

肠杆菌科细菌 KPC 型碳青霉烯酶的研究

谢 宁^{1,2}, 郭 斌^{1,2}, 蔡 燕¹, 黄义山¹, 廖 涛^{1,2}

(1 川北医学院附属医院, 四川 南充 637000; 2 川北医学院, 四川 南充 637000)

[摘要] 目的 了解某院临床分离的肠杆菌科细菌产 KPC 型碳青霉烯酶情况及其基因型别。方法 收集该院 2009—2010 年临床分离的肠杆菌科细菌 1 801 株, 经药敏试验筛选出耐药性高的菌株, 采用改良 Hodge 试验和聚合酶链反应(PCR)扩增检测细菌产 KPC 型碳青霉烯酶情况, 并测序分析其基因型别。结果 1 801 株肠杆菌科细菌中, 有 783 株(43.48%)对第三代头孢菌素耐药, 其中 4 株还对碳青霉烯类抗菌药物耐药; 改良 Hodge 试验初筛出 2 株耐药菌株, 经 PCR 扩增证实为碳青霉烯酶 *bla*KPC-2 基因。结论 该院已出现产 KPC-2 型碳青霉烯酶耐药基因的肠杆菌科细菌, 临床与实验室应加强监测和控制。

[关键词] 肠杆菌科; KPC 酶; 碳青霉烯酶; 阴沟肠杆菌; 肺炎克雷伯菌; 大肠埃希菌; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)04-0266-04

Study on *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in isolates of Enterobacteriaceae

XIE Ning^{1,2}, GUO Bin^{1,2}, CAI Yan¹, HUANG Yi-shan¹, LIAO Tao^{1,2} (1 The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 2 North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) production in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a hospital. **Methods** 1 801 clinical Enterobacteriaceae isolates were collected from this hospital from 2009 to 2010. Highly drug-resistant strains were screened by antimicrobial susceptibility testing, KPC-type carbapenemase was detected with the modified Hodge testing and polymerase chain reaction (PCR), and DNA sequencing was performed to confirm carbapenemase genotypes. **Results** Of 1 801 Enterobacteriaceae isolates, 783 (43.48%) were resistant to the third cephalosporins, 4 of which were also resistant to carbapenem; 2 isolates were screened as drug-resistant strains by Hodge testing, and *bla*KPC-2 gene was identified in this 2 isolates by PCR. **Conclusion** KPC-2 Enterobacteriaceae strains with carbapenemase-producing drug-resistant gene have emerged in this hospital, monitor and control should be strengthened.

[Key words] Enterobacteriaceae; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; carbapenemase; *Enterobacter cloacae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2012, 11(4): 266-269]

肠杆菌科细菌作为社区获得性和医院感染的重要病原菌, 可引起呼吸道、泌尿道以及全身系统性感染。由于抗菌药物的大量使用, 肠杆菌科细菌的耐药现象也十分普遍。国内外研究^[1-2]发现, 肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物的敏感性正趋于降低, 患者常常死于无药可治。笔者对川北医学院附

属医院收集的肠杆菌科细菌进行了 KPC 型碳青霉烯酶的研究, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2009—2010 年川北医学院附属医

[收稿日期] 2011-12-31

[基金项目] 川北医学院苗圃基金课题(MP-ZK-14)

[作者简介] 谢宁(1984-), 女(汉族), 四川省绵阳市人, 讲师, 主要从事临床微生物检验、细菌耐药机制及医院感染流行病学研究。

[通讯作者] 廖涛 E-mail: liaotao63@163.com

院住院患者分离的 1 801 株肠杆菌科细菌。所有细菌均经 Vitek-32 GNI+ 卡鉴定到种,入选标准为: GNS-143 卡结果显示头孢噻肟、头孢曲松和头孢他啶中一种或多种耐药;厄他培南最低抑菌浓度(MIC) $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$;美罗培南 MIC $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$;亚胺培南 MIC $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。满足以上任一项的肠杆菌科菌株即可入选。对照菌株为 *E. coli* ATCC 25922 和 *K. pneumoniae* ATCC 700603。

1.2 改良 Hodge 试验 制备 0.5 麦氏浊度单位的大肠埃希菌 ATCC 25922 菌液,10 倍稀释,用棉签蘸取菌液均匀涂布 M-H 平板,中间贴厄他培南(10 μg)纸片,再用无菌接种环将待检菌株(以上入选菌株)从纸片边缘向外划线;阴性对照为 ATCC 700603,阳性对照为 KPC-2 的肺炎克雷伯菌(肺克+,浙江省丽水市中心医院检验科黄金伟赠送)。35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16~18 h 后观察结果。

