病原学检测的临床意义[J]. 中国医药指南, 2014, 6(16): 147-148.
[9] 周长江. 呼吸道合胞病毒感染流行病学研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(4): 425-426.
[10] 王莉佳, 刘恩梅, 赵晓东. 重庆医科大学儿童医院急性呼吸道感染住院患儿病毒病原学分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2005, 20(12): 735-737.

(收稿日期: 2016-03-27　修回日期: 2016-06-20)

·临床研究·

碳青霉烯类非敏感肠杆菌的耐药性与基因型研究

杜任生, 庾永基, 肖伟明
(广州市花都区第二人民医院检验科　510850)

摘　要: 目的　研究碳青霉烯类非敏感肠杆菌的耐药性与基因型。**方法**　自 2013 年 6 月至 2014 年 6 月采集碳青霉烯类非敏感肠杆菌共计 110 株, 选用 K-B 纸片分析细菌对药物有无敏感性, 采用改良后的 Hodge 试验分析碳青霉烯细菌在临床上的使用反应。测试菌株耐药基因对 BLAST 对比(局部序列比对)与 PCR、DNA 进行分析测试。**结果**　测试出替加环素中介 11 株和耐药 4 株(黏质沙雷菌、产气肠杆菌 2 株)。110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌对头孢噻肟和阿莫西林/克拉维酸耐药率最高, 头孢他啶、四环素、复方磺胺甲噁唑、亚胺培南、厄他培南、环丙沙星、氨曲南等耐药率均为 64.9%～88.4%; 而妥布霉素、阿米卡星、呋喃妥因、头孢吡肟耐药率较低, 为 16.6%～40.1%; 敏感率增高的为替加环素、米诺环素, 分别为 82.0%和 86.6%。研究发现 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌当中, 检测出 blaSHV-12、blaCTX-M-15、ESBLs、blaCTX-M-33 等基因。在 110 株碳青霉烯细菌当中还检测出 1 株黏质沙雷菌, 基因型号为 blaKPC-2; 改良后的 Hodge 试验 77 株阳性, 检出率为 70%。36 株(32.7%)ESBLs 呈阳性, 5 株阴沟肠杆菌(blaIMP-26)与 1 株产气肠杆菌(blaVIM-2)基因、31 株大肠埃希菌。**结论**　碳青霉烯肠杆菌的基因型主要有 blaKPC-2 基因、blaIMP-26 基因、blaVIM-2 基因。药敏结果显示碳青霉烯类肠杆菌科细菌对米诺环素和替加环素敏感率增高, 临床用药时可根据患者病情进行合理选择, 以达到控制感染的效果。

关键词: 碳青霉烯类抗菌药物;　耐药性;　基因型;　肠杆菌
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.054　**文献标识码:** A　**文章编号:** 1673-4130(2016)16-2333-02

近几年随着科技不断发展, 临床上应用广谱 β-内酰胺酶与 Amp C 酶的肠杆菌科细菌越来越广泛, 对广谱 β-内酰胺酶使用率也是不断增加。由于临床上经常使用碳青霉烯类抗菌药物进行抗菌治疗, 随着时间推移, 造成临床使用抗感染药物的困难逐年上升。目前。碳青霉烯类肠杆菌被国内外学者广泛关注[1-4]。为进一步研究碳青霉烯类肠杆菌基因型情况, 采集本院感染菌株 110 株, 分析碳青霉烯类肠杆菌抗耐药性与基因型。

1　材料与方法

1.1　菌株　自 2013 年 6 月至 2014 年 6 月收集本院临床标本当中分离的碳青霉烯类非敏感肠杆菌共 110 株, 其中黏质沙雷菌 10 株、布氏柠檬酸杆菌 1 株、阴沟肠杆菌 20 株、大肠埃希菌 62 株、气肠杆菌 14 株、奇异变形杆菌 1 株、摩根摩根菌 2 株, 实验过程中亚胺培南与厄他培南只要出现上述两种或两种以上细菌耐药即为非敏感菌株。产 IMP-4 型酶、KPC-2 型酶肺炎克雷伯菌、TEM-5 型、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 酶肺炎克雷伯菌、IMI-1 型酶阴沟肠杆菌、SHV-3 型酶。

