

# 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及其分子检测

李子尧, 鲁炳怀

基金项目: 国家重点研发计划课题(编号:2018YFC1200100, 2018YFC1200102)

作者单位: 100029 北京, 中日友好临床医学研究所, 中日友好医院呼吸中心, 呼吸与危重医学科临床微生物与感染实验室

作者简介: 李子尧(1997-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肺炎克雷伯菌耐药机制与毒力。E-mail: li\_z\_y0910@163.com

通讯作者: 鲁炳怀(1972-), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 临床微生物与感染病原学诊断, 耐药机制。E-mail: zs25041@126.com



鲁炳怀, 医学博士, 主任医师, 北京大学医学部教授, 北京大学医学部与北京协和医学院硕士研究生导师。兼任中华医学会检验分会微生物学组委员, 中华医学会热带病与寄生虫分会青年学组委员, 中国医促会临床微生物与感染分会常委, 欧洲临床微生物和感染病学会药敏委员会第二届华人抗菌药物敏感性委员会委员(CHICAST)。研究方向: 临床微生物与感染病原学诊断, 耐药机制, 呼吸道感染微生物的检测方法。近年来主要从事单核细胞增生李斯特菌与肺炎克雷伯菌的耐药机制与致病机制的研究。主持多项国家级与省部级科研项目。发表SCI收录文章近30篇。

**[摘要]** 肺炎克雷伯菌是引起社区获得性感染和医院感染的重要病原体, 碳青霉烯类抗生素是目前治疗肺炎克雷伯菌严重感染的重要抗菌药物, 而耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CR-KP)分离率逐年提升, 标志着耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药情况愈加严峻。耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌可以通过 $\beta$ -内酰胺酶的生成、孔蛋白的改变和外排泵活性的增加导致碳青霉烯的耐药。目前分子检测方法有聚合酶链反应(PCR)类、基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、下一代测序及环介导等温扩增(LAMP)技术, 但部分尚未应用于临床。了解耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制, 改进检测方法是十分重要的。

**[关键词]** 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯类耐药; 抗生素; 耐药机制; 分子检测

**[中图分类号]** R 378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2021)03-0256-06

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2021.03.07

**Drug-resistant mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its molecular detection** LI Zi-yao, LU Bing-huai. Laboratory of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Center of Respiratory Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Institute of Clinical Medicine, Beijing 100029, China

**[Abstract]** *Klebsiella pneumoniae* is an important pathogen causing community-acquired and nosocomial infections. Carbapenems are important antibiotics in the treatment of *Klebsiella pneumoniae* severe infection, and the isolation rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-KP) is increasing year by year, which indicates that the antibiotics resistance of CR-KP is becoming more and more serious. CR-KP can lead to carbapenem resistance through the production of  $\beta$ -lactamase, the change of porin and the increase of efflux pump activity. At present, the molecular detection methods include polymerase chain reaction (PCR), matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), next generation sequencing and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology, but some of them have not been used in clinical practice. It is essential to understand the drug-resistant mechanism of CR-KP and to improve the detection method.

**[Key words]** *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenem resistance; Antibiotics; Drug-resistant mechanism; Molecular detection

肺炎克雷伯菌是一种机会性病原体,可引起社区获得性感染和医院感染,约占所有革兰阴性感染的1/3,如尿路感染、膀胱炎、肺炎、外科伤口感染、心内膜炎和败血症,特别多见于免疫力低下的人群<sup>[1]</sup>。高毒力的肺炎克雷伯菌还会导致坏死性肺炎、化脓性肝脓肿和内生性眼内炎<sup>[2~4]</sup>。碳青霉烯类抗生素是广谱β-内酰胺类药物,可用于治疗各种肺炎克雷伯菌引起的感染,然而我国的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CR-KP)的分离率呈逐年上升状态,对CR-KP的耐药机制的研究是非常有必要的。

