

• 临床检验研究论著 •

亚胺培南不敏感大肠埃希菌碳青霉烯酶基因的检测^{*}沈 瀚, 宁明哲, 周万青, 曹小利, 张之烽, 张 葵[△]
(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 江苏南京 210008)

摘 要:目的 了解碳青霉烯酶基因在亚胺培南不敏感大肠埃希菌中的分布情况。方法 收集亚胺培南不敏感的大肠埃希菌 25 株, K-B 纸片法测定菌株对药物的敏感性; 采用 EDTA 协同试验及改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶表型检测; PCR 法扩增碳青霉烯酶基因并进行序列分析。结果 25 株大肠埃希菌呈现泛耐药现象, 其中亚胺培南耐药 15 株, 中度敏感 10 株; 改良 Hodge 试验阳性 15 株, 金属酶表型试验全部阴性; 15 株菌株检出 KPC-2 酶基因, 未检出其它碳青霉烯酶基因。结论 产 KPC-2 酶是造成该院大肠埃希菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因。

关键词: 大肠杆菌; 卡巴配能类; 药物敏感性测定; 聚合酶链反应**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.002**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)06-0643-02

Analyze the genotypes of carbapenemase in imipenem non-sensitive *Escherichia coli*^{*}
Shen Han, Ning Mingzhe, Zhou Wanqing, Cao Xiaoli, Zhang Zhifeng, Zhang Kui[△]
(Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to
Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: **Objective** To analyze the genotypes of carbapenemase among *Escherichia coli* isolates which is non-sensitive to imipenem. **Methods** 25 *E. coli* isolates which were non-sensitive to imipenem were collected, and K-B agar diffusion test were performed to detect the sensitive of these *E. coli* isolates to antimicrobial agents. Modified Hodge test and EDTA disk synergy test were carried out to screen carbapenemases. And the corresponding carbapenemases encoding genes were further confirmed by PCR amplification along with DNA sequencing. **Results** All the 25 *E. coli* isolates displayed extensively drug resistance to the antimicrobial agents tested. Among them, 15 isolates were resistant to imipenem, and 10 isolates were intermediate. All the strains were negative for metal-enzymes indicated by EDTA disk synergy test. Whereas, the 15 imipenem resistant *E. coli* probably contain class A carbapenemase from the modified Hodge test. And further analysis confirmed that they were the KPC-2 enzymes. **Conclusion** KPC-2 enzyme is the main carbapenemase responsible for the resistance of *E. coli* isolates to imipenem in the hospital.

Key words: *Escherichia coli*; carbapenem; microbial sensitivity tests; polymerase chain reaction

碳青霉烯类抗菌药物是抗菌谱最广, 抗菌活性最强的非典型 β -内酰胺抗菌药物, 因其具有超广谱的、极强的抗菌活性, 对 β -内酰胺酶高度的稳定性以及毒性低等特点, 已经成为治疗临床严重细菌感染, 特别是产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌感染最主要的抗菌药物之一^[1]。但是随着该类药物的广泛应用, 碳青霉烯类药物耐药问题日益严峻, 特别是碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌^[2]。研究显示, 肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物的耐药主要与碳青霉烯酶的产生密切相关^[3]。本研究以本院 2010 年 3 月至 2012 年 6 月筛选的 25 株亚胺培南不敏感大肠埃希菌为研究对象, 旨在检测碳青霉烯酶的分布流行情况。

1 材料与方

1.1 菌株来源 收集本院 2010 年 3 月至 2012 年 6 月期间临床样本中分离的亚胺培南不敏感的大肠埃希菌共 25 株。菌株来源为尿液 6 份, 分泌物 5 份, 痰液、胆汁及血液样本各 3 份, 其它样本来源 5 份。所有菌株经 ATB 32E 鉴定条(法国梅里埃公司产品)鉴定。大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 为抗菌药物敏感性试验质控菌株。在改良 Hodge 试验中, 肺炎克雷伯菌 ATCC1705 为阳性对照, 肺炎克雷伯菌 ATCC1706 为阴性对照。

1.2 仪器及试剂 Taq DNA 聚合酶、10×buffer(含 Mg^{2+})、

dNTPs 为 TaKaRa 公司产品; DNA Marker 为北京全式金公司产品; PCR 扩增仪为 PE 公司产品; 凝胶成像分析系统为捷达公司; PCR 引物由英俊公司合成; MH 琼脂平板为法国生物梅里埃公司产品; 普通 DNA 产物纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感性测定 所有药敏纸片均购自英国 Oxoid 公司。药物敏感性测定采用 K-B 纸片法, 结果按 CLSI2009 年版标准判定。检测药物包括: 氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、阿米卡星、头孢噻肟、头孢唑啉、头孢西丁、头孢吡肟、亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、左氧氟沙星、复方磺胺甲恶唑、氨基曲南。

