

• 论 著 •

## 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌临床感染现状分析

陆文香, 许倩<sup>△</sup>, 钟桥, 徐卫东, 王亚南  
(苏州市立医院本部检验科, 江苏苏州 215002)

**摘要:**目的 了解该院临床分离的耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的临床分布及产碳青霉烯酶情况。方法 采用改良 Hodge 试验确认 CRE 菌株产碳青霉烯酶的情况, 乙二胺四乙酸(EDTA)双纸片协同试验筛查 CRE 菌株产金属  $\beta$ -内酰胺酶情况, 并对 CRE 菌株的临床分布作回顾性分析。结果 该科室经仪器法筛查, 标准琼脂扩散敏感试验(K-B 法)复核证实, 检出 37 株 CRE 菌株, 检出菌株数从 2012~2014 年呈逐年递增趋势。从细菌种类看, 耐碳青霉烯类菌株主要是肺炎克雷伯菌(16 株), 其次是大肠埃希菌(6 株)、黏质沙雷菌(6 株)、阴沟肠杆菌(4 株)。CRE 菌株主要来源于重症监护室和老年病房。痰液、尿液、血液是检出 CRE 菌株的主要标本来源。经改良 Hodge 试验证实, 36 株 CRE 为产碳青霉烯酶菌株, 其中肺炎克雷伯菌 4 株、阴沟肠杆菌 3 株、阿斯布肠杆菌 1 株, 经 EDTA 协同试验筛查出产金属酶。结论 有基础疾病的老年患者是 CRE 院内感染易感人群, 是防控重点对象, 该院 CRE 耐碳青霉烯类抗菌药物的主要机制是产生碳青霉烯酶, 其中部分菌株产金属酶。

**关键词:** 肠杆菌科; 碳青霉烯类; 改良 Hodge 试验; 乙二胺四乙酸; 协同试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1861-03

## Analysis of clinical infection status of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae

Lu Wenxiang, Xu Qian<sup>△</sup>, Zhong Qiao, Xu Weidong, Wang Yanan

(Department of Clinical Laboratory, Municipal Hospital of Suzhou, Suzhou, Jiangsu 215002, China)

**Abstract:** Objective To investigate the clinical distribution of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae(CRE) strains separated in this hospital and the situation of its production of carbapenem enzyme. **Methods** The production of carbapenem enzyme by CRE strains was confirmed by using modified Hodge test, the situation of the production of metallo-beta-lactamases by CRE strains was screened by using imipenem-EDTA double-disk synergy test, and the clinical distribution of CRE strains was retrospectively analysed. **Results** 37 strains of CRE isolated in this laboratory were screened by using instrument method and verified by using disk diffusion (K-B) method. It showed an increasing trend from 2012 to 2014 in the amount of CRE strains. In terms of bacterial species, K. pneumonia(16 strains) was the main kind of carbapenems-resistant strains, followed by E. coli(6 strains), Ser. marcescens(6 strains) and E. cloacae(4 strains). CRE strains were mainly isolated from geriatric ward and intensive care unit(ICU). Sputum, urine and blood specimen were key sources of CRE strains. Modified Hodge test confirmed that 36 strains of CRE were the strains that can produce carbapenemase, including 4 strains of K. pneumonia, 3 strains of E. cloacae, and 1 strain of E. asburiae, and strains producing metallo-beta-lactamases were confirmed by using imipenem-EDTA double-disk synergy test. **Conclusion** Elderly patients with underlying diseases are susceptible population of CRE hospital infection and are primary preventive targets. The principal mechanism of carbapenem-resistant CRE strains in this hospital is the production of carbapenemase and production of metallo- $\beta$ -lactamases in a small number of strains.

