

# 耐碳青霉烯类肠杆菌科(CRE)耐药分子 机制及控制流行的应对策略\*

张艳双, 刘 静, 万 楠, 栾 亮

(中国人民解放军北部战区总医院检验医学中心, 沈阳 110000)

**摘要:**耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)世界范围内扩散传播且越来越流行,其引起的相关性感染的死亡率高达70%。在过去20年间,碳青霉烯类抗生素大量应用导致耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌迅速增加且耐药性已得到认可。由于其治疗方法有限、易感染性以及高死亡率,使得CRE在医疗环境中的传播逐渐成为全球重大的公共卫生威胁。因此,为避免这种灾难性流行病的发生,需要做好准备计划,积极采取有效的预防控制措施来阻止这些细菌的传播。在文中作者综述了CRE菌株的发展、耐药分子机制,并根据现状提出预防控制措施,以遏制CRE的流行。

**关键词:**耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌;分子机制;预防控制措施

中图分类号:R378.2;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)02-001-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.001

## Molecular Mechanism of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*(CRE) Resistance and Coping Strategies for Controlling Epidemics

ZHANG Yan-shuang, LIU Jing, WAN Nan, LUAN Liang

(Laboratory Medicine Center, General Hospital of Northern Theater Command of  
the Chinese People's Liberation Army, Shenyang 110000, China)

**Abstract:** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) spreads and spreads worldwide, with a mortality rate of 70% for related infections. Over the past 20 years, the extensive use of carbapenem antibiotics has led to a rapid increase in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and resistance has been recognized. Due to its limited treatment, susceptibility and high mortality, the spread of CRE in the medical environment has become a major public health threat worldwide. Therefore, in order to avoid the occurrence of such a catastrophic epidemic, it is necessary to prepare a plan and actively take effective preventive and control measures to prevent the spread of these bacteria. In the article, the authors reviewed the development of CRE strains, the molecular mechanisms of drug resistance, and proposed preventive and control measures based on the status quo to curb the prevalence of CRE.

**Keywords:** carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; molecular mechanism; prevention and control measures

多重耐药菌(MDROs)的流行在现今是一种主要的公共卫生安全威胁,在全球范围内持续增加,且与发病率、死亡率存在显著的相关性。肠杆菌科细菌作为革兰阴性菌(GNB)家族中最常见的病原菌,可在各种社区和医疗保健环境中造成获得性感染。在GNB中,抗性的主要驱动力是 $\beta$ -内酰胺酶(由bla编码), $\beta$ -内酰胺酶是一种快速扩展的 $\beta$ -内酰胺水解酶,其目前编码的蛋白质序列的数量已超过2100。除此之外,这些微生物病原菌还可以携带额外的质粒基因,对抗其他类别的抗生素,从而使细菌对多种药物具有抗性。

近几年,长期大量、不规范合理使用碳青霉烯类抗生素导致对其耐药的肠杆菌科细菌的产生呈飞速发展的趋势,在世界范围内越来越流行。而肠杆菌科细菌中又以肺炎克雷伯菌最为明显。作为最后一道防线的碳青霉烯类药物越来越多地受到

含有碳青霉烯酶耐药基因和其他耐药基因移动遗传元件的挑战<sup>[1]</sup>。随着抗药性分子机制不断发展,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的流行病学也发生着变化,全世界越来越多的人正在受到这些危险微生物的影响。

1 肠杆菌耐碳青霉烯的分子机制 对碳青霉烯类药物耐药的机制主要有两种:① $\beta$ -内酰胺酶活性与结构突变;②产生碳青霉烯酶,即水解碳青霉烯类抗生素的酶。前一种机制包括由质粒编码的超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)和头孢菌素酶(AmpC),其在肠杆菌科细菌中的表达通常与诱导型或去抑制型的染色体基因的酶过量产生有关。ESBLs和AmpC能够与孔蛋白的突变相结合,所述的孔蛋白是GNB外膜蛋白质的一个突变体,当改变或丢失时,可以延缓抗生素到足够慢的速率在细菌膜上的扩散,以促进ESBL和AmpC酶的作用<sup>[2]</sup>。与

