

• 检验技术与方法 •

耐亚胺培南的阴沟肠杆菌碳青霉烯酶基因检测及同源性分析

宋景秋,戴 蕾,陶 月

(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耐亚胺培南的阴沟肠杆菌中的分布情况,并进行同源性分析。方法 收集耐亚胺培南的阴沟肠杆菌 4 株,K-B 纸片法测定菌株对药物的敏感性;采用改良 Hodge 试验及 EDTA 协同实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,ERIC-PCR 扩增后电泳进行同源性分析。结果 4 株阴沟肠杆菌呈现泛耐药现象;改良 Hodge 试验阳性 4 株,金属酶表型试验全部阴性;4 株菌株均检出 KPC-2 酶基因,未检出其他碳青霉烯酶基因。同源性分析结果显示 4 株菌株分为两型。结论 引起该院阴沟肠杆菌对碳青霉烯类药物不敏感的首要原因为细菌产 KPC-2 酶。

关键词:肠杆菌,阴沟; 碳青霉烯酶; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)01-0075-02

Carbapenemase gene detection and homology analysis of imipenem-resistant *Enterobacter cloacae*

Song Jingqiu, Dai Lei, Tao Yue

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstract: **Objective** To study the distribution of carbapenemase gene in imipenem-resistant *Enterobacter cloacae*, and make homology analysis. **Methods** Four strains of imipenem-resistant *Enterobacter cloacae* were collected. The drug sensitivity was measured by the K - B paper method. The modified Hodge test and EDTA collaborative experiments were used to detect carbapenemase phenotype. PCR was used to amplify carbapenemase gene and the sequence was analyzed. ERIC -PCR amplification electrophoresis was done for homology analysis. **Results** Four strains occurred pan-resistant *Enterobacter cloacae* phenomenon, the results of modified Hodge test were all positive and those of metalloenzymes phenotypic test were all negative. The four strains were detected with KPC-2 gene, without the other carbapenemase genes. The four strains were divided into two types by homology analysis. **Conclusion** Producing KPC-2 enzyme is the main cause of carbapenem resistance in *Enterobacter cloacae* in our hospital.

Key words: *Enterobacter cloacae*; carbapenemase; homology analysis

阴沟肠杆菌是临床常见的条件致病菌之一,因其可产超广谱 β -内酰胺酶及 AmpC 酶,导致其对多种抗菌药物高度耐药,临床对其有效治疗十分困难。碳青霉烯类抗菌药物抗菌谱广,经常用于治疗肠杆菌科细菌引起的各类感染。但随着碳青霉烯酶(carbapenemases)的产生,使得碳青霉烯类药物耐药问题日益严峻。现以本院检出的 4 株亚胺培南耐药阴沟肠杆菌为研究对象,研究其耐药基因携带情况,并进行同源性分析。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集 4 株对亚胺培南耐药的阴沟肠杆菌,均来自南京市鼓楼医院住院患者标本,痰液 2 份、腹水 2 份。所有菌株经 VITEK COMPACT2 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司产品)。

1.2 仪器及试剂 Taq DNA 聚合酶、DNA 标记物、PCR 扩增仪、凝胶成像分析系统、PCR 引物、普通 DNA 产物纯化试剂盒均参见文献[1]。

1.3 抗菌药物敏感试验 参见文献[1]。

1.4 改良 Hodge 试验 参考 CLSI 2012 版。

1.5 金属酶表型试验 参考文献[2]进行。

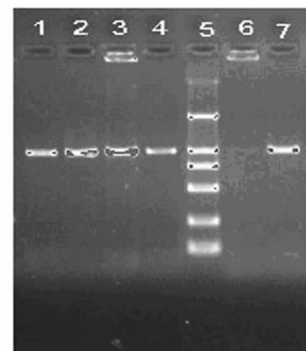
1.6 基因检测 参见文献[1]。参照文献[1-3]合成碳青霉烯酶相关基因扩增引物(bla_{kpc} 、 bla_{vim} 、 bla_{imp} 、 bla_{sme} 、 bla_{ndm})。

1.7 染色体 DNA 同源性分析 同文献[4]。

2 结 果

2.1 抗菌药物敏感性结果 K-B 纸片法结果显示,4 株阴沟

肠杆菌对常规药物呈泛耐药性,仅对复方新诺明敏感性较高(75%)。



1~4:分别为编号 1、2、3、4 号阴沟肠杆菌;5:DL 2 000 DNA 标记物;6:阴性对照 ATCC1706 肺炎克雷伯菌;7:阳性对照 ATCC1705 肺炎克雷伯菌。

图 1 阴沟肠杆菌 KPC-PCR 电泳

2.2 碳青霉烯酶表型检测结果 4 株待检阴沟肠杆菌中,改良 Hodge 试验均阳性(100%),金属酶表型筛选试验皆为阴性。

2.3 基因分析结果 4 株阴沟肠杆菌中均检测到 KPC 酶(100%),未检出其他类型碳青霉烯酶基因;产物纯化后测序,

结果经 BLASTn(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn>) 比对,均为 KPC-2 型。PCR 电泳图谱见图 1,PCR 产物测序见图 2。