### 1 几种常见的CR-KP耐药机制

CR-KP对碳青霉烯类抗生素的耐药性是由不同耐药机制共同介导的,主要有碳青霉烯酶的生成、孔蛋白的改变和外排泵活性的增加等。

**1.1 碳青霉烯酶** 在青霉素发现并纯化后不久,便鉴定出了β-内酰胺酶,其可以降解青霉素类抗生素而产生耐药<sup>[5]</sup>。β-内酰胺酶主要集中在细菌的周质内,从而在β-内酰胺类药物到达细胞壁中的青霉素结合蛋白(penicillin binding protein, PBP)靶位之前将其β-内酰胺环水解。目前对β-内酰胺酶有两种分类方法,第一种是按照其一级分子结构的分子分类法(Ambler分类系统)<sup>[6]</sup>,也是目前最常用的分类法;第二种是按照其结合水解和抑制功能特性的功能分类法(Bush-Jacoby分类系统)<sup>[7]</sup>。《临床微生物手册》给出了β-内酰胺酶分类,见表1,可供参考<sup>[8]</sup>。碳青霉烯酶是一种能水解碳青霉烯类抗生素(如厄他培南、亚胺培南与美罗培南)的β-内酰胺酶。通常情况下,碳青霉烯酶也可以水解β-内酰胺类抗生素,如青霉素类、β-内酰胺类-β-内酰胺酶抑制剂复合制剂、头孢菌素类等。通常而言,产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌一般意味着对目前所有β-内酰胺类药物均耐药。产碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因。自从IMP-1自肺炎克雷伯菌鉴定出后,多种碳青霉烯酶陆续发现,如GES-4、VIM-1、NDM-1、OXA-48、KPC-2。其中KPC酶成为最重要的碳青霉烯酶,可由质粒介导快速传播。IMP对碳青霉烯类抗生素水解能力较弱,携带并不一定在药敏试验中对碳青霉烯类耐药。Ambler分类法将β-内酰胺酶分为A、B、C和D四大类β-内酰胺酶。碳青霉烯酶根据其分子结构的差异分为3类,分别隶属于Ambler分类系统中的A、B和D类β-内酰胺酶,由bla基因编码。A类和D类碳青霉烯酶需要丝氨酸作为他们的活化位点,而B类金属β-内

酰胺酶(metallo-β-lactamases, MBLs)需要金属锌作为其活化中心。Ambler A类β-内酰胺酶是最大的一类β-内酰胺酶,其特点是活性部位含有丝氨酸。它能够灭活大部分的β-内酰胺类药物。该类β-内酰胺酶包括青霉素酶、头孢菌素酶、窄谱和广谱β-内酰胺酶、超广谱β-内酰胺酶(extended spectrum β-lactamases, ESBLs)和碳青霉烯酶。它们对克拉维酸和他唑巴坦的抑制作用的敏感性是可变的,但都可被新型β-内酰胺酶抑制剂包括阿维巴坦、瑞来巴坦(relebactam)和维博巴坦(vaborbactam)所抑制<sup>[7,9]</sup>。在CR-KP中经常观察到的各种重要的β-内酰胺酶[例如ESBLs(TEM、SHV、CTX-M)和KPC]都属于这类β-内酰胺酶。TEM型β-内酰胺酶能够水解早期头孢菌素和青霉素,在肺炎克雷伯菌中比较常见。SHV-1具有与TEM-1相似的底物和抑制谱,几乎普遍存在于肺炎克雷伯菌中<sup>[10]</sup>。因为抗生素的选择压力及耐药基因在各个细菌之间进行转移,TEM和SHV酶的基因均已发生相当多的突变,这导致这两种酶类型的高度多样性,也增加抗生素的耐药范围<sup>[7,10]</sup>。目前已有报道SHV-1和SHV-11的大量产生降低了哌拉西林-他唑巴坦的有效性<sup>[11]</sup>。包括CTX-M在内的其他A类ESBLs(PER酶、GES酶和VEB酶等)目前已在包括肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、肠杆菌在内的肠杆菌病原体中得到鉴定<sup>[12,13]</sup>。大多数A类ESBLs仍然对克拉维酸敏感。但仍然有部分A类ESBLs(如TEM-30、SHV-40和TEM-50)表现出对各种β-内酰胺酶抑制剂的敏感度降低<sup>[14]</sup>。产碳青霉烯酶(如KPC酶)的肺炎克雷伯菌早有报道,而且是引起CR-KP的重要原因,如KPC-1可导致对亚胺培南、美罗培南、阿莫西林-克拉维酸、哌拉西林-他唑巴坦、头孢他啶、氨基糖苷类和头孢曲松的耐药<sup>[15]</sup>。KPC酶的编码基因通常位于转座子Tn4401内,允许其在其他革兰阴性菌中传播<sup>[16]</sup>。虽然在含有KPC丝氨酸碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌中发现β-内酰胺酶抑制剂的抑制物,但产KPC酶感染仍然可以成功地用各种新的β-内酰胺-β-内酰胺酶抑制剂组合所治疗,包括亚胺培南-瑞来巴坦、美罗培南-维博巴坦和头孢他啶-阿维巴坦<sup>[17]</sup>。但不幸的是,目前已有关于产KPC酶的肺炎克雷伯菌对头孢他啶-阿维巴坦耐药的报道<sup>[18,19]</sup>。Ambler B类β-内酰胺酶代表了另一组临床上重要的酶。因其活性位点上需要锌离子,故而也称为MBLs。MBLs能水解大多数β-内酰胺,包括青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类和β-内酰胺酶抑制剂,但氨基糖苷类除外,其可被乙二

