

• 临床检验研究论著 •

## 耐碳青霉烯类药的革兰阴性菌的临床研究\*

杨虹<sup>1</sup>, 李迎慧<sup>2</sup>, 白丽霞<sup>1</sup>

(1. 北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518036; 2. 深圳市疾病预防控制中心微生物检验科, 广东深圳 518055)

**摘要:**目的 研究 10 株耐碳青霉烯类药的革兰阴性菌的耐药情况。方法 采用微量肉汤稀释法或纸片扩散法检测碳青霉烯类等抗菌药物的敏感性;采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析来自同一患者不同部位的鲍氏不动杆菌的同源性;采用聚合酶链反应(PCR)检测 I 类整合酶、整合子和 NDM-1 基因,阳性产物进行 DNA 测序;分析感染患者血清降钙素原的变化。结果 6 株革兰阴性菌对亚胺培南耐药,9 株对美罗培南耐药,5 株同时对亚胺培南和美罗培南耐药。从患者 1 的脑脊液、引流管和脓液标本分离的鲍氏不动杆菌,PFGE 结果显示有 1~2 个条带的差异;PCR 检测显示 I 类整合酶均呈阳性,而整合子和 NDM-1 均呈阴性。从患者 2 血液和痰液标本中分离的鲍氏不动杆菌,PFGE 结果完全一致,当该患者出现鲍氏不动杆菌的血液感染后,其血清降钙素原水平升至 15.34 ng/mL,患者随后很快死亡。结论 耐碳青霉烯类药的鲍氏不动杆菌在呼吸道定植要引起高度重视,其随后的血液感染预后严重。

**关键词:**鲍氏不动杆菌;微生物敏感性试验;碳青霉烯类;耐药;降钙素原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1083-02

## Clinical analysis of carbapenems-resistant Gram-negative bacteria\*

Yang Hong<sup>1</sup>, Li Yinghui<sup>2</sup>, Bai Lixia<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518036, China; 2. Department of Microbiological Test, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

**Abstract:** **Objective** To study the drug-resistance of 10 strains of carbapenems-resistant Gram-negative bacteria. **Methods** Broth microdilution or disk diffusion test were adopted to detect the sensitivity of carbapenems and other antibacterial drugs. Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) was used to analyze the homology of *Acinetobacter baumannii* collected from different parts of same patients. Polymerase chain reaction(PCR) was employed to detect class I integrase, integron and NDM-1 gene, and their positive products were conducted DNA sequencing. Changes of serum procalcitonin of infected patients were analyzed. **Results** Six strains of Gram-negative bacteria were found to be resistant to imipenem, nine resistant to meropenem, five resistant to both imipenem and meropenem. When detecting *Acinetobacter baumannii* isolated from specimens of cerebrospinal fluid, drainage tube and pus of patient 1, differences were found in 1 to 2 bands by PFGE, and PCR detection revealed that class I integrase from different specimens were all positive, while integron and NDM-1 gene negative. When studying *Acinetobacter baumannii* isolated from specimens of blood and sputum of patient 2, PFGE results showed no difference. After *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection occurred in the patient 2, the serum level of procalcitonin rised to 15.34 ng/mL and the patient died soon. **Conclusion** Carbapenems-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization in respiratory tract should arouse high attention due to the serious prognosis of patients with its further blood infection.

