

来的问题,并逐渐减少与发达国家的差距。目前各种实验进展的临床转化速度越来越快,例如在基因工程疫苗方面的新一代核酸疫苗,以及利用基因工程技术将保护性抗体大规模生产用以口服被动治疗,或者将安全有效的保护性抗原通过转基因植入植物当中,利用植物的真核细胞系统进行有效地加工后,通过日常饮食可有效地刺激胃肠黏膜免疫,再配合全身免疫可以达到长期预防和治疗的效果均有潜力成为替代当前高耐药根除疗法的候选方案。令人欣慰的是一些新型的治疗方式已经获得了理想的实验效果,在进一步改进和验证后,希望能早日向临床转化,以解决抗菌药物耐药带来的严重问题。

参考文献

- [1] Achyut BR, Ghoshal UC, Moorchung N, et al. Transforming growth factor-B1 and matrix metalloproteinase-7 promoter variants induce risk for Helicobacter pylori-associated gastric precancerous lesions[J]. DNA Cell Biol, 2009, 28(6): 295-301.
- [2] 黎莉, 杨卫文, 杨景林. 幽门螺杆菌感染与胃肠外疾病的关系[J]. 河北联合大学学报: 医学版, 2013, 15(2): 182-184.
- [3] Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. A National study of Helicobacter pylori infection in gastric biopsy specimens[J]. Gastroenterology, 2010, 139(6): 1894-1901.
- [4] 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(5): 265-270.
- [5] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways[J]. Trends Cell Biol, 2009, 19(3): 119-129.
- [6] Nagy TA, Wroblewski LE, Wang D, et al. β -Catenin and p120 mediate PPAR δ -dependent proliferation induced by helicobacter pylori in human and rodent epithelia[J]. Gastroenterology, 2011, 141(2): 553-564.
- [7] Malfertheiner P, Megraud F, O'morain CA, et al. Management of helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence consensus report[J]. Gut, 2012, 61(5): 646-664.
- [8] Raghavan S, Hjulstrom M, Homlgren J, et al. Protection against experimental Helicobacter pylori infection after immunization with inactivated H. pylori whole-cell vaccines[J]. Infect Immun,

2002, 70(11): 6383-6388.

- [9] Strugatsky D, McNulty R, Munson K, et al. Structure of the proton-gated urea Channel from the gastric pathogen Helicobacter pylori[J]. Nature, 2013, 493(7431): 255-258.
- [10] Flach CF, Svensson N, Blomquist M, et al. A truncated form of HpaA is a promising antigen for use in a vaccine against Helicobacter pylori[J]. Vaccine, 2011, 29(6): 1235-1241.
- [11] Liu X, Hu J, Zhang X, et al. Oral immunization of mice with attenuated Samlonella typhmiurium expressing Helicobacter pylori-urease B subunit[J]. ChinMed J, 2002, 115(10): 1513-1516.
- [12] Smythies LE, Novak MJ, Waites KB, et al. Poliovirus replicons encoding the B subunit of Helicobacter pylori urease protect mice against H. pylori infection[J]. Vaccine, 2005, 23(7): 901-909.
- [13] Huang X, Xu B, Duan G, et al. The rOmp22-HpaA fusion protein confers protective immunity against helicobacter pylori in mice[J]. Curr Microbiol, 2013, 67(4): 487-492.
- [14] Giudice GD. Helivax Antex Biologics [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(7): 896-899.
- [15] Summerton NA, Welch RW, Bondoc L, et al. Toward the development of a stable, freeze-dried formulation of Helicobacter pylori killed whole cell vaccine adjuvanted with a novel mutant of Escherichia coli heat-labile toxin[J]. Vaccine, 2010, 28(5): 1404-1411.
- [16] 冀子中, 金夏, 韩丰, 等. 2 311 株分离自不同年龄段患者的幽门螺杆菌的多重耐药性分析[J]. 中华消化杂志, 2013, 33(12): 826-830.
- [17] 徐采朴. Maastricht IV 共识报告有关幽门螺杆菌感染治疗的新策略[J]. 现代消化及介入诊疗, 2013, (3): 189-192.
- [18] 刘文忠, 萧树东. 幽门螺杆菌新国际共识解读[J]. 胃肠病学, 2012, 17(1): 1-4.
- [19] 甘伙烨, 彭铁立, 赵琳丽, 等. 标准三联疗法四联疗法及序贯疗法根除幽门螺杆菌的疗效观察[J]. 山西医药杂志, 2014, 43(3): 258-260.
- [20] 中华医学会消化病分会幽门螺杆菌学组. 第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J]. 内科理论与实践, 2013, 51(1): 54-60.