胺四乙酸 EDTA 抑制<sup>[7, 20, 21]</sup>。由于重要的 MBLs(如 IMP、VIM 和 NDM 家族的 MBLs) 都可被整合到可移动基因元件中, 而伴随着这些可移动基因元件在细菌之间的转移, 碳青霉烯酶的氨基酸发生取代, 产生碳青霉烯酶的不同变体。这导致碳青霉烯酶的活性及其对碳青霉烯类抗生素的亲合力发生变化, 所以对 MBLs 需要引起特别的关注<sup>[22, 23]</sup>。Ambler D 类 β-内酰胺酶主要由苯唑西林水解酶(oxacillin hydro-lase, OXA) 组成, 能水解具有 ESBLs 样底物特性的苯唑西林及其衍生物, 几乎所有 OXA 酶, 除了 OXA-48, 都对 β-内酰胺酶抑制剂耐药<sup>[7, 24]</sup>。肺炎克雷伯菌可通过携带有 OXA-48 基因的质粒来表达获得 OXA-48<sup>[25]</sup>。同时这些质粒中也编码了其他 ESBLs, 如 CTX-M, 从而使肺炎克雷伯菌对大多数 β-内酰胺类抗生素耐药<sup>[26]</sup>。

表 1 β-内酰胺酶分类

Bush-Jacoby 分类系统	主要亚组	Ambler 分类系统	主要特性
1 组头孢菌素酶		C 类 (Amp C 酶)	通常编码在染色体上, 对除碳青霉烯类抗生素以外的所有 β-内酰胺类抗生素耐药, 不可被克拉维酸抑制
2 组青霉素酶	2a	A 类 (丝氨酸 β-内酰胺酶)	葡萄球菌青霉素酶
	2b	A 类	广谱; TEM-1, TEM-2 和 SHV-1
	2be	A 类	超广谱; TEM 和 SHV 变异体
	2br	A 类	IRT β-内酰胺酶
	2c	A 类	可水解羧苄青霉素
	2e	A 类	头孢菌素酶, 可被克拉维酸抑制
	2f	A 类	碳青霉烯酶, 可被克拉维酸抑制
	2d	D 类 (OXA)	苯唑西林水解酶
3 组 MBLs	3a	B 类 (金属酶)	锌离子依赖性的碳青霉烯酶, 不降解氨基糖甙
	3b	B 类	
	3c	B 类	
4 组		未分类	多种酶

1.2 孔蛋白 外膜蛋白通道(孔蛋白)的数量及功能的改变也是碳青霉烯类耐药的重要机制。CR-KP 中经常观察到主要外膜蛋白 OmpK36 和 OmpK35 的改变<sup>[27]</sup>。这些改变可能在治疗过程中出现, 增强了其他抵抗机制的影响, 如降解酶。在治疗莫西沙星敏感的肺炎克雷伯菌感染时, 发生了 OmpK36 的缺

