

DOI:10.13350/j.cjpb.240103

• 论著 •

龙岩市肺炎克雷伯菌分子分型与耐药性分析*

曹春远^{1,2}, 邱付兰³, 李美华¹, 陈海滨¹, 何云¹, 廖琳虹¹, 陈小东¹, 陈前进^{1,2,*}

(1. 龙岩市疾病预防控制中心, 福建龙岩 364000; 2. 福建医科大学龙岩市疾病预防控制中心教学点; 3. 龙岩市第一医院)

【摘要】 目的 了解龙岩地区人感染肺炎克雷伯菌的分子分型特征、耐药特性及部分耐药机制, 为肺炎克雷伯菌感染的防治提供参考。方法 收集 2017-2020 年龙岩市辖区综合医院分离的人感染肺炎克雷伯菌, 采用 PFGE 技术进行分子分型检测, 运用 BioNumerics 软件进行聚类分析, 采用 MIC 法及 K-B 法进行耐药性检测。结果 66.67% 的肺炎克雷伯菌分离自痰液标本, 129 株肺炎克雷伯菌分子分型与聚类分析显示龙岩市人感染肺炎克雷伯菌菌株间相似度为 54.3%~100%, 可分为 118 个 PFGE 型别, 不存在优势流行型别。对 110 株肺炎克雷伯菌进行药敏试验, 有 92 株耐药, 耐药率为 0.90%~22.73%, 其中产 AmpC 酶菌 3 株, 占 3.26% (3/92), 该菌对左氧氟沙星敏感; 产 ESBLs 酶菌株占 21.82% (24/110), 对多粘菌素 B 和亚胺培南均敏感。产 AmpC 或 ESBLs 菌株对抗菌药物的耐药率显著高于不产 AmpC 和 ESBLs 的菌株 ($\chi^2_{\text{AmpC}}=60.682, P<0.01; \chi^2_{\text{ESBLs}}=122.038, P<0.01$)。3 株菌对美罗培南耐药, 其中 1 株同时对亚胺培南耐药, 1 株同时对多粘菌素耐药。多重耐药肺炎克雷伯菌检出率为 15.45%, 最长达八重耐药。结论 龙岩市人感染肺炎克雷伯菌呈分子多态性分布, 对抗菌药物总体耐药相对较低, 产 AmpC 酶较低, 但产 ESBLs 酶及多重耐药率较高, 存在产碳青霉烯酶且同时耐多粘菌素的强耐药株, 因此需要加强对肺炎克雷伯菌的耐药性监测。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; 分子分型; PFGE; 耐药性; AmpC 酶; ESBLs; 碳青霉烯酶

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)01-0015-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jan;19(1):15-19,24.]

Analysis of molecular typing and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in Longyan City

CAO Chunyuan^{1,2}, QIU Fulan³, LI Meihua¹, CHEN Haibin¹, HE Yun¹, LIAO Linhong¹, CHEN Xiaodong¹, CHEN Qianjin^{1,2} (1. Longyan Center for Disease Control and Prevention, Longyan 364000, Fujian, China; 2. Teaching Center of Fujian Medical University in Longyan CDC; 3. Longyan First Hospital)***

【Abstract】 **Objective** To understand the molecular typing characteristics, drug resistance characteristics and partial drug resistance mechanism of *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in Longyan City, so as to provide reference for the prevention and treatment of *K. pneumoniae* infection. **Methods** *K. pneumoniae* isolated from the general Hospital of Longyan City from 2017 to 2020 were collected, PFGE technology was used for molecular typing detection, BioNumerics software was used for cluster analysis, and MIC and K-B methods were used for drug resistance detection. **Results** 66.67% of *K. pneumoniae* were isolated from sputum samples. Molecular typing and cluster analysis of 129 strains of *K. pneumoniae* in Longyan City showed that the similarity among the strains was 54.3%-100%, which could be divided into 118 PFGE types, and there was no dominant epidemic type. The drug susceptibility test of 110 strains of *K. pneumoniae* showed that 92 strains were resistant to drugs, with resistance rates ranging from 0.90% to 22.73%. Among them, 3 strains producing AmpC β -lactamases accounted for 3.26% (3 of 92), which were sensitive to levofloxacin. ESBLs-producing strains accounted for 21.82% (24/110), and were sensitive to both polymyxin B and imipenem. The antimicrobial resistance rate of strains AmpC or ESBLs producing strains was significantly higher than that of strains non-AmpC or non-ESBLs producing ($\chi^2_{\text{AmpC}}=60.682, P<0.01; \chi^2_{\text{ESBLs}}=122.038, P<0.01$). Three strains were resistant to meropenem, among which 1 strain was resistant to imipenem and 1 strain was resistant to polymyxin. The detection rate of multidrug-resistant *K. pneumoniae* was 15.45%, with up to eight multidrug-resistant bacteria. **Conclusion** *K. pneumoniae* isolated from Longyan City showed molecular polymorphism distribution, and overall resistance to antibiotics was relatively low, low production of AmpC β -lactamases, but high production of ESBLs β -lactamases and multi-drug resistance, there were carbapenase production and polymyxin resistant strains, it is necessary to strengthen the resistance surveillance of *K. pneumoniae*.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; molecular typing; PFGE; drug resistance; AmpC β -lactamases; ESBLs β -lactamases; carbapenase