(收稿日期: 2015-04-08)

• 综 述 •

KPC 型碳青霉烯酶的研究现状与进展

朱天成 综述, 陶庆春[△] 审校

(北京中医药大学第三附属医院检验科, 北京 100029)

关键词: 碳青霉烯酶; 肺炎克雷伯菌; 耐药机制; 基因型

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 20. 042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)20-3020-05

随着抗菌的药物的滥用,临床上耐药细菌不断出现,给感染性疾病的诊断与治疗带来了严重的困难,严重威胁广大人民群众的身体健康,给公共卫生事业带来了严峻挑战。然而 KPC 型碳青霉烯酶的流行让碳青霉烯类抗菌药物作为革兰阴性菌的最后一道防线的地位受到严重威胁,所以有必要对 KPC 型碳青霉烯酶进行综述,增进对耐药菌传播机制与流行情况的了解,以指导临床用药与科研。

1 KPC 型碳青霉烯酶的流行病学

1.1 KPC 型碳青霉烯酶的发现 KPC 型碳青霉烯酶于 1996 年首次在美国本土被发现,首见于北卡罗来纳州的 1 株肺炎克雷伯菌中,该细菌对美罗培南与亚胺培南不敏感,但是克拉维酸可以抑制其大部分活性^[1]。共有 3 种碳青霉烯酶通过等电聚焦电泳实验被发现,即 TEM-1, SHV-29, KPC-1。通过质粒转染接合实验发现:对亚胺培南、美罗培南、超广谱头孢菌素和

氨曲南的耐药性产生主要是因为 50 kb 大小的质粒上存在着 KPC-1。氨基酸序列分析进一步确定 KPC-1 是一种新型的碳青霉烯酶, KPC-1 与 SEM-1 具有 45% 的相似性。由于其在肺炎克雷伯菌中分离得到, 所以将其命名为 KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)。

1.2 KPC 型碳青霉烯酶的传播与流行 自从在美国卡罗来纳州发现 KPC-1 以来, 世界各地不同国家地区陆续对产 KPC 酶细菌进行了一系列报道, 在一定程度上表现出大范围播散趋势, 在全球范围内已经出现了产 KPC 型酶的播散, 而且在希腊和以色列两个国家先后出现过暴发流行^[2]。2005 年和 2011 年在美国先后发生了碳青霉烯类抗菌药物耐药的肺炎克雷伯菌流行^[3-4]。目前, 阿根廷、英国、巴西、挪威、瑞典、美国、法国、哥伦比亚、以色列、希腊、加拿大、波兰和意大利等国家已经报道发现了产 KPC 酶的细菌^[5]。我国首次报道产 KPC 酶细菌是 2007 年由浙江大学 Wei 等^[6]完成, 报道了浙江地区出现了 KPC-2 亚型, 且该菌株同样属于肺炎克雷伯菌。

1.3 KPC 型碳青霉烯酶在国内的流行趋势 我国 2010 年 CHINET 耐药监测数据表明肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类的耐药率为 10%, 由此可见 KPC 酶介导的耐药将成为肺炎克雷伯菌耐药的重要机制之一^[7]。2010 年全国细菌耐药监测网对我国 10 个省市 14 家医院的监测结果显示, 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌对亚胺培南的耐药率分别为 1.6% 和 8.8%, 对美罗培南的耐药率分别为 1.4% 和 8.9%^[8]。Jones 等^[9]报道我国 12 家大型医疗机构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率为 2.1%~4.3%, 与抗碳青霉烯类肠杆菌属 (CRE) 比较, 对碳青霉烯类抗菌药物耐药的铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌检出率更高, 且多重耐药现象更严重。Castanheira 等^[10]报道 2009~2011 年 14 个欧洲及地中海国家 25.6% 的铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物不敏感。韩国的一项调查结果显示, 1997~2009 年对亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌的分离率从 17% 上升到 26%, 鲍曼不动杆菌的耐药率则从 1% 上升至 51%^[11]。有文献报道 2003~2007 年 4 年间英国碳青霉烯类抗菌药物耐药鲍曼不动杆菌从 7% 上升至 24%^[12]。而 2007 年的另一项国际监测数据也显示欧洲碳青霉烯类抗菌药物耐药鲍曼不动杆菌的分离率为 22% 左右, 亚洲某些国家的分离率高达 50%^[13]。