1.3 KPC 型碳青霉烯酶基因扩增和测序 对入选菌株采用聚合酶链反应(PCR)技术扩增碳青霉烯酶(*bla*KPC)基因。煮沸法提取细菌 DNA,引物序列根据 GenBank 中提供的序列设计,由上海生物工程公司合成,序列如下:正向 5'- CCCACTGTG-CAGCTCATTCA -3',反向 5'- CGTTGACGC-CCAATCCC -3',扩增片段长度为 680 bp。PCR 反应体系为:模板 DNA 3 μL , 10 \times PCR buffer(Mg $^{2+}$ plus) 5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 混合物 4 μL ,

10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ 引物各 1 μL , 5 U/ μL rTaq 酶 0.25 μL , 无菌水 35.75 μL , 总体积为 50 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。扩增产物经 1% 琼脂糖(含 SYBRGreen)电泳分离,凝胶成像,观察结果。PCR 产物经上海基康公司 ABI 3730 测序仪测序,所得结果在 GenBank 上进行 blast 比对。

2 结果

2.1 药敏试验结果 1 801 株临床分离肠杆菌科细菌中,有 783 株(43.48%)对头孢噻肟、头孢曲松和头孢他啶中一种或多种耐药,即为本研究入选菌株,其中 4 株对美罗培南或亚胺培南耐药,分别是 2 株大肠埃希菌(编号:大肠 09-97、大肠 10-422),2 株阴沟肠杆菌(编号:阴沟 09-138、阴沟 10-76)。临床分离的常见肠杆菌科细菌对第三、四代头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物药敏结果显示,大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌对第三、四代头孢菌素类均呈现不同程度耐药性;肺炎克雷伯菌对美罗培南、亚胺培南不耐药,但大肠埃希菌和阴沟肠杆菌均出现对美罗培南、亚胺培南耐药的现象。见表 1。

表 1 2009—2010 年常见肠杆菌科分离株耐药率(%)

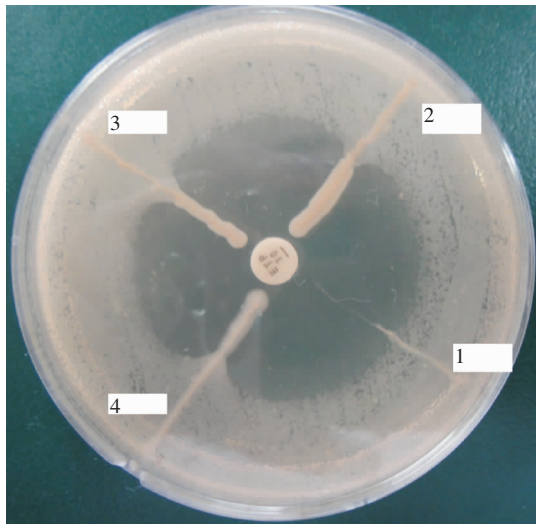
Table 1 Antimicrobial resistance rates of the common Enterobacteriaceae isolates from 2009 to 2010 (%)

Antimicrobial agent	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>	
	2009(<i>n</i> = 376)	2010(<i>n</i> = 431)	2009(<i>n</i> = 219)	2010(<i>n</i> = 197)	2009(<i>n</i> = 147)	2010(<i>n</i> = 141)
Ceftriaxone	55.59	48.72	44.29	40.10	53.06	51.77
Cefotaxime	48.67	47.56	40.18	41.12	44.22	47.52
Ceftazidime	46.54	46.40	40.18	43.15	43.54	40.43
Cefepime	44.68	45.01	27.85	39.09	25.17	33.33
Meropenem	0.00	0.23	0.00	0.00	0.00	0.71
Imipenem	0.27	0.00	0.00	0.00	0.68	0.71

2.2 改良 Hodge 试验 783 株入选菌株中,2 株改良 Hodge 试验阳性,1 株肺炎克雷伯菌(肺克 10-135)和 1 株阴沟肠杆菌(阴沟 10-76);与阳性对照一样,菌落出现矢状生长,其他菌株均为阴性。见图 1。

