

• 临床检验研究论著 •

产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的筛查

黄 汉, 郭鹏豪, 陈怡丽, 廖 康[△]

(中山大学第一附属医院检验医学部, 广东广州 510080)

摘要:目的 筛查肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的情况, 了解产碳青霉烯酶的细菌分布情况。方法 收集中山大学附属第一医院 2008 年 5 月至 2010 年 4 月临床分离的 27 株 [厄他培南最低抑菌浓度 (MIC) $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$] 肠杆菌科细菌。用微量肉汤稀释法测定亚胺培南、美罗培南、厄他培南对细菌的 MIC, 改良 Hodge 试验作为表型确证试验。结果 27 株厄他培南耐药菌株中, 包括 15 株阴沟肠杆菌、7 株大肠埃希菌、2 株肺炎克雷伯菌、2 株弗氏柠檬酸杆菌和 1 株产酸克雷伯菌。经改良 Hodge 试验检测出 3 株阳性菌株, 分别为 2 株阴沟肠杆菌和 1 株产酸克雷伯菌。Hodge 试验阳性菌株对美罗培南全部耐药, 对亚胺培南 2 株耐药, 1 株中介。结论 改良 Hodge 试验可以快速筛查肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的情况, 敏感性高、操作简单, 可在临床实验室中常规开展。

关键词:肠杆菌科细菌; 碳青霉烯酶; 改良 Hodge 试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.020

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)08-0985-02

Screening of the carbapenemase in *Enterobacter*Huang Han, Guo Penghao, Chen Yili, Liao Kang[△]

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To screen out the carbapenemase-producing *Enterobacter* in the first affiliated hospital of Sun Yat-Sen university and investigate the clinical distribution in order to select antibiotics correctly according the results. **Methods** 27 *Enterobacter* isolated with ertapenem MIC $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ were randomly collected from May 2008 to April 2010 in the first affiliated hospital of Sun Yat-Sen university. The MIC of imipenem, meropenem and ertapenem were determined by broth dilution assay. Modified Hodge test was used to screen out carbapenemase-producing *Enterobacter* as the phenoypic confirmatory test. **Results** Among 27 ertapenem resistant *Enterobacter*, there were 15 *Enterobacter cloacae* strains, 7 *Escherichia coli* strais, 2 *Klebsiella pneumoniae* strains, 2 *Citrobacter freundii* and 1 *Klebsiella oxytoca* strain. There were 3 modified Hodge test positive bacterial strains including 2 *Enterobacter cloacae*, and 1 *Klebsiella oxytoca*. They were all resistant to meropenem, while 2 of the three modified Hodge test positive bacterial strains were resistant to imipenem, and one was intermediate. **Conclusion** It's convenience to screen out the carbapenemase-producing *Enterobacter* by the modified Hodge test with a high sensitivity. It is suggested that MHT should be widely used in clinical Laboratory.

Key words: *Enterobacter*; carbapenemase; modified Hodge test

随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用, 产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌逐年增多, 此类细菌耐受包括碳青霉烯类抗菌药物在内的所有 β -内酰胺类抗菌药物。获得性碳青霉烯酶的发现, 使得碳青霉烯类抗菌药物在肠杆菌科细菌中的地位受到了威胁。为深入了解临床肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的情况, 对中山大学附属第一医院 2008 年 5 月至 2010 年 4 月分离的厄他培南耐药的肠杆菌科细菌进行筛查。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集中山大学附属第一医院 2008 年 5 月至 2010 年 4 月临床分离的 27 株 [厄他培南最低抑菌浓度 (MIC) $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$] 肠杆菌科菌株, 不包括同一患者同一部位同一时期分离的重复菌株。细菌经法国生物梅里埃公司的 Vitek 2 细菌鉴定系统鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 法国生物梅里埃公司提供的 Vitek 2 细菌鉴定系统, 美国 Corning 公司提供的 96 孔板, 上海跃进医疗器械厂提供的电热恒温培养箱。

