

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20205847

· 论 著 ·

耐碳青霉烯革兰阴性杆菌耐药性及耐药基因 *blaKPC* 的分子特征王珍珍^{1,2}, 赵战勤³, 常永超¹, 王瑞丽¹, 薛云²

(1. 河南科技大学临床医学院 河南科技大学第一附属医院, 河南 洛阳 471003; 2. 河南科技大学医学技术与工程学院, 河南 洛阳 471003; 3. 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 目的 探讨耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的临床耐药性及耐药基因 *blaKPC* 的分子特征。方法 分析 2017 年 1 月—2018 年 12 月某院临床检出的耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌。通过 WHONET 5.6 软件对药物敏感试验数据进行统计分析, 采用 PCR 检测碳青霉烯耐药基因 *blaKPC*、*blaNDM*、*blaIMP*、*blaVIM*、*blaOXA-48*, 对 PCR 阳性产物进行 DNA 测序, 分析耐药基因的分子结构特点。结果 共收集 510 株耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌, 其中耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 (CRE) 420 株, 耐碳青霉烯非肠杆菌科细菌 90 株。菌株主要来自重症监护病房 (ICU)、神经外科和呼吸科, 分别占 60.8%、11.8%、5.3%; 标本来自痰、脓性分泌物、静脉血、无菌中段尿, 分别占 66.9%、8.8%、8.2%、6.5%。耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌对常用抗菌药物具有较高的耐药性。PCR 结果显示, 420 株 CRE 中 *blaKPC*、*blaNDM*、*blaIMP* 的阳性率分别为 54.3% (228/420)、1.2% (5/420)、1.4% (6/420), 未检测出 *blaVIM* 和 *blaOXA-48* 基因, 其中肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌、大肠埃希菌分别占携带 *blaKPC* CRE 的 83.8%、11.8%、2.6%; 其他少见菌种中也检出 *blaKPC* 基因。非肠杆菌科细菌中仅有 2 株鲍曼不动杆菌检测出 *blaKPC*。DNA 测序结果显示, 174 株携带 *blaKPC* 的菌株中 173 株检测为 *blaKPC-2*、1 株检测为 *blaKPC-1*。结论 该地区耐碳青霉烯类革兰阴性菌以 CRE 为主, 其中以携带 *blaKPC-2* 的肺炎克雷伯菌占绝对优势, 其他菌株中也均有发现。提示临床需重点加强耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的监测及预防, 防控 *blaKPC* 的传播流行。

[关键词] 革兰阴性杆菌; 碳青霉烯酶; CRE; 分型; 耐药性**[中图分类号]** R378**Drug resistance of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli and molecular characteristics of drug resistance gene *blaKPC***WANG Zhen-zhen^{1,2}, ZHAO Zhan-qin³, CHANG Yong-chao¹, WANG Rui-li¹, XUE Yun²

(1. The First Affiliated Hospital, College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 3. Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical drug resistance of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli and molecular characteristics of drug resistance gene *blaKPC*. **Methods** Clinically isolated carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in a hospital from January 2017 to December 2018 were analyzed. Antimicrobial susceptibility testing data were statistically analyzed by WHONET 5.6 software, carbapenem-resistant genes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaIMP*, *blaVIM*, and *blaOXA-48* were detected by polymerase chain reaction (PCR), PCR positive products were performed DNA sequence to analyze the molecular structure of drug resistance genes. **Results** A total of 510 strains of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli were collected, including 420 strains of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and 90 strains of carbapenem-resistant non-Enterobacteriaceae. Strains were mainly from intensive care unit (ICU), departments of neurosurgery and respiratory, accounting for 60.8%, 11.8% and 5.3% respec-

[收稿日期] 2019-09-28

[基金项目] 国家自然科学基金(U1704117、31302106)

