

• 临床检验研究论著 •

耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌耐药机制研究

梁权辉¹, 徐韞健²

(1. 广州医科大学第一临床学院检验系 09 级, 广东广州 510120;

2. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:目的 分析该院临床分离的可疑产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的耐药性与耐药机制。方法 采用 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪检测其对 21 种抗菌药物的药敏结果, 采用改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶筛选, 用聚合酶链反应检测碳青霉烯酶 KPC 基因、外膜孔道蛋白(OmpK35 和 OmpK36)编码基因、转座子 tnpA、tnpU 基因。结果 47 株可疑产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌对青霉素类、头孢菌素类、喹诺酮类抗菌药物的耐药率高达 80% 以上, 对亚胺培南、美罗培南、丁胺卡那霉素耐药率为 35% 以下; 耐亚胺培南菌株对头孢哌酮/舒巴坦、头孢美唑、头孢替坦、头孢吡肟、哌拉西林/他唑巴坦、庆大霉素、妥布霉素、美罗培南、厄他培南的耐药率明显高于敏感菌株, 二者差异具有统计学意义($P < 0.05$); 改良 Hodge 试验阳性 6 株, 检出碳青霉烯酶 KPC 基因 4 株, 符合率为 66.67%, 均为 KPC-2 型; 膜孔蛋白 OmpK35、OmpK36 基因缺失率分别为 38.30%、65.96%; 转座子 tnpA、tnpU 检出率分别为 4.25% 和 38.30%。结论 产碳青霉烯酶并非菌株耐碳青霉烯类药物的主要原因, 尚存在其他耐药机制。

关键词:碳青霉烯酶; 克雷伯菌, 肺炎; 大肠杆菌; 抗药性, 微生物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)02-0165-04

Study on resistant mechanism of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*Liang Quanhui¹, Xu Yunjian²

(1. Department of Medical Laboratory, the First Clinic College, Guangzhou Medical University,

Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Medical Laboratory, the First

Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance and the resistant mechanism of suspicious carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. **Methods** All bacteria were isolated from the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, and antimicrobial susceptibility was done by VITEK-2 automatic bacterium identifying and drug sensitivity analyzing systems. The screening of the carbapenemase was detected by the modified Hodge test, and the polymerase chain reaction (PCR) was carried out to amplify carbapenem hydrolyzing gene(KPC), outer membrane protein genes (OmpK35 and OmpK36), transposon tnpA and tnpU. **Results** Among 47 strains of suspicious carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, the higher drug resistance rates to them were penicillins, cephalosporins and quinolones, which were more than 80%. The resistance rates for imipenem, meropenem and amikacin were less than 35%. In addition to the imipenem-resistant strains, the resistance rates to cefoperazone/sulbactam, cefmetazole, cefotetan, cefepime, piperacillin/tazobactam, gentamicin, tobramycin, meropenem and ertapenem were significantly higher than the sensitive strains ($P < 0.05$). 6 strains were positive in the modified Hodge test, with 4 strains carried out KPC-2 gene, and the correspondence rate of 66.67%. The absence rates of outer membrane protein genes (OmpK35 and OmpK36) were 38.30% and 65.96%, respectively. The positive rates of transposition tnpA and tnpU accounted for 4.25% and 38.30%, respectively. **Conclusion** The emergence of carbapenemase is not the main reason of carbapenem-resistance producers in bacteria, and there may be other resistant mechanisms to reduced susceptibility of carbapenems.

Key words: carbapenemases; *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; drug resistance, microbial

碳青霉烯类抗菌药物是临床应用的重要广谱抗菌药物, 具有抗菌谱广、抗菌作用强的特点, 它对包括超广谱 β -内酰胺酶 (extended spectrum beta-lactamases, ESBLs) 和头孢菌素酶 (AmpC) 在内的 β -内酰胺酶高度稳定, 是治疗多重耐药革兰阴性杆菌的有力武器^[1-2]。但随着该类药物的广泛使用, 耐碳青霉烯类抗菌药物的菌株逐渐增多, 其主要的耐药机制就是产生可水解碳青霉烯类抗菌药物的 β -内酰胺酶-碳青霉烯酶^[3-4]。为进一步了解可疑产碳青霉烯酶菌株对常见抗菌药物的耐药性和耐药原因, 本研究收集了 2011 年 6 月至 2012 年 6 月期间广州医学院附属第一医院临床分离的 47 株可疑的产碳青霉烯