1.4 近期国内病例报导 南京医科大学第二附属医院胡慧敏等^[14]在 756 株肺炎克雷伯菌中, 检出耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌 41 株, 检出 36 株 KPC 酶阳性菌株, 阳性率 87.8%。PCR 扩增检出 KPC 酶阳性菌株 39 株。张芳芳等^[15]收集对亚胺培南或美罗培南药敏纸片抑菌圈直径小于或等于 22 mm 的肠杆菌科细菌 CRE 共 114 株。研究者采用 PCR 方法扩增发现的碳青霉烯酶基因 (blaVIM、blaDNM、blaKPC、blaOXA-48) 并对 PCR 扩增产物进行测序; 所有菌株均进行了质粒接合试验; 114 株 CRE 以肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌和肠杆菌属细菌为主, 其中 98 株产碳青霉烯酶, 以 KPC-2 酶为主要类型 (78/98)、其次为 IMP-4 酶 (15/98), IMP-8 酶 (2/98), 1 株肺炎克雷伯菌同时携带有 blaKPC-2 和 blaIMP-4 基因, 还发现 4 株产 NDM-1 酶的菌株, 未见 OXA-48 酶及 VIM 酶阳性菌株。21 株 (21.4%, 21/98) CRE 菌株转移接合试验成功。PFGE 结果显示 49 株 blaKPC 阳性肺炎克雷伯菌共分为 12 个型, 其中 34 株属于同一谱型 (A)。本次分离的肠杆菌科细菌所产碳青霉烯酶的基因型以 blaKPC-2 为主, 其次为 blaIMP-

4, 并发现 4 株 blaNDM-1 阳性 CRE 菌株, 产 KPC-2 酶的肺炎克雷伯菌在外科 ICU、呼吸科及胸外科等科室间存在克隆株的流行传播, 应采取及时有效的防控措施。于亲德等^[16]分离碳青霉烯类耐药型肺炎克雷伯菌 14 株, 这些耐药菌株对常用碳青霉烯类抗菌药物亚胺培南和美罗培南不敏感; 对常见头孢类抗菌药物头孢唑酮、头孢西丁、头孢他啶和头孢吡肟均呈高度耐药; 对氨基糖苷类抗菌药物阿米卡星不稳定; 对喹诺酮类药物环丙沙星呈中度耐药。该组碳青霉烯类耐药型肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶表型检测均为阳性, 基因型属 KPC-2; 脉冲电泳分型显示 A 克隆 2 株、B 克隆 9 株、C 克隆 3 株, 多位点序列分型显示 ST11 9 株、ST15 4 株、ST439 1 株, 分型结果基本一致。韩艳等^[17]从各种标本的细菌培养共 1 106 份中筛选出对碳青霉烯类药物不敏感的肺炎克雷伯菌株 38 株, 对这 38 株菌进行改良 Hodge 试验, 使用 PCR 方法对 38 株菌进行 blaKPC-2 基因扩增并测序明确基因型。结果肺炎克雷伯菌 ESBLs 检出率 42.9%, 其对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率小于 5.0%, 对氨基糖苷类及含酶抑制剂类抗菌药物的耐药率相对较低。38 株菌有 36 株菌改良试验阳性, 38 株菌有 31 株扩增出 KPC-2 基因, 发现 2012 年肺炎克雷伯菌 ESBLs 检出率较往年下降, 氨基糖苷类药物和加酶抑制剂类药物有很好的抗菌活性, KPC-2 基因是引起该地区肺炎克雷伯菌多重耐药的主要原因。孙红等^[18]使用改良的 Hodge 实验 (MHT) 初筛产 KPC 的肺炎克雷伯菌, PCR 和测序鉴定耐药肺炎克雷伯菌是否带有 KPC 基因并通过 GenBank 的比对确定 KPC 基因型。用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 技术对 KPC 阳性菌株进行同源性分析。结果, 13 株对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌中有 10 株 MHT 结果为阳性, 阳性率为 76.92%, 其中有 2 株细菌为 KPC 基因阳性, 阳性率为 15.38%, 通过 GenBank 比对, 此 KPC 基因为 2 型。PFGE 结果显示这 2 株细菌来源于同一克隆。赵树龙等^[19]研究表明产 KPC 铜绿假单胞菌的出现给临床抗感染治疗带来严峻挑战。