**Key words:** Enterobacteriaceae; carbapenems; modified Hodge test; ethylenediaminetetraacetic acid; synergistic test

国内外监测数据显示,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)不断增多,给临床抗感染治疗带来极大的挑战,已成为全球关注的焦点<sup>[1-6]</sup>。改良 Hodge 试验作为一种表型确认方法被广泛用来检测碳青霉烯酶,而且是目前美国临床实验室标准化协会(CLSI)唯一推荐的碳青霉烯酶表型检测方法。对于检测弱产碳青霉烯酶菌株,尤其产金属酶的肠杆菌科细菌,改良 Hodge 试验检测结果难以判读,乙二胺四乙酸(EDTA)协同试验可特异性筛查金属酶。2012~2014 年,本院临床分离的 CRE 菌株与往年相比明显增多,本研究对这类菌株的耐药是否与产碳青霉烯酶有关,以及其临床分布特征进行分析,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株** 2012 年 1 月至 2014 年 6 月本科室用仪器法和手工琼脂扩散敏感试验(K-B 法)筛选对亚胺培南或美罗培南药敏结果耐药或中介的肠杆菌科菌株,共检测 37 株 CRE 非重复

细菌。

**1.2 仪器与试剂** Phoenix100 全自动微生物鉴定仪(美国 BD 公司);血平板、MH 平板为郑州安图绿科生物有限公司产品;乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )为华美生物工程公司产品。亚胺培南、美罗培南、厄他培南药敏纸片(10  $\mu\text{g}$ )为英国 Oxoid 公司产品。空白纸片用滤纸自制。

## 1.3 方法

**1.3.1** 0.5 mol/L EDTA- $\text{Na}_2$  的制备 称取 18.6 g EDTA- $\text{Na}_2$  加入 200 mL 的干净烧杯中,加 75 mL 蒸馏水,边搅拌边用氢氧化钠(NaOH)调 pH 至 8.0,定容到 100 mL,121.3  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 15 min 后分装于无菌试管中,密封后置冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.3.2 药物敏感性试验** 使用 K-B 法检测肠杆菌科细菌对 3 种碳青霉烯类抗菌药物的耐药性。

**1.3.3 改良 Hodge 试验** 对 CRE 菌株进行改良 Hodge 试验,取大肠埃希菌 ATCC25922 用生理盐水制备成 0.5 麦氏单

位菌悬液,再用生理盐水 1∶10 稀释菌液后均匀涂布于 MH 平板,平板干燥 3~10 min 后,贴厄他培南纸片于平板中心处,用 10  $\mu$ L 接种环挑取在血平板上过夜孵育的测试菌株或质控菌株 3~5 个菌落,距离纸片边缘 2~5 mm 处垂直于纸片边缘划线。35  $^{\circ}$ C 孵育 16~20 h 后判读结果。观察抑菌圈边缘划线处生长有无增强,若有增强则判为阳性,提示待测菌株产碳青霉烯酶。

**1.3.4 EDTA 协同试验** 对 CRE 菌株进行 EDTA 协同试验,将 0.5 麦氏单位菌悬液均匀涂布于 MH 平板,贴亚胺培南(10  $\mu$ g)纸片,在距离亚胺培南纸片约 1 cm 处贴一空白无菌圆形纸片,上面滴加 0.5 mol/L EDTA 溶液 4  $\mu$ L,35  $^{\circ}$ C 过夜培养后观察结果,亚胺培南抑菌圈在靠近加 EDTA 纸片侧明显扩大者为产金属酶菌株。

**1.4 质量控制** 用大肠埃希菌 ATCC25922 进行常规纸片扩散法药敏试验质量控制。3 种碳青霉烯类抗菌药物对质控菌株的抑菌环结果均在 CLSI 的允许范围内。改良 Hodge 试验

质量控制:阳性质控菌株为产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌,阴性质控株为临床分离敏感型肺炎克雷伯菌野生株。EDTA 协同试验质量控制以产金属酶的铜绿假单胞菌为阳性对照菌株。

2 结 果

**2.1 CER 菌株分布特征** 2012 年检出 7 株 CER,2013 年检出 16 株,2014 年 1~6 月检出 14 株,有明显递增趋势。从细菌种类看,CER 菌株主要是肺炎克雷伯菌(16 株),其次为大肠埃希菌(6 株)、黏质沙雷菌(6 株)、阴沟肠杆菌(4 株)。从送检科室看,主要来源于重症监护室(ICU),共 23 株,老年科,共 8 株。从标本类型看,24 株来源于痰液标本,6 株来源于尿液标本,2 株来源于血液标本。CRE 菌株临床分布概况见表 1。

