

## 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药性及产酶类型分析

谢海连, 朱胜波, 唐健

柳州市中医医院(柳州市壮医医院) 广西柳州

**【摘要】目的** 了解本院碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)的临床感染特点和产酶情况。**方法** 对分离自临床样本的非重复CRKP的试验数据进行分析。另随机选取59株美罗培南敏感性降低[最小抑菌浓度(MIC)≥4μg/mL]的CRKP, mCIM联合eCIM检测其产酶情况。**结果** 共检出448株CRKP, 临床标本主要来自呼吸内科, 其次为重症监护室; 随机选取的59株CRKP中有48株产碳青霉烯酶, 其中31株产金属β-内酰胺酶。**结论** CRKP感染情况严峻, 需加强管理, 有效降低院内CRKP感染率。eCIM联合mCIM检测成本低、操作简单, 是一种经济、高效的表型筛选方法。

**【关键词】**耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶表型; 改良碳青霉烯类失活法; 乙二胺四乙酸-碳青霉烯类失活法

**【基金项目】**广西卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20210536)

**【收稿日期】**2024年2月17日

**【出刊日期】**2024年3月25日

**【DOI】**10.12208/j.ijcr.20240100

### Analysis of drug resistance and enzyme production types of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*

Hailian Xie, Shengbo Zhu, Jian Tang

Liuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital (Liuzhou Zhuang Medical Hospital), Liuzhou, Guangxi

**【Abstract】 Objective** To investigate the clinical characteristics and enzyme production of *Klebsiella carbapenem pneumoniae* (CRKP) in our hospital. **Methods** The data of non-replicated CRKP isolated from clinical samples were analyzed. In addition, 59 strains of CRKP with reduced meropenem sensitivity [minimum inhibitory concentration (MIC) ≥4 μg/mL] were randomly selected, and mCIM combined with eCIM was used to detect their enzyme production. **Results** A total of 448 strains of CRKP were detected, mainly from respiratory department, followed by intensive care unit. Among 59 randomly selected CRKP strains, 48 strains produced carbapenemase and 31 strains produced metallic β-lactamase. **Conclusion** CRKP infection is serious and management should be strengthened to effectively reduce the infection rate of CRKP in hospital. eCIM combined with mCIM is an economical and efficient phenotypic screening method with low cost and simple operation.

**【Keywords】** Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenem enzyme phenotype; Improved carbapenem inactivation method; Ethylenediaminetetraacetic acid carbapenems deactivation method

近年来,碳青霉烯类抗菌药物的使用愈发普遍,而一些革兰阴性杆菌对此类药物的耐药性也呈现出逐渐增强的趋势,如CRKP、CREC、CRPA、CRAB等检出率不断上升,给临床抗菌治疗带来很大的挑战,也给患者带来很大的经济负担<sup>[1-2]</sup>。本研究回顾性分析本院2019年1月至2022年12月分离的肺炎克雷伯菌进行药物敏感性分析,为院内日常防控感染提供参考。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 研究对象

收集柳州市中医医院2019年至2023年各类临床样本的CRKP,即对美罗培南的最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)≥4)448株(已剔除重复菌株),从中挑选59株进行耐药表型检测。质控标准菌株:大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853,用于鉴定药敏系统。

##### 1.2 试剂与仪器

采用湖南天地人科技TDR 300B-PLUS全自动细菌鉴定及药敏分析仪及专用鉴定板卡对细菌的高效鉴

定与药敏分析。试剂配件选用英国 OXIOD 药物敏感性试验纸片 (10 $\mu$ g/片)、广州迪景微生物科技有限公司血琼脂平板与 M-H 平板、杭州滨和微生物试剂有限公司乙二胺四乙酸试剂以及胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)。

### 1.3 方法

1.3.1 进行细菌的培养与鉴定过程中严格遵循《全国临床检验操作规程》第 4 版指导原则。分析工具为湖南长沙天地人生物科技有限公司生产的 TDR 300B-Plus 生化药敏分析仪, 与之配套的是专为肠杆菌科细菌检测设计的试剂盒。所有操作步骤均严格遵循仪器和试剂盒的使用说明。质控频率为每货号每个批次进行 1 次。质控及临床菌株按 CLSI 最新的标准判读药敏结果。