1.2.2 抗菌药物 杭州默沙东制药有限公司提供的厄他培南、亚胺培南西司他丁钠; 住友制药苏州有限公司提供的美罗

培南; 英国 Oxoid 公司提供的厄他培南纸片 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.2.3 溶剂 0.01 mmol/L PBS 缓冲液, 以及安徽双鹤药业有限责任公司提供的灭菌注射用水。

1.2.4 培养基 法国生物梅里埃公司提供的 MH 培养基, 广东环凯微生物科技有限公司提供的 LB 肉汤培养基。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 微量肉汤稀释法测定厄他培南、亚胺培南和美罗培南的 MIC 值, 根据 CLSI M100-S22 文件判断药敏试验结果。

1.3.2 表型确证试验 用改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶, 操作方法及结果判断标准参照 CLSI M100-S22 文件。阳性对照: 经基因确定产 KPC-2 的肺炎克雷伯菌; 阴性对照: 大肠埃希菌 ATCC25922。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 27 株菌株中, 包括 15 株阴沟肠杆菌、7 株大肠埃希菌、2 株肺炎克雷伯菌、2 株弗氏柠檬酸杆菌和 1 株产酸克雷伯菌。27 株菌株均对厄他培南耐药。15 株阴沟肠杆菌中对亚胺培南耐药的占 20% (3/15), 对美罗培南耐药的占 46.7% (7/15)。7 株大肠埃希菌中对亚胺培南耐药的占 42.9% (3/7), 对美罗培南耐药的占 71.4% (5/7)。2 株肺炎克

雷伯菌和 2 株弗氏柠檬酸杆菌对亚胺培南、美罗培南均敏感。

1 株产酸克雷伯菌对亚胺培南、美罗培南均耐药, 见表 1。

表 1 27 株待测菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率(%)

菌名	n	厄他培南	美罗培南	亚胺培南
阴沟肠杆菌	15	100	46.7	20.0
大肠埃希菌	7	100	71.4	42.9
弗氏柠檬酸杆菌	2	100	0	0
肺炎克雷伯菌	2	100	0	0
产酸克雷伯菌	1	100	100	100

2.2 Hodge 试验结果 27 株菌株中, 3 株阳性(包括 2 株阴沟肠杆菌, 1 株产酸克雷伯菌), 阳性率为 11.1%; 24 株阴性。Hodge 试验阳性菌株对美罗培南全部耐药, 对亚胺培南 2 株耐药, 1 株中介。Hodge 试验结果判断如图 1、2 所示。

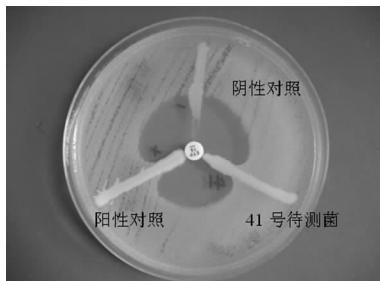


图 1 41 号菌, 产酸克雷伯菌, 改良 Hodge 试验阳性

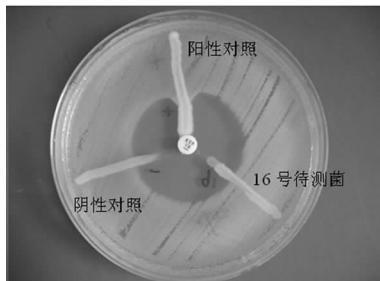


图 2 16 号菌, 弗氏柠檬酸杆菌, 改良 Hodge 试验阴性

3 讨 论

碳青霉烯类抗菌药物是一类抗菌谱广、抗菌活性强、毒性低、耐酶且稳定的抗菌药物。目前肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的机制主要有 3 种。(1)产碳青霉烯酶是最主要的耐药机制, 按 Ambler 分子分类为 A、B、D 3 类酶;(2)外膜蛋白的缺失或表达减少;(3)药物作用靶位的改变^[1]。B 类酶为金属酶, 属于 Bush 分群中的第 3 组, 见于铜绿假单胞菌、不动杆菌、肠杆菌科细菌;A 类、D 类酶为丝氨酸酶, 属于 Bush 分群中的第 2f 和 2d 亚组。A 类酶见于一些肠杆菌科细菌, D 类酶仅见于不动杆菌。在肠杆菌科细菌中我国已报道的碳青霉烯酶主要以肺炎克雷伯菌中的 KPC-2 为主, 国外以 KPC-2、KPC-3 为主^[2]。

