

文章编号 1006-8147(2017)06-0537-05

论 著

## 碳青霉烯耐药克雷伯菌耐药机制研究

陈妍妍<sup>1</sup>, 宋巍<sup>2</sup>, 曹阳<sup>1</sup>, 宗晓龙<sup>1</sup>, 魏殿军<sup>1</sup>

(1.天津医科大学第二医院检验科, 天津 300211; 2.天津医科大学总医院院内感染管理科, 天津 300052)

**摘要** 目的: 探讨碳青霉烯耐药克雷伯菌的耐药机制。方法: 临床微生物实验室分离到 36 株碳青霉烯耐药克雷伯菌, 改良 Hodge 试验、EDTA 协同试验及 PCR 法检测碳青霉烯酶耐药基因, PCR 法检测 ESBLs 及 Ampc 酶耐药基因, PCR、实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测外膜蛋白基因 Ompk35 及 Ompk36 存在及表达情况。结果: 9 株改良 Hodge 试验阳性, EDTA 协同试验均阴性, 碳青霉烯酶耐药基因均阴性; 36 株碳青霉烯耐药克雷伯菌至少存在 1 种  $\beta$  内酰胺酶耐药基因; 外膜蛋白基因无缺失, 33 株存在外膜蛋白表达量下降。结论: 分离的碳青霉烯耐药克雷伯菌耐药机制可能为 ESBLs 及 Ampc 酶表达合并外膜蛋白表达下降。

**关键词** 碳青霉烯耐药; 克雷伯菌; 外膜蛋白; 耐药机制

中图分类号 R446

文献标志码 A

### Resistance mechanism of carbapenem resistant *Klebsiella*

CHEN Yan-yan<sup>1</sup>, SONG Wei<sup>2</sup>, CAO Yang<sup>1</sup>, ZONG Xiao-long<sup>1</sup>, WEI Dian-jun<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Nosocomial Infection Management Section, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the mechanism of carbapenem resistant *Klebsiella*. **Methods:** Thirty-six carbapenem resistant *Klebsiella* were collected. Modified Hodge test, EDTA synergy test and PCR were applied to detect genes of ESBLs and Ampc carbapenemases. PCR and RT-PCR test were conducted to detect gene of outer membrane protein Ompk35 and Ompk36 and their expressions. **Results:** Nine strains were found by modified Hodge test positive. EDTA co-test results were negative. Carbapenemase resistance genes detection results were all negative. Thirty-six strains of carbapenem resistant *Klebsiella* showed at least one  $\beta$ -lactamase resistance gene. There was no deletion of membrane protein gene, and 33 cases showed decreased expression of outer membrane protein. **Conclusion:** The probable drug-resistant mechanism of the *Klebsiella* isolated is the combined expression of the ESBLs and Ampc enzyme and may decrease expression of out membrane protein.

**Key words** carbapenem resistance; *Klebsiella*; outer membrane protein; resistance mechanism

克雷伯菌是肠杆菌科细菌中最为重要的一类, 是临床引起院内、院外感染的常见病原体。碳青霉烯类抗菌药物是一类广谱的  $\beta$ -内酰胺酶类抗菌药物, 对革兰阴性、革兰阳性、厌氧及多重耐药菌均有良好的抗菌活性。近年来由于此类药物广泛应用, 碳青霉烯耐药细菌不断涌现, 在肠杆菌科细菌中, 克雷伯菌对其耐药情况逐渐显现, 目前研究结果显示, 其主要耐药机制为以下 4 点<sup>[1-3]</sup>: (1) 产生碳青霉烯酶, (2) ESBLs 及 Ampc 酶合并细菌外膜蛋白缺失或表达降低, (3) 外排泵高表达, (4) 碳青霉烯类抗菌药物作用靶位改变。其中(1)(2)为主要耐药机制。本文旨在研究我院分离到的碳青霉烯耐药克雷伯菌的耐药机制, 制定合理有效的临床诊疗方案, 为医院感染控制提供数据支持。

**作者简介** 陈妍妍(1989-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医院感染及分子流行病学研究; 通信作者: 魏殿军, E-mail: weidianjun01@163.com。

### 1 材料及方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 收集 2013-2014 年度天津医科大学第二医院微生物实验室临床分离的碳青霉烯耐药 36 株克雷伯菌属细菌, 包括肺炎克雷伯菌及产酸克雷伯菌。36 株菌的科室分布为: 新生儿科 26 株, 儿科 3 株, 干部科 2 株, 神经外科 1 株, 胸外科 2 株, 血液科 1 株, 中医科 1 株。标本来源: 咽拭子(22 例)、痰液(12 例)、尿液(2 例)。36 位患者的疾病分布: 肺炎 28 例, 支气管炎 5 例, 泌尿系统感染 2 例, 肋骨骨折 1 例。

