

• 论 著 •

应用实时荧光 PCR 快速检测血培养标本中的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌^{*}

李 媛¹, 熊 樱¹, 易佰城¹, 陈国金¹, 彭 莎¹, 孙怀超¹, 杨友华¹, 何 超^{2△}

1. 四川省德阳市绵竹市人民医院检验科, 四川德阳 618200; 2. 四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041

摘 要:目的 应用实时荧光 PCR(RT-PCR) 技术进行血培养标本中耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的快速检测。方法 挑取细菌纯菌落配制成菌悬液, 吸取菌悬液分别加入血培养瓶制备梯度细菌浓度的模拟血培养标本, 放入血培养仪孵育, 分别提取仪器报阳培养液中的细菌 DNA。应用 RT-PCR 技术扩增和检测肺炎克雷伯菌 Khe 基因和 4 种碳青霉烯酶基因(KPC、NDM、VIM、IMP)。进行灵敏度试验、特异度试验和重复性试验。结果 使用 RT-PCR 方法检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 18 株和非肺炎克雷伯菌 30 株, 试验特异度为 100% (48/48), 最低检测限为 0.5 cfu/mL, 3 次重复试验结果一致。从 18 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分离株中检出 7 株(38.9%)携带 KPC 酶基因, 9 株(50.0%)携带 NDM 酶基因, 1 株(5.6%)同时携带 KPC 酶基因和 NDM 酶基因。结论 应用 RT-PCR 技术可快速检测血培养标本中的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌, 为该类药物相关血流感染的早期诊治提供依据。

关键词:肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 实时荧光 PCR; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.006

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)08-0921-04

文献标志码:A

Rapid detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in blood culture by real-time PCR^{*}

LI Yuan¹, XIONG Ying¹, YI Baicheng¹, CHEN Guojin¹, PENG Sha¹, SUN Huaichao¹,
YANG Youhua¹, HE Chao^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Mianzhu People's Hospital, Deyang, Sichuan 618200, China; 2. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To discuss the rapid detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (K. pneumoniae) in blood culture samples by Real-time PCR(RT-PCR). **Methods** Pure bacterial colonies were selected and prepared into bacterial suspension, and the bacterial liquid was added into the blood culture bottle respectively to prepare simulated blood culture samples with gradient bacterial concentration, which were then put into the blood culture instrument for incubation, and the bacterial DNA in the positive culture medium was extracted. The Khe gene of K. pneumoniae and four kinds of carbapenemases genes (KPC, NDM, VIM, IMP) were amplified and detected by RT-PCR. Sensitivity, specificity and repeatability test were performed. **Results** Eighteen K. pneumoniae isolates and thirty non-K. pneumoniae isolates were detected by RT-PCR. The specificity of the method was 100% (48/48) and the lowest limit of detection was 0.5 cfu/mL. The results of three replicate tests were consistent. Among 18 isolates of carbapenem-resistant K. pneumoniae, 7 strains (38.9%) carried KPC gene, 9 strains (50.0%) carry NDM gene, and one strain (5.6%) carried KPC and NDM enzyme genes at the same time. **Conclusion** RT-PCR can be used to rapidly detect carbapenem-resistant K. pneumoniae in blood culture samples and provide a basis for the early diagnosis and treatment of blood stream infections caused by this kind of bacteria.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase; Real-time PCR; rapid detection

近年来, 由于碳青霉烯类药物的广泛使用, 肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物的耐药率逐渐升高, 给临床治疗带来严峻挑战^[1-3]。血流感染是一种严重的全

身感染性疾病, 患者住院时间长, 病死率高, 应尽快精

^{*} 基金项目: 四川省医学会青年创新课题(No. Q18060)。

作者简介: 李媛, 女, 主管技师, 主要从事微生物检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail: hc_wsw@126.com。

本文引用格式: 李媛, 熊樱, 易佰城, 等. 应用实时荧光 PCR 快速检测血培养标本中的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(8): 921-924.