2 KPC 型碳青霉烯酶的传播机制

KPC 酶由质粒编码介导在细菌间互相传播。目前应引起大家关注的是, 一个携带有 blaKPC-2 基因的肺炎克雷伯菌克隆 (ST258) 表达基因已经在世界各地被大范围识别^[20]。但是, 有研究表明, 一个给定的遗传元件 (转座子 Tn4401) 总是与 blaKPC 基因相结合^[20]。转座子来自不同地区和不同的序列类型的肠杆菌科细菌和铜绿假单胞菌是, 其性质为一个 TN3 样转座子。位点不同、大小不同以及不相容性的质粒上可分别插入 Tn4401^[21]。由于转座子的存在, blaKPC-2 基因能够极其便利地在质粒间传递, 同时尚可在同种或不同种菌株间传播。Tn4401 存在 2 个亚型, 分别是 Tn4401b 介导 70.6 kb 的质粒, Tn4401a 介导 24 kb 和 120 kb 的 2 个质粒。此外, Tn4401 可以创建 1 个 5 bp 的重复序列, 但是其无任何目的位点的特异性。

3 KPC 型碳青霉烯酶的耐药机制

KPC 酶属于 A 类丝氨酸酶, 在 BUSh 分类中的为 2f 亚组^[22]。基因位于质粒上, 由于 KPC 酶有很多种水解活性, 这引起了对包括碳青霉烯类抗菌药物在内的广泛耐药性, 但可以被他唑巴坦、克拉维酸等酶抑制剂部分抑制, 然而其耐药性不会被乙二胺四乙酸 (EDTA) 抑制。因为肺炎克雷伯菌其产生 KPC 酶, 致使其对 3 种或 3 种以上不同类别抗菌药物同时耐药。它们仅对多黏菌素和替加环素表达敏感, 呈典型泛耐药特性。产 KPC 酶菌株在世界各地快速扩散与广泛流行的主要是

因为其载体是转移质粒,定位于属于 Tn3 家族的转座子(Tn4401)上^[23],该转座子为新型转座子。由于 KPC 酶的扩散转移与基因环境可能存在一定程度的地域差异,而且产 KPC 酶菌株存在不尽相同的耐药机制,由此带来了广谱耐药的现象。这种由于基因介导的多重耐药将来可能会是一种主要的耐药机制。同时国内学者尚有不同的观点,梁权辉等^[24]研究表明:在 47 株可疑产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中对头孢菌素类、青霉素类、喹诺酮类抗菌药物的耐药率竟达 80% 以上,对美罗培南、亚胺培南、丁胺卡那霉素耐药率则为 35% 以下;耐亚胺培南菌株对头孢美唑、头孢替坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、哌拉西林/他唑巴坦、庆大霉素、妥布霉素、美罗培南、厄他培南的耐药率要明显高于敏感菌株,二者差异具有统计学意义;改良 Hodge 试验阳性 6 株,检出碳青霉烯酶 KPC 基因 4 株,符合率 66.67%,均是 KPC-2 型;膜孔蛋白 OpmK36、OpmK35 基因缺失率分别为 65.96%、38.30%;转座子 tnpA、tnpU 检出率则分别是 4.25% 和 38.30%。由此证明了产碳青霉烯酶不一定是菌株耐碳青霉烯类药物的主要原因,可能还存在其他耐药机制。谢小芳等^[25]采用改良 Hodge 试验、亚胺培南-EDTA 纸片协同试验和 AmpC 酶三维试验检测 29 株耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌的产酶情况;PCR 法检测 KPC-2 及 NDM-1 两种碳青霉烯酶耐药基因情况。实验结果为 29 株分离菌中 26 株菌改良 Hodge 试验阳性,7 株亚胺培南-EDTA 纸片协同试验阳性,7 株 AmpC 酶三维试验阳性,16 株携带 KPC-2 型碳青霉烯酶耐药基因,占 55.17%,未扩增出 NDM-1 碳青霉烯酶耐药基因,由此证明了产碳青霉烯酶主要是耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌的耐药机制。有报道证明肺炎克雷伯菌携带 KPC-2 型 β -内酰胺酶基因和存在 *gyrA* 基因 QRDR 区突变^[26],其可能为碳青霉烯类与喹诺酮类药物的主要耐药机制,肺炎克雷伯菌药敏表型与耐药基因型相同则表明其疑为医院感染。国内尚有学者的研究表明,blaKPC-2 基因的流行克隆均为 ST11 型^[27]。其细菌亚胺培南耐药性全部为可接合性质粒介导。还同时介导和转移了编码 TEM 型、CTX-M 型或 DHA 型的 β -内酰胺酶基因 Tn4401-Tn3 复合转座子或者是其变体 2 介导了 blaKPC-2 基因的转移。临床上肺炎克雷伯菌亚胺培南耐药的主要原因是产 KPC-2 酶菌株的克隆播散,同时可接合质粒造成的耐药基因快速水平转移也是很重要的因素。

