

# 碳青霉烯类抗菌药物不敏感的肺炎克雷伯菌产 KPC 酶监测\*

杨勇文, 李从荣<sup>△</sup>(武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

**【摘要】** 目的 了解武汉地区肺炎克雷伯菌产 KPC 型碳青霉烯酶的耐药基因流行状况及型别, 为有效监测和控制医院感染提供实验室依据。方法 收集 2014 年 6 月至 2015 年 10 月武汉地区 3 家三甲医院对碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的肺炎克雷伯菌 53 株, 均采用 Phoenix-100 全自动系统进行鉴定和药敏试验, 采用改良 Hodge 试验进行 KPC 初筛, 聚合酶链反应对 53 株菌分别进行 blaKPC 基因扩增, 阳性扩增测序验证型别。结果 53 株菌中 38 株菌改良 Hodge 试验阳性, 阳性率为 71.70% (38/53); 32 株扩增出 780 bp 左右的目的条带, 阳性率为 60.38% (32/53); 经测序和比对分析为 blaKPC-2 基因。结论 武汉地区对碳青霉烯酶类抗菌药物不敏感的肺炎克雷伯菌的碳青霉烯酶基因主要为 KPC-2 型, 临床感染和控制部门应加强监控, 防范产 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌在院内暴发和流行。

**【关键词】** 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; KPC 酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)10-1313-03

Monitoring of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* insensitive to carbapenems<sup>\*</sup> YANG Yong-wen, Li Cong-rong<sup>△</sup> (Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

**【Abstract】** Objective To understand the epidemic status and type of drug resistance gene of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) producing in Wuhan area to provide the laboratory evidence for effective monitoring and control of nosocomial infection. Methods Totally 53 strains of *Klebsiella pneumoniae* with reducing sensitivity to carbapenems were collected in 3 tertiary hospitals in Wuhan from June 2014 to October 2015. The Phoenix-100 automatic system was adopted to perform the identification and drug sensitive test. The KPC initial screening was carried out by using the modified Hodge test. The PCR method was used to amplify the blaKPC gene in 53 strains, and the positive amplification sequence was verified by sequencing. Results Among 53 strains of bacteria, 38 strains were positive in the modified Hodge test, the positive rate was 71.70% (38/53); 32 strains were amplified out 780 bp targeted band, the positive rate was 60.38% (32/53); which were blaKPC-2 gene by sequencing and comparative analysis. Conclusion The *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene insensitive to carbapenemases antibacterial drugs enzymes in Wuhan area is mainly KPC-2 type. Clinical infection and control departments should strengthen the monitoring and prevent the epidemic outbreaks of KPC-2 type producing *Klebsiella pneumoniae* in hospital.

**【Key words】** *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemases; KPC enzyme

肺炎克雷伯菌是导致院内感染最常见的肠杆菌科细菌之一。碳青霉烯类抗菌药物作为新型  $\beta$ -内酰胺酶类抗菌药物, 是治疗产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBLs) 最有效的抗菌药物, 成为抵御产 ESBLs 革兰阴性菌的最后一道屏障<sup>[1]</sup>。目前, 在世界范围内产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌 (CPE) 的暴发流行屡有报道<sup>[2]</sup>。CPE 的出现是医院感染控制和临床治疗的难题<sup>[3]</sup>。目前, 武汉地区 CPE 的主要流行基因型还罕见相关报道。本研究通过收集武汉地区 3 家三甲医院 53 株对碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的肺炎克雷伯菌, 检测其碳青霉烯酶的表型和其 KPC 酶基因型, 旨在了解武汉地区肺炎克雷伯菌产 KPC 型碳青霉烯酶的整体流行情况, 为指导临床合理使用抗菌药物和控制 CPE 在跨区域的传播提供依据, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 菌株来源及鉴定** 收集 2014 年 6 月至 2015 年 10 月武汉地区 3 家三甲医院对碳青霉烯类抗菌药物 (如: 亚胺培南、美罗培南和厄他培南) 敏感性下降的肺炎克雷伯菌 53 株, 其中武汉大学人民医院 14 株, 湖北省妇幼保健院 27 株, 武汉市中