**2.2 CER 菌株药敏试验、改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验结果** 37 株 CRE 菌株经改良 Hodge 试验证实 36 株为产碳青霉烯酶菌株,其中 4 株肺炎克雷伯菌,3 株阴沟肠杆菌和 1 株阿斯布肠杆菌经 EDTA 协同试验筛查出产金属酶。37 株 CRE 的药敏结果及改良 Hodge 试验、EDTA 协同试验结果见表 2。

表 1 37 株 CRE 菌株临床分布概况(*n*)

类别	分布	肺炎克雷伯菌	阴沟肠杆菌	大肠埃希菌	粘质沙雷菌	弗劳地枸橼酸杆菌	成团泛菌	I 型芳香沙雷菌	阿斯布肠杆菌	产酸克雷伯菌	合计
科室	ICU	10	3	2	6	0	1	1	0	0	23
	老年科	3	1	4	0	0	0	0	0	0	8
	其他	3	0	0	0	1	0	0	1	1	6
标本类型	痰液	11	4	3	3	0	1	1	0	1	24
	血液	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
	尿液	1	0	3	1	1	0	0	0	0	6
	其他	4	0	0	0	0	0	0	1	0	5

表 2 37 株 CRE 的药敏试验、改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验结果

标本号	细菌名称	仪器法 MIC( $\mu$ g/mL)		K-B 法(10 $\mu$ g,mm)			改良 Hodge 试验	EDTA 协同试验
		IPM	MEM	ETP	IPM	MEM		
120201080	大肠埃希菌	8		8	11	8	+	—
120725085	肺炎克雷伯菌	>8	>8	6	6	6	++	—
120830004	肺炎克雷伯菌	>8	2	13	15	14	+	+
121006028	肺炎克雷伯菌	8	4	11	15	12	+	+
121128007	肺炎克雷伯菌	8	8	8	12	13	++	—
121206054	肺炎克雷伯菌	>8	>8	6	8	6	++	—
121210006	肺炎克雷伯菌	>8	>8	6	6	6	++	—
130121086	肺炎克雷伯菌	8	2	6	10	13	++	—
130121086	成团泛菌	>8	>8	6	6	6	+	—
130204039	黏质沙雷菌	>8	>8	6	6	6	+	—
130217095	黏质沙雷菌	>8	>8	6	6	6	+	—
130711092	肺炎克雷伯菌	>8	4	8	10	11	+	—
130716092	肺炎克雷伯菌	8	<1	8	8	8	+	—
130217020	肺炎克雷伯菌	>8	<1	10	15	13	++	—
130813073	I 型芳香沙雷菌	8	8	13	11	14	+	—
130814122	阴沟肠杆菌	>8	4	13	13	14	弱+	+
130819126	阴沟肠杆菌	>8	8	6	6	6	弱+	+
130827073	阴沟肠杆菌	>8	8	12	12	13	+	+
130827077	阴沟肠杆菌	>8	8	6	6	6	+	—
130830135	阿斯布肠杆菌	>8	4	13	15	15	+	+

续表 2 37 株 CRE 的药敏试验、改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验结果

标本号	细菌名称	仪器法 MIC(μg/mL)		K-B 法(10 μg, mm)			改良 Hodge 试验	EDTA 协同试验
		IPM	MEM	ETP	IPM	MEM		
131006113	大肠埃希菌	8	4	8	13	12	+	—
131113034	弗劳地枸橼酸杆菌	8	8	11	15	14	+	—
131220014	黏质沙雷菌	>8	>8	6	8	11	+	—
140207033	产酸克雷伯菌	>8	>8	6	6	6	+	—
140207142	肺炎克雷伯菌	>8	<1	8	8	13	+	—
140219182	肺炎克雷伯菌	8	2	11	6	6	+	+
140221001	大肠埃希菌	>8	>8	6	6	6	+	—
140224059	黏质沙雷菌	>8	>8	6	6	6	+	—
140515188	肺炎克雷伯菌	>8	8	6	6	8	+	—
140517065	肺炎克雷伯菌	4	<1	10	13	11	+	—
140516029	黏质沙雷菌	>8	>8	6	6	6	+	—
140519135	肺炎克雷伯菌	4	<1	11	12	14	+	—
140604186	大肠埃希菌	8	8	6	6	6	+	—
140612096	大肠埃希菌	>8	>8	6	6	6	+	—
140627078	肺炎克雷伯菌	>8	8	6	6	6	—	+
140612130	大肠埃希菌	>8	>8	6	6	6	+	—
140618143	黏质沙雷菌	>8	>8	6	6	6	+	—

