

暴发可能会导致极高的病死率,因此临床上应及时进行监控和干预。虽然本研究检出产 ESBLs 肺炎克雷伯菌株只有 1 株,但随着抗菌药物的广泛应用,临床上检出产 ESBLs 的细菌呈逐年上升趋势的情况不容忽视。

## 参考文献

[1] 吴华,周晓君,李天娇,等. 2016 年海南省高毒力肺炎克雷伯菌的临床分布、毒力基因和分子流行病学特点[J]. 中国感染控制杂志,2018,17(1):10-15.

[2] 邱炳峰,王选,池丹,等. K1 型肺炎克雷伯菌毒力基因及分子分型研究[J]. 浙江预防医学,2015,27(12):1244-1246.

[3] 林敏,黄式文,李志方,等. 肺炎克雷伯菌产 ESBLs 的检测与耐药情况分析[J]. 热带医学杂志,2016,16(4):514-516.

[4] TURTON J F, PERRY C, ELGOHARI S, et al. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets[J]. J Med Microbiol, 2010,59(5):541-547.

[5] SHON A S, BAJWA R P, RUSSO T A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed [J]. Virulence, 2013,4(1):107-118.

[6] 邱世洁,余广超,温旺荣. 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展[J]. 国外医药(抗菌药物分册),2018,39(2):129-134.

[7] PAN Y J, LIN T L, CHEN C T, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp[J]. Sci Rep, 2015, 23(5): 15573-15590.

[8] 魏丹丹,万腊根,刘洋. 强毒性血清型肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 重庆医学,2016,45(11):1558-1560.

[9] FUNG C P, CHANG F Y, LEE S C, et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis[J]. Gut, 2002,50(3):420-424.

[10] KIM Y J, KIM S I, KIM Y R, et al. Virulence factors and clinical patterns of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine[J]. Infect Dis, 2017, 49(3): 178-184.

(收稿日期:2019-12-24 修回日期:2020-02-06)

## • 短篇论著 •

# 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析\*

宋 静<sup>1</sup>, 戎建荣<sup>2△</sup>

(1. 山西医科大学, 山西太原 030051; 2. 山西大医院检验科, 山西太原 030032)

**摘要:**目的 研究山西大医院碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)分离株的临床分布,主要耐药表型和耐药基因,评估 CRKP 菌株在改良碳青霉烯类灭活实验(mCIM)中的诊断能力。**方法** 以 41 株 CRKP 菌株为研究对象,采用 VITEK-2 全自动微生物分析仪进行鉴定和药敏试验。使用 mCIM 进行产酶菌株筛选。使用 PCR 方法检测 KPC、NDM 等基因。**结果** 41 株临床分离株主要来自重症医学科,占 24.39%。标本类型主要为痰标本,占 31.71%。41 株对 90% 以上的常用药物具有耐药性,其中 40 株携带 KPC 基因,1 株携带 KPC 和 NDM 基因,1 株携带 NDM 基因。mCIM 可以准确的检测出碳青霉烯酶。**结论** KPC 型碳青霉烯酶是临床分离的 CRKP 株中的主要酶,通过使用 mCIM 可以有效地发现产生耐碳青霉烯酶的菌株。

**关键词:**肺炎克雷伯菌; 改良碳青霉烯类灭活实验; 碳青霉烯类抗菌药物

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.025

**中图法分类号:**R446.5

**文章编号:**1673-4130(2020)10-1250-04

**文献标识码:**B

肺炎克雷伯菌是一种常见的肠杆菌科细菌,可引起医院感染,是一种条件性病原体。当身体的免疫功能下降时,细菌会在肺部、泌尿道等许多部位引起感染<sup>[1]</sup>。碳青霉烯类抗菌药物作为临床治疗肠杆菌科细菌引起感染的重要药物,近年来,随着这些药物的广泛使用,碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)已经出现在世界各地,检出量逐年上升,引起医疗界的

广泛关注<sup>[2]</sup>。

本研究以山西大医院临床分离的 CRKP 菌株为研究对象,探讨其临床分布及耐药性。为临床针对不同酶型用药,控制产酶菌株提供理论依据。同时,采用 2017 年美国临床和实验室标准协会推荐的改良碳青霉烯类灭活实验(mCIM)对碳青霉烯酶进行筛选<sup>[3]</sup>,并探讨其在检测 CRKP 中的应用价值。

\* 基金项目:山西省应用基础研究项目(201601D011116)。

△ 通信作者, E-mail:13593181596@163.com。

本文引用格式:宋静,戎建荣. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10): 1250-1253.