#### 1.3.2 碳青霉烯酶表型的检测:

eCIM 联合 mCIM 对碳青霉烯酶进行分型试验将随机收集的 59 株 CRKP 接种至血平板, 于培养箱中培养 18~24 h, 每株菌株同时进行 mCIM 和 eCIM 试验。操作如下:

mCIM 试验: 使用 1.0 $\mu$ l 接种环从血琼脂平板上刮取经过一夜培养的纯净菌落。将菌落通过涡旋震荡器的混合, 接种到 2.0ml 的胰蛋白胨大豆肉汤 (持续 10~15s), 确保菌悬液均匀混合。在每个试管中放入 10 $\mu$ g 美罗培南无菌纸片, 确保纸片完全浸没在菌悬液中, 将其放入 35 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4h, 使美罗培南充分与菌悬液中细菌接触。孵育结束后使用生理盐水制备 0.5 麦氏浊度的大肠埃希菌 ATCC25922 菌悬液。用 10.0 $\mu$ l 的接种环轻轻将美罗培南纸片从胰蛋白胨大豆肉汤中取出, 并贴在试管的内壁上除去纸片上多余的水分, 确保纸片上的美罗培南能够均匀分布。将处理过的纸片再次贴在预先涂布有大肠埃希菌 ATCC25922 的 MH 平板上, 随后被放入 35 $^{\circ}$ C 的培养箱中孵育, 时间设定为 18~24h。孵育结束后测量抑菌圈直径。

eCIM 试验: 取 2.0ml 胰蛋白胨大豆肉汤的小型离心管中, 选取第 2 支试管加入 20.0 $\mu$ l 浓度为 0.5 $\mu$ mol/L 的乙二胺四乙酸溶液。调整乙二胺四乙酸的浓度至 5.0mm, 并遵循上述 mCIM 试验流程操作。两组实验同时进行, 均将 MCI 试验管中的美罗培南纸片放置在同块已均匀涂布标准大肠埃希菌 ATCC25922 菌株的 MH 平板上。判读标准参照美国临床实验室标准化协会 2022 年 M100-S32 文件标准。

### 1.4 统计学方法

统计分析方法: 采用 WHONET 5.6 和 EXCEL 2013 软件实施分析。

## 2 结果

### 2.1 CRKP 的临床分布

检出的 CRKP 科室分布以呼吸内科为主 (240 株, 占 53.57%), 其次是重症监护室 (126 株, 占 28.13%) 第三位是神经外科 (23 株, 占 5.13%)。其他科室检出例数均少于 10 株。

### 2.2 CRKP 的检出率

2019-2023 年每年肺炎克雷伯菌中耐碳青霉烯类抗菌药物的数量及检出率见表 2。

### 2.3 CRKP 的标本来源

CRKP 菌株的标本分布以呼吸道标本为主, 其中支气管肺泡灌洗液 (232 株, 占 51.79%), 痰液 (65 株, 占 14.51%); 其次是尿液 (63 株, 占 14.066%)。

### 2.4 CRKP 的耐药性分析

对检出的 448 株 CRKP 菌株对常见抗菌药物的耐药率分析, 见表 2。

### 2.5 eCIM 联合 mCIM 的结果分析

随机抽取 2019 年至 2023 年各类临床样本的 CRKP 59 株中, mCIM 试验阳性 48 株 (产碳青霉烯酶); 其中 eCIM 实验阳性 31 株 (产金属  $\beta$ -内酰胺酶); eCIM 试验阴性 17 株 (产丝氨酸型碳青霉烯酶); mCIM 试验阴性 11 株 (不产碳青霉烯酶)。

表 1 CRKP 检测率

年份	肺炎克雷伯菌	
	检出数量	检出率
2019 年	22	4.68%
2020 年	18	3.02%
2021 年	36	4.87%
2022 年	216	21.05%
2023 年	156	12.02%
合计	448	10.85%

表 2 CRKP 对抗菌药物的耐药率 (%)

抗菌药物	肺炎克雷伯菌 (n=448)
阿米卡星	63.8
氨苄西林	100
氨苄西林/舒巴坦	98.6
氨曲南	93.3
复方新诺明	34.2
美罗培南	96.9
米诺环素	21
哌拉西林/他唑巴坦	96
庆大霉素	82.4
替加环素	3.8
头孢吡肟	96
头孢呋辛	98.7
头孢哌酮/舒巴坦	96.1
头孢曲松	98.4
头孢他啶	96.4
头孢西丁	94.4
头孢唑林	98.9
左氧氟沙星	88.4