**1.1.2 菌株鉴定及药敏实验** 采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统进行细菌鉴定。美罗培南、亚胺培南采用 K-B 法重复测定碳青霉烯类抗菌药物敏感情况。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 为我院检验

科保持菌株。2 株阳性对照菌(1 株肺炎克雷伯菌 KP1,1 株阴沟肠杆菌 YG2)为产 KPC 酶阳性菌株,由温州医科大学附属第一医院周铁丽教授赠送。

## 1.2 方法

### 1.2.1 耐药表型检查

1.2.1.1 改良 Hodge 试验:用生理盐水将 ATCC25922 大肠埃希菌调成 0.5 麦氏标准菌悬液,再用生理盐水 1:10 稀释;按照药敏试验操作方法将菌悬液均匀涂布于 MH 平板上,待平板干 3~10 min 后,在平板中间贴上美罗培南(10  $\mu$ g)纸片;用无菌接种环挑取 3~5 个过夜生长的实验菌株或质控菌株菌落自纸片外缘向外划直线,划线至少 20~25 mm 长;35  $^{\circ}$ C 培养 16~18 h 后观察结果,如美罗培南抑菌圈内出现矢状生长者为耐碳青霉烯菌株。根据 CLSI 2013 年标准执行及判定标准。

1.2.1.2 EDTA 协同试验:按照参考文献[4]所示试验方法及判定标准。用生理盐水制备 0.5 麦氏标准菌悬液,按照常规纸片扩散法程序接种于 MH 琼脂培养基上,干燥 3~10 min;在已涂布待测菌液的 MH 平板上贴上美罗培南(10  $\mu$ g)纸片,在距其 1 cm 处贴一空白纸片,加入 4  $\mu$ L EDTA 溶液(0.5 mol/L);35  $^{\circ}$ C 培养 16~18 h 后观察结果;读取结果:美罗培南抑菌圈在靠近 EDTA 纸片侧明显扩大判断为阴性,否则为阳性。

1.2.2 耐药基因检测 PCR 扩增碳青霉烯酶基因片段:A 类 KPC、IMI、SME、GES、NMC 5 种;B 类 IMP、VIM、NDM 3 种;D 类 OXA-48;超广谱  $\beta$  内酰胺酶 ESBLs 及 AmpC 酶耐药基因,包括 TEM-1&2、SHV-1、CTX-M、DHA-1&2。

采用煮沸法提取细菌 DNA,进行基因扩增,引物设计见表 1。反应体系:Premix 12.5  $\mu$ L,primerF 1  $\mu$ L,primerR 1  $\mu$ L,模板 DNA 2  $\mu$ L,去离子水 8.5  $\mu$ L,共 25  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 12 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,63  $^{\circ}$ C 30 s,68  $^{\circ}$ C 3 min,共 25 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物和 DNA 标准带进行琼脂糖凝胶电泳,通过凝胶成像系统对 DNA 片段长度进行分析。出现预期条带判读为基因阳性。

1.2.3 克雷伯菌属外膜蛋白 ompk35、ompk36 基因检测 采用 PCR 方法进行 ompk35、ompk36 基因扩增,引物设计<sup>[9]</sup>见表 1。方法同上。

1.2.4 克雷伯菌属外膜蛋白 ompk35、ompk36 基因定量分析 采用实时荧光定量 PCR 方法,RNA 提取按照试剂盒说明书进行,提取后用紫外分光光度计检测抽提总 RNA 的质量和浓度,以 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。逆转录 cDNA 的提取

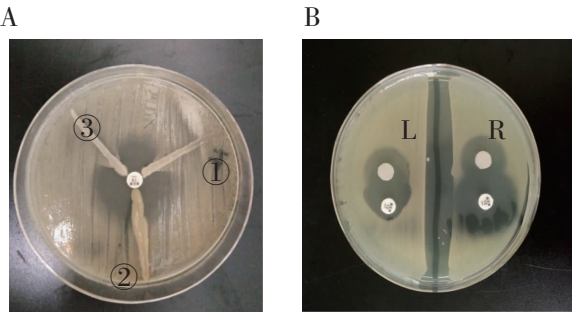
严格按照 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒说明书进行。用 SYBR Green 荧光检测 mRNA 的表达:2\*SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 12.5  $\mu$ L,上下游引物各 0.5  $\mu$ L,cDNA 2.0  $\mu$ L,DEPC 水 9.5  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 10 s;95  $^{\circ}$ C 15 s,54  $^{\circ}$ C 11 s,72  $^{\circ}$ C 22 s 循环 40 次。每个基因设置 3 个复孔,重复检测 3 次 mRNA 的相对表达水平,使用  $2^{-\Delta\Delta q}$  法进行评估。