[作者简介] 王珍珍(1990-), 女(汉族), 河南省驻马店市人, 主管技师, 主要从事微生物耐药机制研究。

[通信作者] 薛云 E-mail: xueyun6688@163.com

tively; specimens were from sputum, purulent secretion, venous blood, and sterile midstream urine, accounting for 66.9%, 8.8%, 8.2% and 6.5% respectively. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli were highly resistant to commonly used antimicrobial agents. PCR results showed that among 420 strains of CRE, positive rates of *blaKPC*, *blaNDM*, and *blaIMP* were 54.3% (228/420), 1.2% (5/420), and 1.4% (6/420) respectively. *blaVIM* and *blaOXA-48* genes were not found, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Escherichia coli* accounted for 83.8%, 11.8%, and 2.6% of *blaKPC*-carrying CRE respectively; *blaKPC* was also detected in other rare strains. *blaKPC* was detected in only 2 strains of *Acinetobacter baumannii* in non-Enterobacteriaceae. DNA sequencing showed that among 174 strains carrying *blaKPC*, 173 strains were found *blaKPC-2* and 1 strain was found *blaKPC-1*. **Conclusion** CRE is the main Gram-negative bacteria resistant to carbapenems in this area, dominantly *Klebsiella pneumoniae* carrying *blaKPC-2*, and other strains are also found. It is suggested that the monitoring and prevention of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* should be strengthened to prevent and control the spread of *blaKPC*.

[Key words] Gram-negative bacillus; carbapenemase; CRE; typing; drug resistance

碳青霉烯类抗生素是治疗临床革兰阴性杆菌感染的最后一道防线。耐碳青霉烯类革兰阴性菌的产生及全球性的播散,使得临床抗感染药物的选择面临巨大的挑战^[1]。碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因是产碳青霉烯酶水解相应抗生素,最主要的碳青霉烯酶有五大类^[2],包括 KPC、NDM、IMP、VIM 和 OXA-48,其中最常见的是由 *blaKPC* 同位基因编码的 A 类丝氨酸类酶 KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)^[3]。2003 年美国 YIGITH 等在一株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)中首次发现了 *blaKPC* 基因^[4],并将其归类于 A 类丝氨酸水解酶,命名为 KPC-1。2003 年 YIGITH 等^[5]在一株臭鼻克雷伯耐药菌株上发现了第二个 *blaKPC* (*blaKPC-2*) 基因,与 *blaKPC-1* 相比,在编码区 520 bp 处发生点突变,表现出单个氨基酸的改变(S174G)。随后世界各地相继发现了 *blaKPC* 的其他亚型,目前已知 *blaKPC* 至少存在 18 种亚型,共有 20 个位点的碱基突变(13 个氨基酸改变),其中只有 1 个变异体有 6 个碱基缺失(KPC-14,核苷酸位置:722~727 bp),其他基因亚型之间均表现在单个碱基的突变^[6-7],KPC-2 和 KPC-3 是世界范围内广泛传播的碳青霉烯酶。

为减少耐药菌株的水平传播,临床须对携带该类菌株的患者进行单独管理^[8]。然而目前,发展中国家绝大多数医院缺乏相应的强化感染控制措施(intensive infection control measures ICMs)。对于碳青霉烯耐药的检测只是局限在表型耐药,并未深入分析耐药的分子机制及其传播规律。中国各地报道的耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的临床耐药性及碳青霉烯酶的分布表现出地域差异^[9-12]。本研究基于河南科技大学第一附属医院两个院区 2017 年

1 月—2018 年 12 月获得的临床分离株,分析碳青霉烯耐药菌株临床分布特点,重点追踪 *blaKPC* 基因及其亚型流行规律,为临床对碳青霉烯类耐药菌株的综合防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株来源 2017 年 1 月—2018 年 12 月河南科技大学第一附属医院两个院区临床送检的各种标本检出的耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌。耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的判断标准严格遵守美国疾病控制与预防中心的最新定义^[13],细菌对亚胺培南、美罗培南或厄他培南中至少一种耐药,耐药判断依据为 2017 版临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)指南^[14],肠杆菌科细菌耐药最低抑菌浓度(MIC)值:亚胺培南 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 和(或)美罗培南 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 和(或)厄他培南 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$;非肠杆菌科细菌中铜绿假单胞菌和不动杆菌属对亚胺培南或美罗培南至少一种抗菌药物耐药(亚胺培南 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 和(或)美罗培南 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$);其他非肠杆菌科细菌对亚胺培南或美罗培南中至少一种耐药(亚胺培南 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 和(或)美罗培南 $\geq 16 \mu\text{g/mL}$)。质控菌株购于卫生部临床检验中心:肺炎克雷伯菌 ATCC 700603、铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.1.2 主要仪器及试剂 Micoscan Walkaway 960 (德国西门子)、VITEK 2 Compact 全自动细菌药敏分析仪(法国生物梅里埃)、PCR 扩增仪(杭州博日公司)、电泳仪(珠海黑马公司)、凝胶成像仪(上海欧翔科学仪器有限公司)、PCR 反应试剂盒、扩增引物、mix 及 DNA marker[生工生物工程(上海)有限