4 KPC 型碳青霉烯酶的预防与治疗

季丽杭等^[28]回顾性分析医院产 KPC 型碳青霉烯酶细菌感染的 61 例患者临床资料,通过对检测出产 KPC 型碳青霉烯酶的科室和月份分布对比其他感染 KPC 酶细菌患者的接触史、检测出 KPC 酶细菌之前 1 个月内患者抗菌药物的使用等进行综合分析。认为入住神经外科、ICU 和与感染产 KPC 酶细菌的患者入住同一病区及 7~12 月入住月份是产 KPC 酶细菌感染的危险因素,应早期隔离、检测、控制,及时上报建立健全一套完整地感染防控机制,加强手卫生等措施,防止 KPC 碳青霉烯酶微生物流行。国内有报道表明,碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)发生率 2009 年为 0.0%,2013 年则上升到 4.3%^[29]。CRKP 对加替沙星耐药率最低占 33.3%,对氨苄西林、头孢唑啉、环丙沙星、阿莫西林/棒酸、替卡西林/棒酸的耐药率竟高达 100.0%;头孢类除头孢唑肟、头孢哌酮/舒巴坦耐药率在 50.0% 以下,其余的均在 50.0%~100.0%,美罗培南,亚胺培南耐药率高达 80.0% 以上。CRKP 对常用抗菌药物有着

严重的耐药趋势,对感染严重,病情危急的患者不能仅凭经验用药,应依据药敏试验选择对应选择相应的抗菌药物。刘静等^[30]研究证明 KPC 酶基因的出现是由于碳青霉烯类抗菌药物广泛应用引起了耐药基因发生了突变,携带 KPC 酶的质粒存在不同种细菌种属之间进行转移的进一步增加了转移的可能性,面临以上情形,应在临床上加强监控,防止产碳青霉烯酶菌株在院内暴发和流行。慕心力^[31]收集 8 例碳青霉烯类抗菌药物耐药肺炎克雷伯菌感染的病例,共分离到 16 株碳青霉烯类抗菌药物耐药肺炎克雷伯菌,测定 16 株细菌对包括碳青霉烯类抗菌药物在内大多数抗菌药物耐药,这些菌株仅对复方磺胺甲噁唑敏感。产 KPC 酶肺炎克雷伯菌感染的高危因素主要有高龄,合并基础疾病,接受侵入性操作或手术,入住过重症监护室监护治疗,接受过多种抗菌药物治疗等,证明了目前产 KPC-2 酶细菌引起的感染治疗方法很有限,预后不佳。郑海岚等^[32]研究发现阿米卡星、磷霉素对 KPC 型碳青霉烯酶耐药率都较低。然而阿米卡星联合磷霉素治疗产 KPC 酶细菌感染的临床疗效以及细菌清除率可高达 71.4%,但是无论单用阿米卡星或是单用磷霉素效果均较差,即便是延长了使用时间疗效也不好。Gomez 等^[33]则建议使用亚胺培南和多黏菌素联合治疗,认为这样可以有效避免单一治疗带来的耐药情况。尚有一些学者的实验证明,多黏菌素与替加环素的联合治疗可以有效防止其中任何一个抗菌药物耐药性的出现。随着产 KPC 型酶的细菌在世界各地的广泛流行,临床医生必将进一步依赖多黏菌素和替加环素的使用,一部分业内人士认为进一步提高碳青霉烯类抗菌药物的剂量在临床上是有效的,虽然一直未有确切的证据。磷霉素作为临床上常用的一种抗菌药物,其抑菌机制主要为:通过抑制细菌肽聚糖的合成从而对革兰阴性或阳性菌起作用,进而可以替代黏菌素或替加环素治疗产 KPC 酶的细菌。但是存在着一个重大缺陷:即单独使用极易产生耐药现象。但是如果与黏菌素联合用药,可使治愈率提高至 67%^[34-35]。Novexel 公司已开发出一种新药-NXL104,该药物已进入 II 期临床试验。NXL104 是一种新型的非 β -内酰胺类抑制剂,是一种广谱的抑制剂,但是并没有直接杀菌作用,其能使 A、C 类酶不能水解 β -内酰胺类抗菌药物,其中包括 ESBLs、KPC 和 AmpC 酶。临床上,头孢他啶/NXL104 合剂已经运用^[36]。部分学者对于氨基糖苷类药物的应用做了有益的尝试^[36-40]。在一共 30 个接受了氨基糖苷治疗的 KPC 病例中,有 20%(6/30)采用作单一的疗法,运用单一的药物治疗。80%(24/30)采用复合治疗,但是单一疗法与复合疗法的治疗成功率对比没有明显不同。而且接受氨基糖苷单一疗法的 6 例患者均获成功。其中接受复合疗法的患者中,最常见的组合是阿米卡星加多黏菌素 E,其次为氨基糖苷加碳青霉烯,氨基糖苷加替加环素,氨基糖苷加氟喹诺酮,阿米卡星加四环素,庆大霉素加氨基曲。虽然在复合治疗中多黏菌素和氨基糖苷在体外会发生拮抗现象,但是 6 名基于多黏菌素加氨基糖苷治疗的患者均获成功,所有基于氨基糖苷的治疗失败都是因为患者的菌血症。国外学者等研发了一种新的 β -内酰胺酶抑制剂 MK-7655 与碳青霉烯类抗菌药物联合作用,临床实验证明两者联合应用可以抑制 β -内酰胺酶的产生,从而有望进一步恢复碳青霉烯类抗菌药物的活性,这不失为为临床解决微生物耐药问题提供了一种新的思路^[41]。