表 1 碳青霉烯酶、ESBLs、Ampc 酶及外膜蛋白基因所用引物序列  
Tab 1 The primer sequences of carbapenemases, ESBLs and Ampc

基因名称	引物名称	序列(5'→3')
KPC	KPC-f	TCTGGACCGCTGGGAGCTGG
	KPC-r	TGCCCCGTGACGCCCAATCC
IMI	IMI-f	ATAGCCATCCTTGTITAGCTC
	IMI-r	TCTGCGATTACTTTATCCTC
SME	SME-f	AGATAGTAAATTTTATAG
	SME-r	CTCTAACGCTAATAG
GES	GES-f	AGTCGGCTAGACCCGAAG
	GES-r	TTTGTCCGTGCTCAGGGAT
NMC	NMC-f	GCATTGATATACCTTTAGCAGAGA
	NMC-r	CGGTGATAAAATCACACTGAGCATA
IMP	IMP-f	TTGACACTCCATTTACTG
	IMP-r	GATTGAGAAATTAAGCCACTCT
VIM	VIM-f	GATGGTGTTTGGTCGCATA
	VIM-r	CGAATGCGCAGCACCAG
NDM-1	NDM-1-f	CAGCACACTTCCTATCTC
	NDM-1-r	CCGCAACCATCCCCCTCTT
OXA-48	OXA-48-f	GCTTGATCGCCCTCGATT
	OXA-48-r	GATTTGCTCCGGGCGGAAA
TEM-1&2	TEM-1&2-f	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC
	TEM-1&2-r	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC
SHV-1	SHV-1-f	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC
	SHV-1-r	ATCCCGCAGATAAATCACCAC
CTX-M	CTX-M-f	GCTTTATGCGCAGACGAGTG
	CTX-M-r	CATTGTGCGGTTGACGTGTT
DHA-1&2	DHA-1&2-f	TGATGGCACAGCAGGATATTC
	DHA-1&2-r	GCTTTGACTCTTTTCGGTATTCCG
Ompk35	Ompk35-f	GGATGGAAGATGCCTTCAG
	Ompk35-r	CATGACGAGGTTCCATTGTG
Ompk36	Ompk36-f	GGGAAGAATCGCACGAAATA
	Ompk36-r	TCTTACCAGGGCGACAAGAG
RT-ompk35	RT-ompk35-f	GCAATATTCTGGCAGTGCTGAT
	RT-ompk35-r	ACCATTTTTCATAGAAGTCCAGT
RT-ompk36	RT-ompk36-f	TTAAAGTACTGTCCCTCCTGG
	RT-ompk36-r	TCAGAGAAGTAGTGCAGACCGTCA
RT-rpoB	RT-rpoB-f	AAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCC
	RT-rpoB-r	TGACGTTGCATGTTCCGCCCATCA

## 2 结果

2.1 改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验结果 36 株碳青霉烯耐药克雷伯菌改良 Hodge 试验有 9 株为阳性,提示可能产生碳青霉烯酶。EDTA 协同试验均阴性,并未筛选出金属酶(图 1)。



A ①阳性对照②阴性对照③试验菌株(阳性);B L.阳性对照,R.试验菌株(阴性结果)

图 1 试验菌株 Hodge 试验和 EDTA 协同试验结果

Fig 1 The results of modified Hodge test and EDTA synergy test

表 2 碳青霉烯酶、ESBLs 及 Ampc 酶耐药基因检出情况

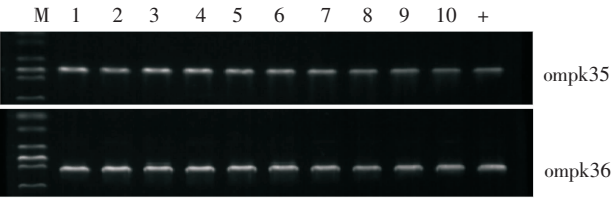
Tab2 Detection of drug resistance genes of carbapenems, ESBLs and Ampc