准治疗以改善患者预后。以往耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)血流感染的实验室诊断主要依赖于血培养技术,该技术操作流程主要涉及样本孵育、仪器报阳后转种、菌株分离鉴定以及体外药敏试验,从血培养仪器报阳到出具药敏报告往往需要 2~3 d,不能尽早指导临床治疗。因此,缩短 CRKP 的实验室检测时间,为 CRKP 相关血流感染提供早期快速的诊断依据,以改善患者临床结局,具有非常重要的临床价值。本研究旨在应用实时荧光 PCR(RT-PCR)技术快速检测血培养标本中的肺炎克雷伯菌并进行耐药基因筛查,为 CRKP 相关血流感染提供早期诊治依据,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 标准菌株:肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705(碳青霉烯类耐药株)和肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1706(碳青霉烯类敏感株)购自成都好映象科技有限公司。临床分离株:18 株 CRKP 和 30 株非肺炎克雷伯菌(蜂房哈夫尼亚菌 2 株,植生拉乌尔菌 3 株,解鸟氨酸拉乌尔菌 1 株,产酸克雷伯菌 2 株,沙门菌属 1 株,丙型副伤寒沙门菌 1 株,洋葱伯克霍尔德菌 1 株,奇异变形杆菌 2 株,普通变形杆菌 1 株,铜绿假单胞菌 4 株,大肠埃希菌 4 株,阴沟肠杆菌 2 株,产气肠杆菌 1 株,摩根摩根菌 1 株,雷氏普罗威登斯菌 1 株,嗜麦芽窄食单胞菌 2 株,鲍曼不动杆菌 1 株)为绵竹市人民医院检验科(以下简称“本实验室”)于 2018 年 3 月至 2019 年 7 月从临床标本中分离的菌株。耐药基因阳性对照菌株 DNA 来自四川大学华西医院实验医学科,均已测序验证。

1.2 仪器与试剂 细菌 DNA 提取试剂盒和荧光定量 PCR 反应试剂盒(TaKaRa 宝生物)。SLAN-96P 实时荧光定量 PCR 仪(上海宏石),KDC-140HR 高速冷冻离心机(中科中佳),BACT/ALERT3D 全自动血培养仪(法国生物梅里埃)等。

1.3 方法

1.3.1 血培养中肺炎克雷伯菌的快速检测

1.3.1.1 细菌 DNA 的提取 挑取平板上纯菌落,用 0.85% 的 NaCl 溶液配制成 0.5 MCF 的菌悬液(相当于 1.0×10^8 cfu/mL 含菌量),再依次稀释成浓度为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 和 0.1 cfu/mL 的菌悬液,取不同浓度菌悬液分别注入血培养瓶,摇匀后放入血培养仪,仪器报阳后,按照差速离心法^[4](用无菌注射器抽取报阳的血培养瓶中标本 4.0 mL,加入 6.0 mL 无菌生理盐水,混匀,180×g 低速离心 10 min;取 3 mL 上清液转至新的无菌管中,以 14 170×g 离心 2 min;弃上清液,加入 1.0 mL 无菌生理盐水混匀,以 14 170×g 离心 1 min;弃上清液,加入 1.0 mL 无菌生理盐水混匀,以 14 170×g 离心 2 min;弃上清液,菌悬液沉淀用于 DNA 提取备用)将菌悬液浓缩,根据细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌 DNA,置

-20℃ 保存待用。

1.3.1.2 引物合成 肺炎克雷伯菌 Khe 基因引物和探针序列如下^[5]:正向引物 KheF, 5'-TGGGGATC-CACCACGA-3';反向引物 KheR, 5'-AGAGATAGC-CGTTTATCCACAC-3';探针 KheTmp, 5'-6FAM-GAGGAAGAGTTCATCTACGTGCTGGAGG-BHQ1-3',由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3.1.3 Khe 基因 RT-PCR 体系 在 25 μL 反应体系中,加入 1×Premix Ex Taq(Probe qPCR)12.5 μL,正向和反向引物(0.2 μmol/L)各 0.5 μL,探针(0.2 μmol/L)0.5 μL,DNA 模板 2 μL,灭菌水 9 μL。肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705、ATCC BAA 1706 为反应体系的内部质控。PCR 反应条件:95℃ 预变性 30 s,1 个循环;94℃ 变性 10 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环。退火阶段检测荧光(FAM 通道),随后使用上海宏石 96P 软件进行分析得到循环阈值(CT 值),以 CT 值≤35 判定为阳性。

1.3.1.4 灵敏度试验 转种复苏肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705 和 ATCC BAA1706,用 1.3.1.1 方法提取细菌 DNA,用 1.3.1.3 扩增体系进行荧光 PCR 检测,测定其最低检测限值。

1.3.1.5 特异度试验 将本实验室收集的 18 株 CRKP 和 30 株非肺炎克雷伯菌进行转种复苏,按照 1.3.1.1 模拟血培养报阳,提取细菌 DNA,按照 1.3.1.3 进行荧光 PCR 检测。