MIC:最小抑菌浓度;IPM:亚胺培南;MEM:美洛培南;ETP:厄他培南;+:阳性;—:阴性。

3 讨 论

碳青霉烯类抗菌药物曾被认为是抗菌活性最强和对超广谱 β 内酰胺酶(ESBLs)、AmpC β 内酰胺酶(AmpC 酶)稳定的内酰胺类抗菌药物,但是随着此类药物的大量使用,细菌也逐渐获得了耐药性。本研究报道的 37 例 CRE 感染者,除 1 例产科患者 25 岁外,其余患者均在 60 岁以上;其中 90 岁以上 4 例,80~89 岁 8 例,70~79 岁 13 例,提示有基础疾病的老年患者是 CRE 院内感染的易感人群,是防控的重点对象。37 株 CRE 细菌,主要分布在 ICU、老干病房、呼吸病房,患者多有基础疾病,住院时间长,或反复入院间隔时间短。ICU 患者有转科记录,是 CRE 院内传播的重要因素。

肠杆菌科细菌对碳青霉烯类耐药的主要原因是产碳青霉烯酶,由于这些酶大多为质粒介导,极易在不同菌种间横向传播,造成碳青霉烯类耐药性的扩散。本院 CRE 主要是肺炎克雷伯菌,其次是大肠埃希菌、黏质沙雷菌和阴沟肠杆菌。36 株 CRE 改良 Hodge 试验阳性,提示本院 CRE 耐碳青霉烯类的主要机制是产生碳青霉烯酶。碳青霉烯酶中 A 类酶和 B 类酶在肠杆菌科细菌中较常见,其中 A 类为丝氨酸酶,其活性部位具有丝氨酸结构,NmcA/IMI、SME、KPC 为 3 类主要的 A 型碳青霉烯酶,其中 KPC 酶最常见。A 类酶能被克拉维酸抑制,通常对青霉素类和头孢菌素类的水解能力比对碳青霉烯类强。B 类酶为金属酶,是一种需金属离子发挥活性的内酰胺酶,能有效水解碳青霉烯类抗菌药物,但不能水解氨基曲南,水解活性可被 EDTA 抑制而不能被克拉维酸和他唑巴坦抑制,其中 IMP、VIM 和 NDM 是 3 类最主要的获得性金属酶。对于检测弱产碳青霉烯酶菌株,尤其产金属酶的肠杆菌科细菌,改良 Hodge 试验检测结果难以判读,EDTA 协同试验可特异性筛查金属酶。本研究报道 37 株 CRE 中 8 株产金属 β 内酰胺酶,其中 1 株肺炎克雷伯菌改良 Hodge 试验阴性,EDTA 协同试验阳性,可能因为产金属酶的肠杆菌科细菌改良 Hodge 试验

结果难以判读导致。

目前的 CLSI 标准修订了碳青霉烯类抗菌药物的折点,并在解释标准中提出如果按修改后的新折点判定药敏结果,可以不执行改良 Hodge 试验碳青霉烯酶表型。然而,产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌作为感染控制和流行病学调查的重点菌株,仍需要临床微生物室进行常规检测碳青霉烯酶。碳青霉烯酶基因的出现和传播对治疗和控制感染造成巨大威胁,应重视医院细菌耐药性特点及耐药菌感染的临床流行病学资料,采取积极措施延缓或避免 CRE 菌株的传播。

参考文献

[1] 肖书念,卓超,苏丹虹,等. 2011 年中国 CHINET 克雷伯菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(5):331-336.

[2] 汪明,孙自镛,陈中举,等. 碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(4):339-344.

[3] 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.

[4] 冯雅君,沈萍,杜小幸,等. 产碳青霉烯酶 KPC-2 肺炎克雷伯菌局部流行[J]. 浙江医学,2008,30(9):923-925.

[5] Ho PL, Lo WU, Yeung MK, et al. Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant Escherichia coli strain isolated in Hong Kong[J]. PLoS One, 2011, 6(3):e17989.

[6] 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.