

• 论 著 •

多重耐药肺炎克雷伯菌中碳青霉烯酶的检测和分析

王鹏鲲, 陈定强, 俞 辉

(广州医科大学附属第一医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 研究多重耐药肺炎克雷伯菌临床分离株的碳青霉烯酶的流行情况。方法 收集该院从 2007 年 1 月至 2012 年 12 月临床分离的 151 株多重耐药肺炎克雷伯菌, 并对其药敏结果进行归纳整理, 用碳青霉烯酶表型试验进行检测, 再用聚合酶链反应(PCR)检测已知的碳青霉烯酶基因, 并对扩增产物进行 DNA 测序, 确定其基因型。结果 在 151 株多重耐药肺炎克雷伯菌中, 通过改良 Hodge 试验筛选出 12 株可能产碳青霉烯酶的菌株, 其中有 1 株的金属酶试验为阳性, 该 12 株菌经 PCR 扩增及测序确定产碳青霉烯酶菌株有 5 株, 金属酶阳性株为 IMP-4 型金属酶, 另外 4 株产碳青霉烯酶菌株为 KPC-2 型。结论 近年来该院多重耐药肺炎克雷伯菌出现了产碳青霉烯酶菌株, 临床应根据药敏结果合理选用碳青霉烯类药物, 以减少耐药菌株的产生。

关键词:肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 多重耐药; 聚合酶链式反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)24-3423-03

Detection and analysis of carbapenemase in multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*

WANG Pengkun, CHEN Dingqiang, YU Hui

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Methods** One hundred and fifty-one multi-drug resistant *K. pneumoniae* strains were collected in our hospital from January 2007 to December 2012 and the drug susceptibility results were analyzed. The carbapenemase phenotype test was used for conducting the detection. The PCR was used to detect the known carbapenemases gene. The amplification products were further sequenced to determine the genotypes. **Results** Among 151 strains of multi-drug resistant *K. pneumoniae*, 12 strains possibly producing carbapenemase were screened by the modified Hodge test, in which 1 strain was positive in the metalloenzyme test. Among these 12 strains, 5 strains producing carbapenemases were confirmed by PCR amplification and sequencing, the metalloenzyme positive strain was the type IMP-4 metalloenzyme and other 4 carbapenemase-producing strains were the type KPC-2. **Conclusion** Multi-drug resistant *K. pneumoniae* appears the strain producing carbapenemase in our hospital in recent years. Clinic should rational select carbapenem drugs according to the drug susceptibility test results for preventing the generation of drug-resistant strain.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase; multi-drug resistance; PCR

肺炎克雷伯菌是最重要的医院感染条件致病菌之一, 可引起典型的原发性肺炎, 也可引起肺外感染, 该菌容易产生超广谱 β -内酰胺酶, 可携带多重耐药的质粒, 在细菌耐药性传播中有重要作用^[1]。随着碳青霉烯类抗菌药物在临床的使用增加, 近几年世界各地陆续出现耐药株, 产碳青霉烯酶是碳青霉烯类药物耐药的重要原因之一, 其可随质粒或整合子等移动元件在不同种属菌株间传播的特性引起了高度的关注。在肠杆菌科细菌中, 耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌的检出率也不断增加^[2]。为了解本院肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶的流行情况, 同时也为医院感染防控和规范碳青霉烯类抗菌药物用药提供实验室依据, 本文对本院临床分离的 151 株多重耐药肺炎克雷伯菌进行碳青霉烯酶基因的分析。

1 材料与方法

1.1 材料来源 实验菌株为本院从 2007 年 1 月至 2012 年 12 月临床分离的 151 株多重耐药的肺炎克雷伯菌, 细菌耐药性及鉴定均经过 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)分析鉴定。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922, 金属酶阳性菌株 RP01 和 Hodge 试验阳性菌株 KP1 为实验室保存的菌株。

1.2 实验试剂 DNA Marker 和 PCR 配套试剂购自 Takara

公司, 琼脂糖和溴化乙锭购自北京鼎国公司, 引物由上海英潍捷基公司合成; 药敏纸片亚胺培南纸片 IPM、厄他培南纸片 ETP 和空白纸片购自 Oxoid 公司; M-H 琼脂培养基、哥伦比亚血琼脂培养基均购自梅里埃微生物制品有限公司;

1.3 改良 Hodge 实验 将大肠埃希菌 ATCC25922 和 24 h 血平板上的单个菌落分别制备菌悬液, 比浊至 0.5 号麦氏管, 再用生理盐水把已配好的大肠埃希菌的菌悬液稀释 10 倍, 用无菌拭子浸入菌悬液中, 在管壁上挤干, 均匀涂于整个 M-H 平板表面, 中间贴厄他培南 ETP 纸片, 每个 M-H 平板接种 4 株菌株, 并做好阴性对照(大肠埃希菌 ATCC25922)和阳性对照(产 KPC 的肺炎克雷伯菌 KP1), 无菌接种环自纸片外缘向平板边缘画线, 35℃ 孵育 16~18 h 后观察结果, 结果判断: ETP 纸片抑菌圈内出现待检菌矢状生长者为产碳青霉烯酶菌株。