\* 基金项目:辽宁省自然科学基金(NO:20180550457)

作者简介:张艳双(1992—),女,硕士在读,研究方向:耐碳青霉烯类肠杆菌科机制研究,E-mail:350005801@qq.com。

GNB中碳青霉烯抗性相关的其他机制还包括药物外排泵和青霉素结合蛋白的改变。

碳青霉烯酶因可水解碳青霉烯类抗生素而导致耐药,其按分子结构可分为A、B、D三类(见表1),A类和D类碳青霉烯酶其活性部位均需要丝氨酸,而B类金属 $\beta$ -内酰胺酶(MBL)需要锌来进行 $\beta$ -内酰胺水解。值得注意的是A类碳青霉烯酶

基因包括肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)、圭亚那扩展谱(GES)、亚胺培南耐药(IMI)、非金属碳青霉烯酶(NMC)、黏质沙雷氏菌酶(SME)和沙雷氏菌碳青霉烯酶(SFC)。在A类中,肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)在临床和流行病学上是最重要的,主要通过医疗保健中设施克隆暴发传播<sup>[3,4]</sup>。

表 1

碳青霉烯酶的分类

分类	活性位点	代表酶	常见细菌
A类	丝氨酸	KPC, SME, IMI, NMC 和 GES 型碳青霉烯酶	肠杆菌科细菌(铜绿假单胞菌中少见)
B类	锌	NDM, IMP, VIM, GIM 和 SPM 型碳青霉烯酶	铜绿假单胞菌肠杆菌科细菌不动杆菌属
D类	丝氨酸	OXA 型碳青霉烯酶	不动杆菌属

KPC能够水解所有 $\beta$ -内酰胺,含有blaKPC的菌株通常具有对氟喹诺酮类、氨基糖苷类和甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲恶唑耐药,从而产生MDROs。产KPC的肠杆菌科细菌的国际传播主要是由于属于克隆复合体258(CC258)的肺炎克雷伯菌菌株的克隆扩增,这些归因于blaKPC-2或blaKPC-3的多位点序列型ST258菌株的克隆扩增。多位点序列型ST258肺炎克雷伯菌菌株包含2个不同的遗传进化枝(I和II),并且已发现几种其他序列类型携带blaKPC,其与多种质粒相关<sup>[5]</sup>。此外,产生KPC的菌株具有低至高水平的碳青霉烯抗性,相应的最小抑制浓度范围从易感到 $>16\text{ }\mu\text{g/ml}$ ,与blaKPC基因拷贝数增加、blaKPC基因正上游缺失和/或外膜孔蛋白损失(OmpK35和/或OmpK36)有关。

B类金属 $\beta$ -内酰胺酶(MBL)是一组复杂的酶,可以水解所有 $\beta$ -内酰胺类,保留单环内酰胺,并且不受 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的抑制。它们与锌对 $\beta$ -内酰胺水解的要求不同于丝氨酸碳青霉烯酶。因此,它们的活性受到金属螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA)的抑制。肠杆菌科细菌中还需要注意的是可传播MBL基因包括IMP(对亚胺培南有活性),VIM(维罗纳整合子编码的MBL)和NDM(新德里MBL)<sup>[6]</sup>。VIM型和IMP型MBL最常嵌入I类整合子中,并与转座子或质粒相关,这有利于传播。

NDM型碳青霉烯酶为B类碳青霉烯酶,于2008年首次在瑞典人身上分离的肺炎克雷伯菌中发现。之后NDM型碳青霉烯酶在世界各地均有报道。尽管产生NDM的肠杆菌科细菌的快速传播类似于产生KPC的肠杆菌科细菌,但NDM型MBL的传播似乎与主要的克隆菌株无关,并且由不同的质粒不相容性(Inc)类型介导。目前理论

上,肠杆菌科细菌中最常见的循环NDM $\beta$ -内酰胺酶基因(blaNDM-1)是从鲍曼不动杆菌进化而来的。blaNDM-1基因上游的完整或变异插入序列ISAba125,包含blaNDM的鲍曼不动杆菌和肠杆菌科细菌,以及blaNDM属与bleMBL的相似共表达<sup>[7,8]</sup>。