5 小 结

产 KPC 酶在全世界范围内快速暴发流行令人担忧,随着

多重耐药产 KPC 酶细菌的出现,给临床抗感染治疗提出了更严峻的挑战,由 KPC 生成的细菌引起的感染意味着高病死率和经常性的治疗失败,现如今临床治疗数据有限,新型的抗菌药物没有开发出来,适合 KPC 感染治疗方案也没有明确的界定。单一疗法比复合疗法的失败率高,在控制 KPC 产生的细菌造成的感染,尤其是重症感染时多黏菌素和氨基糖苷类单独使用时比复合使用治疗失败率更高,任务任重而道远。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Maltezos HC, Giakkoupi P, Maragos A, et al. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece)[J]. *J Infect*, 2009, 58(3): 213-219.
- [3] Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium[J]. *Arch Intern Med*, 2005, 165(12): 1430-1435.
- [4] Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(2): 593-599.
- [5] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(4): 228-236.
- [6] 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.
- [7] 赵倩, 袁喆. 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶的研究进展及其治疗策略[J]. *西部医学*, 2013, 25(7): 1115-1117.
- [8] 朱德妹, 汪复, 胡付品, 等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2011, 11(5): 321-329.
- [9] Jones RN, Castanheira M, Hu B, et al. Update of contemporary antimicrobial resistance rates across China: reference testing results for 12 medical centers (2011)[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 77(3): 258-266.
- [10] Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, et al. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(7): 1804-1814.
- [11] Lee K, Yong D, Jeong SH, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens[J]. *Yonsei Med J*, 2011, 52(6): 879-891.
- [12] Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(2): 233-238.
- [13] Abdalhamid B, Hassan H, Itbaileh A, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a tertiary care hospital in Saudi Arabia[J]. *New Microbiol*, 2014, 37(1): 65-73.
- [14] 胡慧敏, 王欣慧. 产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的检测与耐药状况分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, (22): 3119-3120.
- [15] 张芳芳, 王晓丽, 瞿洪平, 等. 肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的主要类型和流行病学分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2014, (6): 521-