1.4 双纸片协同试验和组合纸片法筛选金属酶 取 MHT 实验中已比浊好的待测菌的菌悬液, 用无菌拭子浸入菌悬液中, 在管壁上挤干, 分别均匀涂于整个 M-H 平板表面, 在平板的一端贴亚胺培南(IPM, 10 μ g)药敏纸片, 在距纸片 2 cm 处贴一空白纸片, 并在空白纸片上面加入 4 μ L 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液, 再在距离 IPM 纸片 4 cm 处另贴一 IPM

纸片,再滴加 4 μ L 0.5 mmol/L EDTA 溶液,35 $^{\circ}$ C 培养过夜。结果判断:IPM 纸片抑菌圈在靠近滴加 EDTA 空白纸片抑菌圈有明显扩大者或滴加 EDTA 的 IPM 纸片的抑菌环直径大于 4 mm 则为产金属酶株。

1.5 PCR 和 DNA 测序 按照文献[3]报道的序列和方法,针对已知的 11 种碳青霉烯酶基因合成引物进行 PCR 检测。产物经纯化回收后送上海英俊生物科技公司进行基因测序,测序结果在 NCBI 网上进行 Blast 比对分析。

2 结 果

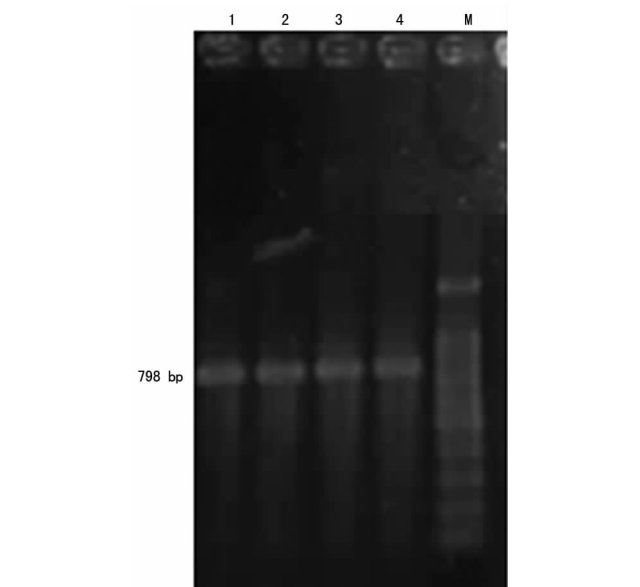
2.1 菌株药敏试验结果 151 株肺炎克雷伯菌的药敏情况见表 1。共有超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)阳性菌 93 株,ESBL 阴性菌 58 株,产 ESBL 的阳性率为 62%。药敏分析表明,产 ESBL 株对青霉素类、第一和第三代头孢菌素类高度耐药,耐药率均高于 90%(第三代头孢替坦除外,为 19%),但对第四代头孢耐药率为 77%;对单环类的氨曲南耐药率高达 100%,而对喹诺酮类、磺胺类药物耐药性也较高,为 70%左右;对加酶抑制剂复合药氨苄西林/舒巴坦的耐药率也高达 94%,而对头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦的耐药率分别为 37%和 30%;产 ESBL 对亚胺培南高度敏感,敏感度为 99%,对厄他培南的敏感率为 78%。在 2009~2012 年收集到的 71 株菌中,产 ESBL 株有 47 株,美洛培南的敏感率为 87%,非产 ESBL 株有 24 株,美罗培南的敏感率为 96%。本研究显示,除厄他培南、亚胺培南、美罗培南和左旋氧氟沙星外,产 ESBL 株均比非产 ESBL 株的耐药性高。

表 1 151 株肺炎克雷伯菌耐药性分析(%)						
药物	ESBL 阳性			ESBL 阴性		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
氨苄西林	98	0	2	98	0	2
氨苄西林/舒巴坦	94	1	5	81	4	15
头孢哌酮/舒巴坦	37	27	36	28	28	46
哌拉西林/他唑巴坦	30	37	33	29	24	47
丁胺卡那霉素	27	0	73	22	2	76
氨曲南	100	0	0	33	3	64
环丙沙星	72	2	26	57	2	41
头孢曲松	97	2	1	31	9	60
头孢唑啉	98	0	2	69	0	31
头孢替坦	19	11	70	34	7	59
厄他培南	8	14	78	24	3	73
亚胺培南	1	0	99	21	0	79
头孢吡肟	77	3	20	22	0	78
呋喃妥因	63	26	11	64	22	14
庆大霉素	60	10	30	48	0	52
左氧氟沙星	59	0	41	60	0	40
复方磺胺甲噁唑	75	0	25	66	0	34
头孢他啶	92	1	7	43	9	48
妥布霉素	41	23	36	29	24	47

