

· 论 著 ·

耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 41 株分布及耐药机制

宋静, 戎建荣, 侯辰蕊

山西白求恩医院检验科, 山西 太原 030032

摘要: **目的** 通过检测分析耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)的流行病学资料,研究耐药趋势及耐药机制。**方法** 收集山西白求恩医院 2018 年 1 月至 2019 年 1 月临床分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌,对其进行鉴定、药敏及表型筛选。通过 PCR 方法检测主要碳青霉烯耐药基因[A 类丝氨酸酶(KPC),B 类金属 β -内酰胺酶(NDM 型、IMP 型、VIM 型)以及 D 类丝氨酸酶(OXA)-48 等]和外膜孔道蛋白基因(OmpK35、OmpK36),并对孔道蛋白基因检测的阳性菌株采用实时荧光定量 PCR 进行基因表达的相对定量分析。**结果** 经分析,CRKP 的分离率为 4.91%。CRKP 时间分布以 2019 年 1 月分离率最高,为 29.27%;CRKP 年龄主要集中在 21~80 岁,其中以 41~50 岁分离率最高,为 24.39%;科室分布以重症医学科为主,分离率为 24.39%,其次为普通外科 21.95%、康复医学科 14.63% 及神经外科 12.20%;标本分布以痰标本为主,分离率为 31.71%,其次为尿 19.51%、血 19.51% 及分泌物 12.20%。CRKP 对亚胺培南、厄他培南的耐药率分别为 90.24%、100.00%;对环丙沙星及阿米卡星的耐药率分别为 95.12% 和 56.10%,对 β -内酰胺类、氨基糖苷类耐药率均较高。改良碳青霉烯灭活实验(mCIM)和 EDTA-改良碳青霉烯灭活实验(eCIM)显示有 31 株(75.61%)菌株表型表现为丝氨酸酶,有 3 株(7.32%)为金属酶;检出的碳青霉烯酶基因,有 39 株(95.12%)为 KPC 型,1 株(2.44%)NDM 型,1 株(2.44%)同时具有以上 KPC 型和 NDM 型;只有 1 株(2.44%)菌株缺失 OmpK36 基因,余均存在 OmpK35 及 OmpK36。进一步分析 OmpK35 中 41 株只有 9 株(21.95%)表达下调,而 OmpK36 中 40 株有 38 株(95.00%)表达下调。**结论** CRKP 耐药现象严峻,感染年龄以中青年为主,且主要集中在重症医学科,以痰液标本为主;其 CRKP 的耐药机制主要为产 KPC 型丝氨酸酶和外膜孔道蛋白 OmpK36 缺失及表达下降。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯抗生素; 耐药趋势; 耐药机制; 碳青霉烯耐药基因; 外膜孔道蛋白

中图分类号: R 446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)09-1163-05

Distribution and drug resistance mechanism of 41 strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

SONG Jing, RONG Jian-rong, HOU Chen-ru

Laboratory Department, Shanxi Bethune Hospital, Taiyuan, Shanxi 030032, China

Corresponding author: RONG Jian-rong, E-mail: 13593181596@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the trend and mechanism of drug resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) by the epidemiological data. **Methods** The CRKP isolated from Shanxi Bethune Hospital from January 2018 to January 2019 were collected for identification, drug sensitivity test and phenotype screening. The major carbapenem-resistance genes [class A (KPC), class B (NDM, IMP, VIM), class D (OXA-48)] and outer membrane pore protein (OmpK 35, OmpK 36) were detected by PCR. The relative quantitative analysis of gene expression was performed by real-time quantitative PCR. **Results** The separation rate of CRKP was 4.91%. The highest separation rate of CRKP was 29.27% in January 2019. The age distribution of CRKP was mainly concentrated in 21-80 years old, with the highest separation rate of 24.39% between 41-50 years old. The distribution of departments was mainly in the ICU with the separation rate of 24.39%, followed by General Surgery 21.95%, Rehabilitation Medicine 14.63% and Neurosurgery 12.20%; the distribution of specimens was mainly sputum samples, the separation rate was 31.71%, followed by urine 19.51%, blood 19.51% and secretion 12.20%. The drug resistance rates of CRKP to imipenem and ertapenem were 90.24% and 100.00%, respectively; the drug resistance rates to ciprofloxacin and amikacin were 95.12% and 56.10%, respectively. The resistance rates to β -lactamases and aminoglycosides were higher. The results of modified carbapenem