* **【基金项目】** 福建省医学创新课题 (No. 2016-CX-50)。

** **【通讯作者】** 陈前进, E-mail: chenqj222@sina.com

【作者简介】 曹春远 (1976-), 男, 福建长汀人, 本科, 副主任技师, 主要从事微生物与免疫学检验。E-mail: fjcaochy@163.com

克雷伯菌属细菌是肠道条件致病菌,分离率仅次于大肠埃希菌。肺炎克雷伯菌是克雷伯菌属中重要的一种细菌,是引起呼吸道感染的重要致病菌^[1],其引发的院内暴发感染与流行对临床患者的治疗及预后产生极大威胁。利用分子分型技术对肺炎克雷伯菌进行流行病学调查研究,分析其同源性及与感染病例之间的关联性,及早发现和判断是否存在肺炎克雷伯菌株的克隆传播,可以有效预警并及时控制其暴发感染或流行的发生。近年来抗菌药物的广泛使用导致肺炎克雷伯菌出现较强的耐药性,多重耐药菌株不断增加,甚至出现产碳青霉烯酶的耐药菌株,给临床治疗带来更大困难。了解肺炎克雷伯菌的耐药特征及耐药机制,对合理使用抗菌药物治疗疾病有指导意义。

本研究应用脉冲场凝胶电泳(Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE)技术对龙岩市肺炎克雷伯菌分离株进行分子分型,通过 MIC 法和 K-B 法进行耐药性检测,并分析其耐药机制,结果报告如下。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株 2017-2020 年龙岩市二级及以上综合性医院临床分离的肺炎克雷伯菌共 129 株。质控菌株 ATCC25922 购自广东环凯生物有限公司;标准参比菌株沙门菌标准菌株 H9812,为福建省疾病预防控制中心提供。在每次样品检测过程中,以标准菌株作为对照进行质控。

1.2 主要仪器与试剂 VITEK 浊度仪、VITEK 2 Compact 和 VITEK GN 鉴定卡购于法国 bioMérieux 公司;Gel Red 染料购于美国 Biotium 公司;限制性内切酶 Asc I 购于美国 NEB 公司;水浴摇床购于上海精宏公司;CHEF-Mapper 脉冲场凝胶电泳系统和 Gel Doc XR 凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司生产;全自动菌液加样接种仪 AIM 和微生物药敏分析仪 Vizion 为美国 Thermo 公司生产;K-B 法抗菌药物纸片为北京天坛药物生物技术开发公司及杭州滨和微生物试剂有限公司产品;MIC 法检测试剂盒由赛默飞世尔科技(中国)有限公司定制,包含 12 种抗菌药物;M-H 培养基为北京陆桥生物技术有限公司产品。

2 方 法

2.1 菌株复核 对 2017-2020 年龙岩市二级及以上综合性医院临床分离的 129 株肺炎克雷伯菌应用 VITEK GN 鉴定卡进行复核鉴定。

2.2 PFGE 分子分型 参考美国 PulseNet 公司(University PulseNet)的《脉冲场凝胶电泳(PFGE)操作规范》^[2]进行试验,以 H9812 标准株作为试验对照。实验步骤包括细菌包埋、裂解、清洗胶块;酶切胶块内

的 DNA;加样、电泳,获取图像。129 株肺炎克雷伯菌和沙门菌标准株(H9812)DNA 的电泳胶块经限制性内切酶 Asc I 和 Xba I 于 37 °C 酶切 3 h 后置于脉冲场凝胶电泳仪电泳 17.8 h(脉冲时间为 6.0~36.0 s,电泳初始电流 145~155 mA),Gel Red 染色 25~30 min,纯水脱色凝胶后使用凝胶成像仪拍摄图像,应用 BioNumerics 软件对菌株的 PFGE 检测结果进行聚类分析。