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2018 年 1 月至 2019 年 1 月山西大医院微生物实验室检出的 41 株 CRKP,排除同一患者重复分离的菌株。质量控制菌株 ATCC 25922、ATCC 1705、ATCC 1706。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及药敏试验 使用法国 VITEK-2 自动微生物分析仪进行鉴定及药敏实验,参照美国临床和实验室标准协会最新参考标准判断折点;纸片扩散法用于药敏试验结果的补充。

1.2.2 mCIM 根据美国临床和实验室标准协会 M100-S27 文件推荐方法<sup>[3]</sup>,取过夜培养纯菌落 1 μL 接种环满环,置于 2 mL TSB 培养基中,并充分摇动。将 10 μg 美罗培南纸片浸入细菌悬浮液中,并在大气条件下于(35±2)℃温育(4±0.25)h。在温育快要结束时,制备大肠杆菌 ATCC 25922 悬浮液(0.5 麦氏浊度)并在 M-H 琼脂平板上均匀涂布。将过量药敏纸片上的细菌溶液挤出并用无菌镊子贴在上述 M-H 琼脂平板上,在 35℃下孵育 18~24 h 以测量抑菌圈的直径。

1.2.3 基因检测 加热煮沸法制备 DNA 模板,PCR 扩增 KPC、GES、IMP-1、GIM<sup>[4]</sup>、NDM、VIM、SPM、OXA-48<sup>[5]</sup> 基因序列。放置在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳,观察 UV 灯下的 PCR 产物。见表 1。

表 1 耐药基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	引物长度 (bp)
KPC	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	893
	TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC	
GES	GTT TTG CAA TGT GCT CAA CG	371
	TGC CAT AGC AAT AGG CGT AG	
IMP-1	TGA GCA AGT TAT CTG TAT TC	740
	TTA GTT GCT TGG TTT TGA TG	
GIM	AGA ACC TTG ACC GAA CGC AG	748
	ACT CAT GAC TCC TCA CGA GG	
NDM	GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	621
	CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC	
VIM	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390
	CGA ATG CGC AGC ACC AG	
SPM	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG	271
	ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	

1.2.4 DNA 测序 PCR 产物由北京赛默飞公司完成测序,根据所测序列与 GenBank 中 BLAST 程序中的序列比对。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学分析,计数资料采用百分比表示。

2 结果

2.1 标本来源 分离出 41 株 CPKP 菌株,其中 13

株来源于痰标本,占 31.71%,见表 2。

表 2 41 株 CPKP 菌株的来源和比例

标本类型	n	比例(%)
痰	13	31.71
尿	8	19.51
血	8	19.51
分泌物	5	12.20
脓液	2	4.88
静脉导管	2	4.88
便	1	2.44
引流液	1	2.44
关节液	1	2.44

2.2 科室分布 重症医学科构成比较高,占 24.39%,其次为普通外科,占 21.95%。不同科室 CRKP 的分布,见表 3。

表 3 CPKP 菌株的分布及比例

科室	n	比例(%)
重症医学科	10	24.39
普通外科	9	21.95
康复医学科	6	14.63
神经外科	5	12.20
骨科	2	4.88
老年医学科	2	4.88
介入治疗科	1	2.44
泌尿外科	1	2.44
全科医学科	1	2.44
肾内科	1	2.44
血液内科	1	2.44
医疗美容科	1	2.44
血管外科	1	2.44

2.3 CPKP 菌株的药敏分析 41 株 CRKP 分离株对常用药物的耐药性均在 90% 以上。对氨基糖苷类药物庆大霉素、头孢菌素类(3 代、4 代)抗菌药物,青霉素或 3 代头孢菌素和酶抑制剂(阿莫西林/棒酸、哌拉西林/他唑巴坦)的组合显示出更高的耐药率,替加环素显示出较低的耐药率,见表 4。

表 4 CPKP 菌株的药敏分析

抗菌药物	n	耐药率(%)
氨苄西林	41	100.0
阿莫西林/棒酸	40	95.0
哌拉西林/他唑巴坦	37	88.0
头胞唑林	41	100.0
头孢西丁	41	100.0
头孢曲松	41	100.0
头孢匹美	38	93.0

续表 4 CPKP 菌株的药敏分析

抗菌药物	n	耐药率(%)
氨曲南	40	98.0
厄他培南	41	100.0
亚胺培南	37	90.0
阿米卡星	23	56.0
庆大霉素	30	73.0
妥布霉素	30	73.0
环丙沙星	39	95.0
左氧氟沙星	38	93.0
替加环素	4	10.0
呋喃妥因	40	98.0
复方磺胺甲噁唑	22	54.0