心医院 12 株。入选标准: 非重复菌株且对 3 种碳青霉烯类抗菌药物中的任意 1 种中介或耐药的肺炎克雷伯菌。其中痰标本 26 株、中段尿标本 14 株、胃液标本 5 株、血液和分泌物标本各 3 株、导管尖端标本 2 株。所有可疑的分离菌株均采用 Phoenix-100 (美国 BD 公司) 全自动微生物分析系统及配套试剂进行菌种鉴定和药敏试验, 同时采用 K-B 法进行补充。药敏试验结果判读参照 2012 年美国临床和实验室标准协会 (CLSI) M100-S22 标准。血平板和 M-H 平板购置于广州迪景公司, 药敏纸片购置于英国 OXIOD 公司。标准菌株肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 和大肠埃希菌 ATCC 25922 均购自国家卫生和计划生育委员会临检中心。

**1.2 改良 Hodge 表型筛查试验 (MHT)** 严格参照 2012 版 CLSI 标准进行操作: 将普通培养 18~24 h 的 ATCC 25922 用生理盐水 (0.9%) 调成 0.5 McFarland 标准浓度, 再通过生理盐水 (0.9%) 进行 10 倍稀释菌悬液, 振荡混匀后均匀涂于 M-H 营养琼脂上, 待 3~10 min 干透后在 M-H 琼脂正中间贴 IPM (10  $\mu$ g/disk) 药敏纸片; 用无菌的 10  $\mu$ L 接种环挑取血平

\* 基金项目: 国家临床重点专科项目 (财社 [2010]305 号)。

作者简介: 杨勇文, 男, 在读硕士, 检验技师, 主要从事临床微生物检验工作。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: 1225870670@qq.com。

皿上 3~5 个经过夜培养的阴、阳性质控菌株和待测肺炎克雷伯菌,分别从逼近纸片的边缘向平皿外侧缘轻滑划 1 条至少 20~25 mm 的直线,经(35±2)℃普通孵箱中孵育 16~20 h 后观察结果,在 IPM 抑菌圈外缘与待测菌株生长直线交叉区域呈现苹果蒂样生长现象(即生长增强)判定为碳青霉烯酶阳性。阴性对照为肺炎克雷伯菌 ATCC 700603,阳性对照为多次传种且测序验证为产 KPC 酶肺炎克雷伯菌。

1.3 PCR 扩增目的基因及测序验证

1.3.1 待测模板制备 使用无菌接种环连续挑取 5~6 个菌落放入预装有 500 μL 双蒸水的 EP 管(1.5 mL)中,充分振荡混匀后 100℃干浴锅中 10 min,取出待冷却至室温后 13 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清至新的 EP 管(1.5 mL)中,-20℃冷冻保存备用。

1.3.2 目的基因的扩增 KPC 基因引物设计参考文献[4],见表 1,引物合成委托 Introvergon 公司。20 μL PCR 反应体系包括 6 μL 双蒸水,10 μL 2×Takara Premix™,正、反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,3 μL 待扩增模板。PCR 扩增条件:95℃预变性 5 min,循环扩增 95℃变性 20 s,63℃退火 45 s,72℃延伸 30 s,进行 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。所有扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 40 min,在 Gel-box 扫描成像仪中拍照,出现预期的目的条带为阳性扩增。

表 1 PCR 法基因扩增引物序列

Table with 4 columns: 引物名称, 引物序列(5'~3'), 退火温度(℃), 目的片段(bp). Rows include KPC-F and KPC-R primers.

1.3.3 阳性产物测序及 blast 比对 委托 Sangon Biotech 公司将 PCR 阳性扩增产物进行测序,拼接后通过 NCBI 数据库 GenBank(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 比对。