酶的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌, 对其进行耐药性分析, 并从分子机制上对其耐药性进行研究。

1 材料与方

1.1 实验菌株 广州医学院附属第一医院 2011 年 6 月至 2012 年 6 月临床分离的可疑产碳青霉烯酶菌株 47 株, 菌株选取标准为厄他培南 MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ 或哌拉西林/他唑巴坦 MIC $\geq 32 \mu\text{g/mL}$, 其中 27 株肺炎克雷伯菌, 20 株大肠埃希菌。标本来源包括痰 20 份、中段尿 13 份、导管头 3 份、伤口分泌物 3 份、拭子 3 份、尿液 2 份、血液 1 份、脓液 1 份、腹水 1 份。均经 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪统一进行鉴定。质控菌株大肠

埃希菌 ATCC 25922, 肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.2 主要试剂和仪器 胰蛋白胨大豆胨肉汤、胰蛋白胨、水解酪蛋白胨(MH)琼脂、厄他培南纸片购自英国 Oxid 公司; DNA 标记物、PCR 配套试剂购自 TaKaRa 公司; 溴化乙锭和琼脂糖购自北京鼎国公司。VITEK-2 全自动细菌鉴定仪购自法国梅里埃公司, PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司, 凝胶成像分析系统购自英国 Syngene 公司, 电泳仪购自北京市六一仪器厂。

1.3 药物敏感试验 采用 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪对临床分离的 47 株可疑产碳青霉烯酶菌株进行 21 种常用抗菌药物敏感试验。结果判断按照美国临床和实验室标准化研究所(CLSI)2011 年标准^[5]进行。

1.4 改良 Hodge 试验 将大肠埃希菌 ATCC25922 涂布至 MH 平板上(0.5 麦氏浊度), 将厄他培南纸片贴到平板中央, 接种待检菌的无菌接种环从药敏纸片边缘向平板边缘划待测菌, 注意不要划破平板表面。35 °C 孵育过夜, 观察厄他培南抑菌圈内出现待测菌矢状生长者则视为 Hodge 试验阳性。

1.5 PCR 引物 根据文献[6-7]设计引物, 引物由华大基因公司合成(见表 1)。

表 1 耐碳青霉烯类抗菌药物基因组引物

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)	退火温度 (°C)
KPC	上游: GCTACACCTAGCTCCACCTTC	948	53
	下游: ACAGTGGTTGGTAATCCATGC		
OmpK35	上游: CAGACACCAAATCTCATCAATGG	1 183	52
	下游: AGAATTGGTAAACGATACCCACG		
OmpK36	上游: CAGCACAATGAATATAGCCGAC	1 115	53
	下游: GCTGTTTCGTCAGCAGGTTG		
tnpA	上游: CGCCAGTCTTGATGAGCCGG	444	58
	下游: TTGCGGTTCCGGTCCGCGAAA		
tnpU	上游: CCAACTGATGGCGGTGCCTT	403	51
	下游: CGGTATGGTGGCTTTCGC		

1.6 PCR 扩增和产物测序 加热裂解法制备总 DNA 模板, PCR 反应体系总体积为 25 μL, 其中正、反引物各 0.5 μL, Premix Taq 溶液 12.5 μL, 灭菌蒸馏水 10.5 μL, DNA 模板 1 μL。扩增条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 51~58 °C (见表 1) 60 s, 72 °C 30 s, 共循环 35 次, 最后 72 °C 再延伸 10 min。取 PCR 产物点样于琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色和洗脱后放凝胶成像系统成像。取阳性 PCR 产物送华大基因公司进行测序, 测序结果在 GenBank 上进行比对。

1.7 统计学处理 药敏数据分析采用 WHONET 5.4 软件, 并应用 SPSS 19.0 软件, 用 χ^2 检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