1.3.1.6 重复性试验 按照 1.3.1.4 和 1.3.1.5 进行 3 次重复试验。

1.3.2 耐药基因的快速筛查

1.3.2.1 多重 RT-PCR 体系 取肺炎克雷伯菌标准菌株和耐药基因阳性对照菌株 DNA,用多重 PCR 方法扩增 KPC、NDM、VIM、IMP 4 种耐药基因,引物序列见表 1^[6]。使用两个多重 RT-PCR 反应体系:一个用于检测 KPC 和 NDM,另一个用于检测 VIM 和 IMP。加样体系如下:Premix Ex Taq(1×)12.5 μL,引物和探针分别为 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,灭菌水 6 μL(空白对照灭菌水加 8 μL)。肺炎克雷伯菌 16S rRNA 作为每种反应体系的内部质控。扩增体系:95℃ 预变性 30 s,1 个循环;95℃ 变性 10 s,60℃ 退火/延伸 30 s,40 个循环。在退火/延伸阶段采集荧光(FAM 通道收集 KPC/VIM 数据,HEX 通道收集 NDM/IMP 数据;ROX 通道收集内部质控数据),随后使用上海宏石 96P 软件进行分析得到 CT 值,以 CT 值≤35 判定为阳性。

1.3.2.2 CRKP 临床分离株模拟标本的快速检测 使用 1.3.1.1 得到的 18 株 CRKP 临床分离株的血培养模拟标本 DNA 为模板,用 1.3.2.1 方法进行检测。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测血培养中肺炎克雷伯菌 采用 1.3.1 建立的 RT-PCR 体系对肺炎克雷伯菌标准株

模拟血培养报阳标本进行扩增,得到的扩增曲线图见图 1。

表 1 用于碳青霉烯酶基因扩增的引物和探针序列	
引物名称	碱基序列(5'→3')
KPC 正向引物	GGCCGCCGTGCAATAC
KPC 反向引物	GCCGCCCAACTCCTTCA
KPC 探针(FAM)	ATAACGCCGCCCAATTTGT
NDM 正向引物	TGCGGCGCAACACAGCCTGA
NDM 反向引物	TGGCCGGGGCCGGGTAAAA
NDM 探针(HEX)	CGAACCAGCAACCGCGCCCA
VIM 正向引物	GTGCAGTCTCCACGCACTAT
VIM 反向引物	GCCGCCGAAGGACATC
VIM 探针(FAM)	CCGCCGACGGTTCGTCA
IMP 正向引物	ATTTTCATAGTGACAGCACGGGC
IMP 反向引物	CCTTACCGTCTTTTAAAGCAGCTCATTAG
IMP 探针(HEX)	TTCTCAACTCATCCCCACGTATGC
16S 正向引物	TGGAGCATGTGGTTTAATTGCA
16S 反向引物	TGCGGGACTTAACCCAACA
16S 探针(ROX)	CACGAGCTGACGACARCCATGCA