据 CLSI M100 文件推荐, 改良 Hodge 试验用于肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的筛查有较高的敏感性(>90%)和特异性(>90%)。叶智颖等^[3]报道, 用改良 Hodge 试验筛查肺炎克雷伯菌的 KPC 酶, 阳性率为 72.2%。安军等^[4]报道用改良 Hodge 试验筛查肺炎克雷伯菌的碳青霉烯酶的阳性率为 92.8%, 大肠埃希菌的阳性率为 37.5%。说明此方法用于产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的筛查, 结果敏感性高, 操作简单, 适合临床实验

室推广应用。本组数据的阳性率远低于国内相关报道, 说明碳青霉烯酶的产生有地域差异性, 这种差异可能与各地抗菌药物的使用差异及耐药菌株的克隆差异有关。本次研究中厄他培南的 MIC 值在 2~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间的菌株改良 Hodge 试验均为阴性, 3 株阳性菌株厄他培南的 $\text{MIC} \geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$, 说明产碳青霉烯酶菌株对厄他培南、美罗培南为高度耐药, 对亚胺培南可为中介或耐药。

细菌产生 β -内酰胺酶多与抗菌药物选择压力有关, 如超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、头孢菌素酶(AmpC 酶)与第三代头孢菌素的过度使用有关, 碳青霉烯酶与碳青霉烯类抗菌药物使用有关。3 例 Hodge 试验阳性菌株患者病历资料显示, 患者在阳性菌株标本采集前均未使用过碳青霉烯类抗菌药物, 有长期使用广谱 β -内酰胺类抗菌药物或 β -内酰胺类/酶抑制剂的情况。提示肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶并不一定是碳青霉烯类抗菌药物选择压力所致, 长期使用广谱头孢菌素或 β -内酰胺类/酶抑制剂等广谱抗菌药物可能是诱导产碳青霉烯酶的因素之一。国外研究亦提示^[5-6], 碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌源于广谱抗菌药物的选择压力, 包括广谱头孢菌素、 β -内酰胺类/酶抑制剂、碳青霉烯类等, 但未特指哪一类的抗菌药物。病例资料显示, 3 例患者有 2 例死亡, 1 例好转出院, 患者预后不良。由于产碳青霉烯酶菌株对各种抗菌药物的高度耐药, 此类感染临床常规用药难于有效控制感染, 根据药敏试验结果及时调整用药方案, 是抗感染治疗成功的关键。

23 株改良 Hodge 试验阴性的菌株中, 对厄他培南耐药的原因并非产碳青霉烯酶, 根据相关文献^[7]报道, 其耐药机制可能是与产 ESBLs 或 AmpC 酶合并膜孔蛋白缺失有关。

综上所述, 改良 Hodge 试验用于肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的筛查简单、易行, 可在临床实验室中常规开展。产碳青霉烯酶菌株对常用抗菌药物高度耐药, 患者预后不良。广谱抗菌药物的大量使用是诱导细菌产碳青霉烯酶的原因之一, 合理用药有利于减少耐药菌株的产生。

参考文献

- [1] 刘雅, 康梅. 临床分离的耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的研究进展 [J]. 华西医学, 2013, 28(4): 631-635.
- [2] 纪明宇, 耿大影, 裴凤艳, 等. KPC 型碳青霉烯酶研究概况及进展 [J]. 临床检验杂志, 2013, 31(4): 282-285.
- [3] 叶智颖, 吕火祥, 胡庆丰, 等. 耐碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯菌 KPC 酶检测分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 454-455, 457.
- [4] 安军, 蔡挺, 张顺, 等. 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶的表型检测及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(21): 4423-4425.
- [5] Gupta N, Limbago BM, Patel JB, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention [J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(1): 60-67.
- [6] Kritsotakis EI, Tsiotis C, Roumelaki M, et al. Antibiotic use and the risk of carbapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in hospitalized patients: results of a double case-control study [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6): 1383-1391.
- [7] Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2723-2725.

(收稿日期: 2013-11-22)