

· 综 述 ·

## 产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌耐药机制及流行病学研究进展\*

陈绍淳 综述, 张 娟<sup>△</sup> 审校

(汕头大学医学院第一附属医院检验科, 广东汕头 515000)

关键词: 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 耐药机制; 流行病学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)23-3328-03

自 2009 年报道产 NDM-1 的肠杆菌后,“超级细菌”这一概念为公众所熟知,这一类耐碳青霉烯类抗生素的肠杆菌常表现为多重耐药菌(MDR),甚至泛耐药菌(PDR),对几乎所有  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药,并使酶抑制剂(克拉维酸等)失效,使临床治疗陷入被动。肠杆菌主要耐药机制为产碳青霉烯酶,水解  $\beta$ -内酰胺类抗生素而表现耐药性状。肺炎克雷伯菌(CPKP)常见于人体呼吸道、消化道,是一种条件致病的肠杆菌科细菌,临床检出率高。近年来产碳青霉烯酶类 CPKP 报道日渐增多,尽管总体上检出率并不高(除了南亚大陆,均  $<7\%$ )<sup>[1-2]</sup>。但 CPKP 已在世界多地出现暴发流行,同时也有在自然环境中发现 CPKP 的报道<sup>[3]</sup>。表明其播散趋势不容乐观,研究 CPKP 的耐药机制及其流行病学规律,对此类感染的防控具有重要意义。

## 1 耐药机制

碳青霉烯酶是一类能广谱水解  $\beta$ -内酰胺环的水解酶。可以使含有  $\beta$ -内酰胺环的抗生素失效。是 CRKP 最常见的耐药机制。编码酶的基因既可位于基因组 DNA 上,也可位于质粒上,因为水平基因转移元件的存在,可以对各种耐药基因进行整合,并通过质粒进行传播,使耐药基因的传播跨越生殖隔离,耐药性更加具有传播性。根据 Ambler 分子分类法,可以把碳青霉烯酶分为 A、D、B 3 类。

**1.1 A 类碳青霉烯酶** A 类碳青霉烯酶是一类丝氨酸蛋白酶,包括 KPC、IMI、SME、GES、NMC、SHV 6 种。其中 NMC、IMI 和 SME 位于染色体上,而 KPC、GES 则常见于质粒上,其余染色体和质粒均可见。此类碳青霉烯酶可水解包括碳青霉烯类、头孢菌素类、青霉素类和氨基甙。

对于 CPKP,以 KPC 酶最为常见。KPC 族酶自 1996 年美国第 1 次报道以来,已经发现 KPC-1 至 KPC-11 11 种亚型<sup>[4]</sup>。KPC 酶对  $\beta$ -内酰胺类抗生素水解能力强,应用  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂(克拉维酸等)对其效果不佳。有报道称应用 3 倍药物浓度的美罗培南、替加环素和克林霉素可以提高产 KPC 酶的 CPKP 感染患者生存率<sup>[5]</sup>。但对于这种用药组合是否会对患者带来不良反应,持续使用高浓度的碳青霉烯类药物是否会进一步推高 CPKP 的最小抑菌浓度(MIC)值等问题有待进一步研究。KPC 酶常位于 IncA/C 型和 IncFIIK + FIBK 型质粒的 Tn4401 转座子上,该质粒具有宿主种类多、分布范围广的特点,更加速了 KPC 基因的传播。KPC 基因最初在相邻的地域间传播,自美国第 1 次报道,现已经在亚洲、欧洲、中东地区普遍报道<sup>[6]</sup>。以往认为 CPKP 多为院内感染常见的普通型,极少对身体健康的人致病,近期中国大陆地区发现了携带

KPC-2 基因的荚膜 K1 型高致病性 CPKP,此类病原菌对人有强致病性,高致病性的 CPKP 感染会给临床用药带来很大挑战<sup>[7]</sup>。

相对于 KPC,其他几种 A 类碳青霉烯酶报道较少,位于染色体上 NMC、IMI 和 SME 其扩散能力较差,并未呈现大规模流行的趋势。GES 属于弱水解性的碳青霉烯酶,很多单表达 GES 的菌表现型常为对碳青霉烯类抗生素敏感性降低或者中介,根据耐药性初筛易导致漏检,在 GES 家族中,GES-5 基因的水解能力最强,最初于韩国报道此酶在 CPKP 中的存在<sup>[8]</sup>。