失及 Amp C β-内酰胺酶的表达<sup>[28]</sup>。也有报道<sup>[29, 30]</sup>称肺炎克雷伯菌孔蛋白突变确实降低了肺炎克雷伯菌对碳青霉烯的敏感性, 但不赋予其临床耐药性, 需要 β-内酰胺酶。荚膜的生成似乎也 and 孔蛋白的生成有着一些联系。KvrA 是一种控制荚膜产生的转录抑制因子。目前已有报道证明 KvrA 的缺失降低了 OmpK35 和 OmpK36 孔蛋白的产生, 从而降低了产 KPC-3 的肺炎克雷伯菌对美罗培南-维博巴坦的敏感性<sup>[31]</sup>。

1.3 外排泵 外排泵能够主动将药物挤出细胞, 其编码基因可以位于染色体上或可移动基因元件内。已经被鉴定的外排泵有 6 个主要家族: RND 家族、MFS 家族、MATE 家族、SMR 家族、ABC 家族和 PACE 家族<sup>[32-34]</sup>。大多数外排泵是多药转运体, 能有效地泵出多种抗生素, 从而导致多药耐药性。其中 RND 家族外排泵在革兰阴性菌中是特别值得关注的。这种类型的外排泵可以排出各种抗生素和结构上不相关的分子。AcrAB-TolC 是典型的属于 RND 超家族的多药外排泵, 通常是染色体编码的, 但也可以通过质粒获得。在肺炎克雷伯菌中 AcrAB-TolC 的过量生产是多重耐药的重要特点, 当其缺失时, 多种药物的耐药性也降低数倍<sup>[35, 36]</sup>。而且在含有碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌中, AcrAB 突变表达与 β-内酰胺酶活性会产生协同效应, 导致高水平的碳青霉烯类耐药性<sup>[37]</sup>。

2 常用的分子生物学检测技术

目前, 临床上检测 CR-KP 的方法仍然是以培养作为鉴定的金标准, 但由于培养所需的时间较长, 会导致临床错过最佳的治疗时间, 降低了临床患者的生存率。分子生物学检测方法由于其灵敏、快速的特点可大大弥补培养导致的延误。以下简要介绍几种分子生物学检测 CR-KP 的技术。

2.1 聚合酶链反应( polymerase chain reaction, PCR) 类技术 目前应用于检测的常用 PCR 的方法主要有普通 PCR、实时定量 PCR 及多重 PCR, 可用于检测 KPCs、NDMs、IMPs、VIMs 与 OXA-48 等碳青霉烯类耐药基因。普通 PCR 及实时定量 PCR 无论是临床还是其他地方, 早已被广泛接受。而多重 PCR 相比于普通 PCR 及实时定量 PCR, 其能够同时检测多个基因的特点, 曾引起广泛关注, 但其受到引物及靶标设计等诸多因素影响, 限制了其发展<sup>[38-41]</sup>。赛沛公司的 GeneXpert 分子诊断系统推出的 Xpert Carba-R 检测试剂盒与生物梅立埃公司的 FilmArray 的多重 PCR 分子诊断系统, 可在大约 1 h 内直接从标本或

纯菌落中定性检测和区分常见碳青霉烯酶基因(如 bla<sub>KPC</sub>、bla<sub>NDM</sub>、bla<sub>VIM</sub>、bla<sub>OXA-48</sub> 和 bla<sub>IMP</sub>) ,其灵敏度和特异度均较高<sup>[42-44]</sup>。PCR 类技术最大的优点是快速、灵敏,但缺陷也相当明显,只能用来检测有限的已知的基因,不能发现新的相关基因。

**2.2 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 检测技术** MALDI-TOF MS 的原理是用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,使生物分子电离,然后在电场作用下飞过飞行管道,检测到检测器的飞行时间来测定离子的质荷比(M/Z)。目前,已广泛应用于微生物的鉴定。MALDI-TOF MS 检测耐药主要通过检测细菌产生的酶、灭活抗生素产生的物质或者耐药细菌特有的物质等<sup>[45]</sup>。相比于改良的 Hodge 实验、脉冲场凝胶电泳等技术,其用时大幅度缩短,灵敏度及特异度均较高<sup>[45,46]</sup>。但其缺陷是目前还不能够准确地报告最低抑菌浓度<sup>[47]</sup>。MALDI-TOF MS 目前已在各个实验室得到应用,未来使用 MALDI-TOF MS 来检测 CR-KP 的方法可能会应用于临床。