公司]、血平板和中国蓝平板(安图生物有限公司)、低电渗琼脂糖(徐州微科曼得公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株培养鉴定及药物敏感试验 按照《全国临床检验操作规程》第 4 版进行常规细菌培养、分离。采用 Micoscan Walkaway 960 和 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析仪进行菌株鉴定及药敏试验。药物敏感试验结果判定依据 CLSI 2017 年标准^[14]。

1.2.2 DNA 模板制备 无菌采集分离株,取适量接种于血平板上,37℃培养 24 h。挑选 3~5 个单个菌落置于 200 μL 的无菌 ddH₂O 中,充分振荡、混匀,置于 100℃金属加热器中煮沸 15 min,立即冰浴 10 min,经 15 000 r/min 低温离心 10 min,取上清,-20℃保存待用。

1.2.3 耐药基因的检测 采用聚合酶链反应(PCR)分别对 *bla*KPC、*bla*NDM、*bla*IMP、*bla*VIM 和 *bla*OXA-48 基因进行扩增。PCR 反应体系为:总体积 25 μL,其中 Master Mix (2×) 12.5 μL,上游引物、下游引物、DNA 模版各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件为:94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s;55℃退火 30 s;72℃模板延伸 30 s;共 36 个循环;72℃延伸 10 min。取扩增产物 10 μL 通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳 30 min,最终在凝胶成像仪上观察结果。引物序列见表 1,引物合成及 PCR 产物序列测定由生工生物工程(上海)完成。

表 1 耐药基因 PCR 引物序列及产物长度

Table 1 Primer sequence and product length of PCR of drug resistance genes

引物名称	引物序列(5' - 3')	产物长度(bp)	参考文献
KPC(F)	TGTCACTGTATCGCCGTC	900	[15]
KPC(R)	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	900	
NDM(F)	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC	782	[15]
NDM(R)	GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT	782	
IMP(F)	GAAGGCGTTTATGTTCATAC	587	[15]
IMP(R)	GTACGTTTCAAGAGTGATGC	587	
OXA-48 (F)	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	[15]
OXA-48 (R)	CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	
VIM(F)	GATGG TGTTT GGTCG CATA	390	[16]
VIM(R)	CGAAT GCGCA GCACC AG	390	

注:F 为上游引物,R 为下游引物。

2 结果

2.1 菌株分布 2017 年 1 月—2018 年 12 月河南科技大学第一附属医院两个院区送检的各类临床标本中共检出耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌 510 株,其中耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)420 株、非肠杆菌科细菌 90 株,菌种分布见表 2。耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌主要来自重症监护病房(ICU)、神经外科和呼吸科,分别占 60.8%、11.8%、5.3%;标本来源主要为痰、脓性分泌物、静脉血、无菌中段尿,分别占 66.9%、8.8%、8.2%、6.5%;患者年龄≥50 岁者占 71.6%;住院日数≥15 d 者占 79.8%。

表 2 510 株耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌菌种分布

Table 2 Species distribution of 510 strains of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli

细菌名称	菌株数	构成比(%)
肠杆菌科	420	82.4
肺炎克雷伯菌	293	57.4
大肠埃希菌	49	9.6
产气肠杆菌	45	8.8
阴沟肠杆菌	10	2.0
成团泛菌	5	1.0
弗劳地柠檬酸杆菌	4	0.8
奇异变形杆菌	3	0.6
其他肠杆菌科细菌	11	2.1
非肠杆菌科	90	17.6
鲍曼不动杆菌	51	10.0
铜绿假单胞菌	28	5.5
洋葱伯克霍尔德菌	5	1.0
嗜麦芽窄食单胞菌	5	1.0
嗜水气单胞菌	1	0.2
合计	510	100.0