inactivation method (mCIM) and EDTA modified carbapenem inactivation method (ECIM) showed that 31 strains (75.61%) were serinase phenotype, 3 strains (7.32%) were metalloenzyme; 39 strains (95.12%) were KPC type, 1 strain (2.44%) was NDM type, and 1 strain (2.44%) had both KPC type and NDM type. Only one strain (2.44%) had *OmpK36* gene deletion, and the others had *OmpK35* and *OmpK36*. There were 9 (21.95%) of 41 of *OmpK35* were down-regulated, while 38 (95.00%) of 40 of *OmpK36* were down regulated. **Conclusion** The drug resistance of CRKP is severe. The infection age was mainly young and middle-aged, and mainly concentrated in the ICU. The drug resistance mechanism of CRKP was mainly the production of KPC type serinase, and the loss and decreased expression of *OmpK36*.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenem antibiotics; Resistance trend; Resistance mechanism; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; Outer membrane pore protein

Fund program: Applied Basic Research Project of Shanxi Province (201601D011116)

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 是重要的条件致病菌, 是常见的引起医院感染的革兰阴性菌之一。近年来, 随着各种碳青霉烯抗生素广泛应用于临床, 临床逐渐出现了耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP), 且耐药率呈逐年上升的趋势, 据中国细菌耐药监测网 (CHINET) 监测数据, 在 2005 至 2018 年期间, CRKP 耐药率从 3% 上升到 25% 左右。此外, 此类菌株所引起的感染, 常伴随高患病率、高致残率、高死亡率, 给临床治疗带来极大的困难。本研究回顾性分析我院 CRKP 的耐药趋势及可能存在的耐药机制, 旨在为临床制定有效、合理的治疗方案提供数据支持, 为进一步采取防控措施提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集山西白求恩医院临床微生物实验室 2018 年 1 月至 2019 年 1 月临床标本中分离出的 KP 835 株, 其中 CRKP 41 株。剔除同一患者重复分离的相同菌株。肺炎克雷伯 ATCC BAA-1705; 大肠埃希菌 ATCC 25922; 标准肺炎克雷伯菌株 ATCC 700603 (北京协和医院惠赠)。

1.2 主要仪器与试剂 Vitek 2 Compact 60 全自动微生物分析仪及配套板卡 (法国生物梅埃公司); 布鲁克质谱分析仪; PCR 扩增仪 (德国 eppendorf) 和凝胶成像仪 (美国 Protein Simple); 电泳仪 (美国 Major science); 小型冷冻高速离心机 (5427, Eppendorf); NanoDrop (NANODROP ONE, Thermo); 实时荧光定量 PCR 仪 (CFX Connect, Bio-Rad); 低速离心机 (D1008E, LAB); PCR 仪 (2720, Thermal)。哥伦比亚血平板 (郑州安图公司); 水解酪蛋白 (Mueller-hintot, MH) 琼脂平板 (天津市金章科技); 乙二胺四乙酸 (EDTA, 北京索莱宝公司); 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (Tryptic Soy Broth, TSB, 青岛海博生物技术); 药敏纸片 (英国 Oxoid 公司); Eastep Super (Promega); Go-

Script™ 反转录系统 (Promega); GoTaq qPCR Master Mix (Promega)。

1.3 鉴定及药敏 使用质谱仪或者全自动微生物分析仪进行鉴定; 使用 Vitek 2 Compact 60 配套的革兰阴性菌卡片进行复核鉴定及药敏, 判断参照 2018 年美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100。

1.4 表型检测 改良碳青霉烯灭活实验 (modified-carbapenem inactivation method, mCIM) 和 EDTA-改良碳青霉烯灭活实验 (EDTA-modified carbapenem inactivation method, eCIM)。根据 2018 年 CLSI^[1] 的操作指南及解释标准执行。

1.5 耐药基因检测 用 PCR 方法对主要的碳青霉烯酶耐药基因 [A 类丝氨酸酶 (KPC), B 类金属 β-内酰胺酶 (NDM 型、IMP 型、VIM 型) 以及 D 类丝氨酸酶 (OXA-48 等)] 进行检测。煮沸法制备 DNA 模板, PCR 扩增 KPC、IMP、NDM、VIM、OXA-48, 引物序列及退火温度见表 1。PCR 反应体系 2 × Taq Plus Master Mix II (Dye Plus) 12.5 μl, 上下游引物各 1 μl, 模板 1.5 μl, 去离子水 9 μl。反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 随后经凝胶成像系统显像后观察结果, 并送英潍捷基 (上海) 测序, 所得序列与 GenBank 数据库进行比对。