1.3.2 改良 Hodge 试验 将 0.5 麦氏浊度单位的大肠埃希菌 ATCC25922 菌液均匀涂布在 MH 平板上, 中间贴美罗培南(10 μ g)纸片, 将实验菌株以美罗培南纸片为起点, 用无菌接种环自纸片外缘向平板边缘以离心方向划线, 以肺炎克雷伯菌 ATCC1705 为阳性对照, 肺炎克雷伯菌 ATCC1706 为阴性对照, 35℃培养 16~18 h 后观察结果, 美罗培南抑菌圈内出现待检菌矢状生长者为阳性。

1.3.3 金属酶表型试验 将待测菌株悬液(0.5 麦氏浊度)涂

^{*} 基金项目: 南京市卫生局课题(YKK09115)。 作者简介: 沈瀚, 男, 副主任技师, 主要从事临床微生物学检验研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zkangkui@yahoo.com.cn。

布 MH 平板,平板上贴亚胺培南纸片,距其中心 24 mm 贴阿莫西林/克拉维酸纸法。另贴一亚胺培南纸片并于其上滴加 5 μ L 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液,35 $^{\circ}$ C 过夜培养。观察各纸片抑菌圈大小及纸片间是否具有协同效应。

1.3.4 基因检测 煮沸法提取细菌 DNA,置-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。参照文献^[3-5]合成碳青霉烯酶相关基因扩增引物,具体见

表 1。总反应体系为 50 μ L,其中 10 \times buffer(含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μ L, DNA 模板 2 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, *Taq* DNA 酶 0.3 μ L, dH_2O 34.7 μ L,退火温度为 55 $^{\circ}$ C。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳观察。将 PCR 扩增阳性产物送上海美吉公司测序,结果在 Genbank 数据库比对。

表 1 PCR 引物序列和产物大小

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
blaKPC	P1:GCT ACA CCT AGC TCC ACC TTC;P2:ACA GTG GTT GGT AAT CCA TGC	920
blaSME	P1:AAC GGC TTC ATT TTT GTT TAG;P2:GCT TCC GCA ATA GTT TTA TCA	830
blaGES	P1:ATG CGC TTC ATT CAC GCA C;P2:CTA TTT GTC CGT GCT CAG G	867
blaNMC	P1:GCA TTG ATA TAC CTT TAG CAG AGA;P2:CGG TGA TAA AAT CAC ACT GAG CAT A	2158
blaAMI	P1:CTG AAG GTG TAC GGA AAC AC;P2:GTT CGG CCA CCT CGA ATT G	322
blaBIC	P1:TAT GCA GCT CCT TTA AGG GC;P2:TCA TTG GCG GTG CCG TAC AC	537
blaIMI	P1:ATA GCC ATC CTT GTT TAG CTC;P2:TCT GCG ATT ACT TTA TCC TC	818

2 结 果

2.1 药物敏感性测定结果 25 株大肠埃希菌对常规药物呈泛耐药性。其中 15 株为亚胺培南耐药,10 株为中度敏感;20 株细菌对复方磺胺甲恶唑敏感。

2.2 碳青霉烯酶表型检测结果 25 株待检大肠埃希菌中,改良 Hodge 试验阳性菌有 15 例(60.0%),金属酶表型筛选试验皆为阴性。

2.3 基因分析结果 25 株大肠埃希菌中共检测出 KPC 酶阳性菌株 15 株(60.0%),均为 MHT 试验阳性菌株,未检出其他类型碳青霉烯酶基因;KPC 测序结果经在 Genebank 中进行比对,均为 KPC-2 型。PCR 电泳图谱见图 1。