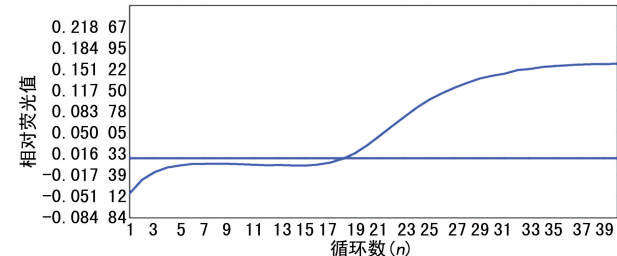


图 1 RT-PCR 检测血培养中肺炎克雷伯菌的曲线图

2.2 灵敏度试验 除 0.1 cfu/mL 的菌液标本外,其余标本均检测到肺炎克雷伯菌,结果显示本研究的最低检测限为 0.5 cfu/mL。

2.3 特异度试验 除肺炎克雷伯菌菌株的模拟标本外,其他非肺炎克雷伯菌菌株的模拟标本均无典型扩增曲线,方法特异度为 100%(48/48)。

2.4 重复性试验 3 次重复试验结果一致,证实该方法有较好的稳定性。

2.5 RT-PCR 快速筛查耐药基因 用 1.3.2.1 建立的 RT-PCR 方法检测肺炎克雷伯菌标准株和耐药基因阳性 DNA 得到的扩增曲线见图 2 和图 3。

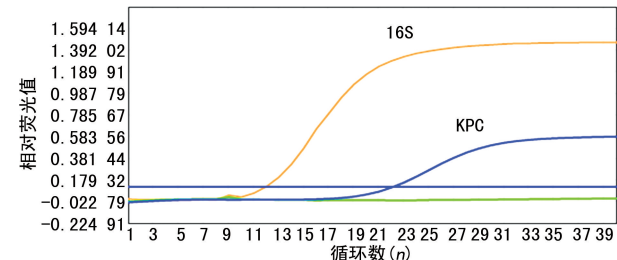


图 2 RT-PCR 检测血培养报阳标本中 KPC 阳性的扩增曲线图

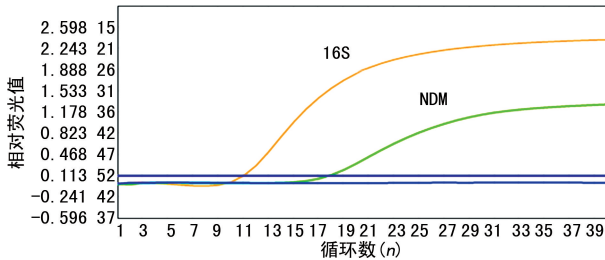


图 3 RT-PCR 检测血培养报阳标本中 NDM 阳性的扩增曲线图

2.6 CRKP 临床分离株模拟标本的检测 18 株 CRKP 检测出 7 株携带 KPC 酶基因[38.9%(7/18)],9 株携带 NDM 酶基因[50.0%(9/18)],1 株同时携带 KPC 酶基因和 NDM 酶基因[5.6%(1/18)],1 株未检测出任何耐药基因[5.6%(1/18)]。

3 讨论

血流感染是常见感染性疾病,往往引起患者住院时间延长,住院费用增加,甚至导致不良预后的发生^[7-8]。有研究表明,医院内感染中血流感染病死率为 35.0%~60.0%,而在重症监护病房中的患者,血流感染病死率为 31.5%~82.4%^[9]。近年来,随着创伤性诊疗技术的开展、广谱抗菌药物的使用等^[10-11],血流感染的发病率较高,而高毒力和多重耐药的肺炎克雷伯菌血流感染更是引起了全球的广泛关注^[12]。2018 年全国细菌耐药监测报告显示,肺炎克雷伯菌在引起血流感染的病原菌中排名第二,仅次于大肠埃希菌^[13]。并且,肺炎克雷伯菌临床分离株对碳青霉烯类药物的耐药率从 2013 年的 4.9% 上升到 2018 年的 10.1%,总体呈现持续上升的趋势^[13]。近年来,在美国、以色列、意大利和希腊等地区其耐药率也急剧上升,可高达 68.0%^[12]。因此,尽早进行病原菌的鉴定和耐药性分析,对该类细菌相关血流感染的临床诊治至关重要。

目前,血流感染的实验室检测主要依赖于血培养,菌株分离鉴定和体外药敏试验花费时间较长,不利于该类疾病的早期诊治。RT-PCR 法作为核酸检测手段之一,具有较高的灵敏度、特异度和稳定性^[14-15]。随着基层医院 PCR 实验室条件的逐步完备,基于该方法的病原学检测技术也适宜于基层医院推广使用。

Khe 基因仅存在于肺炎克雷伯菌中,编码相对分子质量为 19×10³ 的蛋白,可能有溶血素活性,因此可作为鉴定肺炎克雷伯菌的特异性靶标^[5]。本研究利用肺炎克雷伯菌特异性引物和探针建立的 RT-PCR 检测方法,对 18 株 CRKP 和 30 株非肺炎克雷伯菌的检测结果显示,特异度为 100%,最低检测限为 0.5 cfu/mL,并且该方法具有较好的稳定性。

已有报道指出,产碳青霉烯酶是肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制^[16]。实验室进行碳青霉烯酶的检测,可为抗菌药物的选择和精准治

疗提供依据。美国临床实验室标准化协会(CLSI)文件推荐采用改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)检测碳青霉烯酶^[17-18],但该法需要过夜培养,检测时间相对较长。本研究利用 RT-PCR 技术在快速检测血培养标本中肺炎克雷伯菌的同时,进行常见碳青霉烯类耐药基因筛查,不仅可以确定菌株是否含有碳青霉烯酶,还可以对碳青霉烯酶的类型进行鉴别,并且缩短了试验周期,可为 CRKP 相关血流感染的早期精准治疗提供依据。