2.3 药敏试验 选取 16 种常用抗菌药物,采用药敏微量反应板倍比稀释法进行药敏试验,按试剂盒说明书操作,试验结果根据美国临床实验标准委员会 NCCLS(2012 年版)的标准判定。药敏试验结果分级:敏感(S),中度敏感(I),耐药(R)。大肠埃希菌 ATCC25922 为药敏试验质控菌株。

2.4 超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)及碳青霉烯酶(AmpC)检测 应用 K-B 法检测菌株对头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸、头孢西丁、亚胺培南的耐药性, MIC 法检测菌株对阿莫西林/克拉维酸、吉米沙星、阿米卡星、氨曲南、多粘菌素 B、卡那霉素、链霉素、美罗培南、米诺环素、强力霉素、头孢吡肟、左氧氟沙星的耐药性,其中 MIC 法借助全自动药敏试验菌液接种判读分析系统进行菌株的药敏试验和结果判读。药敏结果根据 CLSI2018 折点判读,并根据 K-B 法检测结果分析菌株产 β -内酰胺酶情况:头孢西丁抑菌圈 < 14 mm 为产头孢菌素酶(AmpC),头孢他啶与头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟与头孢噻肟/克拉维酸两组药物中任一组抑菌圈差值 ≥ 5 mm 为产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs),对亚胺培南耐药为产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌(CPKp),同时对三类及以上抗菌药物耐药菌株判定为多重耐药菌。

2.5 数据处理 以 EXCEL 进行数据分析处理,以 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。

结 果

1 菌株复核

2017-2020 年龙岩市二级及以上综合性医院临床分离的 129 株肺炎克雷伯菌经系统生化鉴定,均为肺炎克雷伯菌。

2 肺炎克雷伯菌分离株标本来源分析

129 株肺炎克雷伯菌中分离自痰液 86 株(占 66.67%),分离自血液 20 株(占 15.50%),分离自尿液 10 株(占 7.75%),分离自脓液 7 株(占 5.43%),分离自分泌物 6 株(占 4.65%)。

3 肺炎克雷伯菌分离株的分子分型

对 129 株肺炎克雷伯菌进行 PFGE 检测,并经 BioNumerics 进行指纹图谱聚类分析,结果见图 1。各

菌株之间图谱差异较大,相似度为 54.3%~100%。按 100%的相似度可将 129 株肺炎克雷伯菌分为 118 个 PFGE 型别,其中 025、042、045、069、081、114 和 116 型分别为 2、3、3、2、2、2、4 株菌;按相似度系数 80%以上划分为同一簇,得到 1 个主要的 PFGE 型别簇 A,包括 29 个 PFGE 型别,共 33 株菌,占肺炎克雷伯菌菌株总数的 25.6%(33/129)。其余菌株均散在分布。表明龙岩市肺炎克雷伯菌并不存在优势流行型别,呈现高度多态性分布。