2.2 改良 Hodge 试验和金属酶试验结果 在 151 株肺炎克雷伯菌中,Hodge 试验阳性的有 12 株,占 7.9%,这些菌株可能产碳青霉烯酶;阴性的有 139 株,占 92%,阴阳性对照见图

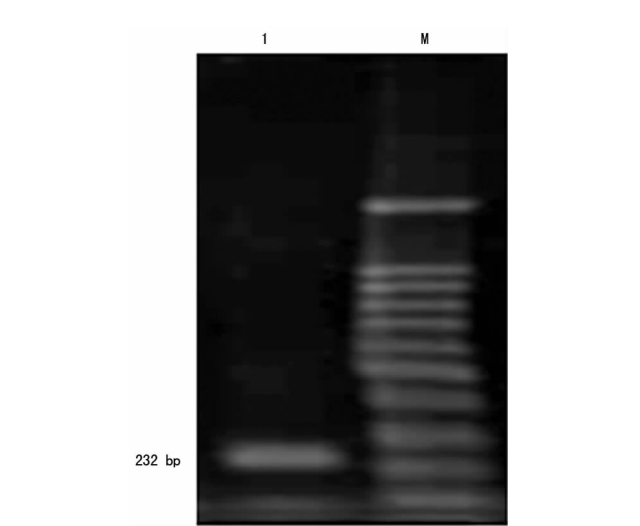
1,且在该 12 株菌中,双纸片协同试验和组合纸片法同时为阳性的细菌有 1 株,说明该菌株可能产金属酶。

2.3 PCR 电泳结果及测序 12 株 Hodge 试验阳性结果经 PCR 扩增后有 5 株确证为产碳青霉烯酶菌株,其中有 4 株为 KPC 型,其阳性率为 2.6%,1 株为 IMP 型,阳性率为 0.7%。该 5 株菌的 PCR 产物电泳结果见图 1 和图 2。PCR 产物测序的结果表明,4 株产 KPC 型菌株均携带 KPC-2 基因亚型,而 1 株产 IMP 型菌株携带 IMP-4 基因亚型。



注:1~4 为含 KPC 基因的菌株;M 为 DNA Marker。

图 1 KPC 基因 PCR 结果



注:1 为含 IMP 基因的菌株;M 为 DNA Marker。

图 2 IMP 基因 PCR 结果

3 讨 论

近年来由于抗菌药物的滥用,尤其是 β -内酰胺类抗菌药物,以致产 ESBL 的肺炎克雷伯菌对多种抗菌药物的耐药性上升,如碳青霉烯类抗菌药物在临床上使用的增加,对碳青霉烯类抗菌药物耐药的菌株被越来越多的报道。碳青霉烯类药物对质粒介导的 ESBL、染色体及质粒介导的头孢菌素酶(AmpC)高度稳定,但其也可被金属 β -内酰胺酶水解灭活,造成碳青霉烯类抗菌药物耐药。而本研究的药敏结果显示,经 PCR 确证试验为产碳青霉烯酶的 5 株菌中,4 株 KPC 型的厄他培南、亚胺培南和美洛培南的耐药率均为 100%,其 ESBL

也均为阳性,而 1 株 IMP 型的厄他培南、亚胺培南和美洛培南的敏感率均为 100%,且 ESBL 为阴性,这 5 株菌对其他常用抗菌药物均高度耐药,由资料可推测,产 KPC 酶可能是本院的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制,文献报道 KPC-2 型的肺炎克雷伯菌在我国广泛存在,但产金属酶的报导相对较少^[3-4]。而本研究所检测到的 5 株耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌中,KPC-2 型的有 4 株,占 80%,IMP-4 型的有 1 株,仅占 20%,这一结果也与该报导相一致。由于本研究先用改良 Hodge 试验筛选出产碳青霉烯酶的耐药株,而改良 Hodge 试验是美国临床实验室标准化委员会(CLSI)推荐的碳青霉烯酶表型检测方法,有研究结果显示,改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶的敏感度为 100%,特异度为 79%,阳性预测值为 70%,阴性预测值为 100%,准确率为 86%^[5]。另外,也有研究表明,改良 Hodge 试验常用来证实是否产 KPC,其灵敏度和特异度均为 100%^[6]。对于本研究的 151 株肺炎克雷伯菌中,改良 Hodge 试验阳性菌有 12 株,但最终经 PCR 确证为产碳青霉烯酶的菌株只有 5 株,并且其中 1 株经双纸片协同试验和组合纸片法筛选金属酶时,两个试验同时为阳性且为 IMP-4 型,其他菌株以上 3 个试验均为阴性。由以上数据可推测改良 Hodge 试验筛选产碳青霉烯酶的耐药株存在一定的假阳性,又或者由于碳青霉烯酶种类很多^[3],PCR 扩增是未能完全涵盖,未能完全排除其他未检测到的碳青霉烯酶引起耐药机制存在。另外,当酶的量极少时也可以造成结果的假阴性,易造成漏检。