**Key words:** acinetobacter baumannii; microbial sensitivity tests; carbapenems; drug resistance; procalcitonin

鲍氏不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌是目前临床分离的最常见的革兰阴性菌,也是引起医院感染的主要条件致病菌,尤其是鲍氏不动杆菌,可造成全身多部位感染,近年来它已成为引起医院感染的主要细菌,也是泛耐药发生的最常见细菌<sup>[1]</sup>。由于抗菌药物在临床的大量使用,这 4 种细菌的耐药性也越来越严重,甚至出现了“超级细菌”——I 型新德里金属 β 内酰胺酶(New Delhi metallo-β-lactamase I, NDM-1)<sup>[2]</sup>。细菌耐药性通常由获得耐药基因引起,整合子是含有位点特异重组系统和基因盒的遗传结构<sup>[3]</sup>,整合子根据整合酶的不同而进行分类,其中 I 类整合子最常见。本研究对 10 株耐碳青霉烯类药的革兰阴性菌的耐药情况进行分析,以探讨临床治疗耐碳青霉烯类药的革兰阴性菌所致感染的策略。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集 2011 年 5 月至 2012 年 12 月临床分离的多重耐药的常见革兰阴性菌,选取具有代表意义的 10 株耐碳青霉烯类等抗菌药物的革兰阴性菌(5 株鲍氏不动杆菌、3 株铜绿假单胞菌、1 株肺炎克雷伯菌和 1 株大肠埃希菌)进行实验,其中有 3 株鲍氏不动杆菌分别来自患者 1 的脑脊液、引流管和脓液;2 株鲍氏不动杆菌分别来自患者 2 的血液和痰液;3 株铜绿假单胞菌分别来自 3 位不同患者的痰液;肺炎克雷伯菌来自患者的分泌物;大肠埃希菌来自患者的腹腔引流液。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853,二者为标准菌株。

**1.2 试剂与仪器** Taq DNA 聚合酶及聚合酶链反应(poly-

\* 基金项目:深圳市科技计划资助项目(201102017)。 作者简介:杨虹(1974~),女,硕士,副主任技师,主要从事临床微生物检验工作及细菌耐药研究。

merase chain reaction, PCR) 的相关试剂购自美国 Fermentas 公司;引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成,上海立菲生物技术有限公司测序。蛋白酶 K、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 购自美国 Sigma 公司, *Apa* I 限制性内切酶为美国 New England Biolabs 公司产品。血琼脂平皿和麦康凯琼脂平皿为广州市迪景微生物科技有限公司产品;mini-VIDAS 全自动免疫荧光分析仪、血培养瓶购自法国生物梅里埃中国有限公司;Microscan Walkaway40 型全自动细菌鉴定及药敏分析系统、阴性菌复合板为美国德灵公司产品;C1000™ Thermal Cycler PCR 仪、PowerPac Basic 型电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像及分析系统为美国 BIO-RAD 公司产品。

**1.3 微生物敏感性试验** 采用微量肉汤稀释法或纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)检测碳青霉烯类抗菌药物的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)或抑菌环直径,具体操作步骤参照仪器说明。药敏结果按美国临床和实验室标准化协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)标准进行判定。

**1.4 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)实验** 对 5 株鲍氏不动杆菌进行 PFGE 实验,该步骤由深圳市疾病预防控制中心微生物检验科完成。

**1.5 I 类整合酶、整合子的 PCR 检测** 引物序列和反应条件参照文献[4]。整合酶的反应条件:94 ℃ 预变性 4 min, 94 ℃ 变性 1 min, 55 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min 后取扩增产物电泳检测。整合子的改良 PCR 反应参数:94 ℃ 预变性 4 min, 98 ℃ 变性 10 s, 68 ℃ 退火、延伸 3 min, 共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 20 min 后取扩增产物电泳检测。

**1.6 NDM-1 基因及降钙素原的检测** NDM-1 基因的引物序列、反应体系以及反应条件均参照中国疾病预防控制中心文件——中疾控发[2010]472 文件。降钙素原由 mini-VIDAS 全自动免疫荧光分析仪及其配套试剂进行检测。

**2 结果**

**2.1 微生物敏感性试验的检测结果** 在选取的 10 株革兰阴性菌中,有 6 株对亚胺培南耐药,9 株对美罗培南耐药,5 株同时对亚胺培南和美罗培南耐药。肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌很少耐碳青霉烯类药,在 1.5 年的时间内分别收集到 1 株细菌。5 株鲍氏不动杆菌除了对替加环素不耐药外,对其他抗菌药物均不敏感。