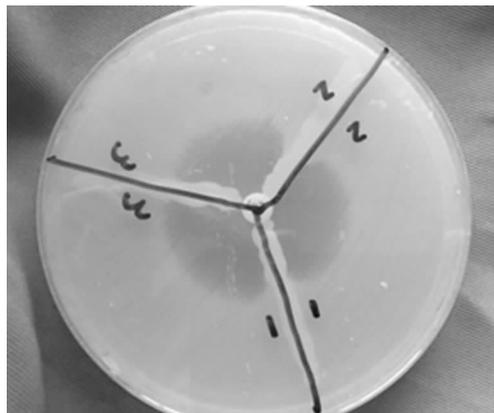
2 结 果

2.1 改良 Hodge 试验结果 抑菌圈出现矢状, 表示有碳青霉烯酶产生, 试验结果如图 1 所示。47 株可疑产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中, 改良 Hodge 试验阳性为 6 株, 阳性率为 12.76%, 包括 5 株肺炎克雷伯菌、1 株大肠埃希菌。

2.2 耐药基因携带情况 检出 KPC 基因 4 株, OmpK35 基因 29 株(即 OmpK35 基因缺失 18 株), OmpK36 基因 16 株(即 OmpK36 基因缺失 31 株), tnpA 基因 2 株, tnpU 基因 18 株。

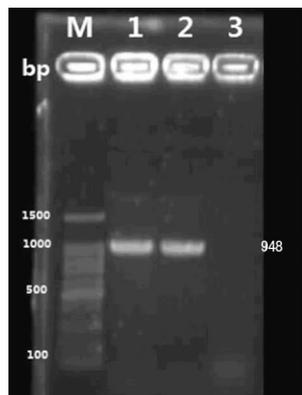
基因阳性产物测序后经 BLAST 比对, 与已在 GenBank 登录的 KPC-2、OmpK35、OmpK36、tnpA、tnpU 基因序列的相似率分别为 99%、99%、99%、97% 和 99%。KPC 基因 PCR 产物电泳图见图 2。

所分离细菌中 3 株同时携带 KPC、OmpK35、OmpK36 和 tnpU, 占 6.38%; 1 株携带 KPC、膜孔蛋白 OmpK36 缺失, 占 2.13%; 同时缺失膜孔蛋白 OmpK35、OmpK36 和携带 tnpU 3 株, 占 6.38%; 14 株同时缺失 OmpK35、OmpK36, 占 29.79%; 18 株缺失 OmpK35, 占 38.30%; 31 株缺失 OmpK36, 占 65.96%; 2 株只携带 tnpA, 占 4.25%, 见表 2。



1~2: 阳性标本; 3: 阴性标本。

图 1 改良 Hodge 试验结果



M: 100 bp Ladder III; 1~2: KPC 基因 PCR 产物; 3: 阴性对照。

图 2 KPC 基因 PCR 产物图

表 2 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中基因的携带情况[n(%)]

菌株	n	KPC (+)	OmpK35 (+)	OmpK36 (+)	tnpA (+)	tnpU (+)
肺炎克雷伯菌	27	3(11.11)	13(48.14)	16(59.26)	2(7.41)	16(59.26)
大肠埃希菌	20	1(5.00)	16(80.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(10.00)
合计	47	4(8.51)	29(61.70)	16(34.04)	2(4.25)	18(38.30)

2.3 药敏结果分析 47 株可疑产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢唑啉、头孢他啶、头孢曲松、氨基曲南、左氧氟沙星、环丙沙星的耐药率依次为 100.00%、93.62%、91.49%、89.36%、87.23%、87.23%、80.85% 和 80.85%; 对丁胺卡那霉素、亚胺培南、美罗培南耐药率较低, 分别为 25.53%、29.79% 和 31.91%。肺炎克雷伯菌与大肠埃希菌在众多类型抗菌药物在耐药选择上总体上差