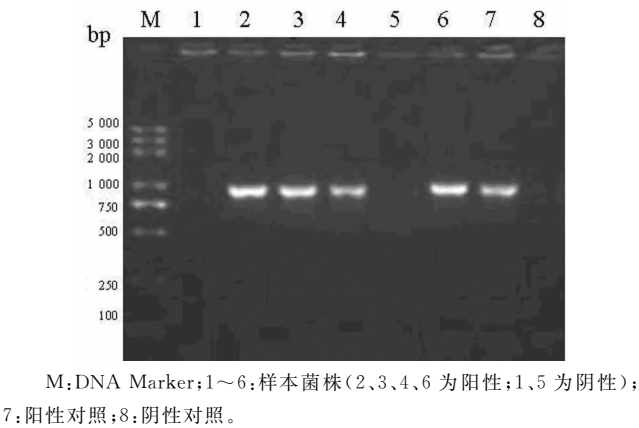


图 1 部分大肠埃希菌 KPC 基因 PCR 产物电泳图

3 讨 论

碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌在全球范围内广泛播散,是感染性疾病治疗过程中的一个难题^[4]。而碳青霉烯酶的产生是细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因。该类酶可分为两类,一类为活性中心含有丝氨酸的酶,包括 A 组 KPC、SME、IMI、GES 等和 D 组家族的 OXA-23~27、40、48 等;另一类为金属酶家族,主要为 IMP、VIM、GIM、SPM 和 SIM^[5]。携带这类酶的细菌引起的感染与患者的发病率和病死率密切相关。目前,肠杆菌科细菌中,以 KPC 型碳青霉烯酶最为流行^[6]。此外,孔蛋白缺失、外排泵的过表达、膜通透性下降、碳青霉烯类药物高亲和性的结合位点 PBP2 缺失、数量下降或亲和性下调等联合作用也与碳青霉烯耐药相关^[7]。药物敏感性测定结果显示,25 株亚胺培南不敏感大肠埃希菌对头孢菌素类、含酶抑

制剂、喹诺酮类、氨基糖苷类以及碳青霉烯类广泛耐药,这与产碳青霉烯酶菌株的耐药特点相似^[8],除了由碳青霉烯酶广谱的底物水解特点决定外,喹诺酮作用靶位的突变以及 16S rRNA 甲基化酶的产生与外排泵的过表达等联合作用也是导致细菌对这些临床常用抗菌药物泛耐药的主要原因^[9-11]。本研究中,改良 Hodge 实验和基因分析显示,15 株亚胺培南耐药菌株均携带 KPC-2 型碳青霉烯酶,是介导细菌对亚胺培南耐药的主要原因。而其余 10 株细菌虽然对亚胺培南的敏感性为中介,但表型试验和基因分析均为阴性,可能是在临床抗菌药物频繁使用所产生的选择压力下,超广谱 β -内酰胺酶与头孢菌素酶的产生与细菌外膜上亚胺培南的孔蛋白 OmpC 和 OmpF 的突变或缺失有关^[12]。目前已发现的 KPC 型酶已有 11 种,分别从 KPC-1 型至 KPC-11 型酶^[13],这类酶不仅通过克隆菌株播散,也可通过移动性遗传元件如质粒、转座子播散^[2]。目前,中国地区均以 KPC-2 型检出率较高,国内相继分离到 KPC-3、KPC-5 等变异体^[14]。而本文所调查的 15 株耐亚胺培南大肠埃希菌均为 KPC-2 型。这些酶的出现、播散和持续进化,将会给临床抗感染治疗带来严峻的挑战,迫切需要加强碳青霉烯耐药菌株的检测。

参考文献

[1] 黄金竹,母连军. 碳青霉烯类抗生素的研究概况[J]. 国外医药:抗生素分册,2007,28(4):145-154.

[2] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.

[3] 陈振华,刘文恩. 碳青霉烯酶研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 841-843.

[4] Tzouveleakis 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.

[5] Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(Suppl 3): S8-14.

[6] 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(7): 1120-1123.

[7] 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, 37(8): 623-627.

[8] Gutkind GO, Di Conza J, Power P, et al. β -lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic(下转第 646 页)

死组以不稳定斑块为主(149 个),对照组以稳定斑块居多(45 个),见表 2。

表 1 两组血清 hsCRP 水平比较、颈动脉 IMT 及斑块检出率对比

组别	n	hsCRP(mg/L)	IMT(mm)	斑块检出率(%)
脑梗死组	126	7.85±1.68	1.45±0.16	87.6
对照组	119	2.62±0.89	1.08±0.12	16.4

表 2 两组颈动脉超声检测结果对比

组别	n	斑块总数(个)	斑块性质	
			不稳定斑块(个)	稳定斑块(个)
脑梗死组	126	234	149	85
对照组	119	61	16	45

3 讨 论

颈动脉粥样硬化是缺血性脑卒中的独立危险因素,而动脉粥样硬化往往和慢性炎症过程相伴随。炎症血清标志物能够反映 ACI 的预后^[4-5]。

CRP 是在活化的巨噬细胞分泌的细胞因子刺激下诱导肝细胞产生的一种急性非特异性反应蛋白,临床上将用较敏感的方法测出的较低浓度的血清 CRP 称为 hsCRP。在人体正常生理状态下含量极微,但在组织损伤、感染及血管病变等情况下可升高数十倍以上,通常作为独特的炎症标记物来检测^[6]。动脉粥样硬化形成的整个病理生理过程,炎症反应可能起到了极为重要的作用,属于一种低度慢性炎症状态^[7]。当机体受到外来不良刺激,就会产生过量的炎症因子,从而刺激巨噬细胞产生白介素-6(IL-6)等细胞因子,进一步刺激肝脏合成 hsCRP,并释放进入血液。在血液中显著升高的 hsCRP 就会异常激活补系统,通过诱导内皮细胞黏附分子的产生,来激活血小板,继而引起血小板的异常聚集、黏附,从而形成不稳定硬化斑块^[8]。CRP 不仅可作为组织受损伤后产生的一种非特异性的反应蛋白,而且直接参与了脂质过氧化、内皮细胞功能失常、动脉炎症反应等一系列病理过程,是一项敏感的炎症反应指标,其含量与脑梗死面积和神经功能的损伤程度具有相关性,是 ACI 患者病情变化的指标之一^[9]。本研究结果显示,脑梗死组血清 hsCRP 水平明显高于健康体检组,提示脑梗死患者 hsCRP 水平与动脉粥样硬化疾病发生密切相关。