1.6 外膜孔道蛋白基因定性检测 使用 PCR 方法进行克雷伯菌外膜孔道蛋白 *OmpK35*、*OmpK36* 基因检测, 引物及退火温度见表 1。

1.7 外膜孔道蛋白基因表达的相对定量 按照 Promega (美国) 试剂盒操作分别进行 RNA 提取, 及 cDNA 的合成。采用 SYBR Green 荧光检测 mRNA 的表达, 反应体系及条件参照荧光定量 PCR 试剂盒。采用 $\Delta Ct = \text{膜孔蛋白 Ct} - \text{内参基因 Ct}$; $\Delta\Delta Ct = \text{测待标本 } \Delta Ct - \text{阳性对照标本 } \Delta Ct$ 。基因设置 3 个复孔, 重复检测 mRNA 的相对表达水平取平均值, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行评估。

表 1 耐药及孔道蛋白基因检测引物

基因	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)
KPC ^[2]	F:ATGTCACTGTATCGCCGTCT R:TTTTAGAGCCTTACTGCC	63.0
IMP ^[2]	F:TGAGCAAGTATCTGTATTC R:TTAGTTGCTTGGTTTGTATG	52.3
NDM ^[3]	F:GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R:CGGAATGGCTCATCAGCATC	63.0
VIM ^[3]	F:GATGGTGTGGTTCGCATA R:CGAATGCCAGCACCAG	64.3
OXA-48 ^[3]	F:GCCTGGTTAAGGATGAACAC R:CATCAAGTTCAACCAACCG	52.3
OmpK35 ^[4]	F:GGATGGAAAGATGCCTTCAG R:CATGACGAGGTTCCATTGTG	63.0
OmpK36 ^[4]	F:GGGAAGAATCGACGAAATA R:TCTTACCAGGGCGACAAGAG	63.0
RT-OmpK35 ^[4]	F:GCAATATCTGGCAGTGGTGAT R:ACCATTTTCCATAGAAAGTCCAGT	60.0
RT-OmpK36 ^[4]	F:TAAAGTACTGTCCCTCTGG R:TCAGAGAAGTAGTGCAGACCGTCA	60.0
RT-rpoB ^[4]	F:AAGCGAATCCAGCTTGTTCAGCC R:TGACCTTGCATGTTCCGCCATCA	60.0

2 结果

2.1 CRKP 的分布 2018 年 1 月至 2019 年 1 月共分离 KP 835 株,其中 CRKP 41 株,分离率 4.91%。CRKP 时间分布以 2019 年 1 月分离率最高,为 29.27%,其次为 2018 年 7~8 月分离率较高,分别为 14.63%、12.20% (图 1a); CRKP 年龄分布主要集中在 21~80 岁,其中以 41~50 岁分离率最高,为 24.39% (图 1b); 科室分布以重症医学科为主,分离率为 24.39%,其次为普通外科 21.95%、康复医学科 14.63% 及神经外科 12.20% (图 1c); 标本分布以痰标本为主,分离率为 31.71%,其次为尿 19.51%、血 19.51% 及分泌物 12.20% (图 1d)。

2.2 CRKP 对抗菌药物的耐药率 41 株 CRKP 对亚胺培南、厄他培南的耐药率分别为 90.24%、100%,对环丙沙星及阿米卡星的耐药率分别为 95.12%、56.10%,对 β-内酰胺类、氨基糖苷类耐药率均较高。见表 2。

2.3 表型及耐药基因检测结果 表型检测显示,产生丝氨酸酶的有 31 株(75.61%),产生金属酶的有 3 株,不产酶的有 7 株;碳青霉烯酶耐药基因检测显示,除 17 号标本产生 NDM 型及 18 号标本同时产 NDM 及 KPC 耐药基因型外,余均可检测到 KPC 型基因, KPC 型合计检出 40 株(97.56%)。见表 3。