2.2 药物敏感试验 420 株 CRE 对亚胺培南、美罗培南、厄他培南的耐药率分别为 90.5%、94.0%、98.3%;对氨苄西林的耐药率为 100%,对氨曲南、头孢菌素类、氨苄西林/舒巴坦、头霉素类抗生素的耐药率均>90%,对阿米卡星、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑的耐药率略低,分别为 69.8%、79.5%、71.4%;对替加环素的耐药率最低,为 18.3%。见表 3。

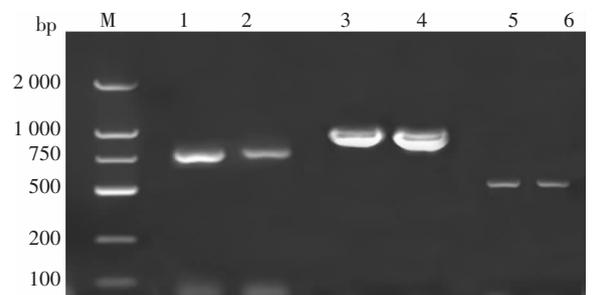
表 3 510 株耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌对常见抗菌药物的耐药情况

Table 3 Resistance of 510 strains of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli to commonly used antimicrobial agents

抗菌药物	肠杆菌科细菌			非肠杆菌科细菌		
	检测菌株数	耐药菌株数	耐药率(%)	检测菌株数	耐药菌株数	耐药率(%)
氨苄西林	420	420	100.0	-	-	-
氨苄西林/舒巴坦	420	409	97.4	51	51	100.0
哌拉西林/他唑巴坦	420	405	96.4	79	68	86.1
阿莫西林/克拉维酸	420	415	98.8	-	-	-
头孢西丁	420	391	93.1	-	-	-
头孢吡肟	420	407	96.9	79	66	83.5
头孢曲松	420	407	96.9	51	49	96.1
头孢他啶	420	400	95.2	89	85	95.5
头孢噻肟	420	400	95.2	51	48	94.1
氨曲南	420	405	96.4	28	27	96.4
亚胺培南	420	380	90.5	79	79	100.0
美罗培南	420	395	94.0	84	84	100.0
厄他培南	420	413	98.3	-	-	-
阿米卡星	420	293	69.8	79	68	86.1
妥布霉素	420	334	79.5	78	68	87.2
环丙沙星	420	395	94.0	79	60	75.9
左氧氟沙星	420	362	86.2	89	61	68.5
庆大霉素	420	397	94.5	79	68	86.1
替加环素	420	77	18.3	-	-	-
复方磺胺甲噁唑	420	300	71.4	61	24	39.3

注:非肠杆菌科细菌(舍弃 1 株嗜水气单胞菌)耐药率数据统计参考 CLSL(2017 版)标准,无标准者不统计分析药敏数据。

2.3 耐药基因检测结果 420 株 CRE 中,耐药基因检出率 56.7%,*blaKPC* 携带率为 54.3%。228 株携带 *blaKPC* 菌株中,肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌、大肠埃希菌分别占 83.8%(191 株)、11.8%(27 株)、2.6%(6 株);另外在 1 株阴沟肠杆菌、1 株摩根摩根菌、1 株弗劳地柠檬酸杆菌、1 株住泉沙雷菌中也检出 *blaKPC* 基因;*blaNDM* 携带率 1.2%(5/420),检出菌为阴沟肠杆菌(2 株)、大肠埃希菌(1 株)、肺炎克雷伯菌(1 株)、鲍曼不动杆菌(1 株);*blaIMP* 携带率 1.4%(6/420),检出菌为克雷伯菌(4 株)、摩氏摩根菌(1 株)、阴沟肠杆菌(1 株);未发现 VIM 和 OXA-48 型耐药基因。90 株非发酵菌中,仅 2 株鲍曼不动杆菌检出携带 *blaKPC* 基因,暂未发现其他菌种携带碳青霉烯耐药基因,部分阳性 PCR 结果见图 1。



