-2	ST11	A
K12	全科	8 月 18 日—28 日	KPC-2、NDM-1	ST11	A

续表 4 (Table 4, Continued)

试验编号	科室	患者住院时间*	耐药基因	MLST 型	ERIC-PCR 分型
K13	血液内科	8 月 19 日—9 月 18 日	KPC-2	ST11	A
K14	肾内科	9 月 6 日—11 月 1 日	KPC-2	ST11	A
K15	新生儿科	1 月 15 日—4 月 21 日	-	ST875	B
K16	新生儿科	2 月 1 日—20 日	-	ST875	B
K17	新生儿科	3 月 27 日—4 月 20 日	-	ST875	B
K18	新生儿科	5 月 19 日—6 月 8 日	-	ST1964	A
K19	新生儿科	4 月 27 日—7 月 19 日	-	ST875	B
K20	新生儿科	5 月 22 日—7 月 9 日	-	ST875	B
K21	新生儿科	7 月 4 日—27 日	-	ST875	B
K22	呼吸内科	10 月 6 日—23 日	-	ST571	C

\*: K1 患者住院时间跨 2016—2017 年,其余患者住院时间均为 2017 年;-:未检测

### 3 讨论

KPN 碳青霉烯酶可水解包括碳青霉烯类抗生素在类的  $\beta$ -内酰胺类抗生素,如头孢菌素类、青霉素类及单环酰胺类,导致菌株对多种抗菌药物耐药,但其不能水解头霉素类抗生素。中国细菌耐药性监测数据<sup>[10]</sup>显示,2015 年 KPN 对 MEM 的耐药率为 2.90%,对 IPM 的耐药率为 3.00%,仅过两年,KPN 对 MEM 及 IPM 的耐药率分别上升至 24.00%、20.90%,上升幅度在 5 倍以上,而感染 CRKP 后病死率高达 47.90%<sup>[11]</sup>。本研究中 22 株 CRKP 对 IPM、MEM、ETP 的耐药率均达 100%,对临床其他常用的抗菌药物也高度耐药。建议临床医生应根据患者的症状和体征,并结合药敏结果,严格选择抗菌药物,避免滥用抗菌药物。22 株 CRKP 中有 7 株分离自新生儿科,6 株分离自 ICU;22 例患者中,11 例年龄  $\geq 60$  岁,6 例年龄  $< 28$  d;所有患者均患 2 种或更多基础疾病,20 例患者住院期间有过  $\geq 2$  项的侵入性操作或治疗,20 例患者住院期间使用抗菌药物种类  $\geq 2$  种,提示病情重、基础疾病多、免疫力低、有创操作和(或)无创操作多、长期使用抗菌药物和(或)联用抗菌药物的患者可能易感染 CRKP,与巴西学者 Da silva 等<sup>[12]</sup>的研究结论一致。对具有上述特征的患者,医务人员应给予高度关注,尽量避免医院感染的发生。22 株 CRKP 中 13 株从呼吸道标本中检出,表明细菌容易侵入呼吸道,引起呼吸系统感染,临床医生应加强患者气道管理,及时送检标本,争取做到早发现,早防控,早治疗。

迄今为止,已发现 24 种 KPN 的 KPC 亚型

(KPC-1 和 KPC-2 后被证实为同一型别),其中 KPC-2 和 KPC-3 是国内外最常见型别,已在全球多个国家暴发流行<sup>[13-14]</sup>。本研究中,14 株产酶菌株均携带 KPC-2 耐药基因,其中 K12 同时携带 NDM-1 基因,提示该院碳青霉烯酶基因存在多态性,但同时携带 KPC-2 及 NDM-1 基因的菌株表现出的耐药性与其他菌株无明显差异,可能是 NDM-1 基因并未表达或仅仅低表达。携带碳青霉烯酶耐药基因的 14 株 CRKP,MLST 分类属于 ST11 型,与中国 CRKP 菌株的主要流行基因型和克隆型一致<sup>[15]</sup>。该院还存在 ST875 型 CRKP 的克隆流行,此型全部分布于新生儿科,与祝俊英等<sup>[16]</sup>研究结果不同,可能与不同地区抗菌药物使用差异有关,且新生儿科的 7 株 CRKP 产酶试验均阴性,提示可能存在其他耐药机制。此外该院还存在 ST1964 和 ST571 两种序列型,但尚未在该院流行。