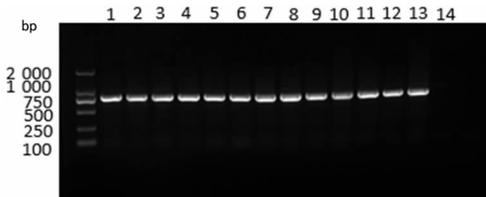
2 结果

2.1 鉴定及药敏试验 收集的 53 株肺炎克雷伯菌经形态学严格确证并复核无误后,重复药敏试验均显示出亚胺培南、美

罗培南和/或厄他培南中介或耐药,53 株肺炎克雷伯菌对临床常用抗菌药物的耐药情况,见表 2。

2.2 MHT 表型筛查试验 53 株对碳青霉烯类抗菌药物不敏感的肺炎克雷伯菌中,38 株 MHT 试验阳性,阳性率为 71.70%。

2.3 KPC 基因 PCR 结果 对 38 株 MHT 表型筛查阳性的菌株进行 PCR 扩增。结果显示,32 株菌的产物经琼脂糖凝胶电泳后出现 780 bp 左右的目的条带,KPC-2 基因的阳性率为 60.38%。见图 1。



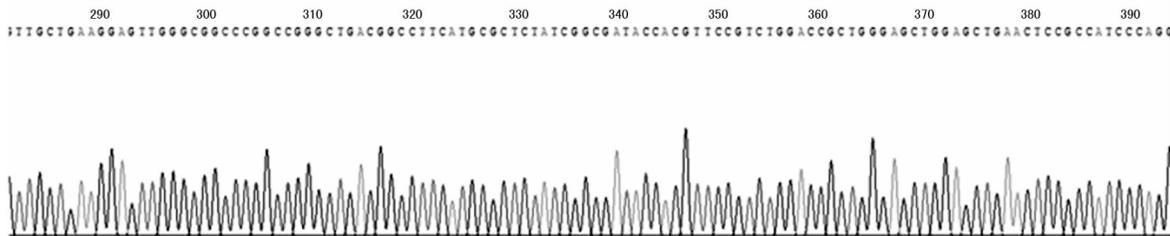
注:1~13 为部分阳性结果;14 为阴性对照。

图 1 KPC 型碳青霉烯酶电泳结果

2.4 测序结果及比对 双向测序 PCR 法阳性扩增产物后进行 blast,发现与 NCBI 数据库中的基因登录号(KP987218.1)完全一致,即为 KPC-2 基因。其部分序列,见图 2。

表 2 53 株肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的耐药情况(%)

Table with 4 columns: 药物, 敏感, 中介, 耐药. Lists various antibiotics and their resistance percentages for 53 K. pneumoniae strains.



注:该部分序列同时包括 KPC-2 基因的保守区和特征性突变。

图 2 KPC-2 基因部分序列

3 讨论

碳青霉烯类抗菌药物为目前抗菌谱最广、抗菌活性最强的一类抗菌药物[5]。其通过抑制胞壁黏肽合成酶,从而阻断合成胞壁黏肽的代谢过程,造成菌体细胞壁的缺损,导致肺炎克雷伯菌细胞质内渗透压改变而溶解细菌[6]。它能够高度稳定多种 β-内酰胺酶,对头孢菌素耐药菌具有优良的抗菌效果。已经成为治疗多重耐药肺炎克雷伯菌最主要的抗菌药物之一[7]。临床上对碳青霉烯类耐药的细菌以非发酵菌属为主,对肺炎克雷伯菌保持较高的敏感性。然而随着临床不合理使用碳青霉烯类抗菌药物,对其耐药的肺炎克雷伯菌报道也越来越多[8],应该引起足够重视。

本研究纳入 2014 年 5 月至 2015 年 10 月武汉地区 3 家三甲医院住院患者分离鉴定的 53 株肺炎克雷伯菌,纳入标准为对 3 种碳青霉烯类抗菌药物中的任意一种敏感性下降的非重复菌株。本次分离菌株的标本以痰标本为主,培养前均经过革兰染色镜检为合格标本(上皮细胞 <10 个/HP,白细胞 >25 个/HP),血平板菌落计数+++及以上确证为致病菌。肺炎克雷伯菌对亚胺培南、美罗培南、厄他培南的耐药率分别为 62.26%、69.81%和 98.11%,因此 CLSI 推荐 ERT 纸片作为 MHT 试验的标准纸片监测 CPE 菌株[9]。对哌拉西林、头孢他啶等 β-内酰胺类的耐药率也较高,尤其是头孢噻肟高达

92.4%,可能与 CPE 菌株中的 KPC 联合产 ESBLs 有关<sup>[10]</sup>。目前,碳青霉烯类抗菌药物是治疗产 ESBLs 革兰阴性细菌感染的唯一可选的抗菌药物,然而 CPE 不但可以水解碳青霉烯类抗菌药物,而且可以使头孢菌素类、青霉素类等抗菌药物失效,并对其他种类的抗菌药物呈现不同水平的耐药<sup>[11]</sup>。因此临床将面临无药可救的地步,应该引起临床工作者的高度关切。