**2.3 测序技术** 目前应用最广泛的就是全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)。基因组包含了细菌的全部遗传信息,进行 WGS 可以明确细菌的具体耐药基因,预测细菌的耐药情况,发掘潜在未知的耐药机制<sup>[48]</sup>。但是 WGS 的缺陷也非常明显,其成本高,用时长等。所以目前尚未应用于临床的检测,仅用于科研工作。近年来 Nanopore 测序技术用于耐药菌的检测,因其灵敏度高、用时短、成本低等优点, Nanopore 技术也引起了关注<sup>[49]</sup>。

**2.4 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术** LAMP 技术是一种新型的核酸扩增方法,其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,在 DNA 聚合酶的作用下,60~65℃ 恒温扩增,1 h 左右即可完成核酸扩增,效率可达 10<sup>9-10</sup> 个数量级,具有操作简单、特异性强、产物易检测等优点<sup>[50]</sup>。检测可以在水浴或加热块中进行<sup>[51]</sup>。相比于 PCR, LAMP 检测产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌的灵敏度、特异度更高而且更快<sup>[52]</sup>。但目前 LAMP 技术远没有 PCR 技术成熟,这可能是限制其应用于临床的重要因素之一。

### 3 小结

碳青霉烯类抗生素一直是治疗肠杆菌属(如肺炎克雷伯菌)引起的严重感染的最主要的药物。但近年来,碳青霉烯类抗生素的滥用造成了选择压力,

导致耐药基因突变或传播。肺炎克雷伯菌通过 β-内酰胺酶、孔蛋白的改变和外排泵活性的增加获得高水平的耐药性。这强调了在治疗过程中需要正确使用碳青霉烯类抗生素。本文仅简要对肺炎克雷伯菌的碳青霉烯类抗生素的耐药机制进行了总结。其中一部分耐药基因可以编码到可移动遗传元件上,而这些移动元件上同时又编码了其他的毒力及耐药基因,这就导致高毒力高耐药的肺炎克雷伯菌的出现<sup>[53,54]</sup>。但目前对于 CR-KP 的诊断还仍然以培养作为金标准,报告周期较长,不能及时指导临床合理正确地用药。虽然目前已经有多种分子生物学检测技术如 PCR、MALDI-TOF MS、测序和 LAMP 等技术,但由于诸如设计、成本等多种原因,大部分目前尚未应用于临床,使得报告周期没有明显缩短。所以了解 CR-KP 的耐药机制,改进检测方法,便于临床尽早作出报告,有助于对其进行预防及控制,防止其进一步进化。

### 参考文献

- [1] Yang X, Dong N, Chan EW, et al. Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29(1): 65-83.
- [2] Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 629-661.
- [3] Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(3): 252-275.
- [4] Siu LK, Yeh KM, Lin JC, et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(11): 881-887.
- [5] Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940 [J]. *Rev Infect Dis*, 1988, 10(4): 677-678.
- [6] Ambler RP. The structure of beta-lactamases [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1980, 289(1036): 321-331.
- [7] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(3): 969-976.
- [8] Jorgensen AH, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology* [M]. Eleventh Edition. Washington (DC): ASM Press, 2015: 1223.
- [9] Bush K, Bradford PA. Interplay between β-lactamases and new β-lactamase inhibitors [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(5): 295-306.
- [10] Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14 Suppl 1: 11-32.
- [11] Han MS, Park KS, Jeon JH, et al. SHV hyperproduction as a mechanism for piperacillin-tazobactam resistance in extended-spectrum cephalosporin-susceptible *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microb Drug Resist*, 2020, 26(4): 334-340.