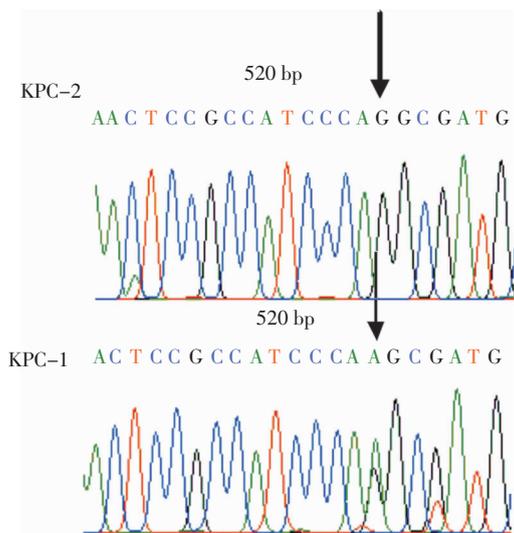
M 为 DNA Marker,1—2 为 NDM 阳性,3—4 为 KPC 阳性,5—6 为 IMP 阳性。

图 1 耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌 *blaNDM*、*blaKPC*、*blaIMP* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR amplification products of *blaNDM*, *blaKPC*, and *blaIMP* in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli

2.4 *blaKPC* 亚型检测结果 对携带 *blaKPC* 基因的 172 株 CRE 和 2 株鲍曼不动杆菌进行基因测序比对分析,结果显示 173 株为 KPC-2 型菌株,1 株为

KPC-1 型菌株,未发现 *bla*KPC 的其他基因亚型。其中 *bla*KPC-1 由肺炎克雷伯菌携带,该 *bla*KPC-1 基因在 *bla*KPC-2 (AY210886) 原始 DNA 序列的 520 bp 处发生突变,暂未发现其他位点的碱基突变。见图 2。



KPC-2 与 KPC-1 在 520 bp 处有基因 G-A 的突变。

图 2 KPC-2 与 KPC-1 的 DNA 序列差异

Figure 2 Difference between KPC-2 and KPC-1 DNA sequence

3 讨论

碳青霉烯类抗生素是治疗产 AmpC 酶和超广谱 β -内酰胺酶 (extended-spectrum β -lactamases, ESBLs) 菌株的临床治疗药物,随着该类药物的过渡使用,其耐药范围也从欧洲发达国家发展到中国及非洲的发展中国家^[17]。本研究结果显示,该院分离的耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌以 CRE 为主 (82.4%),其中肺炎克雷伯菌占 CER 的 69.8%。耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌多集中在 ICU (60.8%) 和神经外科 (11.8%),年龄多在 50 岁及以上 (71.6%),与国内研究^[18]报道一致。回顾性分析患者的既往史发现,大部分耐药菌感染患者存在严重的原发疾病,如颅脑损伤,严重心脑血管疾病,住院日数大多 ≥ 15 d (79.8%),并且长期接受广谱抗菌药物的治疗,说明严重原发疾病、患者的健康状态以及广谱抗菌药物的使用,都是耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的重要危险因素,提示临床应注意合理使用抗菌药物,避免超适应证给药。本研究表明,耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌可分离自痰、血、尿、腹腔等,说明耐药菌株引起

的感染并不仅限于呼吸系统和泌尿系统,还能引起血液、腹腔、颅内等多部位感染,其感染的广泛性应引起临床重视。

*bla*KPC-2 通常位于 20~200 kb 大小不相容的共轭质粒中^[19],该质粒不仅能在不同菌种之间水平传播,引起医院 CRE 的暴发流行^[20],而且能同时携带包括 ESBLs 在内的多种耐药基因,导致携带 *bla*KPC 的菌株能同时水解多种抗菌药物^[21]。药敏结果显示,420 株 CRE 对青霉素类、氨基苄西林/舒巴坦、头孢菌素类、氨基糖苷类、头霉素类抗生素的耐药率均高于 90%,与其他文献^[18, 22]报道相近,可能与耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌感染者长期使用 β -内酰胺类抗生素有关,提示临床应当慎重经验用药。对阿米卡星、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑的耐药率略低,分别为 69.8%、79.5%、71.4%,临床可选择这些抗菌药物治疗感染者,但值得注意的是,耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌对其他常见抗菌药物均耐药,临床可选择的抗菌药物受限,必须根据患者实际耐受情况及药敏试验结果合理使用。目前治疗耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌最有效的措施之一是多粘菌素或替加环素联合碳青霉烯类抗生素,随着该治疗方案的普遍应用,已出现联合用药治疗失败的报道^[23]。该院替加环素的耐药率为 18.3%,高于其他地区的报道^[22, 24],可能与 CRE 的菌种构成比不同有关,或是因为检测方法和菌株收集数量有限对统计结果有一定的影响,将在以后的研究中继续完善。研究^[24]表明,在产 ESBLs 或 AmpC 酶肠杆菌科菌株中,厄他培南比亚胺培南及美罗培南有更高的 MIC 值。本研究虽未对相关数据进行检测,但高产 ESBLs 或 AmpC 联合膜孔蛋白缺失或低表达导致外膜通透性降低是 CRE 产酶之外重要的耐药机制^[24]。是否可以通过比较碳青霉烯类抗生素的 MIC 值,进行产碳青霉烯酶的初步判断,还需进一步的试验支持。90 株耐碳青霉类非肠杆菌科细菌对临床常用抗菌药物耐药比较严重,除了对复方磺胺甲噁唑和左氧氟沙星的耐药率分别为 39.3% 和 68.5% 外,对大多数抗菌药物的耐药率均大于 80%,这说明耐碳青霉烯类非肠杆菌科细菌的临床用药选择非常有限。

