

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药机制研究

黄 峰, 许元元, 秦淑国

[摘要] **目的:**探讨耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及耐药特性。**方法:**对 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌进行药敏试验、改良 Hodge 试验,并采用聚合酶链反应(PCR)方法检测细菌肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)基因。**结果:**42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌中,药敏试验结果显示耐药情况严重,仅对替加环素、阿米卡星、妥布霉素、复方新诺明较敏感。改良 Hodge 试验及 KPC 基因检测全部阳性,基因测序为 KPC-2 型。**结论:**KPC-2 是引起肺炎克雷伯菌耐药的主要原因,应引起临床及实验室的关注。

[关键词] 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;耐药机制;改良 Hodge 试验

[中图分类号] R 378.99 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.03.030

Study of the resistance mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

HUANG Feng, XU Yuan-yuan, QIN Shu-guo

(Department of Clinical Laboratory, The General Hospital of Wanbei Coal-Electric Group, Suzhou Anhui 234000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the drug resistance gene of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, and its resistant features. **Methods:** The drug sensitivity test and modified Hodge test in 42 strains of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase were performed, and the KPC gene of bacterium was detected using PCR. **Results:** The drug resistance in 42 strains of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase were severe, which was sensitive to the tigecycline, amikacin, tobramycin and cotrimoxazole. The detection results of modified Hodge test and KPC gene were positive, and the type KPC-2 gene was identified. **Conclusions:** KPC-2 is the major cause of drug resistance of *Klebsiella pneumoniae*, which should be paid attention to in clinic and laboratory.

[Key words] carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; resistance mechanism; modified Hodge test

肠杆菌科细菌作为医院感染和社区获得性感染的重要病原菌,可引起呼吸道、尿路等各种部位的感染以及菌血症,近年来由于抗菌药物的大量及不合理使用促进了耐药菌株的迅速扩散。碳青霉烯类抗菌药物作为一组新型 β -内酰胺酶抗生素,对多重 β -内酰胺酶具有良好的稳定性,主要包括亚胺培南、美罗培南、比阿培南、帕尼培南等,是有效治疗革兰阴性杆菌感染的重要药物^[1-3]。但随着该类药物应用的增加,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌迅速增多,给临床抗感染治疗带来了极大困扰^[4],其中以耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌最为常见。本研究对我院收集的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌进行药敏试验及耐药基因分析,旨在了解我院肺炎克雷伯菌耐药情况及耐药基因特点,为临床合理用药及院感防控提供依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

收集我院 2015 年 9 月至 2016 年 4

月临床标本分离的 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(排除同一病人重复分离株),其中血液 3 株,痰液 36 株,尿液 1 株,深静脉导管 2 株。

1.2 仪器及试剂 Vitek 2 compact 型全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)及配套革兰阴性菌的鉴定、药敏卡片。药敏纸片为英国 OXOID 公司产品, M-H 琼脂为法国梅里埃公司产品。聚合酶链反应(PCR)扩增仪为 PTC-200 型 PCR 分析仪。PCR 扩增试剂盒(Taq PCR Master Mix)、DNA Marker D、4S Red plus 核酸染色剂均购自上海生工生物工程股份有限公司,所用引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。电泳仪为北京市六一仪器厂生产的 DYY-6C 型,美国 Bio-rad 公司的凝胶成像系统。DNA 测序仪器为 ABI-PRISM3730,测序试剂为 BigDyeterminator v3.1。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 购自卫生部临检中心。阳性对照菌株肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 及阴性对照菌株肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 由江苏南京鼓楼医院馈赠。

1.3 药敏试验 采用法国生物梅里埃 Vitek 2 compact 全自动细菌药敏分析仪及配套革兰阴性菌的药敏卡片进行标准操作。

[收稿日期] 2016-06-09

[基金项目] 蚌埠医学院科研课题(BYKY16170)

[作者单位] 皖北煤电集团总医院(蚌埠医学院第三附属医院)检验科,安徽 宿州 234000

[作者简介] 黄 峰(1975-),男,副主任技师。

1.4 改良 Hodge 试验 参照 CLSI M100-S23 介绍的方法进行,使用无菌 0.9% 氯化钠注射液将大肠埃希菌 ATCC25922 菌悬液调至 0.5 Mcf,并进行 1:10 稀释,将菌液接种在 MH 琼脂平板上,干燥 3 ~ 10 min,在平板上中心贴厄他培南或美罗培南纸片,用 1 μL 接种环挑取 3 ~ 5 个待测菌落并在平板上接种,接种时从平板中心纸片边缘向平板边缘划线,长度至少为 20 ~ 25 mm,(35 ± 2) °C 孵育 16 ~ 20 h,观察结果。如果在被测菌株与大肠埃希菌 ATCC25922 抑菌环交汇处大肠埃希菌生长增强,即产碳青霉烯酶。