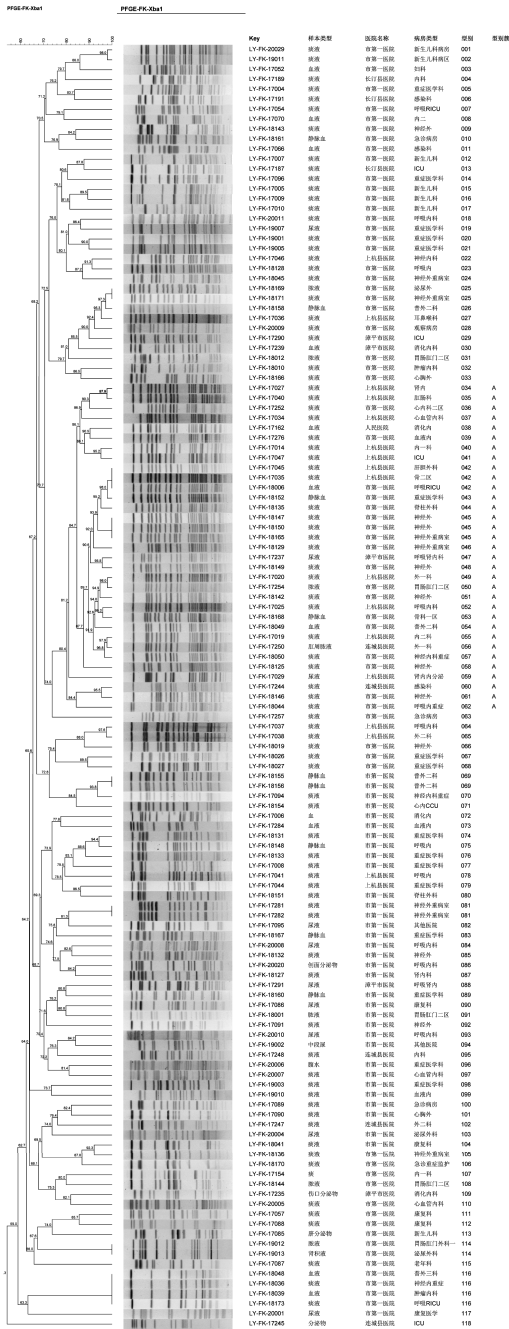


图 1 129 株肺炎克雷伯菌的 PFGE 分型
Fig. 1 PFGE typing of 129 strains of *K. pneumoniae*

4 肺炎克雷伯菌的耐药性

对 110 株肺炎克雷伯菌进行 16 种抗菌药物的耐

药性检测,耐药率为 0.90%~22.73%。耐药率低于 3%的为美罗培南、亚胺培南和多粘菌素 B,分别为 2.73%、0.91%和 0.90%;阿米卡星、左氧氟沙星和头孢西丁耐药率分别为 4.55%、4.55%和 3.26%,对强力霉素、头孢噻肟、氨曲南、米诺环素、吉米沙星、链霉素等的耐药率均在 10%以上(表 1)。

表 1 肺炎克雷伯菌对抗菌药物的耐药情况 (n=110)
Table 1 Resistance of *K. pneumoniae* to antimicrobial drugs (n=110)

抗菌药物 Antibacterial drugs	耐药菌株数 No. of drug resistant strains	耐药率(%) Drug resistance rate
强力霉素	25	22.73
头孢噻肟	20	18.18
氨曲南	19	17.27
米诺环素	19	17.27
吉米沙星	17	15.45
链霉素	13	11.80
卡那霉素	10	9.09
头孢吡肟	9	8.18
阿莫西林/克拉维酸	7	6.36
头孢他啶	6	5.45
阿米卡星	5	4.55
左氧氟沙星	5	4.55
头孢西丁	3	3.26 *
美罗培南	3	2.73
亚胺培南	1	0.91
多粘菌素 B	1	0.90

* 仅检测了 92 株肺炎克雷伯菌对头孢西丁的耐药性。

5 肺炎克雷伯菌产 AmpC 酶情况

应用头孢西丁对 92 株肺炎克雷伯菌进行 AmpC 酶初筛检测,其中 3 株阳性,占 3.26%。3 株 AmpC 酶阳性菌均对亚胺培南和左氧氟沙星敏感,对强力霉素、米诺环素、多粘菌素的耐药率为 33.33%,对其余药物耐药率均为 66.67%。非产 AmpC 酶菌株均对多粘菌素 B、亚胺培南、美罗培南敏感,对阿米卡星和头孢他啶、阿莫西林/克拉维酸的耐药率分别为 1.12%、1.12%和 2.25%,对强力霉素和头孢他啶/克拉维酸的耐药率为 23.60%,对其余药物的耐药率均小于 17%。除左氧氟沙星外,产 AmpC 酶菌株对抗菌药物的耐药率均高于非产 AmpC 酶菌株 ($\chi^2 = 60.682, P < 0.01$)(表 2)。

6 肺炎克雷伯菌产 ESBLs 情况

110 株肺炎克雷伯菌中检出产 ESBLs 24 株(占 21.82%)。产 ESBLs 的菌株对多粘菌素 B 和亚胺培南均敏感,对头孢西丁、阿米卡星、美罗培南、阿莫西林/克拉维酸和卡那霉素的耐药率分别为 4.10%、4.17%、4.17%、8.33%和 8.33%,对头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶/克拉维酸、氨曲南和强力霉素的耐药率均达 50.00%以上,其中对头孢噻肟/克拉维酸的耐药率高达 91.67%,说明克拉维酸对肺炎克雷伯菌产