**2.4 表型实验与分子学方法比较** 应用统计软件 SPSS17.0 与 PCR 检测方法行一致性检验,  $Kappa = 0.48$ , 一致性程度尚可, 灵敏度 95%、特异度 100%。

**2.5 基因检测** 41 株产碳青霉烯酶菌株进行测序, 40 株携带 KPC 基因。其中, 1 株菌同时携带 KPC 和 NDM 基因, 1 株携带 NDM 基因, 剩余耐药基因为阴性。

3 讨 论

本研究显示, 分离的 CRKP 主要来源于重症医学科(24.39%)和普通外科(21.95%), 标本类型主要为痰(31.71%)、尿液(19.51%)和血液(19.51%), 可能与该科室中患者存在基础疾病重、住院时间长, 抗菌药物使用不规范、常进行侵入性诊疗等有关<sup>[6-7]</sup>。因此, 对于此类科室, 应该严格落实医院感染控制相关措施, 积极隔离 CRKP 感染的患者, 尽可能阻断交叉传播途径, 以降低 CRKP 的感染率。

CRKP 治疗临床感染的主要原因是碳青霉烯酶的产生<sup>[8-10]</sup>。根据分子结构, 可以分为 A 类、B 类和 D 类。A 类, 最常见的是 KPC 型, 是丝氨酸酶; B 类以 NDM、VIM 及 IMP 型更常见, 发挥活性需要金属离子参与; D 类碳青霉烯酶为 OXA-23, OXA-48 型等。在本研究中, mCIM 测定法用于检测耐药菌株是否产生碳青霉烯酶, 检测灵敏度 95%, 特异度 100%, 灵敏度低的原因可能为同时合并产 AmpC 酶、外排泵的高表达等其他耐药机制<sup>[11]</sup>。KPC 型为主要的酶类型, 且这类菌株往往表现出高水平耐药, 可选择药物较少, 因此一旦出现这类细菌, 临床将会面对一个非常棘手的问题。此外, 编码 KPC 型酶的编码基因常常通过质粒介导, 因此很容易在不同种属细菌之间进行转移和传播<sup>[12]</sup>。同时, 还有 1 株菌株同时携带 KPC 和 NDM 基因, 1 株菌株携带 NDM 型, 这类菌株对多黏菌素和替加环素以外的抗菌药物具有泛耐药特

性<sup>[13]</sup>, 也应该引起临床足够的重视。

总之, 本院 CRKP 的耐药率超过 90%, 主要集中在重症监护病房。KPC 型的碳青霉烯酶的产生是 CRKP 耐药的主要原因, 需引起医务人员的关注。mCIM 作为筛选碳青霉烯酶表型方法, 可以准确、及时地用于产酶菌株的筛选, 为临床医生进行个体化治疗提供依据, 同时协助医院感控部门控制 CRKP 的传播及暴发。

参考文献

[1] 谭云昌, 姚文丽, 宋江勤. 下呼吸道革兰阴性杆菌感染及耐药倾向分析[J]. 中国医刊, 2013, 48(2): 58-60.

[2] HUDSON C M, BENT Z W, MEAGHER R J, et al. Resistance determinants and Mobile genetic elements of an NDM-1-encoding Klebsiella pneumoniae strain[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99209.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S27[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2017.

[4] BRADFORD P A, BRATU S, URBAN C, et al. Emergence of carbapenem-resistant Klebsiella species possessing the class a carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York city [J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(1): 55-60.

[5] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.

[6] 豆清娅, 邹明祥, 李春辉, 等. 耐亚胺培南肺炎克雷伯菌的耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(13): 2906-2909.

[7] 林琳, 王军, 胡志军, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染的临床危险因素分析[J]. 重庆医学, 2018, 47(2): 236-239.

[8] CHENG L, CAO X L, ZHANG Z F, et al. Clonal dissemination of KPC-2 producing Klebsiella pneumoniae ST11 clone with high prevalence of oqxAB and rmtB in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2016, 15(1): 18-21.

[9] POIRCL L, WALSH R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.

[10] 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.

[11] GOODMAN K E, SIMNER P J, TAMMA P D, et al. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)[J]. Expert Rev Infect Ther, 2016, 14(1): 95-108.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-

S20[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010.

[13] WANG J, WANG M, HUANG Y, et al. Colonization pressure adjusted by degree of environmental contamination: a better indicator for predicting methicillin-resistant

staphylococcus aureus acquisition [J]. Am J Infect Control, 2011, 39(9): 763-769.