研究<sup>[17]</sup>证实,CRKP 的耐药基因可位于以下基因元件上:包括可移动的质粒、整合子及插入序列等,可在不同患者、病区、医院、地区,甚至不同菌种间进行传播,造成大范围的流行。本研究同源性分析发现,K1~K14 MLST 均为 ST11 型,ERIC-PCR 分型均为 A 型;K15~K17 和 K19~K21 MLST 均为 ST875 型,ERIC-PCR 分型均为 B 型;K22 菌株在两种同源性分析方法中均独立成一型,分别为 ST571 型和 C 型,以上菌株两种同源性分析方法结果一致。分型结果相同的菌株中 K1~K6 同属 ICU,K7~K10 同属脑血管外科,其中 K1 与 K2,K2 与 K3,K3 与 K5,K8 与 K9,K9 与 K10 均有共同住院时间,且 K8 与 K9 病床相连,K2 是由脑血管外科转入,与脑血管外科的 K7 有共同住院时间,K8

因病情加重后转入 ICU,与 ICU 的 K2 与 K3 均有共同住院时间,血液内科的 K13 是由 ICU 转入的,与 ICU 的 K3 有共同住院时间,而肾内科的 K14 是由 ICU 转入的,与 ICU 的 K3、K5 均有共同住院时间,提示该院 ICU、脑血管外科、肾内科和血液内科病区存在 ST11 型 CRKP 的克隆传播。新生儿科分型相同的 K15~K17 和 K19~K21 中,K15 与 K16 及 K17 均有共同住院时间,K19 与 K20 和 K21 均有共同住院时间,而 K20 与 K21 有共同住院时间,说明 2017 年该院新生儿科存在 ST875 型 CRKP 暴发流行。针对此次 ST11 型和 ST875 型 CRKP 在该院的暴发流行,通过及时与相关科室沟通,隔离感染患者,加强医务、保洁等人员的医院感染防控意识,加强手卫生管理,及清洁和消毒床单元和共用物品,已基本控制该院 CRKP 的进一步播散。

近年来,CRKP 在全球各地散发和(或)流行时有发生,甚至在曾经检出率较低的欧洲国家也出现了流行,对 CRKP 的监测与防控仍是一项非常重要的工作。临床医生应了解 CRKP 的耐药机制及分子流行病学特点,做好医院感染防控,减少 CRKP 的传播。

#### [参考文献]

- [1] Tang Y, Shen P, Liang W, et al. A putative multi-replicon plasmid co-harboring beta-lactamase genes blaKPC-2, blaCTX-M-14 and blaTEM-1 and trimethoprim resistance gene dfrA25 from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type (ST) 11 strain in China[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171339.
- [2] Satlin MJ, Chen L, Patel G, et al. Multicenter clinical and molecular epidemiological analysis of bacteremia due to carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) in the CRE epicenter of the United States[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(4): 2349-2365.
- [3] Lorenzoni VV, Silva DDC, Rampelotto RF, et al. Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2017, 50(5): 685-688.
- [4] Madkour LA, Soliman MS, Hassan DM, et al. Detection of carbapenemase-producers; evaluating the performance of the carbapenem inactivation method and Carba NP test versus multiplex PCR[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 9(1): 10-14.
- [5] Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[J]. CLSI document M100; 2018. Wayne, PA: CLSI, 2018.
- [6] Smith ME, Hanson ND, Herrera VL, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Kleb-*

*siella pneumoniae* isolates [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(3): 711-714.

- [7] 刘婧娴. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及分子流行病学研究[D]. 上海:上海交通大学,2015.
- [8] 黄维真,梁军荣,王双杰,等. 新生儿耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药性及耐药基因研究[J]. 检验医学与临床,2016,13(15): 2100-2102.
- [9] 苏珊珊,宫雪,张吉生,等. 重症监护室流行耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及同源性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018,18(5):508-514.
- [10] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2018,18(3):241-251.
- [11] Wang Z, Qin RR, Huang L, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and mortality of *Klebsiella pneumoniae* infection [J]. Chin Med J (Engl), 2018, 131(1): 56-62.
- [12] Da Silva KE, Maciel WG, Sacchi FP, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: watch out for surgery [J]. J Med Microbiol, 2016, 65(6): 547-553.
- [13] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(3): 565-591.
- [14] Chen L, Mathema B, Chavda KD, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding [J]. Trends Microbiol, 2014, 22(12): 686-696.
- [15] 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.
- [16] 祝俊英,王春,孙燕,等. 儿童患者中分离的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学分析及耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(5):578-582.
- [17] Poirel L, Lienhard R, Potron A, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Switzerland[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(3): 675-676.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:陈娅,邱隆敏. CRKP 碳青霉烯酶基因检测及同源性分析[J]. 中国感染控制杂志,2019,18(6):481-488. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20195329.

Cite this article as: CHEN Ya, QIU Long-min. Carbapenemase gene detection and homology analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chin J Infect Control, 2019,18(6): 481-488. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20195329.