2.4 外膜孔道蛋白基因定性检测结果 OmpK35 及 OmpK36 基因检出情况电泳图见图 2。除 18 号只产生 OmpK35, OmpK36 缺失之外,余均可以检测到 OmpK35 及 OmpK36 基因。

2.5 OmpK35 及 OmpK36 基因定量分析情况 标准菌株 ATCC700603 的膜孔蛋白 OmpK35、OmpK36 基因转录 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为 1,待测标本 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值与 1 进行比较,高于 1 说明基因转录水平上调,反之转录水平下调(颜色越深代表表达量越高,反之表达量越低)。OmpK35 中,41 株中有 9 株(21.95%)表达量下降,其他菌株均有不同程度的表达上调,而 OmpK36 中,

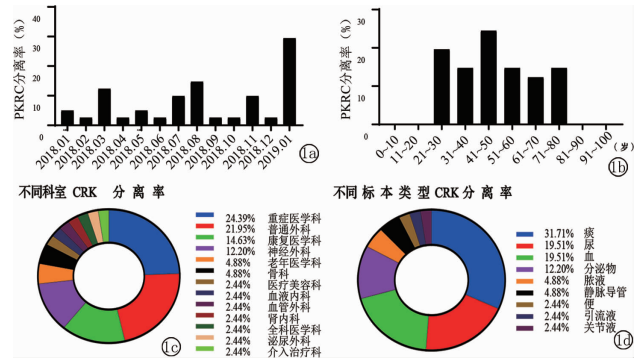
表 2 CRKP41 株对抗菌药物的耐药率 (n=41)

抗菌药物	耐药株数	耐药率(%)	抗菌药物	耐药株数	耐药率(%)
氨苄西林	41	100.00	亚胺培南	37	90.24
阿莫西林/棒酸	40	97.56	阿米卡星	23	56.10
哌拉西林/他唑巴坦	37	90.24	庆大霉素	30	73.17
头孢唑林	41	100.00	妥布霉素	30	73.17
头孢西丁	41	100.00	环丙沙星	39	95.12
头孢曲松	41	100.00	左氧氟沙星	38	92.68
头孢匹美	38	92.68	呋喃妥因	40	97.56
氨基南	40	97.56	复方新诺明	22	53.66
厄他培南	41	100.00			

表 3 表型及耐药基因检测结果 (n=41)

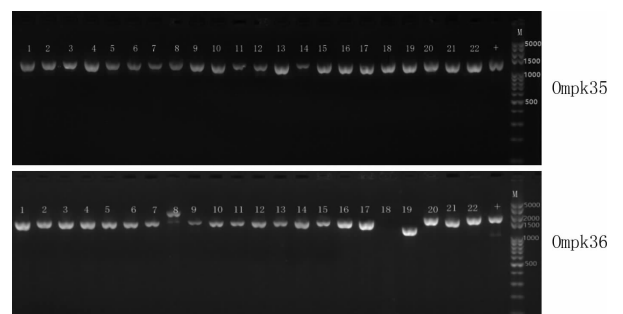
耐药基因	耐药菌株(株)	表型检测方法	
		mCIM	eCIM
KPC	31	+	-
	1	+	+
	7	-	N
NDM	1	+	+
KPC + NDM	1	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性; N: 结果无法解释。