### 3 讨论

本研究中, 2019 年至 2021 年我院 CRKP 的总检出率为 10.85%, 与广西的检出率相近, 且低于全国的数据<sup>[3-5]</sup>; 但 2022 年检出率突然增高, 为 21.05%, 高于全国耐药监测网“中国两网监测云”公布的全国及广西的数据; 2023 年有所下降, 为 12.02%, 提示本院 CRKP 在 2022 年感染情况十分严峻, 在加强感染控制管理后有所下降, 感染控制有效。CRKP 临床标本主要来自呼吸内科, 其次为重症监护室。标本类型以呼吸道标本为主, 其次为尿液标本。CRKP 对多种抗菌药物的耐药率较高。

本研究 59 例 CRKP 中, 通过 mCIM 试验联合 eCIM 试验, 显示 mCIM 试验阳性 48 株 (产碳青霉烯酶); 其中 eCIM 实验阳性 31 株 (产金属  $\beta$ -内酰胺酶); eCIM 试验阴性 17 株 (产丝氨酸型碳青霉烯酶); mCIM 试验阴性 11 株 (不产碳青霉烯酶); 我院 CRK 以产金属  $\beta$ -内酰胺酶为主。2015 年,  $\beta$ -内酰胺类复合药物-头孢他啶-阿维巴坦因其独特的治疗效果和安全性, 顺利通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 的严格评估, 正式获准用于治疗对碳青霉烯类药物产生耐药性的肠

杆菌科细菌。这种药物不仅具有卓越的抗菌活性, 能够有效对抗产生金属  $\beta$ -内酰胺酶的病原体, 而且在治疗碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌 (CRKP) 方面也展现出了显著效果, 是目前<sup>[6-8]</sup>治疗 CRKP 的重要药物。

临床微生物实验室拥有高效、精确的检测能力, 能够及时鉴别 CRE (包括 CRKP) 的产酶情况。当面对产丝氨酸酶菌株时, 临床医生能够迅速选择具有特异作用的药物, 如头孢他啶-阿维巴坦, 以确保精准用药。对于产金属  $\beta$ -内酰胺酶的菌株, 实验室会进行联合药敏试验, 为精准用药提供更为确凿的依据。通过这些措施能有效地遏制产碳青霉烯酶菌株在院内的传播, 迅速控制感染, 从而提高患者生存率<sup>[9-10]</sup>。

mCIM 试验联合 eCIM 试验是一种操作简便、价格低廉、准备率高、可重复的方法, 可高效检测肺炎克雷伯产碳青霉烯酶情况, 该方法<sup>[11]</sup>值得在各实验室推广使。

### 参考文献

- [1] 尹娟, 王莹超, 睦阳, 等. mCIM 与 eCIM 在产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌表型筛查中的价值[J]. 检验医学, 2021,

- 36(2):177-180.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100-S28,CLSI,2018.
- [3] 全国细菌耐药监测网.全国细菌耐药监测网 2014-2019 年细菌耐药性监测报告[J].中国感染控制杂志,2021, 20(1):15-31.
- [4] 全国细菌耐药监测网.2020 年全国细菌耐药监测报告[J].中华检验医学杂志,2022,45(2):122-136.
- [5] 全国细菌耐药监测网.2021 年全国细菌耐药监测报告[J].中华检验医学杂志,2023,46(6):566 -581.
- [6] RODRIGUEZ-BANO J , GUTIERREZ-GUTIERREZ B , MACHUCA I , et al. Treatment of infections caused by extended-s pectrum-beta-lactamase- , am pc- , andcarbap-enemase-p roducing enterobacteriaceae[J] .Clin Microbiol Rev , 2018 , 31(2) :e00079-17.
- [7] 李宜檀,林镇洲,王明贞,等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子生物学特征 及对头孢他啶-阿维巴坦耐药机制的初步研究[J],微生物学免疫学进展,2023,51(5):47-54
- [8] 吴英,雷蕾,刘礼初,等.佛山市中医院耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌的产酶型别及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2023,20(3):320-327.
- [9] 尚佳文 ,徐文娜,许南松,等。mCIM 和碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测 CRE 和 CRPA 产酶表型的方法学评价[J],现代检验医学杂志 ,38(3):165-169.
- [10] 唐克文,李娟,冯丽娜,等.mCIM 试验与 eCIM 试验在产碳青霉烯酶肠杆菌耐药表型检测中的联合应用效能[J]. 山东医药,2019,59(224):35-39.

**版权声明:** ©2024 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。  
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



**OPEN ACCESS**