本研究分析了 18 株本实验室分离的 CRKP 菌株制备的血培养模拟标本,发现 NDM 酶基因的检出率和 KPC 酶基因的检出率分别为 50.0%(9/18)和 38.9%(7/18),提示在绵竹市人民医院产 NDM 酶和 KPC 酶可能是肺炎克雷伯菌耐碳青霉烯类药物的主要机制,但 CRKP 的遗传学来源有待进一步研究证实。有报道显示,产 NDM-1 型 CRKP 曾主要在印度次大陆播散^[16],但近年来产 NDM-1 型 CRKP 在中国多个地区被分离出,如浙江衢州[5.2%(4/76)]^[19]、南昌[2.4%(1/41)]^[20]等。但毕颖敏等^[21]、付玉冰等^[22]报道的上海和唐山地区产 KPC 酶是 CRKP 耐药最主要的机制。另外,本研究中尚有 1 株未检测出 4 种常见的碳青霉烯酶基因,尚待进一步研究其可能的耐药机制。

综上所述,本研究应用 RT-PCR 技术快速检测血培养中 CRKP,该方法快速、灵敏、特异、重复性好,可为该类细菌相关血流感染的早期诊治提供依据,也可在基层医院进行推广应用。

参考文献

- [1] NORDMANN P, DORTET L, POIREL L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! [J]. Trends Mol Med, 2012, 18(5): 263-272.
- [2] LEE C R, LEE J H, PARK K S, et al. Global dissemination of Carbapenemase-Producing klebsiella pneumoniae: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods [J]. Front Microbiol, 2016, 7(895): 12-41.
- [3] 赵晓杰, 邓丽华, 施德仕, 等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学和耐药基因分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(11): 1530-1532.
- [4] 尚军, 李修远, 王丽赞, 等. 优化差速离心法在血培养报警瓶 MALDI-TOF MS 细菌鉴定中的应用 [J]. 临床检验杂志, 2016, 34(12): 913-918.
- [5] WEISS D, GAWLIK D, HOTZEL H, et al. Fast, economic and simultaneous identification of clinically relevant Gram-negative species with multiplex real-time PCR [J]. Future Microbiol, 2019, 14(1): 23-32.
- [6] POLLETT S, MILLER S, HINDLER J, et al. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013 [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(11): 4003-4009.
- [7] KAYE K S, MARCHAIM D, CHEN T Y, et al. Effect of nosocomial bloodstream infections on mortality, length of stay, and hospital costs in older adults [J]. J Am Geriatr Soc, 2014, 62(2): 306-311.
- [8] BARNETT A G, PAGE K, CAMPBELL M, et al. The increased risks of death and extra lengths of hospital and ICU stay from hospital-acquired bloodstream infections: a case-control study [J]. BMJ Open, 2013, 3(10): e003587.
- [9] 范世珍, 林松青, 莫莉. 实时定量 PCR 在血流感染病原体快速检测中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(16): 2278-2279.
- [10] 何超, 王远芳, 徐欢, 等. 婴幼儿普通外科术后血流感染的病原学分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2017, 17(8): 903-906.
- [11] 何超, 王远芳, 邓劲, 等. 心血管外科术后血流感染的病原学特征分析 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2017, 24(6): 435-438.
- [12] 辛宇航, 韩艳秋. 血流感染研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(52): 113-116.
- [13] 全国细菌耐药监测网. 2018 年全国细菌耐药监测报告 (简要版) [EB/OL]. (2019-11-19) [2020-07-16]. <http://www.carss.cn/Report/Details/648>.
- [14] 孙长贵, 成军. 分子诊断技术在临床微生物学检验中的应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(2): 109-112.
- [15] 章晟, 庄璐, 李秋平, 等. 实时定量 PCR 检测新生儿全血中肺炎克雷伯菌方法的建立和应用 [J]. 生物技术通讯, 2017, 28(5): 665-670.
- [16] 周开矿, 邹杨, 毕茹茹, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的分子流行特点及耐药机制 [J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(5): 795-800.
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; M02 [S]. 13th ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.
- [18] 张青, 陈喆, 李克诚, 等. 改良 Hodge 与 Carba NP 和 mCIM 试验快速检测产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的方法学比较 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(10): 1441-1446.
- [19] 王菊梅, 张洪球, 陆军, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因检测及同源性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(23): 5281-5284.
- [20] 刘衍伶, 邓林强, 胡龙华, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药机制及呼吸机相关性感染的流行病学分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(10): 1137-1143.
- [21] 毕颖敏, 沈震, 董栋, 等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌药物敏感性及 blaKPC 基因检出率 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(3): 298-302.
- [22] 付玉冰, 董爱英, 汪亚斯, 等. 血流感染 CRKP 的临床特点及高毒力血清型分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(9): 1091-1095.