编号	细菌号	细菌	碳青霉烯酶			ESBLs			Ampc
			A 型	B 型	D 型	TEM 型	SHV 型	CTX-M 型	DHA 型
1	A5744	肺克	-	-	-	-	-	+	-
2	C5275	肺克	-	-	-	-	+	+	+
3	C3204	产酸克	-	-	-	-	+	-	+
4	C5706	肺克	-	-	-	-	+	+	+
5	A5011	肺克	-	-	-	+	+	+	+
6	C2008	产酸克	-	-	-	-	-	-	+
7	A5354	肺克	-	-	-	+	-	-	-
8	C5332	肺克	-	-	-	-	-	+	+
9	C4807	产酸克	-	-	-	-	+	-	+
10	A3107	肺克	-	-	-	-	+	+	+
11	C2800	产酸克	-	-	-	-	+	-	-
12	A230	肺克	-	-	-	+	+	+	+
13	C5111	产酸克	-	-	-	-	+	+	+
14	C5725	肺克	-	-	-	-	+	+	+
15	C6221	肺克	-	-	-	-	-	+	+
16	A5107	肺克	-	-	-	-	+	-	-
17	C4096	产酸克	-	-	-	+	-	+	-
18	C2796	产酸克	-	-	-	-	-	-	+
19	C5713	肺克	-	-	-	-	+	-	+
20	C6948	产酸克	-	-	-	-	+	+	+
21	C4580	肺克	-	-	-	-	+	-	+
22	C5733	肺克	-	-	-	-	+	-	+
23	A5947	肺克	-	-	-	-	+	+	+
24	C2367	产酸克	-	-	-	-	-	+	-
25	A5946	肺克	-	-	-	-	-	+	-
26	C5027	产酸克	-	-	-	-	+	-	+
27	A3814	肺克	-	-	-	-	-	+	-
28	C4644	肺克	-	-	-	-	-	-	+
29	A2155	肺克	-	-	-	-	+	-	+
30	A6047	肺克	-	-	-	-	+	-	-
31	C6431	产酸克	-	-	-	-	-	-	+
32	C5119	产酸克	-	-	-	+	-	-	+
33	C4916	产酸克	-	-	-	-	+	-	+
34	C6693	产酸克	-	-	-	-	-	-	+
35	C5104	肺克	-	-	-	-	+	-	+
36	C4604	产酸克	-	-	-	+	-	-	-

肺克:肺炎克雷伯菌,产酸克:产酸克雷伯菌

2.2 碳青霉烯酶、ESBLs 及 Ampc 酶基因检出结果 36 株碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌中碳青霉烯酶基因片段 A 型、B 型、D 型均为阴性,基因 TEM-1&2、SHV-1、CTX-M、DHA-1&2 的阳性检出率分别为 16.7%、58.3%、44.4%和 72.2%(表 2)。36 株碳青霉烯耐药克雷伯菌至少存在 1 种  $\beta$  内酰胺酶耐药基因。

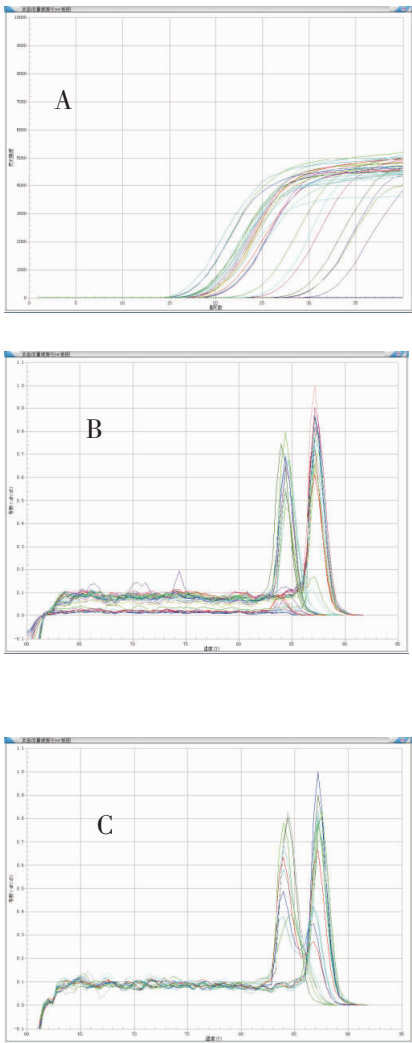
2.3 外膜蛋白基因 ompk35/ompk36 检出情况 36 株碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌外膜蛋白 Ompk35 及 Ompk36 基因 PCR 结果显示全部菌株均为阳性。由此可见,该 36 株菌并未发生两种外膜蛋白基因的缺失(图 2)。