(收稿日期: 2019-11-29 修回日期: 2020-02-20)

• 短篇论著 •

## 多种分子检测方法在精确诊断 2 例罕见 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血中的应用\*

姚翠泽, 王继成, 秦丹卿, 杜丽, 刘玲, 袁腾龙, 梁杰, 黄华洁<sup>△</sup>

(广东省妇幼保健院医学遗传中心, 广东广州 511442)

**摘要:**目的 分析多种分子检测方法在精确诊断罕见  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血中的应用, 探讨其对预防珠蛋白生成障碍性贫血出生缺陷的重要性。方法 对 2 例外周血标本进行血红蛋白毛细管电泳和红细胞参数的分析, 再应用跨越断裂点 PCR、PCR 结合反向点杂交、多重连接依赖性探针扩增、珠蛋白基因测序及染色体微阵列等多种方法鉴定此病例的  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血基因突变类型。结果 检测到 2 例病例均为罕见的缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血。1 例为  $\alpha$ -珠蛋白基因簇调控位点 HS-40 区域至  $\zeta$  珠蛋白基因上游区域杂合缺失, 导致 2 个  $\alpha$ -珠蛋白基因无法正常表达; 另 1 例缺失大小为 27.6 kb 合并常见的东南亚型的双重缺失突变。结论 此类罕见缺失型的  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血合并最常见东南亚缺失类型时, 可引起中重型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血患儿的出生。对罕见  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血的精确分子诊断可为遗传咨询和产前诊断提供重要的指导意义, 对预防中重型珠蛋白生成障碍性贫血出生缺陷至关重要。

**关键词:** 罕见缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血; 分子诊断; 精确诊断; 预防出生缺陷

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.026

**中图法分类号:** R556.6

**文章编号:** 1673-4130(2020)10-1253-04

**文献标识码:** B

珠蛋白生成障碍性贫血常见于我国南方地区, 是一类因珠蛋白合成障碍所致的遗传性溶血性疾病, 主要分为  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血和  $\beta$ -珠蛋白生成障碍性贫血两类。 $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血的分子基础是  $\alpha 2$  或  $\alpha 1$  珠蛋白基因发生缺失或点突变致使  $\alpha$ -珠蛋白产量下降, 其中缺失型约占 80%~90%<sup>[1-2]</sup>。其缺失范围从几 kb 到整个  $\alpha$ -珠蛋白基因簇及上游调控区域的缺失。中国人群中的缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血主要为 —<sup>SEA</sup>、— $\alpha^{3.7}$ 、— $\alpha^{4.2}$  三种常见类型<sup>[3]</sup>。目前, 常见的珠蛋白生成障碍性贫血缺失类型出生缺陷防控工作效果显著, 但值得注意的是, 近年来, 我国陆续有多种罕见缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血的研究报道<sup>[4-5]</sup>。这些罕见缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血如果合并其他常见的  $\alpha$ -珠蛋白基因突变可导致中重型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血, 所以在珠蛋白生成障碍性贫血高危地区人群中, 重视此类罕见珠蛋白生成障碍性贫血的筛查和检测对更全面地预防珠蛋白生成障碍性贫血出生缺陷工作尤为重要。目前国内临床实验室使用跨越断裂点 PCR 技术的商业

化试剂盒只能检测上述中国人 3 种常见缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血, 对于罕见缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血的基因检测还需要多种分子检测方法的应用。本研究通过对 2 例不同类型的罕见缺失型  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血病例的基因检测, 为多种分子检测方法在精确诊断罕见  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血中的应用提供新的思路, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2 例均就诊于本院产前诊断科。病例 1: 男, 24 岁, 血液学表现异常, 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测未见异常。其配偶孕 21<sup>+</sup> 周, 常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测为 —<sup>SEA</sup>/ $\alpha\alpha$ , 胎儿超声诊断为胎儿水肿综合征。病例 2: 女, 28 岁, 孕 29<sup>+</sup> 周, 孕期顺利, 无输血史。常规珠蛋白生成障碍性贫血基因检测为 —<sup>SEA</sup> 纯合突变, 与血液学表现不一致。

### 1.2 方法

**1.2.1 血液学表型分析** 乙二胺四乙酸抗凝管采集所有病例外周血 2 mL, 使用迈瑞 2000 全自动血液分

\* 基金项目: 广东省医学科研基金项目(B2019150)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: elva\_hhj811@163.com。

本文引用格式: 姚翠泽, 王继成, 秦丹卿, 等. 多种分子检测方法在精确诊断 2 例罕见  $\alpha$ -珠蛋白生成障碍性贫血中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10): 1253-1256.