ESBLs 的抑制性不强。非产 ESBLs 菌株对全部抗菌药物的耐药率均未超过 16%，对头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶/克拉维酸不耐药，对亚胺培南、多粘菌素 B 耐药率分别为 0.91% 和 1.16%，对美罗培南和左氧氟沙星的耐药率均为 2.33%，对强力霉素的耐药率为 15.12%，对米诺环素和吉米沙星的耐药率均为 12.79%。除阿米卡星、亚胺培南、卡那霉素和多粘菌素 B 外，产 ESBLs 菌对抗菌药物的耐药率高于不产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌 (表 3, $\chi^2 = 122.038, P < 0.01$)。

表 2 产 AmpC 酶和非产 AmpC 酶肺炎克雷伯菌对抗菌药物的耐药性比较

抗菌药物	产 AmpC 肺炎克雷伯菌 (n=3)		非产 AmpC 肺炎克雷伯菌 (n=89)	
	AmpC-producing <i>K. pneumoniae</i>		non-AmpC-producing <i>K. pneumoniae</i>	
	耐药菌株数 No. of drug resistant strains	耐药率 (%) Drug resistance rate	耐药菌株数 No. of drug resistant strains	耐药率 (%) Drug resistance rate
强力霉素	1	33.33	21	23.60
氨曲南	2	66.67	15	16.85
米诺环素	1	33.33	15	16.85
吉米沙星	2	66.67	13	14.61
链霉素	2	66.67	8	8.99
卡那霉素	2	66.67	6	6.74
头孢吡肟	2	66.67	5	5.62
左氧氟沙星	0	0.00	5	5.62
阿米卡星	2	66.67	1	1.12
美罗培南	2	66.67	0	0.00
多粘菌素 B	1	33.33	0	0.00
亚胺培南	0	0.00	0	0.00
阿莫西林/克拉维酸	/	/	2	2.25
头孢噻肟	/	/	15	16.85
头孢他啶	/	/	1	1.12
头孢噻肟/克拉维酸	/	/	12	13.48
头孢他啶/克拉维酸	/	/	21	23.60

7 肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性

110 株肺炎克雷伯菌中有 3 株对美罗培南耐药，其中 1 株同时对亚胺培南耐药，另有 1 株对多粘菌素耐药。

8 肺炎克雷伯菌多重耐药情况

根据抗菌药物分类，将本研究中药敏试验的抗菌药物分成 β -内酰胺酶抑制剂复合抗菌药物 (AMC)、头孢菌素 (CE)、美罗培南 (MPM)、亚胺培南 (IPM)、氨曲南 (AT)、氨基糖苷类 (AMS)、喹诺酮类 (QUS)、粘菌素类 (POB)、四环素类 (TE) 等 9 类。根据多重耐药菌的定义，有 17 株为多重耐药肺炎克雷伯菌 (占 15.45%)。根据多重耐药肺炎克雷伯菌对抗菌药物组合耐药率占比可分成 4 种耐药谱：第 1 种是三重耐药，

耐药率最高 (41.18%)，以 CE+TE+AT 和 TE+AMS+QUS 为主；第 2 种是四重耐药，中度耐药 (耐药率 29.41%)，以 CE+TE+AT+QUS 为主；第 3 种为八重耐药，耐药率较低 (11.76%)；第 4 种是五~七重耐药，耐药率均为 5.88% (表 4)。

表 3 产 ESBLs 和非产 ESBLs 肺炎克雷伯菌对抗菌药物的耐药性比较
Table 3 Comparison of antimicrobial resistance between ESBLs-producing and non-ESBLs-producing *K. pneumoniae*

抗菌药物	产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 (n=24)		非产 ESBLs 肺炎克雷伯菌 (n=86)	
	ESBLs-producing <i>K. pneumoniae</i>		non-ESBLs-producing <i>K. pneumoniae</i>	
	耐药菌株数 No. of drug resistant strains	耐药率 (%) Drug resistance rate	耐药菌株数 No. of drug resistant strains	耐药率 (%) Drug resistance rate
强力霉素	12	50.00	13	15.12
米诺环素	8	33.33	11	12.79
吉米沙星	6	25.00	11	12.79
链霉素	5	20.83	8	9.30
卡那霉素	2	8.33	8	9.30
氨曲南	13	54.17	6	6.98
阿莫西林/克拉维酸	2	8.33	5	5.81
阿米卡星	1	4.17	4	4.65
头孢吡肟	6	25.00	3	3.49
头孢西丁	1	4.10	2	2.94
左氧氟沙星	3	12.50	2	2.33
美罗培南	1	4.17	2	2.33
多粘菌素 B	0	0.00	1	1.16
亚胺培南	0	0.00	1	0.91
头孢他啶	/	/	4	4.65
头孢噻肟	/	/	4	4.65
头孢他啶/克拉维酸	12	50.00	0	0.00
头孢噻肟/克拉维酸	22	91.67	0	0.00