异不大,详见表 3。在 ESBLs 耐药株统计中,肺炎克雷伯菌(15/27)和大肠埃希菌(11/20)检出率均为 55.00%。

2.4 亚胺培南耐药菌株的耐药性分析 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌对亚胺培南耐药的有 14 株,敏感 32 株,中介 1 株。耐亚胺培南的菌株对 20 种抗菌药物耐药率均较高,除丁胺卡那霉素(28.57%)和呋喃妥因(42.86%)外,其余 18 种抗菌药物的耐药率均在 70%以上;对比耐药菌和敏感菌的药敏可知,亚胺培南耐药株对头孢哌酮/舒巴坦等 9 种抗菌药物的耐药率普遍高于敏感菌株,二者差异具有统计学意义($P < 0.05$),具体见表 4。

表 3 对 21 种抗菌药物敏感试验结果

抗菌药物	肺炎克雷伯菌(27 株)		大肠埃希菌(20 株)	
	耐药株数	耐药率(%)	耐药株数	耐药率(%)
头孢哌酮/舒巴坦	19	70.37	13	65.00
头孢美唑	16	59.26	14	70.00
美罗培南	8	29.63	7	35.00
氨苄西林	26	100.00	20	100.00
氨苄西林/舒巴坦	25	92.59	19	95.00
丁胺卡那霉素	9	33.33	3	15.00
氨曲南	26	96.30	15	75.00*
环丙沙星	19	70.37	19	95.00*
头孢替坦	14	51.85	11	55.00
头孢曲松	25	92.59	16	80.00
头孢唑啉	26	96.30	17	85.00
厄他培南	22	81.48	12	60.00
头孢吡肟	18	66.67	12	60.00
呋喃妥因	19	70.37	2	10.00*
庆大霉素	17	62.96	12	60.00
亚胺培南	8	29.63	6	30.00
左氧氟沙星	20	74.07	18	90.00
复方新诺明	17	62.96	14	70.00
头孢他啶	26	96.30	16	80.00
妥布霉素	15	55.56	12	60.00
哌拉西林/他唑巴坦	12	44.44	9	45.00

* : $P < 0.05$, 与肺炎克雷伯菌比较。

表 4 亚胺培南耐药与敏感菌药敏结果比较

抗菌药物	亚胺培南耐药(14 株)		亚胺培南敏感(32 株)	
	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)
头孢哌酮/舒巴坦	14	100.00	17	53.13*
头孢美唑	13	92.86	17	53.13*
美罗培南	14	100.00	4	12.50*
氨苄西林	14	100.00	31	96.88
氨苄西林/舒巴坦	14	100.00	29	90.63
丁胺卡那霉素	4	28.57	7	21.88
氨曲南	14	100.00	26	81.25
环丙沙星	12	85.71	25	78.13
头孢替坦	13	92.86	12	37.50*
头孢曲松	14	100.00	26	81.25
头孢唑啉	14	100.00	28	87.50

续表 4 亚胺培南耐药与敏感菌药敏结果比较

抗菌药物	亚胺培南耐药(14 株)		亚胺培南敏感(32 株)	
	株数	耐药率(%)	株数	耐药率(%)
厄他培南	14	100.00	19	59.38*
头孢吡肟	13	92.86	16	50.00*
呋喃妥因	6	42.86	14	43.75
庆大霉素	11	78.57	17	53.13*
左氧氟沙星	11	78.57	26	81.25
复方新诺明	10	71.43	21	65.63
头孢他啶	14	100.00	28	87.50
妥布霉素	11	78.57	15	46.88*
哌拉西林/他唑巴坦	14	100.00	6	18.75*

* : $P < 0.05$, 与亚胺培南耐药菌比较。

3 讨论

大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制主要有 4 种:(1)产生碳青霉烯酶;(2)主动外排系统的活跃;(3)ESBLs 或 AmpC 酶的产生;(4)外膜蛋白的缺失或数量的减少,其中产碳青霉烯酶是细菌耐药的主要机制^[8]。肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(klebsiella pneumoniae carbapenemase, KPC)是近年发现的一种新型的能够钝化碳青霉烯的细菌酶,它能够水解碳青霉烯类、头孢菌素类和氨曲南等抗菌药物。KPC 酶存在于质粒上,可在细菌间进行水平或垂直传播,已经在世界范围内引起关注,报道的地区和细菌种类也日益增加。