对产碳青霉烯酶菌株引起的感染治疗起来比较困难,需要根据药敏结果综合分析选用适合的抗菌药物。部分病例需使用多黏菌素,产酶株体外即使对碳青霉烯类抗菌药物敏感,也不宜应用碳青霉烯类抗菌药物^[7]。还要提高耐药株的检出率,加强实验室的管理。另外,还要避免院内感染的暴发流行。在

防止细菌流行的同时,还必须高度重视质粒的流行,警惕耐药基因在不同属、种细菌之间或是同一菌种的不同生物型、血清型之间传播。

参考文献

- [1] 洪秀华,刘运德.临床微生物学检验[M].2 版.北京:中国医药科技出版社,2010:318-320.
- [2] 苏丹虹,沈苹,杜小幸,等.肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌产 KPC 酶的检测研究[J].中国抗生素杂志,2009,11(34):684-687.
- [3] Poirel L, Walsh TR, Cu villier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1):119-123.
- [4] 黄支密,糜家睿,盛以泉,等.携带 blaKPC2 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌院内感染暴发的病原学分析[J].中华流行病学杂志,2010,31(5):559-562.
- [5] 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.
- [6] Anderson KF, Lons way 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.
- [7] 俞云松.细菌 β -内酰胺酶检测的临床意义[J].中华结核和呼吸杂志,2008,31(6):475-477.

(收稿日期:2016-09-11 修回日期:2016-10-29)

(上接第 3422 页)

中招募献血志愿者。

为消除不同检测试剂对不同人群 NAT 阳性率差异的影响,作者针对两种 NAT 试剂各自筛查出的 NAT 阳性献血者,依照不同性别、年龄、职业做了单独分析比较,发现罗氏试剂的结果分析与表 3 结果一致;科华试剂在献血者不同性别、年龄组的差异,与整体联合分析的结果一致,均为男性献血者 NAT 阳性率高于女性;36~45 岁献血者的 NAT 阳性率最高,18~<25 岁献血者的 NAT 阳性率最低,但在职业分布上,以技术人员阳性率最高,其次为农民,估计与科华试剂检出的阳性标本数较少,而职业分类较多,受检测样本量的影响较大有关。

综上所述,通过对献血者的标本实施 NAT,能使输血感染相关病毒的风险降到最低,极大程度地保障血液安全;另外从以上数据的统计分析可以看出:郑州地区献血者人群的人口学特征是,45 岁以下占主体、男性为主、其他职业人群为主,女性、18~<25 岁及公务员、医务工作者、学生的 NAT 阳性率较低,这为有针对地动员更多女性和年轻的献血者参加献血,及时调整招募策略,以及采取措施鼓励更多献血者重复献血,提供了一定的参考数据。

参考文献

- [1] Sachs UJ. Recent insights into the mechanism of transfusion-related acute lung injury[J]. Curr Opin Hematol,

2011,18(6):436-442.

- [2] 任芙蓉,王憬惺,赵海燕,等.我国 5 城市合格献血者血液 HIV 及 HCV 残余风险研究[J].中国输血杂志,2007,20(6):469-475.
- [3] 张龙穆,冯秋霞,杨忠思,等.核酸检测对 HIV 筛查的影响[J].临床输血与检验,2015,17(3):249-251.
- [4] 冯秋霞,侯云,刘丽,等.1 遍 ELISA+1 遍 NAT 血液筛查模式的应用研究[J].中国输血杂志,2014,27(9):920-922.
- [5] 涂东晋,赵亮,林授,等.福州地区献血者人群隐匿性乙型肝炎病毒感染及其基因型与 S 区突变的研究[J].中国输血杂志,2015,28(5):523-527.
- [6] Satake M, Taira R, Yugi H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program[J]. Transfusion, 2007, 47(7):1197-1205.
- [7] 王芳,栾燕,刘显智.核酸检测技术(NAT)在献血者人类免疫缺陷病毒筛查中的应用[J].中国输血杂志,2010,23(10):892-894.
- [8] 李俊英,王艺芳,葛文超,等.2 种核酸筛查系统应用于病毒核酸检测的比较[J].中国输血杂志,2015,28(6):720-723.

(收稿日期:2016-09-01 修回日期:2016-10-20)