表 4 多重耐药肺炎克雷伯菌耐药谱及构成
Table 4 Drug resistance spectrum and constituent of multi-drug resistant *K. pneumoniae*

耐药谱 Drug resistance spectrum	菌株数 Number of strains	构成比 (%) Constituent ratio
AMC+CE+AT	1	
AT+AMS+QUS	1	
3 耐 CE+AT+QUS	1	
CE+TE+AT	2	41.18
TE+AMS+QUS	2	
4 耐 CE+TE+AT+AMS	2	29.41
CE+TE+AT+QUS	3	
5 耐 AMC+TE+AT+AMS+QUS	1	5.88
6 耐 AMC+CE+TE+AT+AMS+QUS	1	5.88
7 耐 AMC+CE+TE+AT+AMS+MPM+QUS	1	5.88
8 耐 AMC+CE+TE+AT+POB+AMS+MPM+QUS	1	11.76
AMC+CE+TE+AT+AMS+MPM+IPM+QUS	1	

讨论

肺炎克雷伯菌是普遍存在于自然界中的人畜共患革兰氏阴性条件致病菌，可引起泌尿道感染、呼吸道感染和血流感染，常见于呼吸内科、神经外科和重症医学

科患者^[3]。对菌株的正确分型能够提供细菌基因组信息,是进行细菌流行病学研究的重要依据,能够在各菌株间克隆关系的研究、感染源和传播途径的确定、病原菌流行的防控、交叉感染的预防、强致病力菌株的确定等方面均起到极其重要的作用^[4]。

本研究对2017-2020年龙岩市二级及以上综合性医院临床分离的129株肺炎克雷伯菌进行PFGE检测并指纹图谱聚类分析,建立了龙岩市肺炎克雷伯菌的分子分型数据库。结果显示,各肺炎克雷伯菌株图谱差异较大,相似度为54.3%~100%,按100%的相似度可将菌株酶切图谱分为118个PFGE型别;按80%相似度分簇,也仅有一个簇33株菌比较明显,其余均散在分布。表明龙岩市肺炎克雷伯菌呈现高度多态性分布,并不存在优势流行型别。PFGE分子数据库的建立,有助于观察本地区不同医院肺炎克雷伯菌株间的异同及其在流行传播过程中发生在分子水平的变异,了解菌株间的流行规律。通过PFGE进行同源性分析,可发现院内感染的暴发^[5]。

随着广谱抗菌药物的广泛使用,肺炎克雷伯菌在选择性条件下发生了抗菌谱变迁,并发展成医院感染的重要致病菌之一^[6-7]。肺炎克雷伯菌通常寄居于人体的鼻咽部和肠道,而肠道是其感染机体的主要来源。

本研究中的129株肺炎克雷伯菌66.67%来源于痰液,略低于张帆等^[8]报道的河南辉县统计结果(76.59%),说明呼吸系统是克雷伯菌属的重要感染部位。医院内呼吸道感染的肺炎克雷伯菌主要来源于患者自身口咽部定植的肺炎克雷伯菌,受各种因素作用,使口咽部正常定植的菌群进入下呼吸道导致感染^[9]。提示应该加强对住院患者呼吸系统肺炎克雷伯菌感染的监控,密切关注本病区病原菌的分布情况,熟悉抗菌药物的耐药性,以便于经验性选择抗感染治疗药物,有效防控医院感染的发生。

耐药性检测显示,肺炎克雷伯菌对16种抗菌药物均存在不同程度的耐药,耐药率在0.9%~23%,其中对强力霉素的耐药率大于22%,对多粘菌素B、美罗培南和亚胺培南耐药率不超过3%。提示肺炎克雷伯菌对四环素类药物耐药比较严重,不宜作为临床指导用药。而碳青霉烯类和新型抗菌药物粘菌素类对肺炎克雷伯菌有较高的抗菌活性。

近年来随着头孢菌素的广泛应用,出现了高产AmpC酶和质粒介导的AmpC酶肺炎克雷伯菌,并引起耐药菌株广泛传播,给临床治疗带来困难。本研究中的产AmpC酶肺炎克雷伯菌占3%左右,对左氧氟沙星和亚胺培南均敏感,因此临床上可用左氧氟沙星和亚胺培南治疗产AmpC酶肺炎克雷伯菌感染。