D型OXA $\beta$ -内酰胺酶在不动杆菌属中发现具有水解苯唑西林的能力,在肠杆菌科细菌中越来越多,特别是OXA-48变体<sup>[9,10]</sup>。与产生OXA-48的肠杆菌科细菌传播相关的骨架最常见的是IncL/M型质粒,其通过获得Tn1999复合转座子整合了blaOXA-48基因。OXA-48酶水解青霉素水平较高,水解碳青霉烯水平较低。此外菌株可能表达多种ESBLs,使它们对所有 $\beta$ -内酰胺类具有抗性。

## 2 控制医疗保健环境中CRE菌株流行的应对策略

### 2.1 强化医疗环境管理

CRE菌株引起相关感染的发病率在世界范围内显著增加,给国家造成了严重的经济损失和极大的社会危害,已成为重大公共卫生难题。因此,地方、区域和国家都需要积极采取预防措施来控制CRE的传播。

医疗环境中,不断强化医疗环境管理来控制CRE菌株的传播十分关键。在门诊医疗环境中,应当重视筛查CRE感染的高危人群,逐渐建立CRE感染的筛查措施。对感染及携带的患者需隔离处理,特别是患有引流伤、尿失禁或具有其他传播危险因素的患者,在访问后应对检查区域进行全面清洁。通过加强环境消毒、阻断接触传播来加强医院感染防控措施。而对于病房医疗环境的管理,我们建议CRE阳性患者每天至少清洁和消毒一次房间,并尽可能使用专用的或一次性设备。在转移CRE阳性患者后,应对房间及其内容物和浴室进行彻底清洁和消毒,包括隐私窗帘、床垫等<sup>[11]</sup>。

CRE被认为是导致设备器械相关感染的主要原因。导尿管(IDC)、动静脉导管、气管内导管和植入性的留置装置等均可以通过提供表面以便病原体黏附和生物膜的发展来促进感染的发生。因此,最大限度地减少、限制侵入性设备的使用是CRE预防的一项重要干预措施。患者必须具有使用侵入性设备的适应症,同时使用过程中要严格执行无菌操作,并在治疗结束时尽快移除设备。除此之外,在医疗设备的管理中,医院要必须明确设备表面清洁和消毒的责任和频率,并监督合规性。

**2.2 加强医护人员手卫生教育** 医务人员在医疗环境中CRE的流行传播中扮演着重要角色。通常通过医护人员的手,导致医疗环境中患者与患者之间耐药菌株的传播,也是导致MDROs发病率和流行率增加的主要因素。因此,必须加强设施内的手部卫生管理,重点是医护人员的手卫生教育。对医务人员进行有关手卫生和接触预防措施的教育和培训,是确保正确理解和实施标准的传播预防措施的先决条件。所有的医疗机构都必须能够方便地使用手卫生设施。

**2.3 全面提高实验室能力水平** 诊断实验室对感染控制和公共卫生的贡献往往被低估和资金不足。国家应确保当地实验室具有利用国际公认的方法进行敏感性试验的能力,对CRE的检测和数据报告的最低测试要求应达成一致,并定期进行质量保证。

应发布统一的实验室指南,用于筛选肠杆菌科细菌对碳青霉烯类耐药性以及产碳青霉烯酶的CRE分离株的表型和分子检查。现如今微生物实验室对耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌常用的有表型检测方法如纸片扩散法(K-B法)、改良Hodge试验(MHT)、Carba-NP试验、EDTA双纸片协同试验等以及通过分子生物学技术基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)、传统PCR、实时PCR等检测相应耐药基因来确定<sup>[12]</sup>。由于这些生物体具有不同的流行潜力,微生物实验室必须能够将产生碳青霉烯酶的CRE分离株与其它碳青霉烯抗性机制区分开来。现有数据表明,产生碳青霉烯酶(CP)的肠杆菌科细菌比非产生碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌具有更大的传播潜力。此外,blaOXA-48可以成功地水平传播并具有强大的流行潜力。因此,提高实验室的诊断能力对于遏制CRE菌株的传播有重要的意义。