1.2　试剂与仪器　血琼脂平板、M-H 肉汤、血液增菌培养基、M-H 琼脂均为杭州天微生物公司生产。PCR 检测试剂盒为北京天根公司生产。阿米卡星、环丙沙星、头孢西丁、头孢噻肟、头孢他啶/克拉维酸、阿莫西林/克拉维酸、妥布霉素、四环素、头孢噻肟/克拉、维酸头孢他啶、氨曲南、亚胺培南、米诺环素、药敏纸片头孢吡肟、呋喃妥因、替加环素、复方磺胺甲噁唑, 以上产品均为上海生工公司生产。本次使用的 VITEK-33 全自动微生物分析仪为 SP1000 PCR 扩增仪, Tanon1600 凝胶成像系统以及 DYY-Ⅲ电泳仪。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、溴化乙锭和琼脂糖、乙二胺四乙酸(EDTA)使用试剂盒均由上海天能公司生产。

1.3　方法

1.3.1　鉴定细菌及药敏试验　本次采用菌株经 VITEK-32 全自动微生物分析仪进行鉴定, 根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)使用 K-B 纸片检测菌株的药物敏感性[5]。

1.3.2　检测碳青霉烯　本次检测 KPC-2 型酶肺炎克雷伯菌显示为阳性对照株, 按照 GLSI 标准进行改良的 Hodge 试验。

1.3.3　扩增产物测序及 DNA 序列分析　本文的扩增引物根据文献[6-8]设计, 委托上海生工公司合成。本次检测 PCR 扩增产物使用 ABI-PRISM3730 仪器进行测试, 对检测出的 GenBank 与 BLAST 数据进行分析, 试剂使用配套试剂, 操作过程完全按照仪器和试剂的说明书进行。

1.3.4　ESBLs 检测　使用 2013 年版 CLSI 推荐的纸片法表型确证试验[5]。

2　结　　果

2.1　药敏试验结果　实验数据显示, 本次测试出替加环素中介 11 株和耐药 4 株(黏质沙雷菌、产气肠杆菌 2 株)。本次试验耐药率为 93.9%, 显示 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌对与头孢噻肟和阿莫西林/克拉维酸耐药率最高, 头孢他啶、四环素、复方磺胺甲噁唑、亚胺培南、厄他培南、环丙沙星、氨曲南等耐药率均为 64.9%～88.4%; 而妥布霉素、阿米卡星、呋喃妥因、头孢吡肟耐药率较低, 为 16.6%～40.1%; 敏感率增高的为替加环素、米诺环素, 分别为 82.0% 和 86.6%。

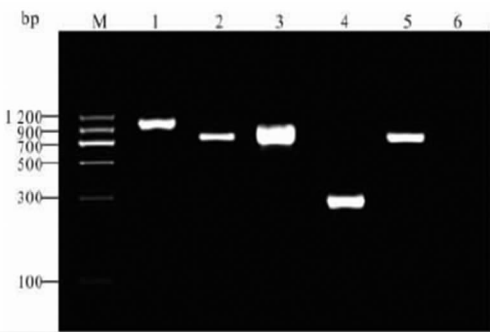
2.2　ESBLs 与 MHT 检测结果　本次从 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌细菌当中测出产碳青霉烯酶细菌 77 株(70%)、阴

沟肠杆菌 15 株(19.5%)、黏质沙雷菌 6 株(7.8%)。77 株产碳青霉烯酶细菌中大肠埃希菌 49 株(63.6%)、产气肠杆菌 5 株(6.5%)。36 株 ESBLs 细菌。数据显示同时产 ESBLs 和碳青霉烯酶两种酶的细菌为 18 株,占 16.6%。见表 1。

表 1　数据分析 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌科细菌碳青霉烯酶与 ESBLs 的检出率[n(%)]

菌株	菌株数	单产碳青霉烯酶	单产 ESBLs	同时产碳青霉烯酶和 ESBLs
大肠埃希菌	62	32(51.6)	11(17.7)	17(27.4)
阴沟肠杆菌	20	15(75.0)	5(25.0)	0(0.0)
产气肠杆菌	14	5(35.7)	1(7.1)	0(0.0)
黏质沙雷菌	10	6(60.0)	0(0.0)	0(0.0)
摩根摩根菌	2	0(0.0)	1(50.0)	0(0.0)
布氏柠檬酸杆菌	1	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
奇异变形杆菌	1	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)
合计	110	59(53.6)	18(16.4)	18(16.4)