**1.2 B 类碳青霉烯酶** B 类碳青霉烯酶属于金属酶类,包括 NDM、IMP、VIM、GIM、SPM。与其他两类不同,其活性位点上包含金属离子,对亚胺培南、厄他培南等常见碳青霉烯类抗生素有很强的水解活性。多位于可接合质粒上,并与整合子、插入序列等可移动性基因元件结合,使其具有很强的传播能力<sup>[9]</sup>。金属酶活性可被乙二胺四乙酸(EDTA)所抑制,据此原理,亚胺培南药敏纸片添加 0.5 mmol/L 的 EDTA 制成的组合纸片和单纯亚胺培南纸片联合应用可用于检测肠杆菌科的金属酶表型。

B 类酶中检出率呈现地域分布特点,其中 NDM 酶自 2009 年在印度新德里检出并因此得名,成为南亚地区检出率最高的 B 类碳青霉烯酶,在印度某些城市,检出率甚至超过 60%,并且成为重要的输出地区<sup>[10-11]</sup>。其最常见 NDM-1 型,多次在该地区暴发流行,现在携带 NDM 酶的 CPKP 在中国、韩国、日本等东亚国家检出率也呈逐年升高。中国上海报道 1 次产 NDM-1 型的 CPKP 在新生儿科的暴发流行<sup>[12]</sup>。同时在欧洲、美洲大陆等与南亚并无接壤的地区也相继报道,欧洲表达 NDM-1 酶的 CPKP 报道,多为输入性病例,其余 NDM 型报道较少,西班牙、菲律宾相继发现携带 NDM-7 型基因的 CPKP,较于 NDM-1、NDM-7 型酶对碳青霉烯类水解效率更高,应引起重视。VIM 和 IMP 酶的水解效率更高,其多在欧洲及美洲大陆出现流行<sup>[13-14]</sup>。希腊发现携带 VIM-19 的 CPKP,并确认为本土案例,所幸的是,VIM 和 IMP 酶检出率并不高,其并未如 NDM 型酶迅速扩散。

**1.3 D 类碳青霉烯酶** D 类碳青霉烯酶是一类苯唑西林酶,多位于染色体上,目前已发现超过 400 种 OXA 家族基因,其中 232 种对常见碳青霉烯类抗生素均有低水解活性,且不被克拉维酸等  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抑制<sup>[15]</sup>。多见于鲍曼不动杆菌,CPKP 偶见报道,主要为 OXA-48 型<sup>[16]</sup>。产 OXA-48 型酶的 CPKP 常见于土耳其、约旦、伊朗等中东、中亚地区报道,欧洲病例多以输入性病例为主,一项法国的研究表明,纳入研究的

\* 基金项目:广东省高水平大学重点学科建设资助项目(2015049)。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:Juanzh005@126.com。

病例中,53%的 OXA-48 阳性 CPKP 感染患者均有国外旅游史<sup>[17]</sup>。近期西班牙的相关研究发现,携带 OXA-245 的 CPKP<sup>[18]</sup>。与其他几种广泛报道的碳青霉烯酶一样,OXA 也常与各种基因元件结合,并通过基因元件在不同菌株之间扩散。对一株分离自土耳其的 OXA-48 携带的 CPKP 的研究表明,其位于可接合的质粒上,但并未与 I 类整合子相结合<sup>[19]</sup>。携带 OXA 基因的 CPKP 常在用药后出现耐药性增强,据 Lunha 等<sup>[20]</sup>研究,当携带 OXA-48 酶的 CPKP 孔蛋白 Ompk36 变异时,或合并表达其他碳青霉烯酶时,可表现出较原来更高水平的耐药,这也是此类 CRKP 治疗过程中耐药性变化的主要原因。