**2.4 合理有效的抗菌方案是治疗CRE感染的关键** 由于不规范合理应用抗生素以及对CRE引起严重感染缺乏可用有效的治疗方案,导致耐药菌的流行传播。其中最常见的问题就是医院获得性肺

炎(HAP)和呼吸机相关性肺炎(VAP)。因此,应审查感染治疗的指南,以确保提供广谱药物的替代品,并强调抗生素的降级和减少特定抗生素类别和总抗生素的负担,制定有效的治疗方案。

**2.4.1 抗生素的应用:**多黏菌素在1947首次发现,随后被广泛应用在革兰阴性菌引起的全身感染的治疗。但因其耳肾毒性等缺陷,被一些新的广谱抗生素逐渐取代。因而近20年的时间里,多黏菌素的使用仅限于眼科和局部用药,全身或雾化的多黏菌素仅用于囊性纤维化和烧伤患者。21世纪以来,由多重耐药的革兰阴性菌引起的感染增多,尤其是CRE引起的严重感染的出现,比如产KPC-2肺炎克雷伯杆菌和NDM-1(新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶)的肠杆菌科细菌等等。因为替加环素和多黏菌素类药物对其相对敏感,所以在某些情况下多黏菌素成为治疗CRE引起严重感染的最后一道防线。其治疗机制为带正电荷的多黏菌素阳离子多肽在液体环境下与革兰阴性菌细胞外膜中带负电荷的类脂A发生静电结合,导致细菌的细胞外膜破坏,促使细胞中如核苷酸、氨基酸等重要组分被暴露,从而抑制细菌生长或导致细菌死亡<sup>[13]</sup>。

在经验性治疗方面,对于怀疑CRE导致的严重感染患者,可使用多黏菌素增加细菌细胞膜通透性,同时还可以应用磷霉素干扰细胞壁合成或氨基糖苷类、替加环素等抑制蛋白质合成,以充分降低最小抑菌浓度。但多黏菌素的肺穿透性差,碳青霉烯类和磷霉素可以弥补这一缺陷,从而使其在肺部达到临床最佳浓度。

CRE重症感染患者其死亡风险高,因此针对CRE重症感染的患者推荐使用联合方案<sup>[14]</sup>。在治疗CRE重症感染的众多联合方案中,含碳青霉烯联合方案可有效改善CRE感染患者预后。2009~2010年开展的一项观察性研究显示,含 $\geq 2$ 种有活性抗生素治疗方案(尤其含碳青霉烯方案),可以显著降低CRE血流感染患者的死亡风险。当碳青霉烯MIC $\leq 8$  mg/L时,其联合有活性抗生素治疗CRE血流感染患者,28天全因死亡率仅19.3%,远低于碳青霉烯联合无活性抗生素全因死亡率(58.3%)。

**2.4.2 临床新药的开发:**CRE的广泛流行给全球带来日益严重的威胁,因而迫切需要研发新型的抗生素。最近,美国食品药品监督管理局批准了两个新的抗生素组合,即头孢他洛林-他唑巴坦和头孢他啶-阿维巴坦。

头孢洛林作为第五代头孢菌素类抗生素,其机制是与细菌细胞壁上的青霉素结合蛋白(PBPs)结合抑制肽聚糖合成导致其结构异常进而使细菌溶

解或死亡,因此对革兰阳性菌有强大的抗菌作用。此外,其还可与青霉素结合蛋白 2a(PBP-2a)有效结合,PBP-2a 常不易与临床应用的  $\beta$ -内酰胺类抗生素结合。因此,头孢洛林可以凭借其与 PBP-2a 结合的特性对包括 MRSA 在内的菌株均具有有效的抗菌活性,优于其他  $\beta$ -内酰胺类抗生素,更适合广泛应用于临床。