- 525.
- [16] 于亲德, 徐平, 于勇文, 等. 肺炎克雷伯菌介导碳青霉烯类耐药的基因检测研究[J]. *海南医学*, 2014, 25(17): 2499-2502.
- [17] 韩艳, 陈丽萍, 李智伟. 肺炎克雷伯菌耐药分布及 KPC-2 耐药基因研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(3): 435-440.
- [18] 孙红, 郭普, 钟政荣, 等. 对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌 KPC 基因型分析[J]. *蚌埠医学院学报*, 2012, 37(10): 1232-1234.
- [19] 赵树龙, 刘仁坤, 梁慧, 等. 产 KPC 铜绿假单胞菌的耐药性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 35(10): 1235-1237.
- [20] Cuzon G, Naas T, Truong H, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene[J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(9): 1349-1356.
- [21] Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(11): 5370-5373.
- [22] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(3): 969-976.
- [23] Naas T, Cuzon G, Villegas MV, et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(4): 1257-1263.
- [24] 梁权辉, 徐健魁. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌耐药机制研究[J]. *国际检验医学杂志*[J] 2014, 35(2): 165-169.
- [25] 谢小芳, 沈海英, 周惠琴, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 KPC-2 与 NDM-1 基因的研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(11): 2601-2603.
- [26] 郑红波, 黄东标, 王祥德. 耐碳青霉烯类与喹诺酮类肺炎克雷伯菌的耐药机制研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(19): 4687-4689.
- [27] 王步补, 阮战伟, 项小婵. 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌分子流行病学及耐药传播机制研究[J]. *全科医学临床与教育*, 2014, 12(1): 18-22.
- [28] 季丽杭, 丁卉, 朱延焱, 等. 产 KPC 型碳青霉烯酶细菌感染的相关因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(20): 4952-4954.
- [29] 万琼, 陈芸. 耐碳青霉烯类抗菌药物的肺炎克雷伯菌的耐药状况分析[J]. *实用临床医学*, 2014, 15(6): 20-22.
- [30] 刘静, 邵冬华. 产 KPC 酶肺炎克雷伯菌检测及耐药性研究[J]. *临床误诊误治*, 2012, 25(10): 81-84.
- [31] 慕心力. 产 KPC 酶肺炎克雷伯菌临床治疗分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [32] 郑海岚, 华俊彦, 朱雅艳, 等. 阿米卡星与磷霉素治疗产 KPC 酶细菌的疗效观察[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(12): 2923-2942.
- [33] Gomez E, Sanchez M, Gul Z, et al. Polymyxin combination therapy and the use of serum bactericidal titers in the management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a report of 3 cases[J]. *Case Rep Med*, 2011, 2011: 659769.
- [34] Endimiani A, Patel G, Hujer KM, et al. In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1): 526-529.
- [35] Corvec S, Furustrand T, U, Betrisey B, et al. Activities of fosfomycin, tigecycline, colistin, and gentamicin against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a foreign-body infection model[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(3): 1421-1427.
- [36] Louie A, Castanheira M, Liu W, et al. Pharmacodynamics of beta-lac-

tamase inhibition by NX104 in combination with ceftaroline; examining organisms with multiple types of β -lactamases[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(1): 258-270.

[37] Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011[J]. *Euro Surveill*, 2011, 16(33): 19944.

[38] Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, et al. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae clinical isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(8): 2804-2809.

[39] Leão RS, Carvalho-Assef AP, Correal JC, et al. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter-related infection[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(3): 380-382.

[40] Richter SN, Frasson I, Bergo C, et al. Transfer of KPC-2 carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in a patient: first case in Europe[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(5): 2040-2042.

[41] Hirsch EB, Ledesma KR, Chang KT, et al. In vitro activity of MK-7655, a novel β -lactamase inhibitor, in combination with imipenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(7): 3753-3757.

(收稿日期: 2015-04-14)

• 综 述 •

循环肿瘤细胞的分子检测及临床应用的研究进展

韩丹丹, 魏 敏, 邓 芳[△]综述, 李 明 审核
(安徽省肿瘤医院, 安徽合肥 230000)

关键词: 肿瘤; 循环肿瘤细胞; 分子诊断; 个体化治疗
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 20. 043 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2015)20-3024-04

癌症是目前危害人类健康的首要疾病, 分子检测在癌症的诊断和治疗中发挥的作用日益增大, 基因重排、染色体易位和融合基因形成、原癌基因及抑癌基因等分子检测对于疾病的诊断、疗效监测、预后判断等具有重要的意义。并且在个体化治疗的时代, 基因检测成为决定日常临床治疗的一部分^[1-3]。