## 2 产碳青霉烯酶的 CPKP 流行病学研究

### 2.1 分型技术的研究进展

克隆分型技术可以了解特定时间、空间内细菌的分布情况,追踪其传播途径,并通过分析不同克隆型之间情缘关系远近来研究其演变规律。目前,用于细菌分型的技术主要有多位点序列分型(MLST)、脉冲电场凝胶电泳(PFGE)、利用随机引物的肠杆菌基因间共有多重序列的 ERIC-PCR 分型和全基因组测序分型技术。其中 PFGE 技术具有分辨率高的特点,是公认的细菌分型的金标准<sup>[21]</sup>。但操作繁琐耗时,且目前尚未形成通用的标准化操作,各实验室之间的分型结果可重复性差;ERIC-PCR 法简便易行,但分辨率较低<sup>[22]</sup>;全基因组测序精度高,方便易行但其高昂费用阻碍了大规模应用,MLST 技术是基于全球菌株数据库<sup>[23]</sup>。通过菌株比对进行分型,其优点在于可以与数据库中克隆型进行对比,分析其传播规律,由于是建立在比对基础上的技术,其不足之处在于数据库中没的克隆型无法进行分析,但随着提交新克隆型的研究者增多,MLST 的数据库也正趋于完善,其在研究细菌传播、演变上的价值愈加受到研究者的重视。

### 2.2 CPKP 的 MLST 数据研究

把本地区的临床菌株与 MLST 数据库进行对比,可以了解本地区流行的主要克隆型,克隆型的流行同样具有地域分布特性。由于 KPC、NDM 这两型碳青霉烯酶传播广,受到关注高,以下主要介绍这两型碳青霉烯酶携带菌株的克隆型流行情况。

由于 KPC 主要在 CPKP 上检出,MLST 数据库中有记录的相关克隆型达 57 种,未计入数据库中的克隆型也呈多样性。携带 KPC 基因中 ST258 的 CPKP 占 46.3%,系统发育树分析提示该型可能为携带 KPC 的 CPKP 的祖先型。通过全基因组测序技术,对 ST258 的 CPKP 分析表明,该克隆型已经成为美国医疗机构常见的克隆型<sup>[24]</sup>。随着 KPC 的扩散,越来越多的克隆型在各地发现,在保加利亚大学附属医院,ST15 型的产 KPC-2 酶的 CPKP 是其主要克隆型<sup>[25]</sup>。意大利的瓦莱达奥斯塔地区 CPKP 主要流行 ST101、ST1789、ST512 和 ST405 这 4 种型<sup>[26]</sup>。这些报道表明 KPC 携带的菌株正在增加,表明 KPC 基因的扩散趋势不容乐观。

表达 NDM 酶的 CPKP 最初发现于南亚,在 2009 年在临床上第 1 次检出之前,已于 2006 年在印度新德里的自然水体中检出携带 NDM-1 基因的肠杆菌<sup>[3]</sup>,并发现其属于多个克隆型,表明早在 NDM 基因流行之前,在流行地环境中就已存在一个数量相当的种群,加之其与多种水平基因转移元件相结合<sup>[27]</sup>,具有播散能力强,短短几年间便在世界范围内扩散,但因发现时间较短,收入 MLST 数据库的产 NDM 型 CPKP 克隆型只有 17 个克隆型。但近年来发表的文献表明,携带 NDM 的 CPKP 克隆型正在不断增多,印证了此基因不断播散的趋势,在中国长沙报道了 1 次产 NDM-1 的 CPKP 暴发,其主要

克隆型为 ST17<sup>[28]</sup>。在希腊,报道了两次产 NDM-1 酶的 ST11 型 CPKP 暴发流行除了院内监测发现携带 NDM 基因的克隆型在增加,自然环境中的带有 NDM 基因的种群也在不断地发现,在西班牙,3 所医院内流行的产 NDM-7 酶的 CPKP 同属 ST437 型,流行病学调查发现,此型 CPKP 在当地环境中属于优势种群,这也促成了此次流行<sup>[29-30]</sup>。这表明以往院内流行的产 NDM 的 CPKP 开始在当地环境中出现。