M:marker ; +:阳性对照;1~10;均为阳性  
图 2 外膜蛋白基因 ompk35/ompk36 检出情况电泳图

Fig 2 Detection of outer membrane protein ompk35 and ompk36

2.4 外膜蛋白基因 ompk35/ompk36 定量分析结果 36 株 CR-克雷伯菌中,外膜蛋白 ompk35 基因表达量下降的有 25 例(69.44%),外膜蛋白 ompk36 基因表达量下降的有 21 例(58.33%),同时存在两种基因表达量下降的有 15 例(41.67%),没有表达量下降的有 3 例(8.33%)(图 3,表 3)。



A. Ompk35 及内参基因 ropB 扩增曲线;B. 内参基因 ropB (左)及 ompk35(右)基因溶解曲线;C. 内参基因 ropB(左)及 ompk36(右)基因溶解曲线

图 3 外膜蛋白基因 ompk35/ompk36 定量分析图

Fig 3 Outer membrane protein gene ompk35/ompk36 quantitative analysis

表 3 Ompk35、ompk36 基因的相对表达

Tab 3 The expressions of ompk35 and ompk36

编号	Ompk35-2 <sup>-ΔΔCt</sup>	Ompk36-2 <sup>-ΔΔCt</sup>
ATCC13833	1	1
1	2.17	6.59
2	1.32	0.94
3	1.28	12.16
4	1.04	1.88
5	0.01	1.53
6	0.06	1.05
7	0.64	0.01
8	0.46	0.01
9	0.86	0.45
10	7.53	0.73
11	0.02	0.85
12	0.48	7.02
13	1.19	0.01
14	0.83	0.81
15	0.86	0.82
16	0	1.14
17	0.01	8.22
18	0	0
19	1.04	0.04
20	0.65	2.18
21	1.52	0
22	0.35	3.53
23	0.54	5.75
24	0	25.79
25	0.36	5.54
26	0.09	0.72
27	0.04	1.45
28	0.44	1.63
29	0	0
30	0.04	0.77
31	0.11	0
32	0	0.32
33	0.36	0.09
34	0.07	0.37
35	0	0.09
36	2.43	0

3 讨论

碳青霉烯类抗菌药物是目前所使用的抗菌药物中抗菌谱最广、抗菌活性最强的一类药物,临床上尤其对革兰阴性杆菌感染最有效,且其对 ESBLs 及 Ampc 酶稳定有效<sup>[6]</sup>。但是随着此类药物的大量应用,碳青霉烯类抗菌药物的耐药现象在肠杆菌科细菌中出现且耐药形势愈加严重,2014 年 CHINET 细菌耐药检测资料显示,肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药率已达到 10%,而肺炎克雷伯菌对美罗培南及亚胺培南耐药率均超过 10%<sup>[7]</sup>。

本次试验结果显示,36 株碳青霉烯耐药克雷伯菌表型确证实验中,改良 Hodge 试验 9 株为阳性,EDTA 协同试验均为阴性,未筛选出金属酶。碳青霉



烯酶基因检测结果显示,3类9种常见的碳青霉烯酶耐药基因均为阴性。对于MHT阳性而碳青霉烯酶基因确证为阴性这一现象<sup>[9]</sup>,我们考虑可能原因为:(1)该9株碳青霉烯耐药克雷伯菌可能产生其他种类碳青霉烯酶,并非目前国内及国际常见的基因类型,即本次试验中没有涉及到的耐药基因型;(2)该36株CRE没有碳青霉烯酶存在,其他耐药机制导致MHT阳性,基因确证阴性。这种情况也有文献报道<sup>[9-10]</sup>,部分研究结果表明,表型确证试验如果遇到产生ESBLs或Ampc酶联合外膜孔道蛋白缺失的情况,会出现MHT假阳性情况发生。为此我们进一步筛查该36株碳青霉烯肺炎克雷伯菌属细菌ESBLs或Ampc酶存在情况。结果显示:产生ESBLs的TEM型耐药基因的菌株6例(16.67%),SHV型耐药基因菌株21例(58.33%),CTX-M型耐药基因菌株16例(44.44%);产生Ampc酶的DAH耐药基因的菌株26例(72.22%)。这36株CR-肺炎克雷伯菌至少存在1种 $\beta$ 内酰胺酶耐药基因,存在2种及以上耐药基因的菌株占61.11%,这些现象警示我们目前分离得到的CRE菌株耐药基因存在情况非常严重,一个菌株同时携带多种耐药基因,这一现象与文献报道相符<sup>[11]</sup>。