注: 1a: 时间分布; 1b: 年龄分布; 1c: 科室分布; 1d: 标本类型分布。

图 1 CRKP 的分布



注: M: marker; 阳性对照 +; OmpK35: 1~22 号标本阳性; OmpK36: 18 号标本为阴性, 余标本均为阳性。

图 2 OmpK35 及 OmpK36 基因检出情况电泳图

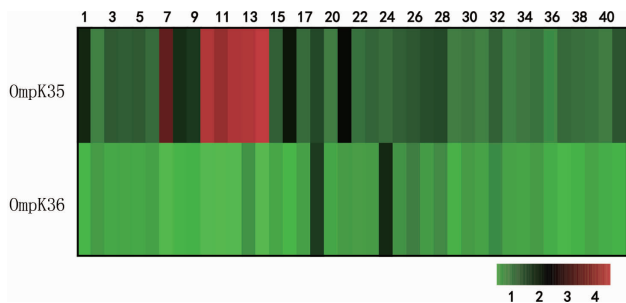


图3 OmpK 35 与 OmpK36 膜孔蛋白基因转录水平

40 株中有 38 株(95.00%)均有不同程度表达下调。见图 3。

3 讨论

碳青霉烯抗菌药物如亚胺培南、美罗培南及厄他培南等是临床治疗严重感染的主要抗菌药物。在过去的十年当中,碳青霉烯耐药肠杆菌科由于缺乏有效的治疗手段,广泛传播,导致高死亡率,已成为公共卫生的重大威胁^[5]。本研究结果显示,山西白求恩医院连续 13 个月临床 CRKP 的分离率为 4.91%,稍高于 2018 年 CHINET 耐药数据监测网山西省耐药率 1.5%。分离的 CRKP 患者年龄段主要集中在 21~40 岁,标本类型以痰液标本为主(31.71%)。分离的科室主要以重症医学科为主,可能与该科室中患者存在多次侵入性诊疗操作,基础疾病重、住院时间长及使用抗菌药物种类多、次数频繁及时间长等相关因素有关^[6-7]。因此,对于重症医学科等易感科室应该更加重视控制耐药细菌的传播,对具有感染危险因素的人群进行隔离,积极做好手卫生消毒等工作,以减少患者与医务人员的相互交叉传播。

本研究中,对亚胺培南、厄他培南的耐药率分别为 90.24%、100%,对环丙沙星及阿米卡星的耐药率分别为 95.12%、56.10%,对 β -内酰胺类、氨基糖苷类耐药率均较高。面对如此高的耐药率,临床对于 CRKP 可选治疗药物十分有限,而替加环素及多粘菌素为治疗多重耐药菌的重要选择。如何尽量降低上述两种药物的耐药率及控制耐药菌株的传播及爆发,对于临床医生、微生物实验室、院感控制部门至关重要。不同地区产酶菌株产酶型别流行情况有所差别,本研究参照 2018 年 CLSI 推荐的 mCIM 及 eCIM 实验进行碳青霉烯酶的筛选,表型实验显示,仅 1 株为 NDM 型,余 40 株均为 KPC 型(含 1 株同时产 KPC 型和 NDM 型),具体为:31 株 mCIM 实验(+),基因检测均为 KPC 型;7 株 mCIM 实验(-),基因检测为 KPC 型;1 株 mCIM 实验(+),eCIM 实验(+),基因型为 KPC。1 株 mCIM 实验(+),eCIM 实验(+),基因型为 NDM 型,其抑菌圈直径 Δ deCIM-mCIM 为

16 mm;1 株表型试验筛查同为上述两者阳性但是基因型为 KPC 型, Δ deCIM-mCIM 为 15 mm,上述两株抑菌圈直径相差甚微,此外本研究样本量偏少,EDTA 是否同样可以使得丝氨酸酶受到抑制,仍需进一步研究证实。但已有研究表明,EDTA 可以使得少量丝氨酸酶(KPC, OXA-48)在一定程度上受到抑制,使结果出现假阳性结果^[8]。OmpK35 及 OmpK36 是存在于肺炎克雷伯菌属中的两种重要的外膜孔道蛋白。OmpK35 属于 OmpF 组,孔道蛋白组直径偏大,而 OmpK36 属于 OmpC 组,直径偏小。有研究表明,膜孔蛋白的缺失是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯耐药的又一重要原因之一^[9-11]。本研究行外膜孔道蛋白基因检测结果显示,18 号标本缺失 OmpK36 基因,只携带 OmpK35 基因,余菌株均携带上述两种外膜孔道蛋白基因。可能由于基因缺失导致编码基因开放阅读框序列改变而导致基因不表达,从而产生耐药。同时其作为物质渗透的通道,OmpK35 和 OmpK36 具有强大的渗透功能,有研究表明 OmpK36 单独缺失会引起头孢菌素类的 MIC 升高,而 OmpK35 单独缺失对抗生素的影响不明显^[12]。还有研究表明,外膜孔道蛋白表达量下降,可能是 CRKP 产生耐药的原因之一^[13-15]。为了进一步明确耐药机制,本研究将所有外膜孔道蛋白基因检测阳性的菌株进行 RT-PCR,通过对 mRNA 的含量进行定量分析,从而推断蛋白质的表达量。结果显示 OmpK 35 基因中仅有 21.95% 表达下降,本研究并未检测出 OmpK35 缺失的菌株。具有 OmpK36 菌株中有 95.00% 存在 RNA 表达量下降。

综上所述,本研究表明产生 KPC 型碳青霉烯酶联合膜孔蛋白 OmpK36 缺失及表达下降是导致碳青霉烯耐药的主要原因,此类菌株不但可以产生泛耐药甚至全耐药情况,而且因其可通过可移动基因转移造成广泛传播,所以要引起医务人员的极大关注。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100-S28[S]. Wayne PA:CLSI,2018;112-124.
- [2] Bradford PA, Bratu S, Urban C, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City[J]. Clin Infect Dis,2004,39(1):55-60.
- [3] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011,70(1):119-123.