在本研究中,47 株可疑耐碳青霉烯类菌改良 Hodge 试验阳性有 6 株,提示该菌株产碳青霉烯酶,经聚合酶链反应扩增出 4 株含 KPC 基因,其中 3 株为肺炎克雷伯菌,1 株为大肠埃希菌,经 GenBank 比对确定为 KPC-2 基因型,说明本地区流行的 KPC 酶主要为 KPC-2 型。改良 Hodge 试验是 CLSI 推荐的用于筛查 KPC 型碳青霉烯酶的方法,本研究结果显示符合率为 66.67%,没检出 KPC 酶的 2 株菌可能产生了除 KPC 酶外的碳青霉烯酶,可能携带有 B 类金属酶 5 类基因型,如 VIM、IMP、SPM、GIM 和 SIM,或者携带有 D 类碳青霉烯酶如 OXA223、OXA258、OXA240 等^[9]。另外改良 Hodge 试验会出现假阳性,有报道^[9]菌株产了较多的 ESBLs 或 AmpC 可能导致其出现假阳性,本实验的其中 1 株为 ESBLs 阳性,缺失 OmpK35、OmpK36 基因,另外 1 株 ESBLs 阴性。

在 14 株耐亚胺培南菌株中,大多肺炎克雷伯菌携带转座子 tnpU,说明转座子 tnpU 在肺炎克雷伯菌中对耐药基因的表达调控起重要作用^[10];全部大肠埃希菌显示外膜孔道蛋白 OmpK36 基因缺失,说明外膜孔蛋白 OmpK36 基因对其耐药起着至关重要作用。综上所述,本地区耐碳青霉烯类抗菌药物肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的耐药机制如下:(1)出现碳青霉烯酶,主要为 KPC-2 型;(2)对于肺炎克雷伯菌,膜孔蛋白基因缺失引起的耐药零星出现,多携带转座子 tnpU;(3)对于大肠埃希菌,外膜孔蛋白 OmpK 36 基因缺失是其耐药的最主要原因,导致肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药或敏感性下降的原因是产生上述碳青霉烯酶、外膜蛋白缺失、转座子携带。

47 株可疑产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌对厄他培南的耐药率高达 72.34%,高于亚胺培南(下转第 169 页)

2.2 AKA 和 CCP 抗体对 RA 组有较高的特异性,见表 2。

表 2 AKA 和抗 CCP 抗体的敏感性及其特异性 (%)

项目	敏感性	特异性
AKA	49.79	97.31
抗 CCP 抗体	68.46	97.21
AKA+抗 CCP 抗体	48.55	97.93

3 讨论

RA 是慢性全身性自身免疫性疾病,主要累及各关节,是呈多发性、对称性的慢性炎症,常反复发作,最终可导致关节畸形和功能丧失,同时也可引起其他器官或组织受累^[3]。因此 RA 的早期诊断和治疗尤其重要。类风湿因子(RF)是类风湿关节炎主要的血清学标志^[4],目前 RF 检测已为临床所常用,但 RF 也可出现在慢性炎症和感染性疾病中,其特异性较低,不利于早期诊断^[5]。后来建立了 ELISA 法检测抗 CCP 抗体^[6],以及间接免疫荧光法检测 AKA 的方法。抗 CCP 抗体和 AKA 可早期出现于类风湿关节炎结果^[7],本研究中显示 AKA 的特异性为 97.31%,抗 CCP 抗体的特异性为 97.21%,联合检测 AKA 和抗 CCP 抗体的特异性为 97.93%。因此,联合检测 AKA 和抗 CCP 抗体可以提高 RA 早期的诊断率^[8-11],可以使 RA 患者尽早得到治疗,改善预后。

在全世界大约有 1% 的人患有 RA,其中 75% 为女性患者^[12],经统计分析本院这段时期内的 RA 患者,女性 215 例,男性 26 例,女性患者高达 90%,提示该病高发于女性患者。本研究发现 AKA 在 RA 组中的阳性率为 49.79%,在非 RA 组中的阳性率仅为 2.69%,经统计学比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),抗 CCP 抗体在 RA 组的阳性率为 68.46%,在非 RA 组中的阳性率仅为 2.79%,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。因此,AKA 和抗 CCP 抗体在 RA 的辅助诊断中有重要的临床意义。