- [12] Zhao WH , Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria [J]. *Crit Rev Microbiol* ,2013 ,39( 1) : 79 - 101.
- [13] Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes [J]. *Antimicrob Agents Chemother* ,2004 ,48( 1) : 1 - 14.
- [14] Cantón R , Morosini MI , de la Maza OM , et al. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance [J]. *Clin Microbiol Infect* 2008 ,14 Suppl 1: 53 - 62.
- [15] Babic M , Hujer AM , Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases [J]. *Drug Resist Updat* ,2006 ,9( 3) : 142 - 156.
- [16] Cheruvanku A , Stoesser N , Sheppard AE , et al. Enhanced Klebsiella pneumoniae carbapenemase expression from a novel Tn4401 deletion [J]. *Antimicrob Agents Chemother* ,2017 61( 6) : e0025 - 17.
- [17] Vena A , Castaldo N , Bassetti M. The role of new  $\beta$ -lactamase inhibitors in Gram-negative infections [J]. *Curr Opin Infect Dis* ,2019 ,32( 6) : 638 - 646.
- [18] Antinori E , Unali I , Bertonecelli A , et al. Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) producer resistant to ceftazidime-avibactam due to a deletion in the bla<sub>KPC-3</sub> gene [J]. *Clin Microbiol Infect* ,2020 ,26( 7) : 946. e1 - 946. e3.
- [19] Shi Q , Yin D , Han R , et al. Emergence and recovery of Ceftazidime-avibactam resistance in bla<sub>KPC-3</sub>-harboring Klebsiella pneumoniae sequence type 11 isolates in China [J]. *Clin Infect Dis* ,2020 ,71( Supplement\_4) : S436 - S439.
- [20] Rice LB. Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol* ,2010 ,31 Suppl 1: S7 - S10.
- [21] 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.
- [22] Cornaglia G , Giamarellou H , Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? [J]. *Lancet Infect Dis* ,2011 ,11( 5) : 381 - 393.
- [23] Kumar G , Issa B , Kar D , et al. E152A substitution drastically affects NDM-5 activity [J]. *FEMS Microbiol Lett* ,2017 ,364( 3) .
- [24] Philippon LN , Naas T , Bouthors AT , et al. OXA-48 , a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa [J]. *Antimicrob Agents Chemother* ,1997 ,41( 10) : 2188 - 2195.
- [25] Pitout JDD , Peirano G , Kock MM , et al. The global ascendancy of OXA-48-Type carbapenemases [J]. *Clin Microbiol Rev* ,2019 ,33( 1) : e00102 - 19.
- [26] Poirel L , Bonnin RA , Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48 [J]. *Antimicrob Agents Chemother* ,2012 ,56( 1) : 559 - 562.
- [27] Hamzaoui Z , Ocampo-Sosa A , Mamar E , et al. An outbreak of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae , associated with OmpK35 and OmpK36 porin loss in Tunisia [J]. *Microb Drug Resist* ,2018 ,24( 8) : 1137 - 1147.
- [28] Lee CH , Chu C , Liu JW , et al. Collateral damage of flomoxef therapy: in vivo development of porin deficiency and acquisition of bla<sub>DHA-1</sub> leading to ertapenem resistance in a clinical isolate of Klebsiella pneumoniae producing CTX-M-3 and SHV-5 beta-lactamases [J]. *J Antimicrob Chemother* ,2007 ,60( 2) : 410 - 413.
- [29] Senchyna F , Gaur RL , Sandlund J , et al. Diversity of resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a health care system in Northern California , from 2013 to 2016 [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis* ,2019 ,93( 3) : 250 - 257.
- [30] Chung HS , Yong D , Lee M. Mechanisms of ertapenem resistance in Enterobacteriaceae isolates in a tertiary university hospital [J]. *J Investig Med* ,2016 ,64( 5) : 1042 - 1049.
- [31] Dulyayangkul P , Wan Nur Ismah WAK , Douglas EJA , et al. Mutation of kvrA causes OmpK35 and OmpK36 porin downregulation and reduced meropenem-vaborbactam susceptibility in KPC-producing Klebsiella pneumoniae [J]. *Antimicrob Agents Chemother* ,2020 ,64( 7) : e02208 - 19.
- [32] Sun J , Deng Z , Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms , physiology and pharmacological exploitations [J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2014 ,453( 2) : 254 - 267.
- [33] Masi M , Winterhalter M , Pagès JM. Outer Membrane Porins. In: *Bacterial Cell Walls and Membranes* [M]. edn. Edited by Kuhn A. Cham: Springer International Publishing ,2019: 79 - 123.
- [34] Li XZ , Plésiat P , Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria [J]. *Clin Microbiol Rev* ,2015 ,28( 2) : 337 - 418.
- [35] Li J , Xu Q , Ogurek S , et al. Efflux pump AcrAB confers decreased susceptibility to piperacillin-tazobactam and ceftolozane-tazobactam in tigeicycline-non-susceptible Klebsiella pneumoniae [J]. *Infect Drug Resist* ,2020 ,13: 4309 - 4319.
- [36] Xu Q , Sheng Z , Hao M , et al. RamA upregulates multidrug resistance efflux pumps AcrAB and OqxAB in Klebsiella pneumoniae [J]. *Int J Antimicrob Agents* ,2021 ,57( 2) : 106251.
- [37] Saw HT , Webber MA , Mushtaq S , et al. Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae to carbapenems [J]. *J Antimicrob Chemother* 2016 ,71( 6) : 1510 - 1519.
- [38] Kaase M , Szabados F , Wassill L , et al. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR [J]. *J Clin Microbiol* ,2012 ,50( 9) : 3115 - 3118.
- [39] Nijhuis R , Samuelsen O , Savelkoul P , et al. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC , OXA-48 , VIM , and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis* ,2013 ,77( 4) : 316 - 320.
- [40] Anandan S , Damodaran S , Gopi R , et al. Rapid screening for carbapenem resistant organisms: current results and future approaches [J]. *J Clin Diagn Res* ,2015 ,9( 9) : DM01 - 3.
- [41] Lee JJ , Lee JH , Kwon DB , et al. Fast and accurate large-scale detection of beta-lactamase genes conferring antibiotic resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother* ,2015 ,59( 10) : 5967 - 5975.
- [42] Cai Z , Tao J , Jia T , et al. Multicenter evaluation of the Xpert Carba-R

