

• 经验交流 •

产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的检测与耐药状况分析

胡慧敏,王欣慧

(南京医科大学第二附属医院检验科,江苏南京 210011)

摘要:**目的** 了解该院肺炎克雷伯菌产 KPC 型碳青霉烯(KPC 酶)的情况。**方法** 收集临床分离的肺炎克雷伯菌 756 株,采用 K-B 法进行药敏试验,筛选出耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌,采用改良的 Hodge 试验、PCR 检测产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌。**结果** 在 756 株肺炎克雷伯菌中,检出耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 41 株,进行 Hodge 试验,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。**结论** 该院内发现了产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌,但其分型还有待于进一步检测。

关键词:KPC 酶; Hodge 试验; 肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯; 耐药
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.050 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)22-3119-02

了解本院肺炎克雷伯菌产 KPC 型碳青霉烯酶(KPC 酶)的情况,本研究对 2012 年 1 月至 2014 年 1 月期间本院分离的 756 株肺炎克雷伯菌进行了药敏试验,从中筛选出 41 株耐碳青霉烯的菌株,对其产 KPC 酶的情况进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2012 年 1 月至 2014 年 1 月本院分离的 756 株肺炎克雷伯菌,从中筛选出 41 株耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌。

1.1.2 仪器与试剂 菌种鉴定及药敏试验采用 Vitek-2 Compact 全自动细菌鉴定药敏系统(法国梅里埃生物技术公司),抗菌药物纸片均由 Oxoid 公司提供,PCR 仪由德国 Eppendorf 公司提供,北京天能公司生产的 Tanon Eps100 电泳仪,凝胶成像分析系统由美国 Syngene 公司提供,高速离心机由德国 Eppendorf 公司提供。

1.1.3 实验引物 设计 KPC 引物:KPC-F 5'-TCG CTA AAC TCG AAC AGG-3';KPC-R 5'-TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC-3'。引物长度为 783 bp。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离、鉴定 通过在本院各科室收集的各类型标本中按常规方法进行培养,并在获得纯培养后进行革兰氏染色、氧化酶试验。依据革兰氏染色和氧化酶的实验结果选择合适的革兰阴性菌鉴定卡片。严格按照操作说明书在 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定仪上进行菌种鉴定。质控菌株为霍氏肠杆菌 ATCC700323 和嗜麦芽窄食单胞菌 ATCC17666。

1.2.2 药敏试验 依照美国临床和实验室标准协会(CLSI)的操作规程,对所分离的 756 株肺炎克雷伯菌采用 K-B 法进行多种药物的药敏试验,记录下各种药物抑菌圈的直径。

1.2.3 改良 Hodge 试验 按照常规药敏 K-B 法程序接种由大肠埃希菌 ATCC25922 在生理盐水制备 0.5 麦氏单位标准菌悬液的 M-H 平板,平板干燥 5 min 后放置厄他培南(10 μg)纸片 1 张在直径 90 mm 平板中央。接种在血平板上过夜生长的 3~5 个试验菌落(10 μL 接种环挑取由纸片边缘向外划直线),划线长度大于 25 mm。通过设定阴阳性对照(已确定产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌为阳性对照、ATCC700603 为阴性对照),观察在(35±2)℃条件下孵育 18~24 h 后,观察抑菌环与待测菌株交叉处有无增强生长。

1.2.4 PCR 扩增及测序与模板制备 采用煮沸裂解法制备模板 DNA,以产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌为阳性对照、

ATCC700603 作阴性对照。参照文献资料所用的方法和引物 PCR 筛选 KPC 基因。

2 结果

2.1 抗菌药物敏感度试验结果 采用 K-B 法对亚胺培南药敏结果进行确认,见表 1。

表 1 41 株耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的药敏结果

抗菌药物	耐药株数(n)	耐药率(%)
阿米卡星	18	43.9
头孢唑林	41	100.0
头孢呋辛	41	100.0
头孢噻肟	41	100.0
头孢他啶	39	95.1
头孢吡肟	36	87.8
头孢替坦	32	78.0
复方磺胺甲噁唑	36	87.8
哌拉西林/他唑巴坦	26	63.4
左氧氟沙星	21	51.2
环丙沙星	21	51.2
阿莫西林/克拉维酸	35	85.4
氨基南	39	95.1

2.2 改良 Hodge 试验检测 KPC 酶 0.5 麦氏浊度单位大肠埃希菌 ATCC25922 菌液稀释 10 倍后均匀涂布 M-H 平板,中间贴厄他培南(10 μg)纸片,接种耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌,无菌接种环自纸片外缘向平板边缘划线,(35±2)℃孵育 18~24 h 后观察结果。见图 1。厄他培南抑菌圈内出现待检菌增强(矢状)生长者为产 KPC 酶菌株,质控菌为大肠杆菌 ATCC25922。本研究 41 株耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌中,有 36 株为 KPC 酶阳性。