**2.2 PFGE 检测结果** 从患者 1 的脑脊液、引流管和脓液标本分离的鲍氏不动杆菌,PFGE 结果显示有 1~2 个条带的差异;从患者 2 血液和痰液标本分离的鲍氏不动杆菌,PFGE 结果完全一致,见图 1。

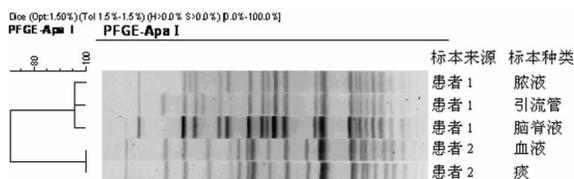
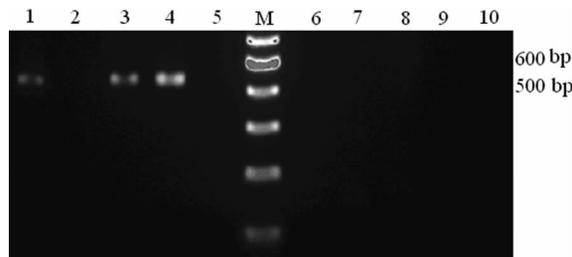


图 1 5 株鲍氏不动杆菌的 PFGE 电泳图

**2.3 PCR 检测结果** 从患者 1 的脑脊液、引流管和脓液标本分离的鲍氏不动杆菌,PCR 检测显示 I 类整合酶均呈阳性;DNA 测序获得的基因序列与 GenBank 的“JQ326989.1”序列比对,最大相似度达 100%。整合子和 NDM-1 的 PCR 结果均呈阴性。I 类整合酶 PCR 产物的电泳图见图 2。

**2.4 血清降钙素原的检测情况** 在患者 2 的痰液标本检出泛耐药的鲍氏不动杆菌期间,共进行了 3 次血清降钙素原检测,

其浓度分别为 0.12、0.09、<0.05 ng/mL;但该患者出现鲍氏不动杆菌的血液感染后,其降钙素原升至 15.34 ng/mL,患者随后很快死亡。患者 1 接受颅脑手术后,出现鲍氏不动杆菌的颅内感染,其血清降钙素原浓度一直处于较低水平(0.07~1.88 ng/mL),变化范围小,有效抗感染后,血清降钙素原降至 0.06 ng/mL。



1:导管(患者 1);2:痰液(患者 4);3:脓液(患者 1);4:脑脊液(患者 1);5:痰液(患者 3);M:标准带;6:血液(患者 2);7:痰液(患者 2);8:痰液(患者 8);9:分泌物(患者 7);10:腹腔引流液(患者 6)。

图 2 I 类整合酶 PCR 产物的电泳图

**3 讨论**

鲍氏不动杆菌广泛存在于自然界、医院环境及人体皮肤,常引起慢性病患者、老年人、接受侵入性治疗者、长期使用广谱抗菌药物者及免疫力低下者的感染[5];住院患者鲍氏不动杆菌携带率可高达 75%,可从痰液、尿液、大便和阴道分泌物中分离出该菌[6]。肺炎克雷伯菌也是引起医院感染的常见革兰阴性杆菌[7]。铜绿假单胞菌耐药性强,存在有多种天然和获得性耐药机制,且具有极强的环境适应能力,是医院感染常见的条件致病菌[8],可导致呼吸系统、泌尿系统和血液感染等[9-10]。大肠埃希菌也是引起社区和医院感染的重要细菌,国内已有大量多重耐药大肠埃希菌耐药相关基因的报道,最近还发表了相关毒力基因的研究报道[11]。因此,对这 4 种临床常见的革兰阴性杆菌的耐药特征及其临床情况进行分析是非常必要的。本研究也发现了对环境适应能力强的鲍氏不动杆菌和铜绿假单胞菌比大肠埃希菌更易耐碳青霉烯类药,在 1.5 年的时间内,耐碳青霉烯类药的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌分别仅收集到 1 株细菌,这与最近国内的研究报道一致[12-13],说明鲍氏不动杆菌和铜绿假单胞菌是医院感染控制的主要对象。

本研究从患者 1 的脑脊液、引流管和脓液标本中分离到鲍氏不动杆菌,PFGE 检测显示有 1~2 个条带的差异,且均检测到 I 类整合酶。研究表明在整合子介导的细菌耐药机制中, I 类整合子具有非常重要的作用,国内文献报道,多重耐药鲍氏不动杆菌 I 类整合子酶基因的阳性率达到了 58.1%[14]。从患者 2 血液和痰液标本中分离的鲍氏不动杆菌,PFGE 的检测结果显示完全一致。可见泛耐药的鲍氏不动杆菌一旦出现在患者的某一部位,易引起多个部位的感染,这给患者的护理工作提出了更高的要求,因此,感染控制工作不仅要减少泛耐药菌在患者之间的传播,还要尽可能减少泛耐药菌在同一个体多个部位的扩散,以降低患者死亡的风险。曾经轰动世界的 NDM-1 超级耐药菌,自 2010 年被发现以来,其相关报道并不多。本研究的 10 株耐碳青霉烯类药的 4 种细菌,也没有检出 NDM-1 和整合子,提示它们不是耐碳青霉烯类药的主要机制。