肺炎克雷伯菌是产ESBLs的代表菌株^[10]。ESBLs可通过质粒介导在不同种属的细菌之间传播,造成广泛耐药和流行。本研究中产ESBLs肺炎克雷伯菌占21.82%(24/110),稍低于国内2016年CHINET细菌耐药性监测结果(25.2%)^[11]和陈夏容等^[12]报道的福建医科大学附属第二医院监测结果(24.9%),低于周蓉等^[7]报道的重庆医科大学第一附属医院监测结果(35.2%),可能与区域性用药差异有关。本研究结果显示,产ESBLs肺炎克雷伯菌对除卡那霉素、阿米卡星、多粘菌素B和亚胺培南外其它抗菌药物的耐药率显著高于非产ESBLs菌株,对美罗培南的耐药率高于亚胺培南。美罗培南是继亚胺培南后又一种新型半合成的碳青霉烯类抗菌药物,由于临床使用量不断增加,其对肺炎克雷伯菌的筛选压力增大。非产ESBLs的菌株对抗菌药物的耐药率<16%,对亚胺培南的耐药率<1%,提示ESBLs阴性菌株对大部分抗菌药物敏感,代表药物为碳青霉烯类。

本研究中有3株肺炎克雷伯菌对美罗培南耐药,其中1株同时对亚胺培南耐药。表型分析显示3株菌均为产碳青霉烯酶菌株,特别是同时耐亚胺培南的菌株产碳青霉烯酶菌株的可能性很大,有待进一步分析确认,但该菌株对多粘菌素与米诺环素敏感。另有1株为同时对美罗培南和多粘菌素耐药的强耐药株,因此有必要加强病原分析与病例管理,防止强耐药株的出现与播散。

形成多重耐药的原因有产 β -内酰胺酶、生物被膜形成、抗菌药物的主动外排,以及临床广泛使用抗菌药物造成的筛选压力等^[13]。2017年国家细菌耐药监测网表明肺炎克雷伯菌的分离率及耐药率呈上升趋势,存在多重耐药^[14]。本研究中的多重耐药菌株对3~8组抗菌药物组合均有耐药,三重耐药率最高,达41.18%,四重耐药率为29.41%,临床治疗三重、四重耐药肺炎克雷伯菌要避免使用头孢菌素、四环素、氨基糖苷类和喹诺酮类抗菌药物。八重耐药率为11.76%,五重~七重耐药率均为5.88%。肺炎克雷伯菌对抗菌药物耐药种类越多,治疗难度越大。

本研究显示龙岩市肺炎克雷伯菌呈广泛分子多态性分布,整体耐药率相对较低,但已有产AmpC酶和产ESBLs酶菌株出现,甚至存在产碳青霉烯酶菌株。因此应高度重视细菌耐药性监测及相关研究,重点关注包括肺炎克雷伯菌在内的临床常见主要病原菌的耐药性变迁,及时检出广泛耐药菌株并采取相应的感染控制预防措施;了解其耐药机制与规律特点,确定其耐药性,合理使用抗菌药物,控制细菌耐药性的产生与传播。

(下转24页)

本实验利用昆虫杆状病毒系统表达发 MTB39A 蛋白,经鉴定该蛋白具有反应原性,为研制可用于初期感染结核诊断试剂或新型结核疫苗奠定了一定的理论与实践基础。

【参考文献】

[1] WHO. Global tuberculosis report [R]. Geneva: World Health Organization, 2022.

[2] Yang J, Lee S, Oh S, et al. The risk of active tuberculosis among individuals living in tuberculosis-affected households in the Republic of Korea, 2015[J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0225744.

[3] Salvador LCM, O'Brien DJ, Cosgrove MK, et al. Disease management at the wildlife-livestock interface: Using whole-genome sequencing to study the role of elk in *Mycobacterium bovis* transmission in Michigan, USA[J]. Mol Ecol, 2019, 28(9): 2192-2205.

[4] Palmer MV, Wiarda J, Kanipe C, et al. Early Pulmonary Lesions in Cattle Infected via Aerosolized *Mycobacterium bovis* [J]. Vet Pathol, 2019, 56(4): 544-554.

[5] Chakaya J, Khan M, Ntoumi F, et al. Global Tuberculosis Report 2020-Reflections on the Global TB burden, treatment and prevention efforts[J]. Int J Infect Dis, 2021, 113(Suppl 1): S7-S12.