2.3　耐药酶基因检测及序列测定结果　110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌中,分别有 33 株(30%)、1 株(0.9%)、5 株(4.5%)检出 blaVIM-2、blaKPC-2、blaIMP-26 等碳青霉烯酶基因;分别有 9 株(8.6%)、5 株(4.5%)、1 株(0.9%)检测出 blaCTX-M-3、blaSHV-12、blaCTX-M-15 等 ESBLs 基因。62 株大肠埃希菌中有 31 株(50.0%)检出 blaKPC-2 基因,检测出有 8 株携带 blaSHV-12 基因、1 株携带 blaCTX-M-15 基因。20 株阴沟肠杆菌中,有 5 株携带 blaIMP-26 基因、1 株携带 blaVIM-2 基因、1 株携带 blaCTX-M-3 基因、3 株携带 blaSHV-1 基因。14 株产气肠杆菌检出含 blaKPC-2 与 blaSHV-12 基因各 1 株。未从柠檬酸杆菌中检测出 GIM、SIM、GES、NDM-1、IMI、OXA、SPM 等基因。除以上检出基因还检出 10 株黏质沙雷菌、1 株布氏柠檬酸杆菌、2 株摩根摩根菌、1 株奇异变形杆菌、1 株 blaKPC-2 阳性、blaCTX-M-15 基因,以上检测未检出碳青霉烯酶以及 ESBLs 基因。详见图 1。



注:M 为 DNA marker;1～5 分别为 blaKPC-2、blaIMP-26、blaVIM-2、blaSHV-12、blaCTX-M-15;6 为阴性菌株。

图 1　PCR 产物基因

3　讨　论

本次研究数据显示 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌中含有 blaVIM-2、blaIMP-26、blaKPC-2 这 3 种碳青霉烯酶耐药基因,阴沟肠杆菌基因主要有 blaVIM-2、blaIMP-26,实验发现碳青霉烯类非敏感肠杆菌可产 ESBLs,本次实验发现 110 株菌当中有 16.6%的菌株同时生产碳青霉烯酶与 ESBLs,研究发现 ESBLs,主要以 blaCTX-M-15 为主,blaSHV-12、blaCTX-M-3 两种基因为辅,主要分布于阴沟肠杆菌与产气肠杆菌。碳青霉烯类中介或耐药的肠杆菌科细菌以肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、黏质沙雷菌等为主,这些细菌应作为医院感染防控的主要对象[6-7]。碳青霉烯类药物被认为是治疗肠杆菌科细菌感染较为有效的药物,但近年来,肠杆菌科细菌对此类药物的耐药率在逐年增加。耐药的主要机制是菌株产生碳青霉烯类水解酶(包括 A、B 和 D 类),其次是 ESBLs 或头孢菌素酶合并外膜蛋白改变和(或)外排泵作用,导致碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降甚至耐药[8-9]。研究发现碳青霉烯类非敏感肠杆菌敏感率低于厄他培南以及亚胺培南,造成的原因有可能是非碳青霉烯酶引起的,造成其敏感率降低的原因还需进一步研究。药敏结果显示碳青霉烯类肠杆菌科细菌对米诺环素和替加环素敏感率增高,临床用药时可根据患者病情进行合理选择,以达到控制感染的目的。

参考文献

[1] Kaase M, Szabados F, Wassill L, et al. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(9): 3115-3118.

[2] Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, et al. Carbapenemases in klebsiella pneumoniae and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4): 682-707.

[3] 孙长贵,杨燕,杨丽君,等. 临床细菌耐药流行病学变化[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(10): 803-812.

[4] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.

[5] Clinicaland Laboratory Standards Institute. Perform ancestand ards for anti miembial susceptibility testing; twenty-thirdinformationalsupple-ment; M100-S23 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2013.

[6] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.

[7] Hussain M, Hasan F, Shah AA, et al. Prevalence of class A and AmpC β-lactamases in clinical Escherichia coli isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan[J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(3): 249-252.

[8] 杨丽君,陈坚,杨燕,等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌基因型检测和同源性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(4): 318-323.

[9] Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, et al. Controlling False-Positive results obtained with the hodge and masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic acid [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1323-1332.

(收稿日期:2016-03-05　修回日期:2016-06-18)