107 - 113.

- [7] Matsubara T, Mita A, Minami K, et al. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue[J]. Cell Metab, 2012, 15(1):38 - 50.
- [8] Yoo HJ, Hwang SY, Hong HC, et al. Implication of progranulin and C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) on inflammation and atherosclerosis in subjects with or without metabolic syndrome[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e55744.
- [9] 李赛姣, 杨菁. 颗粒蛋白前体在生殖系统中的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(24):3798 - 3801.
- [10] 李慕白, 高敬书, 寇丽辉, 等. 小檗碱对胰岛素抵抗多囊卵巢综合征患者激素水平的调节作用[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(11):1718 - 1720.
- [11] Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)[J]. Hum Reprod, 2004, 19(1):41 - 47.
- [12] 林金芳, 李昕, 苏椿淋. 多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗的诊断方法及治疗策略[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(9):663 - 667.
- [13] 张豫文, 孙首悦, 陈宇红, 等. 关于优化胰岛素低血糖 - 生长激
- 素刺激试验中胰岛素用量计算方法的初步探索[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2017, 33(1):29 - 33.
- [14] 丁凤娟, 郝翠芳. 多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗对生育影响的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2019, 38(2):162 - 165.
- [15] 穆柯晓, 孙倩. 多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗患者卵巢超声特征观察[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(13):1435 - 1438.
- [16] Wu XK, Zhou SY, Liu JX, et al. Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 2003, 80(4):954 - 965.
- [17] 姚丽君, 吴文君, 蒋艳敏, 等. 血清颗粒蛋白前体与糖尿病及其微血管并发症的关系[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2018, 38(1):44 - 47.
- [18] 杜丹峰, 张剑峰, 李雪莲. 从脾瘕论黄连治疗多囊卵巢综合征胰岛素抵抗[J]. 中医学报, 2018, 33(7):1276 - 1281.
- [19] 黎小斌, 邝炬, 骆赞韵, 等. 黄连素干预多囊卵巢综合征患者胰岛素抵抗的临床观察[J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(2):172 - 177.
- [20] 邓海云, 魏巍, 关源源. 小檗碱治疗多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗的研究[J]. 天津医药, 2012, 40(10):1009 - 1011.

收稿日期:2019 - 12 - 19 修回日期:2020 - 02 - 10 编辑:石嘉莹

(上接第 1166 页)

- [4] Clancy CJ, Chen L, Hong JH, et al. Mutations of the OmpK36 porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11):5258 - 5265.
- [5] Park SO, Liu JF, Furuya EY, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in three New York City hospitals trended downwards from 2006 to 2014[J]. Open Forum Infect Dis, 2016, 3(4):ofw222.
- [6] 豆清娅, 邹明祥, 李春辉, 等. 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌的耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(13):2906 - 2909.
- [7] 林琳, 王军, 胡志军, 等. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌感染的临床危险因素分析[J]. 重庆医学, 2018, 47(2):236 - 239.
- [8] Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-β-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(4):552 - 556.
- [9] Cai JC, Zhou HW, Zhang R, et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(6):2014 - 2018.
- [10] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3):440 - 458.
- [11] Wang XD, Cai JC, Zhou HW, et al. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 9):1196 - 1202.
- [12] Tsai YK, Fung CP, Lin JC, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(4):1485 - 1493.
- [13] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(4):228 - 236.
- [14] Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, et al. Ertapenem resistance among extended-spectrum-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4):969 - 974.
- [15] 余倩, 胡志东, 田彬, 等. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药基因及毒力因子研究[J]. 中华临床感染病杂志, 2016, 9(1):52 - 58.

收稿日期:2019 - 11 - 17 修回日期:2020 - 01 - 17 编辑:石嘉莹