碳青霉烯酶按照 Ambler 分类,依据氨基酸序列可细分为 A、B 和 D 3 类<sup>[12]</sup>。KPC 型碳青霉烯酶属于 Ambler 分类的 A 类,是一种丝氨酸碳青霉烯酶,是肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类抗菌药物的主要原因<sup>[13]</sup>。1996 年,第 1 株产 KPC-2 型肺炎克雷伯菌在美国卡罗来纳州检出<sup>[14]</sup>。此后,19 个 KPC 亚型被发现,均是由于氨基酸序列的点突变所致,以 KPC-2 型为最常见。我国于 2007 年在浙江省首次分离出产 KPC-2 型肺炎克雷伯菌<sup>[15]</sup>。本研究 53 株菌有 38 株 MHT 试验阳性,阳性率为 71.70%;32 株菌扩增出了目的条带,经测序后 blast 验证为 KPC-2 型,KPC-2 基因的检出率为 60.38%。因此,武汉地区肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的主要原因是这些菌株携带了 KPC-2 型碳青霉烯酶耐药基因。本研究中有 15 株菌 MHT 试验阴性,经过 K-B 法确认后提示碳青霉烯类抗菌药物的敏感性均降低,可能是由于高产 AmpC 酶或外排泵过表达联合外膜蛋白缺失所致。6 株菌 MHT 试验阳性但未扩增出目的片段,与其他 β-内酰胺酶(如:OXA-48)或多种水解酶的表达有关,有待进一步研究。CPE 的 KPC 基因可通过菌株本身的克隆传播以及不同类型的耐药质粒在不同菌属间水平传播<sup>[2]</sup>,因此,当其定植于患者、医务工作者等高危人群以及医疗器械表面等院内环境时,一旦暴发将会在院内广泛扩散。对于碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的肺炎克雷伯菌,临床微生物室应该进行 MHT 初筛试验,以提示院内感染部门及时采取措施以控制 CPE 的传播。

综上所述,武汉地区 CPE 携带的基因型主要为 KPC-2 型,医院感染控制部门应该加强肺炎克雷伯菌的耐药监测和院内消毒,严格监管医务人员手卫生等措施来遏制 CPE 在院内的暴发和流行。

参考文献

[1] Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Piperaki E, et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(9): 862-872.  
 [2] Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae, a key pathogen set for global nosocomial dominance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 5873-5884.  
 [3] Markogiannakis A, Tzouveleki LS, Psychogiou M, et al. Confronting carbapenemase-producing Klebsiella pneumonia[J]. Future Microbiol, 2013, 8(9): 1147-1161.

[4] Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(4): 906-909.  
 [5] Shiber S, Yahav D, Avni T, et al. β-Lactam/β-lactamase inhibitors versus carbapenems for the treatment of sepsis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(1): 41-47.  
 [6] Pacifici GM, Allegaert K. Clinical pharmacology of carbapenems in neonates [J]. J Chemother, 2014, 26(2): 67-73.  
 [7] Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician [J]. Mayo Clin Proc, 2015, 90(3): 395-403.  
 [8] Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions [J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4): 682-707.  
 [9] Bae IK, Kang HK, Jang IH, et al. Detection of Carbapenemases in clinical enterobacteriaceae isolates using the VITEK AST-N202 Card [J]. Infect Chemother, 2015, 47(3): 167-174.  
 [10] Abdallah HM, Wintermans BB, Reuland EA, et al. Extended-spectrum β-lactamase and carbapenemase-producing enterobacteriaceae isolated from Egyptian patients with suspected blood stream infection [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128120.  
 [11] Rafailidis PI, Falagas ME. Options for treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae [J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(6): 479-483.  
 [12] Cherkaoui A, Emonet S, Renzi G, et al. ESBL and carbapenemases in Enterobacteriaceae [J]. Rev Med Suisse, 2014, 10(450): 2142-2148.  
 [13] Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(5): 9654-9692.  
 [14] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 1151-1161.  
 [15] Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae isolate from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 763-765.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2016-01-24)

(上接第 1312 页)

[12] Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process [J]. Chest, 1997, 112(1): 235-243.  
 [13] Nandi D, Mishra MK, Basu A, et al. Effects of IL-18 and

IL-10 pre-treatment on the alteration of endogenous cytokines in liver and spleen of mice with experimental endotoxemia [J]. Indian J Exp Biol, 2010, 48(11): 1103-1110.

(收稿日期: 2015-10-27 修回日期: 2015-12-21)