- assay for detection and identification of carbapenemase genes in sputum specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(9): e00644 – 20.
- [43] Moubareck CA, Hammoudi Halat D, Sartawi M, et al. Assessment of the performance of CHROMagar KPC and Xpert Carba-R assay for the detection of carbapenem-resistant bacteria in rectal swabs: first comparative study from Abu Dhabi, United Arab Emirates [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 20: 147 – 152.
- [44] McMullen AR, Yarbrough ML, Wallace MA, et al. Evaluation of genotypic and phenotypic methods to detect carbapenemase production in Gram-negative bacilli[J]. *Clin Chem* 2017, 63(3): 723 – 730.
- [45] Huang TS, Lee SS, Lee CC, et al. Detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* on the basis of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using supervised machine learning approach[J]. *PLoS One* 2020, 15(2): e0228459.
- [46] Fang L, Xu H, Ren X, et al. Epidemiology and risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and subsequent MALDI-TOF MS as a tool to cluster KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*, a retrospective study[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 462.
- [47] Patel R. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology[J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57(4): 564 – 572.
- [48] Zhao S, Tyson GH, Chen Y, et al. Whole-genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 82(2): 459 – 466.
- [49] Niu H, Zhang W, Wei L, et al. Rapid nanopore assay for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1672.
- [50] Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, et al. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and inexpensive detection of cytomegalovirus DNA in vitreous specimens from suspected cases of viral retinitis[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(6): 2050 – 2052.
- [51] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [52] Nakano R, Nakano A, Ishii Y, et al. Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *J Infect Chemother*, 2015, 21(3): 202 – 206.
- [53] Sun S, Gao H, Liu Y, et al. Co-existence of a novel plasmid-mediated efflux pump with colistin resistance gene *mcr* in one plasmid confers transferable multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 1102 – 1113.
- [54] Heiden SE, Hübner NO, Bohnert JA, et al. A *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak clone from Germany demonstrates features of extensive drug resistance, hypermucoviscosity, and enhanced iron acquisition [J]. *Genome Med*, 2020, 12(1): 113.
- [收稿日期 2021-02-25] [本文编辑 吕文娟 余军]

#### 本文引用格式

李子尧, 鲁炳怀. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及其分子检测[J]. 中国临床新医学 2021, 14(3): 256 – 261.