我国流行的碳青霉烯酶主要是 KPC、NDM 和 IMP,其中以 KPC 酶最常见。本研究结果显示,420 株 CRE 中,耐药基因携带率 56.7%,其中 228 株携带 *bla*KPC 基因,5 株携带 *bla*NDM 基因,6 株携带 *bla*IMP 基因,试验结果以 KPC 酶为主。*bla*KPC 携带率占前三位的菌株分别为肺炎克雷伯菌、产气

肠杆菌和大肠埃希菌,其中肺炎克雷伯菌是携带 *blaKPC* 的优势菌群,与中国其他地区^[25]报道一致。90 株非肠杆菌科细菌碳青霉烯酶携带率为 2.2%,且均为 KPC 酶,这说明非肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制或携带的碳青霉烯酶种类有所不同,这将在下一步研究中继续阐明。该研究中,高比例的产气肠杆菌对 *blaKPC* 的携带,显示出产 KPC 酶的本院特征与地域差异,但因本研究尚未覆盖其他少见基因如 *blaGES*、*blaIMI* 等,因此具有一定局限性。本研究数据表明,KPC 酶不仅局限于肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌、大肠埃希菌等,在阴沟肠杆菌、住泉沙雷菌等菌株中也检测出 *blaKPC* 基因的携带。2 株鲍曼不动杆菌对 *blaKPC* 的携带说明 *blaKPC* 不仅局限在 CRE 中,在不同种属之间也能水平传播。

KPC-2 是世界上最广泛流行的碳青霉烯酶。国际流行 ST258,而我国最常见的是携带 *blaKPC-2* 的 ST11 型肺炎克雷伯菌^[25]。肺炎克雷伯菌具有获得耐药基因,并将其遗传的强大能力,可能是肺炎克雷伯菌成为最主流的携带菌携带 *blaKPC* 菌株的原因。基因测序结果表明 174 株携带 *blaKPC* 菌株中,仅 1 株肺炎克雷伯菌携带 *blaKPC-1*,其他均为 KPC-2 型菌株,表明该院 *blaKPC-2* 占据 *blaKPC* 的主导地位。KPC 家族有四个突变热点,其中氨基酸残基 237 位、239 位影响酶的活性^[26-27]。本研究基因测序结果显示,所有 *blaKPC-2* 的碱基序列一致,并未发现编码区非突变热点的其他变异部位,说明 *blaKPC-2* 来源单一,推测 KPC 耐药基因可能有共同的克隆来源。试验结果以携带 *blaKPC-2* 的肺炎克雷伯菌为主,与中国其他地区的报道一致^[25]。

碳青霉烯类抗生素耐药给患者治疗带来严重压力,病死率极高,是全国乃至全世界所面临的巨大挑战。本研究是单中心研究,涉及的标本量偏少,不能覆盖整个洛阳地区耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的流行情况,单从现有的研究结果来看,本研究是洛阳地区首次报告碳青霉烯类耐药菌株的临床数据,包含了肠杆菌科细菌和非肠杆菌科细菌的表型耐药及分子耐药数据,对临床耐药菌管理、控制及抗菌药物使用有一定指导意义。该地区耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌与河南其他地区相比具有相似性,其流行均高于国家水平。碳青霉烯类抗生素耐药机制以产 KPC 为主,也可见少量金属酶 NDM 和 IMP,且对大多数抗菌药物耐药,因此,对碳青霉烯类耐药菌株的管理应更加严谨,防止其暴发流行。