参考文献

[1] Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis[J]. Rheum

Dis Clin North Am,2001,27(2):269-281.
 [2] 张乃峥. 临床风湿病学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:319.
 [3] 列英. 类风湿性关节炎血清早期诊断指标的研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(10):632-634.
 [4] 李艳霞. 联合检测抗 CCP 与 RF 在类风湿关节炎诊断中的临床价值[J]. 中国医药指南,2011,(17):1800-1802.
 [5] 艾脉兴,曾小峰. 类风湿关节炎自身抗体新认识[J]. 中华风湿病学杂志,2002,6(1):195-197.
 [6] Schellekens GA,Visser H,De Jong BAW, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide[J]. Arthritis Rheum,2000,43(1):155-163.
 [7] 隋振铁. AKA 抗体、抗-CCP 抗体和 RF 分型在类风湿性关节炎诊断的应用[J]. 标记免疫分析与临床,2011,18(6):423-425.
 [8] 李懿莎,左晓霞. 类风湿关节炎相关自身抗体及其意义[J]. 临床内科杂志,2010,27(10):660.
 [9] Rantapaa-Dahlqvist S. Diagnostic and prognostic significance of autoantibodies in early rheumatoid arthritis[J]. Scand Rheumatol,2005,34(1):83-96.
 [10] Berglin E,Johansson T,Sundin U, et al. Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset[J]. Ann Rheum Dis,2006,65(4):453-458.
 [11] Jansen AL, Van der Horst-Bruinsma I, Van Schaardenburg D, et al. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptide differentiate rheumatoid arthritis from undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis[J]. Rheumatol, 2002, 29 (20): 2074-2076.
 [12] 张海军. 抗 CCP 抗体在类风湿性关节炎诊断中的作用及临床意义[J]. 河北医学,2013,19(5):759-761.

(收稿日期:2013-08-15)

(上接第 167 页)

(29.79%) 和美罗培南(31.91%);对于本地区可疑产碳青霉烯酶菌,亚胺培南可能成为临床上治疗重症感染的首选。14 株耐亚胺培南的菌株对所检测抗菌药物的耐药率达到 70% 以上,对丁胺卡那霉素的敏感率最高,可作为首先药物。携带 KPC-2 型基因的菌株除对丁胺卡那霉素敏感外,其余 20 种常见临床使用抗菌药物中均显示耐药;可见携带 KPC-2 型碳青霉烯酶的细菌基本到达无药可用的地步,应引起高度重视。因此,建立本地区耐碳青霉烯酶检测体系,及时发现和定期报告本地区耐药菌的流行趋势,合理规范化使用碳青霉烯类抗菌药物,能够有效减少产碳青霉烯酶菌株的发生和传播。

参考文献

[1] Bratu S, Landara D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium[J]. Arch Intern Med, 2005, 165 (12):1430-1435.
 [2] 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, 2008, 60(10):1151-1161.
 [3] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.

[4] Oteo J, Delgado-Itibarren A, Vega D, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical Escherichia coli during therapy [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(6): 534-537.
 [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S21 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2011.
 [6] 李坤, 史伟峰, 季云, 等. 膜孔蛋白基因缺失与肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类抗生素的关系[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(3): 144-148.
 [7] Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, et al. High level carbapenem resistance in a Klebsiella pneumoniae clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10): 3396-3406.
 [8] 安军, 蔡挺, 张顺. 耐碳青霉烯类大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌多重耐药研究进展[J]. 现代实用医学, 2011, 23(3): 359-360.
 [9] 杨启文, 郑瑞, 王辉, 等. 改良 Hodge 试验检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的性能评估[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(12): 1122-1127.
 [10] 卢慧敏, 余琳, 徐隗健, 等. 转座子 tnpU 基因在多重耐药革兰阴性杆菌中的分布情况[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(8): 948-954.

(收稿日期:2013-08-10)