血清降钙素原是一种无激素活性的降钙素前体,正常生理状态下只由甲状腺 C 细胞合成,在血液中含有量很少[15],当发生全身炎症反应和败血症时,降钙素原可由甲状腺以外的组织细胞大量产生,如肝脏中的巨噬细胞、单核细胞,肺和肠道组织的淋巴细胞和神经内分泌细胞。因此,降钙素原常被临床用于判断细菌是定植,还是感染,从而决定患者是否(下转第 1086 页)

鉴定、不规则抗体筛查和交叉配血出现困难,不能及时解决输血问题而延误患者的病情。

通过对疑难交叉配血病例的回顾性分析,笔者认为导致交叉配血困难的问题主要集中在以下 3 个方面:(1)血型鉴定困难,本研究中血型鉴定困难的标本共有 30 例(26.09%),其因为 ABO 亚型、ABO 血型抗原减弱、假凝集、冷凝集素及 IgM 类不规则抗体等,这与文献的报道基本一致<sup>[2-3]</sup>;(2)不规则抗体的干扰,本研究检出不规则抗体 50 例(43.48%);(3)自身抗体的干扰,本研究检出 35 例存在自身抗体。

通过对疑难交叉配血标本的原因分析,根据实验室的具体情况并参考输血技术手册<sup>[4]</sup>和文献<sup>[5-11]</sup>,笔者对疑难配血标本的检测策略进行了探索,并在实际工作中取得了较好的效果。(1)受理:在受理标本的时候,进行三查三对,详细询问和记录患者的输血史、妊娠史、用药史等临床情况及医院的联系电话,以便及时与临床医务人员进行沟通和交流,确保标本的准确。(2)血型检测:对所有送检标本进行 ABO 血型正、反定型,Rh 血型的分型检测及直接抗人球蛋白实验(抗 IgG 和补体 C3 抗体);并在反定型检测中增加 O 细胞和自身细胞的平行检测,初步判断疑难问题产生的原因,观察血型检测中是否有混合外观凝集情况,结合临床资料综合判断患者有无近期输血的情况,以提示下一步检测如何进行。(3)进一步检测:根据第二步检测结果的提示,若血型正、反定型不符且直接抗人球蛋白实验呈阴性,根据 O 细胞和自身细胞的凝集情况,采用输血技术手册<sup>[4]</sup>和文献推荐的方法<sup>[8]</sup>进行血型检测;若血型正、反定型相符,直接抗人球蛋白实验呈阴性而间接抗人球蛋白实验呈阳性,则进行不规则抗体的筛查和鉴定;对直接和间接抗人球蛋白实验均呈阳性的标本,应根据直接抗 IgG 和补体 C3 抗体的结果,选择合适的自身吸收方法<sup>[11]</sup>,在自身抗体吸收后进行不规则抗体的筛查和鉴定;若直接抗 IgG 抗体的凝集强度超过 1 个(+),则同时制备洗脱液进行不规则抗体的鉴定。(4)交叉配血方法的选择:由于各种血清学方法在检出率和特异性方

面各有所长<sup>[4,12]</sup>,因此,应根据导致疑难配血的原因,选择性联合应用盐水法、木瓜蛋白酶法、聚凝胺法和抗人球蛋白法(试管法、微柱凝胶法)等血型血清学技术进行交叉配血,以确保临床输血安全、有效。