## 3 小结

自从抗生素问世,抗生素与细菌的“军备竞赛”就愈演愈烈,随着碳青霉烯类抗生素应用广泛,细菌对其耐药率也逐年攀升,CPKP 作为院内感染的常见菌种,表达碳青霉烯酶意味着其几乎对所有的  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药,加之各种水平基因转移元件的存在,使碳青霉烯酶耐药基因具有易于扩散的特点,使其可通过水平传播,扩散耐药基因,目前发现越来越多的产碳青霉烯酶的 CPKP 克隆型,意味着携带碳青霉烯酶基因的 CPKP 种群正在不断扩大,同时在多地自然环境中也发现种群数目可观的环境库,由此增加了相关菌株暴发的风险,给临床治疗带来极大挑战。

通过使用 PCR 等分子生物学技术对碳青霉烯酶耐药基因进行研究可以了解其耐药机制,对研制针对性的新型抗生素具有启迪意义,通过各种分型技术进行流行病学研究,有助于掌握各地 CPKP 的流行情况,研究其流行规律,并通过规范用药、加强院感监测等手段控制其流行。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [3] Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, et al. Early dissemination of NDM-1-and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SEN-TRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(3):1274-1278.
- [4] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4):1151-1161.
- [5] Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(7):943-950.
- [6] Kocsis E, Lo Cascio G, Piccoli M, et al. KPC-3 carbapenemase harbored in FIIk plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST512 and *Escherichia coli* ST43 in the same patient[J]. Microb Drug Resist, 2014, 20(5):377-382.
- [7] Wei DD, Wan LG, Deng Q, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent clone of capsular serotype K1 that belongs to sequence type 11 in Mainland China[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(2):192-194.

- [8] Bae IK, Lee YN, Jeong SH, et al. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 58(4):465-468.
- [9] Wang X, Chen G, Wu X, et al. Increased prevalence of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in hospital setting due to cross-species transmission of the bla NDM-1 element and clonal spread of progenitor resistant strains[J]. *Front Microbiol*, 2015, 16(6):595.
- [10] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK; a molecular, biological, and epidemiological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(9):597-602.
- [11] Jean SS, Hsueh PR. High burden of antimicrobial resistance in Asia[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 37(4):291-295.
- [12] Zhu J, Sun L, Ding B, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(4):611-618.
- [13] Papagiannitsis CC, Dolejska M, Izdebski R, et al. Characterisation of IncA/C2 plasmids carrying an In416-like integron with the blaVIM-19 gene from *Klebsiella pneumoniae* ST383 of Greek origin[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 47(2):158-162.
- [14] Spyropoulou A, Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, et al. A ten year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek University hospital; predominance of KPC over VIM or NDM-producing isolates[J]. *J Med Microbiol*, 2015, 65(3):151-175.
- [15] Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, et al. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(1):305784.
- [16] Cetinkol Y, Yildirim AA, Telli M, et al. The investigation of oxacillinase/metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Infez Med*, 2016, 24(1):48-53.
- [17] Liapis E, Pantel A, Robert J, et al. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(12):1121-1123.
- [18] Pérez-Vázquez M, Oteo J, García-Cobos S, et al. Phylogeny, resistome and Mobile genetic elements of emergent OXA-48 and OXA-245 *Klebsiella pneumoniae* clones circulating in Spain[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(4):887-896.
- [19] Poirel L, Héritier C, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(1):348-351.
- [20] Lunha K, Chanawong A, Lulitanond A, et al. High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 85(2):221-226.
- [21] Vimont S, Mnif B, Fevre C, et al. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(10):1308-1310.
- [22] Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria[J]. *Mol Microbiol*, 1991, 5(4):825-834.
- [23] Bilhère E, Lucas PM, Claisse O, et al. Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(5):1291-1300.
- [24] Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(3):1656-1663.
- [25] 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.
- [26] Del Franco M, Paone L, Novati R, et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789)[J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15(1):260.
- [27] Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(9):711-721.
- [28] Zhang X, Li X, Wang M, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* causing neonatal infection in a teaching hospital in mainland China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(7):4349-4351.
- [29] Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, et al. The balkan region; NDM-1-producing *klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(8):2091-2097.
- [30] Seara N, Oteo J, Carrillo R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 46(2):169-173.