肿瘤细胞经过上皮间质转变, 突破细胞外基质进入外周血液循环成为循环肿瘤细胞(CTCs)^[4-5]。鉴于其取材简便, 能反映机体肿瘤情况, 相当于实时活检, 日益得到广泛的关注。从 1869 年 Ashworth 最早在转移性癌症患者血液中观测到 CTCs^[6], 随后在 90 年代中期开始探索捕获、分析 CTCs 的方法并进行大量临床试验^[7-9], 2004~2008 年美国 FDA 相继批准 CellSearch 技术用于转移性乳腺癌、结直肠癌和前列腺癌的临床诊断^[10-12], 2007 年 CTCs 被 ASCO 推荐为肿瘤标志物, CTCs 的应用已经从细胞计数发展到对其分子特性的研究, 其检测可反应肿瘤的生物行为, 可在证实肿瘤的存在、发病过程、评估患者的预后和个体化治疗后改善情况等作出提供相关信息, 以及发现和鉴定新的治疗靶点。本文就近年来 CTCs 富集技术的研究进展进行总结, 并探讨其在肿瘤诊治中应用价值。

1 CTCs 富集技术

CTCs 在外周血的中浓度极为罕见, 每毫升血液中约为 1~10 个。因此对外周血中的 CTCs 进行富集是研究 CTCs 的特性、形态及细胞标志的基础^[13]。目前, CTCs 的富集主要是根据其物理和生物属性原理, 随着纳米材料等新技术的不断进步, CTCs 分离技术层出不穷。

1.1 传统物理技术 在应用物理原理分离方面, 传统的分离法是基于 CTCs 的密度梯度进行离心分离, 但该方法缺乏特异性, 易导致目的肿瘤细胞丢失。Vona 等^[14]提出的基于肿瘤细胞与正常细胞的大小差异来分离肿瘤细胞的分离方法

(ISET), 但 ISET 只能分离直径大于 8 μ m 的肿瘤细胞, 使其分离的灵敏性也受到限制。近年来发展的微流控制技术, 利用细胞的大小和变形能力特征来捕获 CTCs, 制作半径介于 CTCs 和血细胞的阵列微流控制芯片, 使得 CTCs 向一侧汇聚而血细胞保持原有路径流过阵列, 从而实现肿瘤细胞和正常细胞的分选和富集。这种通过物理方法分离的肿瘤细胞形态和表面的各种抗原或分子标记均保存完整, 不影响细胞的特性, 为后续的检测提供了良好的条件^[15]。随着纳米技术的发展, 纳米技术应用到肿瘤的分子诊断有很大的前景, 纳米材料可使磁珠达纳米(10~100 nm)级, 增大了比表面积从而增加与待测细胞接触的概率, 同时可降低对细胞造成的机械性压力, 大大提高 CTCs 的富集效率, 被广泛用于 CTCs 的富集和检测^[16]。2013 年, *Nature* 杂志将 CTCs 纳米检测列为最具创新性和转化潜力的肿瘤诊断新方法^[17]。

1.2 传统免疫技术 免疫方法分为阳性选择法和阴性选择法, 阳性选择法研究较多, 其根据 CTCs 表面免疫分子表征进行选择捕获。常用的分子标志有: EpCAM 和 CK 等。目前公认的金标准 Cell Search TM CTCs 检测系统即依赖于免疫磁珠吸附肿瘤细胞表达 EpCAM(上皮细胞黏附分子)抗原, 利用抗体包被的磁珠来捕获 EpCAM 阳性的细胞, 然后成像并计数^[10]。2010 年, Stott 开发出一种“人字形 CTCs 芯片”, 利用 EpCAM 抗体来捕获 CTCs, 这种设计能够比较快速地处理血液, 每小时达 2 mL, 且具有良好的灵敏度和选择性^[18]。Armstrong 等^[19]的研究表明在乳腺癌和前列腺癌患者的 CTCs 细胞中均可检测到同时表达上皮标志及间皮标志以及干细胞标志的 CTCs 细胞, 可用此装置进行选择富集。但是 Gorges 等^[20]研究表明在正常细胞样和基底样型乳腺癌细胞中很多不表达 EpCAM, 因此仅通过 EpCAM 来捕获 CTCs 细胞则可能会丢失部分 CTCs。此时可利用 CTCs 细胞 CD45 表达缺如的特