### 参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006.
- [2] 苗天红,刘素芳,闫芳,等.114例ABO正反定型不一致原因分析[J].北京医学,2007,29(2):112-113.
- [3] 杨世明,张勇萍,田榆,等.ABO血型正反定型不符与交叉配血不合的原因及其处理方法[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(7):812-813.
- [4] 美国血库协会技术手册委员会.输血技术手册[M].肖星甫,季阳,尚书颂,等,译.北京:人民卫生出版社,1985.
- [5] 兰炯采,陈静娴,武平英,等.推荐疑难配血三步分析法[J].中国输血杂志,2010,23(4):243-244.
- [6] 王志红,陈善华,马红丽,等.探讨疑难配血三步法在实际工作中的应用[J].中国输血杂志,24(3):246-247.
- [7] 闫芳,刘亚庆,刘素芳,等.意外抗体的鉴定在疑难配血中的重要作用[J].北京医学,2011,33(7):587-589.
- [8] 兰炯采,陈静娴,马红丽,等.推荐ABO疑难血型三步分析法[J].中国输血杂志,2010,23(3):165-168.
- [9] 杨世明,张红丽,张勇萍,等.自身免疫性溶血性贫血患者的血清学特性检测分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(8):834-835.
- [10] 向东,刘曦,王健莲,等.红细胞温自身抗体的血清学特点分析及配血对策[J].中国输血杂志,2008,21(12):924-926.
- [11] 兰炯采.加强对自身免疫性溶血性贫血输血前实验的研究[J].中国输血杂志,2012,25(4):295-296.
- [12] 张俊玲,尚锦青,杨波,等.3种配血方法对含Rh抗体血样本配血效果研究[J].中国输血杂志,2008,21(1):12-14.

(收稿日期:2013-01-31)

(上接第 1084 页)

需要进行抗感染治疗。在本研究中,患者 1 的脑脊液和下呼吸道标本均检出鲍氏不动杆菌,但其血清降钙素原的波动范围为 0.07~1.88 ng/mL;患者 2 最初在下呼吸道吸取的痰液标本内检出了鲍氏不动杆菌,血清降钙素原处于低水平,但是后来发生了鲍氏不动杆菌的血液感染,降钙素原从低于 0.05 ng/mL 升至 15.34 ng/mL,这提示血液感染引起的降钙素原变化幅度显著大于其他部位感染。因此,泛耐药的鲍氏不动杆菌在呼吸道定植要引起高度重视,谨防其随后引起血液感染而使临床治疗措手不及。

### 参考文献

- [1] 王辉,孙宏莉,宁永忠,等.不动杆菌属多重耐药及泛耐药的分子机制研究[J].中华医学杂志,2006,86(1):17-22.
- [2] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK; a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9):597-602.
- [3] Rowe-Magnus DA, Mazel D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution[J]. Curr Opin Microbiol, 2001, 4(5):565-569.
- [4] 李超,陈洪亮,陈栋江,等.同时产 arr-3 利福平核糖基化转移酶和 PSE-1 型超广谱 β 内酰胺酶的一株铜绿假单胞菌[J].中华检验医学杂志,2009,32(2):193-195.
- [5] Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an Acinetobacter bau-

- mannii clinical strain[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6):1556-1561.
- [6] Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, et al. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5):1551-1555.
- [7] 余建中,卢建明,夏海,等.重症监护病房两种产超广谱 β 内酰胺酶细菌耐药性动态分析[J].中国实验诊断学,2010,14(9):1428-1430.
- [8] 张祎博,倪语星.铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗菌药机制[J].微生物与感染,2008,10(2):107-110.
- [9] Sun HY, Fujitani S, Quintiliani R, et al. Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa: part II: antimicrobial resistance, pharmacodynamic concepts, and antibiotic therapy[J]. Chest, 2011, 139(5):1172-1185.
- [10] Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa infections[J]. Clin Lab Sci, 2011, 24(1):43-46.
- [11] 汪一萍,陈国忠,鲁勇,等.多重耐药大肠埃希菌毒力基因研究[J].中华临床感染病杂志,2012,5(1):19-23.
- [12] 卓越,苏丹虹,倪语星,等.2010年CHINET克雷伯菌属细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2012,12(3):174-179.
- [13] 张祎博,倪语星,孙景勇,等.2010年中国CHINET铜绿假单胞菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2012,12(3):161-166.
- [14] 侯天文,尹晓琳,李玮,等.多重耐药鲍氏不动杆菌相关耐药基因检测分析[J].中华微生物学与免疫学杂志,2007,27(4):379-383.
- [15] Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin as a marker of bacterial infection[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000, 19(8):679-687.

(收稿日期:2013-01-14)