2.3 PCR 扩增 *bla*KPC 及 DNA 测序比对 PCR

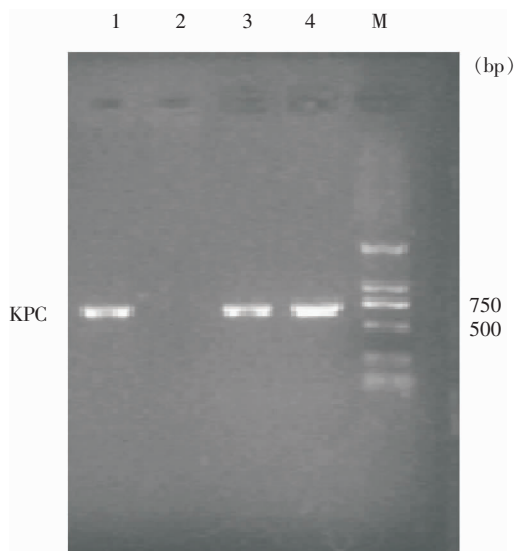
扩增结果显示,肺炎克雷伯菌(肺克 10-135)和阴沟肠杆菌(阴沟 10-76)在 680 bp 左右处均有 *bla*KPC 基因目的条带,其他检测菌均未扩增出条带。见图 2。PCR 产物经测序后与 GenBank 中序列比对,证实为 KPC-2 型碳青霉烯酶基因。



1: Negative control(ATCC 700603); 2: Positive control (*Klebsiella pneumoniae* K+); 3: *Klebsiella pneumoniae* (K10-135); 4: *Enterobacter cloacae* (E10-76)

图 1 改良 Hodge 试验结果

Figure 1 Result of modified Hodge testing



M: DNA marker (2 000 bp); 1: Positive control (*Klebsiella pneumoniae* K+); 2: Negative control(ATCC 700603); 3: *Klebsiella pneumoniae* (K10-135); 4: *Enterobacter cloacae* (E10-76)

图 2 PCR 扩增 *blaKPC* 基因结果

Figure 2 Amplification of *blaKPC* gene by PCR

3 讨论

碳青霉烯类抗菌药物(包括亚胺培南、美罗培南、厄他培南、帕尼培南等)作为一组新型β-内酰胺类药物,具有良好的通透性和广谱抗菌活性,尤其对超广谱β-内酰胺酶和质粒介导的AmpC酶具有良

好的稳定性,被认为是目前治疗革兰阴性杆菌最有效的广谱抗菌药物。本研究结果显示,临床分离的肠杆菌科细菌存在较高耐药率,2009—2010年第三代头孢菌素的耐药率均在40%以上,2010年第四代头孢菌素(头孢匹美)的耐药率也高于2009年,达30%以上。虽然碳青霉烯类药物耐药率最低,但值得注意的是,随着其在临床的广泛使用,耐药菌株首先在鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌中出现^[3-4],肠杆菌科细菌对其的敏感性也开始下降,近年甚至出现耐药株。本研究结果显示,本院在2009年出现耐亚胺培南大肠埃希菌和阴沟肠杆菌各1株,2010年不仅发现耐美罗培南的大肠埃希菌1株,还发现1株既耐亚胺培南也耐美罗培南的阴沟肠杆菌(阴沟10-76),应引起微生物学家和临床医生的高度重视。

近年的国内外研究表明,对碳青霉烯类药物耐药的主要机制之一是产碳青霉烯酶,包括Ambler分子分类的A、B、D类酶,其中属于A类的KPC型碳青霉烯酶是目前引起肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因。2001年Yigit等^[5]首次在美国北卡罗来纳州从肺炎克雷伯菌中分离到KPC-1,随后在法国^[6]、英国^[7]、波兰^[8]等国家也相继报道分离到产KPC酶菌株,甚至在局部造成暴发和流行,而且在肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、沙门菌属、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌和奇异变形杆菌等肠杆菌科多个菌属中存在。我国于2004年在浙江大学医学院附属第一医院首次发现产KPC-2酶的肺炎克雷伯菌^[9],之后江苏^[2]、北京^[10]等地区相继也报道发现了KPC酶。随着产KPC酶肠杆菌科细菌感染的日益增多,使治疗肠杆菌科细菌的最后一道防线破坏,其直接后果是影响抗菌药物的治疗效果。本研究在临床分离的1801株非重复肠杆菌科细菌中筛选出2株产KPC型碳青霉烯酶菌株,提示必须加强监测和控制,以防扩散。同时由于产KPC型碳青霉烯酶菌株对碳青霉烯类抗菌药物不一定耐药,故容易误导临床的抗菌药物选择^[11]。本研究结果也显示,筛选出的2株产KPC型碳青霉烯酶肠杆菌科细菌,1株阴沟肠杆菌(阴沟10-76)对美罗培南和亚胺培南均耐药,而另1株肺炎克雷伯菌(肺克10-135)对头孢噻肟、头孢曲松和头孢他啶均耐药,但对碳青霉烯类抗菌药物敏感。对于此类产KPC酶的菌株,临床使用碳青霉烯类抗菌药物效果不明确,可选用多粘菌素、替加环素等药物治疗。然而,对于碳青霉烯类抗菌药物耐药的菌株也不一定都产