图 1 改良 Hodge 试验结果

2.3 PCR 扩增及测序结果 PCR 产物经 115% 的琼脂糖凝胶电泳分离, Goldview 染色后用凝胶成像系统观察结果, 见图 2。



Marker: 标记物; 1~2: 待测菌株; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照。

图 2 PCR 扩增产物电泳图

3 讨 论

碳青霉烯类抗菌药物是目前临床使用的抗菌谱最广、抗菌活性最强的一类抗菌药物, 尤其对产超广谱 β -内酰胺酶和头孢菌素酶的肠杆菌科细菌感染的治疗有较好的效果。因此, 碳青霉烯类抗菌药物在临床上往往被认为是治疗多重耐药菌感染的最后一道防线^[1]。41 株耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌对头孢唑林、头孢呋辛、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南的耐药率都为 95%~100%, 对阿米卡星的耐药率为 43.9%, 对左氧氟沙星、环丙沙星的耐药率为 51.2%。符合 KPC 酶能够水解碳青霉烯类、青霉素类、头孢菌素类和氨曲南等抗菌药物的报道^[2-7]。近年来, 随着碳青霉烯类抗菌药物在临床上的广泛使用, 耐碳青霉烯类抗菌药物的细菌检出率呈逐渐上升的趋势。在肠杆菌科细菌发现产 KPC 的耐药菌, 包括肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、大肠杆菌、产酸克雷伯菌、沙门菌等^[8]。肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类抗菌药物的主要机制有产 AmpC 酶合并外膜孔蛋白的丢失、金属酶、OXA 酶和 KPC 酶^[9]。KPC 酶属于 Bush 分类中的 A 类 2f 组, 克拉维酸对其酶活性有抑制作用。目前已检出的 KPC 酶有多种亚型, 包括 KPC-1~KPC-14, 它们之间只是有个别氨基酸发生了突变^[10]。由于本实验研究使用的引物是 KPC 的特异性引物, 没有使用各种不同类型的 KPC 酶的引物来进行检测, 无法区分是何种类型的 KPC 酶存在, 后续可以对其耐药机制作更进一步研究。

碳青霉烯酶的基因位于可转移的质粒上, 依靠多种基因元件进行传播, 这也是多重耐药菌株易于传播的重要原因^[11-13]。为了缩短临床治疗周期和防止抗菌药物滥用的情况, 对产碳青霉烯酶的菌株的鉴定势在必行。

为了防止院内感染和多重耐药菌(耐药菌株对碳青霉烯类和其他类抗菌药物的耐药率都较高)在院内传播和暴发流行, 应完善控制措施防止院内感染; 检验科医生和临床医师应共同监测、加强联系; 微生物实验室增加药敏检测的种类, 扩大临床医生选择药物的范围; 提醒感染管理科对临床进行督察; 使用各类抗菌药物科学合理。总而言之, 早发现、早隔离、早治疗是预防院内感染和多重耐药菌院内传播的重中之重。

针对国内抗菌药物滥用的现状, 为了防止出现更多的耐药菌株, 在临床上使用时要强调科学合理, 要根据药敏实验的结果用药, 尤其是要慎用高效广谱类的抗菌药物。以防一旦发生感染, 出现可选用抗菌药物非常有限甚至无药可选用的情况。

本研究中, 本院部分患者没使用过亚胺培南或其他的碳青霉烯类药物, 但也分离到产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌, 因此 KPC 酶是哪一类抗菌药物的选择性压力下出现的仍无法得知。本研究只采用了耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌进行 KPC 酶检测, 为了更好地为临床用药提供参考, 可以结合其他类抗菌药物如头孢菌素类耐药菌株进一步筛查与研究, 从而防止因碳青霉烯类抗菌药物的滥用而造成大量耐药菌株出现。

参考文献

[1] Patersom DL, Kow C, Von GA, et al. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(1): 31-37.

[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, 2001, 45(4): 1151-1161.

[3] Moland ES, Hanson ND, Herrera VL, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(3): 711-714.

[4] Miriagou V, Tzouveleakis LS, Rossiter S, et al. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(4): 1297-1300.

[5] Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12): 3881-3889.

[6] Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(11): 4438-4440.

[7] Espedido BA, Steen JA, Ziochos H, et al. Whole genome sequence analysis of the first Australian OXA-48-producing outbreak-associated *Klebsiella pneumoniae* isolates: the resistome and in vivo evolution[J]. PloS One, 2013, 8(3): 59920.

[8] Miriagou V, Tzouveleakis LS, Rossiter S, et al. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(4): 1297-1300.

[9] Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(8): 2368-2371.

[10] 张嵘, 蔡加昌, 周宏伟, 等. 对亚胺培南耐药黏质沙雷菌中质粒介导 KPC-2 型碳青霉烯酶的研究分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(8): 734-738.

[11] Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence[J]. Euro Surveill, 2008, 13(4): 1854-1861.

[12] Gülmez D, Woodford N, Palepou M F, et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(6): 523-526.

[13] 费静娟, 吴莲凤, 彭定辉, 等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药性[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(10): 1258-1260.