丁士芳等^[10]研究发现,在 ACI 患者中,年龄及梗死面积越大,病情越不稳定,hsCRP 水平就会越高,超声检出的斑块数目也相应增多。Alvarez 等^[11]报道 hsCRP 水平与颈动脉粥样硬化斑块内的巨噬细胞及 T 淋巴细胞含量呈正相关,颈动脉

斑块不稳定患者 hsCRP 水平高于斑块稳定型患者,症状明显的患者 hsCRP 水平高于无症状患者。研究结果显示,脑梗死组不仅血清 hsCRP 水平明显高于健康体检组,而且颈动脉斑块的检出率也明显高于健康体检组,且以软斑块居多,与文献报道一致。表明 hsCRP 与颈动脉粥样硬化斑块的形成及稳定性关系密切,在动脉粥样硬化性脑梗死的发病过程中起着极为重要的作用。

综上所述,hsCRP 作为一种非特异性炎症的敏感标志物之一,在 ACI 的发生、发展过程中都起到极为关键的作用,对于脑梗死患者的诊断、病情变化监测以及预后判断都具有很高的参考价值。

参考文献

[1] 乔兴茂,王雷,姜文洲. C 反应蛋白与缺血性脑卒中的相关性研究[J]. 实用临床医学,2005,6(3):20-24.

[2] 中华医学会第四次脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 临床荟萃,1988,29(8):367-368.

[3] 智光. 冠心病超声诊断学[M]. 北京:人民军医出版社,2001:131-132.

[4] Pizent A, Pavlovic M, Jurasovic J, et al. Antioxidants, trace elements and metabolic syndrome in elderly subjects [J]. J Nutr Health Aging,2010,14(10):866-871.

[5] Quincozes-Santos A, Gottfried C. Resveratrol modulates astroglial functions; neuroprotective hypothesis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011,1215(82):72-78. .

[6] Ablij H, Meinders A. C-reactive protein: history and revival[J]. Eur J Intern Med,2002,13(7):412.

[7] Bhakdi S. Immunopathogenesis of atherosclerosis; the Mainz hypothesis[J]. Med Monatsschr Pharm,2006,29(10):356-359.

[8] Azarpazhooh MR, Mobarra N, Parizadeh SM, et al. Serum high-sensitivity C-reactive protein and heat shock protein 27 antibody titers in patients with stroke and 6-month prognosis[J]. Angiology,2010,61(6):607-612.

[9] 项丽娜,谢聘,张拥波,等. 脑梗死急性期血清超敏 C 反应蛋白和基质金属蛋白酶-9 水平与梗死类型的关系[J]. 中国全科医学, 2010,13(8):831-833.

[10] 丁士芳,张运,张梅. 颈动脉粥样斑块稳定性与急性脑梗死发病机制关系的临床研究[J]. 中华超声影像学杂志,2006,15(8):597-600.

[11] Alvarez CB, Ruiz C, chacon P, et al. High-sensitivity Creactive protein in high-grade carotid stenosis; risk marker for unstable carotidplaque[J]. J Vasc Surg,2003,38(1):1018-1024.

(收稿日期:2012-11-09)

(上接第 644 页)

overview[J]. Curr Pharm Des,2013,19(2):164-208.

[9] Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria; an update[J]. Drug Resist Updat,2012,15(3):133-148.

[10] Madurga S, Sánchez-Céspedes J, Belda I, et al. Mechanism of binding of fluoroquinolones to the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase; towards an understanding of the molecular basis of quinolone resistance [J]. Chembiochem, 2008, 9 (13): 2081-2086.

[11] Nikaido H, Pagès JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria[J]. FEMS

Microbiol Rev,2012,36(2):340-363.

[12] Adler M, Anjum M, Andersson DI, et al. Influence of acquired β-lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in Escherichia coli[J]. J Antimicrob Chemother,2013,68(1):51-59.

[13] Rapp RP, Urban C. Klebsiella pneumoniae carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns [J]. Pharmacotherapy,2012,32(5):399-407.

[14] 胡付品,朱德妹. KPC 型碳青霉烯酶研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2011,11(1):76-80.

(收稿日期:2012-12-01)