阿维巴坦(Avibactam)是现今最具有发展前景的新型  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂,机制可与  $\beta$ -内酰胺酶丝氨酸形成共价化合物,且不发生水解导致其处于抑制状态。除此之外,阿维巴坦在此过程中自身结构由于逆反应恢复可具有长效的抑酶作用。阿维巴坦在酶抑制类具有长效、抑酶谱广,同时有药代动力学稳定、毒副作用微弱、耐受性强等优点,符合临床对抗生素在耐药菌方面的开发需要和制备合理的复方制剂。

3 结论 CRE 的传播流行对所有年龄段的患者都构成了极大的威胁。碳青霉烯耐药的分子机制是可变的,并且产碳青霉烯酶基因和其他抗生素耐药机制的复杂多变等都加剧了 CRE 菌株的耐药性。因此,了解 CRE 病原菌的耐药分子机制、控制措施等对于提高公共卫生安全防范意识,加深对其的理解与认识十分重要。为减少 CRE 菌株引起多重耐药感染给国家带来的巨额经济损失,对 CRE 定居和/或感染等医疗相关风险进行及时有效地干预,采取相关控制措施,如要强化医疗环境中的卫生安全管理,提升医护人员的手卫生防范意识,加大实验室的投资建设、提高实验室的检验水平,实施合理有效的抗菌方案以及积极研发新药,对于防治多重耐药菌株出现甚至阻止这些病原菌的传播都有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] SAHIN K,TEKIN A,OZDAS S,et al. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,2015,14(1):44.
- [2] 徐小红,巫之韵,蔡美莉,等. 产酸克雷伯菌耐碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究[J]. 现代检验医学杂志,2017,32(1):19-21.  
XU Xiaohong,WU Zhiyun,CAI Meili,et al. Study on the resistance mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella oxytoca*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2017,32(1):19-21.
- [3] ZHENG Rui,ZHANG Qian,GUO Yidan,et al. Outbreak of plasmid-mediated NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST105 among neonatal patients in Yunnan,China[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,2016,15(1):10.
- [4] BOYLE D P,ZEMBOWER T R. Epidemiology and management of emerging drug-resistant gram-negative bacteria:extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and beyond[J]. Urol Clin North Am,2015,42(4):493-505.
- [5] JANS B,DANIEL-HUANG T D,BAURAING C,et al. Infection due to travel-related carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, a largely underestimated phenomenon in Belgium[J]. Acta Clinica Belgica,2015,70(3):181-187.
- [6] MOJICA M F,BONOMO R A,FAST W. B1-metallo-beta-lactamases: Where do we stand? [J]. Current Drug Targets,2016,17(9):1029-1050.
- [7] BAHR G,VITOR-HOREN L,BETHEL C R,et al. Clinical evolution of new delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) deprivation[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy,2018,62(1):pii. e01849-17.
- [8] ARANA D M,SAEZ D,GARCIA-HIERRO P,et al. Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase[J]. Clinical Microbiology & Infection,2015,21(2):148. e1-e4.
- [9] STUDENTOVA V,PAPAGIANNITSIS C C,IZDEBSKI R,et al. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers[J]. Folia Microbiologica,2015,60(2):119-129.
- [10] ORENA A,SÁEZ D,BAUTISTA V,et al. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2016,71(8):2131-2138.
- [11] ARENA F,VANNETTI F,DI PILATO V,et al. Diversity of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in long-term acute care rehabilitation settings from an area of hyperendemicity, and evaluation of an intervention bundle[J]. Journal of Hospital Infection,2018,100(1):29-34.
- [12] 刘宇豪,陈晨,次仁曲珍,等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分析[J]. 现代检验医学杂志,2018,33(2):55-57.  
LIU Yuhao,CHEN Chen,CIREN Quzhen,et al. Drug sensitivity and resistance genes of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine,2018,33(2):55-57.
- [13] POIREL L,KIEFFER N,LIASSINE N,et al. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*[J]. Lancet Infectious Diseases,2016,16(3):281.
- [14] SOULI M,KARAIKOS I,MASGALA A,et al. Double-carbapenem combination as salvage therapy for untreatable infections by KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases,2017,36(7):1305-1315.

收稿日期:2019-01-10

修回日期:2019-03-19