细菌外膜上存在亲水性的药物通道蛋白称为外膜蛋白,它是一种非特异的、跨越细胞膜的水溶性扩散通道,对于药物进出细菌体内起着至关重要的作用,尤其是在革兰阴性菌,它的改变会减少抗菌药物渗透至细菌体内减少药物的累积而出现细菌耐药。克雷伯菌及产酸克雷伯菌中,其关键作用的外膜蛋白为ompk35及ompk36。外膜蛋白缺失或表达下降是CRE菌株产生碳青霉烯类抗菌药物耐药的重要机制之一<sup>[12]</sup>。有文献报道,当使用抗菌药物治疗,尤其是 $\beta$ 内酰胺类抗菌药物,肺炎克雷伯菌中ompk35及ompk36蛋白表达会下降或缺失。为了进一步明确本次研究中CRE菌株的耐药机制,我们对36株CR-克雷伯菌外膜蛋白ompk35及ompk36进行深入探讨。运用PCR方法对ompk35及ompk36基因进行扩增,结果显示36株CR-克雷伯菌外膜蛋白ompk35及ompk36基因扩增均阳性,没有发生基因缺失的情况。这一现象排除了外膜蛋白基因缺失引发的耐药这一机制,我们运用RT-PCR的方法测定ompk35及ompk36 mRNA含量,从而推断外膜蛋白的表达量,这种方法可从上游获得表达信息,且直接量化表达量。36株CR-克雷伯菌中,外膜蛋白ompk35基因表达量下降的有25例(69.44%),外膜蛋白ompk36基因表达量下降的有21例(58.33%),同时存在两种基因表达量下降的有15

例(41.67%),没有表达量下降的有3例(8.33%)。可见,该36株CR-克雷伯菌以外膜蛋白ompk35基因表达量下降为主,且存在两种外膜蛋白表达量同时下降的情况。结合本文之前研究结果,可以推断,我院分离的36株CR-克雷伯菌主要的耐药机制为高水平 $\beta$ 内酰胺酶表达合并外膜蛋白表达下降所导致。

本次研究虽然没有筛查出碳青霉烯耐药基因,但是值得注意的是ESBLs及Ampc酶耐药基因广泛、联合存在于临床菌株的现象对临床工作也是极大的压力,它导致的泛耐药情况及高效快速的传播方式对全院患者都是极大的威胁,需要临床医生在平时工作中给以关注。此外,本次研究样本量较小,存在一定的局限性,需在今后的试验中进一步探讨其他机制导致的碳青霉烯耐药情况。

#### 参考文献:

- [1] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009,9(4):228
- [2] Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, et al. Ertapenem resistance among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2009,47(4):969
- [3] 余倩,胡志东,田彬,等.耐碳青霉烯类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*,2016,09(1):52
- [4] 李世杰,郭瑞娟,邢广栋,等.碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌的耐药机制探讨[J].*中国抗生素杂志*,2012(8):623
- [5] Clancy C J, Hao B. Doripenem, gentamicin, and colistin, alone and in combinations against gentamicin-susceptible, KPC-producing *klebsiella pneumoniae* strains with various ompk36 genotypes[J]. *Antimicro Agents Chemother*, 2014,58(6):3521
- [6] 胡付品,朱德妹,汪复,等.2014年CHINET中国细菌耐药性监测[J].*中国感染与化疗杂志*,2015(5):401
- [7] Thomson K S. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues[J]. *J Clin Microbiol*, 2010,48(4):1019
- [8] Sakurada A. Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures[J]. *Rev Chilena Infectol*. 2016,33(1):95
- [9] Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae[J]. *J Clin Microbiol*, 2009,47(6):1631
- [10] Jeong S H, Song W, Park M J, et al. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in clinical isolates of Enterobacteriaceae producing chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008,31(5):467
- [11] Chen T, Feng Y, Yuan J L, et al. Class 1 integrons contributes to antibiotic resistance among clinical isolates of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2013,31(4):385
- [12] Zhang Y, Jiang X, Wang Y, et al. Contribution of  $\beta$ -lactamases and porin protein Ompk35 and Ompk36 to carbapenem resistance in clinal isolate of KPC-2-producing *klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(2): 1214

(2017-01-16 收稿)