2.4 同源性分析结果 4 株阴沟肠杆菌 ERIC-PCR 同源性分析结果显示,1、3 号菌株扩增产物电泳后条带和数量完全相同,属于同一克隆型 A 型;2、4 号菌株与 1、3 号菌株主要条带完全不同,属于另一克隆型 B 型,但 2、4 号菌株有一次要条带不同,属于不同亚型,即 2 号菌株为 B1 型,4 号菌株为 B2 型。

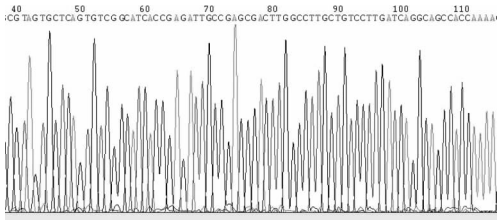
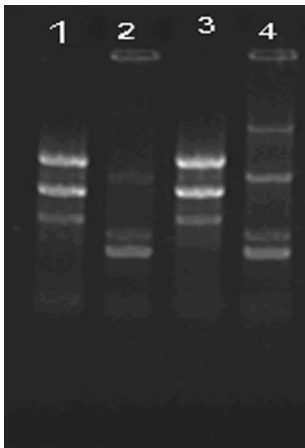


图 2 阴沟肠杆菌 KPC-PCR 测序图



1~4:分别为编号 1、2、3、4 号阴沟肠杆菌。

图 3 阴沟肠杆菌 ERIC-PCR 电泳图

3 讨 论

阴沟肠杆菌是存在于人和动物肠道的正常菌群,近年已成为重要的医院感染病原体。阴沟肠杆菌是产 AmpC 酶的典型细菌,AmpC 酶是经染色体介导,其优先底物是头孢菌素,如头孢西丁,但其不被克拉维酸、他唑巴坦等酶抑制剂抑制。同时阴沟肠杆菌也可产超广谱内酰胺酶(ESBLs),可水解头孢菌素,但 ESBLs 酶活性可被克拉维酸抑制。由于 AmpC 酶和 ESBLs 酶在阴沟肠杆菌中的流行,而碳青霉烯类抗菌药物不被其水解,使得碳青霉烯类抗菌药物成为治疗阴沟肠杆菌引起感染的最有效药物。但是碳青霉烯酶的出现给阴沟肠杆菌的治疗带来一定的困难。

KPC 型碳青霉烯酶于 2001 年于美国首次被发现^[5],之后世界各地陆续检出携带 KPC 酶的肠杆菌科细菌^[6-9],可分为 11 种亚型^[10]。KPC 酶可以水解碳青霉烯类药物,并不被酶抑制剂或 EDTA 抑制。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转座子、质粒播散^[1,11]。中国常见为 KPC-2 型^[3,12],本文中检出的 KPC 酶亦均为 KPC-2 型,可见 KPC-2 酶仍是本院肠杆菌科细菌耐碳青霉烯类抗菌药物的主要原因^[9]。

ERIC-PCR 是在随机扩增多态性 DNA(RAPD)基础上发

展起来的、从遗传进化的角度对微生物基因组 DNA 进行分析的一种分型方法,针对染色体非编码区一段高度保守的约 126 bp 的中央倒置重复区进行扩增,进而从分子水平对菌株亲缘性进行分析。本研究中 4 株阴沟肠杆菌采用 ERIC-PCR 分析显示属于 2 个不同的流行克隆型。1、3 号属于 A 型同一亚型,2、4 号属于 B 型,但为不同亚型。1、3 号菌株均来自同一病区(普外科),均为腹水的标本;2、4 号菌株来自不同病区。可以初步分析,1、3 号菌株为同一菌株引起的感染,需排除院内感染;而 2、4 号菌株也属于同一菌株的不同亚型,需加强院内感染监测。

参考文献

[1] 宁明哲,沈瀚,张之烽,等. 对亚胺培南非敏感的肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类药物机制研究[J]. 临床检验杂志,2012,30(9):706-708.

[2] 施德仕,邵海枫,王卫萍,等. 用改良 Hodge 实验筛查低产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌[J]. 临床检验杂志,2010,28(11):455-457.

[3] 张旭华,庞力,刘婷,等. 肺炎克雷伯菌对亚胺培南耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志,2011,28(10):1199-1201.

[4] 荆守刚,邵海枫,王卫萍,等. 黏质沙雷菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志,2011,12(10):1196-1198.

[5] Bell JM, Turnidge JD, Wiedemann B. Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific region: results from the ST-NTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998 to 2001[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(32):3989-3993.

[6] Cuzon G, Nass T, Demachy MC, et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(6):796-797.

[7] Naas TP, Nordmann P, Vedel G, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolated from France[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 49(40):4423-4424.

[8] Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(28):3098-3101.

[9] Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(27):2880-2882.

[10] 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.

[11] 宁明哲,沈瀚,周万青,等. 检出产 VIM-2、OXA-56 和 TEM-1 的弗氏柠檬酸杆菌[J]. 中华检验医学杂志,2013,29(1):80-82.

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

(收稿日期:2013-09-14)