KPC 型酶,可能还有其他耐药机制,如本院分离的大肠 09-97、大肠 10-422 和阴沟 09-138 菌株未检测出 KPC 型酶,其耐亚胺培南或美罗培南的机制有待进一步研究。

此外,KPC 型碳青霉烯酶基因位于可移动质粒上,故可经质粒、整合子、插入序列的基因元件进行传播,具有在局部暴发流行的潜在威胁^[12]。而且,碳青霉烯类抗菌药物作为临床治疗多重耐药菌的一线药物,产 KPC 酶菌株的出现使临床面临了又一大难题。因此,KPC 酶在世界范围内已引起关注,临床和实验室应重视对此类细菌的监测,合理用药,及时控制,以免发生医院感染,甚至暴发流行的事件。

[参考文献]

[1] Zarfel G, Hoenigl M, Würstl B, *et al.* Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Austria, 2001-2010[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(11):E5-8.

[2] 蒯守刚, 邵海枫, 王卫萍, 等. 大肠埃希菌质粒型碳青霉烯酶 KPC-2 检测和分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(10): 1120-1123.

[3] 周云, 凌保东. 116 株鲍曼不动杆菌临床分离株的耐药情况分析[J]. 川北医学院学报, 2011, 26(2): 119-122.

[4] 文细毛, 任南, 吴安华, 等. 全国医院感染监控网医院耐亚胺培南铜绿假单胞菌检出情况及药敏分析[J]. 中国感染控制杂志, 2009, 8(2): 89-93.

[5] Yigit H, Queenan A M, Anderson G J, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrobial A-

gent Chemother, 2001, 45(4):1151-1161.

[6] Naas T, Nordmann P, Vedel G, *et al.* Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(10):4423-4424.

[7] Woodford N, Zhang J, Warner M, *et al.* Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(6): 1261-1264.

[8] Piekarska K, Zacharczuk K, Szych J, *et al.* Dissemination of the KPC carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Warsaw, Poland[J]. Med Dosw Mikrobiol, 2010, 62(1):9-20.

[9] Wei Z Q, Du X X, Yu Y S, *et al.* Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2):763-765.

[10] Yang Q, Wang H, Sun H, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1):573-577.

[11] Deshpande L M, Rhomberg P R, Sader H S, *et al.* Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999-2005)[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2006, 56(4): 367-372.

[12] Naas T, Cuzon G, Villegas M V, *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase blaKPC gene [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(4):1257-1263.

(上接第 313 页)

3.3 病原学送检率明显提高 2007 年病原学送检率为 40.32%。病原学送检率较低的原因为医生缺乏送检意识;其次是检测时间较长,细菌培养或血培养结果报告一般在标本送检后 3~4 d,影响了医生的积极性,不利于早期指导临床合理用药。经综合管理后,病原学送检率提高至 2010 年的 76.00%,略高于卫生部>70%的基本要求。

3.4 合理用药意识明显增强 综合性管理以来,医务人员尤其是临床医生合理应用抗菌药物的意识明显增强:抗菌药物使用前有病原学送检意识,使用时

有针对性意识,联用时有合理性意识,用药后有严密观察或及时调整意识。

[参考文献]

[1] 刘泉林. 抗菌药物合理应用指导原则[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:1-40.

[2] 吴安华, 任南, 文细毛, 等. 我国 178 所医院横断面抗菌药物使用率调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(12):881-884.

[3] 李晓红, 虞德才, 左改珍, 等. 1132 例住院患者抗菌药物使用率横断面调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(6):684-686.