[参 考 文 献]

- [1] Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace[J]. J Infect Dis, 2017, 215(Suppl 1): S28 - S36.
- [2] Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(9): 821 - 830.
- [3] Biberg CA, Rodrigues AC, do Carmo SF, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil[J]. Braz J Microbiol, 2015, 46(2): 501 - 504.
- [4] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 1151 - 1161.
- [5] Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12): 3881 - 3889.
- [6] Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The epidemiology, evolution, and treatment of KPC-producing organisms [J]. Curr Infect Dis Rep, 2018, 20(6): 13.
- [7] Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, et al. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli* [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5917.
- [8] Babu Rajendran N, Gladstone BP, Rodriguez-Baño J, et al. Epidemiology and control measures of outbreaks due to antibiotic-resistant organisms in Europe (EMBARGO): a systematic review protocol [J]. BMJ Open, 2017, 7(1): e013634.
- [9] 郑恬, 徐修礼, 陈潇. 肠杆菌科细菌耐药性及其耐碳青霉烯类菌株分布特点[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(2): 121 - 125.
- [10] 刘周, 徐晨, 管世鹤. 碳青霉烯耐药肠杆菌耐药机制及临床传播特征分析[J]. 中华传染病杂志, 2019, 37(3): 171 - 173.
- [11] 宁长秀, 卢雪兰, 邹文娇, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌中碳青霉烯酶基因的检测[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(7): 901 - 904.
- [12] 曾为伦, 吴海鸥, 章如玲, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌的相关耐药机制研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(5): 377 - 381.
- [13] Centers for Disease Control and Prevention. Facility guidance for control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteria (CRE)[EB/OL]. (2015 - 11)[2019 - 09 - 20]https://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100 - S27[S]. Pennsylvania: CLSI, 2017.
- [15] Hosseinzadeh Z, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Sarvari J, et al.

Emerge of *bla*NDM-1 and *bla*OXA-48-like harboring carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in southwestern Iran[J]. J Chin Med Assoc, 2018, 81(6): 536 - 540.

- [16] 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.
- [17] Manenzhe RI, Zar HJ, Nicol MP, et al. The spread of carbapenemase-producing bacteria in Africa: a systematic review[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(1): 23 - 40.
- [18] Zhang Y, Wang Q, Yin Y, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: report from the China CRE network [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(2): e01882 - 17.
- [19] Miller BM, Johnson SW. Demographic and infection characteristics of patients with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a community hospital; development of a bedside clinical score for risk assessment[J]. Am J Infect Control, 2016, 44(2): 134 - 137.
- [20] Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge[J]. Med Mal Infect, 2014, 44(2): 51 - 56.
- [21] Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, 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.
- [22] 甘龙杰, 陈善建, 林宇岚, 等. 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌基因型检测及耐药性分析[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 663 - 666.
- [23] Strugeon E, Tilloy V, Ploy MC, et al. The stringent response

promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms[J]. mBio, 2016, 7(4): e00868 - 16.

- [24] 张保荣, 毕茹茹, 孔子艳, 等. 宿迁地区碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌耐药性及碳青霉烯酶基因型分析[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 667 - 671.
- [25] Liu J, Yu J, Chen F, et al. Emergence and establishment of KPC-2-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Shanghai, China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(2): 293 - 299.
- [26] Papp-Wallace KM, Taracila M, Hornick JM, et al. Substrate selectivity and a novel role in inhibitor discrimination by residue 237 in the KPC-2 beta-lactamase[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(7): 2867 - 2877.
- [27] Hidalgo-Grass C, Warburg G, Temper V, et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(11): 6057 - 6059.

(本文编辑:陈玉华)

本文引用格式:王珍珍, 赵战勤, 常永超, 等. 耐碳青霉烯革兰阴性杆菌耐药性及耐药基因 *bla*KPC 的分子特征[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(10): 857 - 863. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20205847.

Cite this article as: WANG Zhen-zhen, ZHAO Zhan-qin, CHANG Yong-chao, et al. Drug resistance of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli and molecular characteristics of drug resistance gene *bla*KPC[J]. Chin J Infect Control, 2020, 19(10): 857 - 863. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20205847.