[6] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. Nature, 1998, 393(6685): 537-544.

[7] Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel *Mycobacterium tuberculosis* mtb39 gene family[J]. Infect Immun, 1999, 67(6): 2941-2950.

[8] Nair S, Pandey AD, Mukhopadhyay S. The PPE18 protein of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits NF-kappaB/rel-mediated proinflammatory cytokine production by upregulating and phosphorylating suppressor of cytokine signaling 3 protein[J]. J

Immunol, 2011, 186(9): 5413-5424.

[9] Bhat KH, Ahmed A, Kumar S, et al. Role of PPE18 protein in intracellular survival and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52601.

[10] Dolasia K, Nazar F, Mukhopadhyay S. *Mycobacterium tuberculosis* PPE18 protein inhibits MHC class II antigen presentation and B cell response in mice[J]. Eur J Immunol, 2021, 51(3): 603-619.

[11] Nair S, Ramaswamy P A, Ghosh S, et al. The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage [J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6269-6281.

[12] Queval CJ, Song OR, Deboosere N, et al. STAT3 represses nitric oxide synthesis in human macrophages upon *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Sci Rep, 2016, 6: 29297.

[13] 姚志鸿, 张志芳, 胡苏洁, 等. 结核分枝杆菌诱导宿主 I 型干扰素应答及其免疫调控功能研究进展[J]. 生物学杂志, 2022, 39(4): 94-97.

[14] Contreras-Gomez A, Sanchez-Miron A, Garcia-Camacho F, et al. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system[J]. Biotechnol Prog, 2014, 30(1): 1-18.

[15] Salem TZ, Cheng XH, Cheng XW. AcMNPV enhances infection by ThorNPV in Sf21 cells and SeMNPV in Hi5 cells[J]. Arch Virol, 2012, 157(10): 1875-1885.

[16] Muralidharan A, Russell M, Larocque L, et al. Targeting CD40 enhances antibody- and CD8-mediated protection against respiratory syncytial virus infection[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 16648.

[17] 王睿男, 蒋菲, 刘亚涛, 等. 重组牛 IFN-γ 蛋白在昆虫杆状病毒表达系统中的表达、纯化和鉴定[J]. 中国草食动物科学, 2021, 41(2): 39-43.

[18] 李双星, 刘业兵, 柳方远, 等. 猫传染性腹膜炎病毒 N 蛋白在昆虫细胞-杆状病毒系统中的表达与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 273-279.

[19] 黄超华, 曹琛福, 阮周曦, 等. 蓝舌病毒血清 8 型 NS3 蛋白在昆虫杆状病毒系统中的表达与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(04): 1-4, 10, 141.

【收稿日期】 2023-08-30 【修回日期】 2023-11-15

(上接 19 页)

【参考文献】

[1] 马丹娟, 黄研, 卢春敏, 等. 2016-2018 年某医院产超广谱 β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际医药卫生导报, 2020, 26(12): 1672-1675.

[2] Hutchison ML, Walters LD, Moore A, et al. Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(9): 5111-5118.

[3] 何珊珊, 陈敏, 金海英. 肺炎克雷伯菌临床分布特点与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 19(2): 4345-4346.

[4] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of america[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6): 426-439.

[5] 庞慧, 弓艳娥, 袁敏, 等. 山西省某医院发现的携带碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌的流行特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(11): 1110-1115.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards

for antimicrobial susceptibility testing [S]. Twenty-first Informational Supplement, 2011, M100-S21.

[7] 周蓉, 朱卫民, 黄文祥, 等. 855 株肺炎克雷伯菌感染的临床分布及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(5): 363-369.

[8] 张帆. 肺炎克雷伯菌医院感染及耐药性分析[J]. 医学检验与临床, 2021, 32(1): 30-33.

[9] 孙长贵, 李振江, 曾贤铭, 等. 肺炎克雷伯菌医院感染监测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(6): 737-739.

[10] 季淑娟, 顾怡明, 谭文涛, 等. 中国部分地区大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌超广谱 β-内酰胺酶基因研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 590-593.

[11] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-491.

[12] 陈夏容, 黄丹丹, 林丽玲. 肺炎克雷伯杆菌致医院感染和社区感染的耐药性研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2019, 25(4): 57-60.

[13] 刘保光, 吴华, 张萍英. 肺炎克雷伯菌耐药研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(2): 108-111.

[14] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251.

【收稿日期】 2023-07-29 【修回日期】 2023-10-16