1.5 耐药基因检测 本研究只检测肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)耐药基因,水煮法提取细菌 DNA 模板,采用 PCR 方法扩增 KPC 耐药基因。反应体系共 50 μL,Taq PCR Master Mix 25 μL,上、下游引物各 2 μL,DNA 模板 1 μL,双蒸水 20 μL。KPC 引物(F5-GCT ACA CCT AGC TCC ACC TTC-3, R5-ACA GTG GTT GGT AAT CCA TGC-3)^[5],反应参数:预变性 94 °C 10 min,变性 95 °C 45 s→退火 55 °C 45 s→延伸 72 °C 70 s,循环 35 个周期,最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经含 4S Red plus 核酸染色剂的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,使用凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.6 测序及 DNA 序列分析 KPC 阳性菌株,PCR 产物提纯后由上海生工生物工程股份有限公司用 ABI-PRISM3730 测序仪进行双向测序,测序结果在 Genbank 用 BLAST 与已知序列比较以确定其基因型。

1.7 数据分析 药敏采用 WHO 推荐的 WHONET5.6 系统软件分析。

2 结果

2.1 菌株来源科室分布 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌,主要来源于重症监护室(ICU),共 26 株,占 61.9%(见表 1)。

2.2 药敏试验结果 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌中,体外药敏试验耐药情况比较严重,仅替加环素、阿米卡星、妥布霉素、复方新诺明、庆大霉素存在活性,敏感率分别为 100.0%、90.5%、31.0%、69.0%、11.9%(见表 2)。

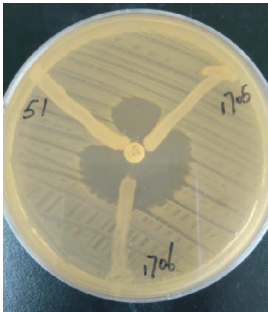
2.3 改良 Hodge 试验结果 经改良 Hodge 试验检测发现 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌均为阳性(见图 1)。

表 1 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌科室分布及构成比

科室	株数	构成比/%
ICU	26	61.9
神经外科	3	7.1
神经内科	5	11.9
胃肠外科	1	2.4
心内科	3	7.1
心胸外科	2	4.8
康复科	1	2.4
呼吸内科	1	2.4
合计	42	100.0

表 2 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌药敏试验结果

抗菌药物	耐药 (株)	中介 (株)	敏感 (株)	耐药率/%	中敏率/%	敏感率/%
氨苄西林	42	0	0	100.0	0.0	0.0
氨苄西林/舒巴坦	42	0	0	100.0	0.0	0.0
哌拉西林/他唑巴坦	42	0	0	100.0	0.0	0.0
头孢他啶	42	0	0	100.0	0.0	0.0
头孢曲松	42	0	0	100.0	0.0	0.0
头孢吡肟	42	0	0	100.0	0.0	0.0
头孢替坦	38	1	3	90.5	2.4	7.1
氨曲南	42	0	0	100.0	0.0	0.0
亚胺培南	42	0	0	100.0	0.0	0.0
阿米卡星	4	0	38	9.5	0.0	90.5
庆大霉素	37	0	5	88.1	0.0	11.9
妥布霉素	7	22	13	16.6	52.4	31.0
环丙沙星	42	0	0	100.0	0.0	0.0
左氧氟沙星	42	0	0	100.0	0.0	0.0
复方新诺明	13	0	29	31.0	0.0	69.0
替加环素	0	0	42	0.0	0.0	100.0

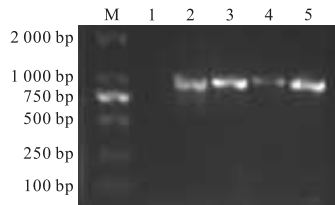


ATCC1705阳性对照,ATCC1706阴性对照,51号为测试菌株

图1 改良Hodge试验

2.4 KPC 耐药基因 经 PCR 检测发现在 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌中均扩增出 920 bp 长度的条带(见图 2),说明此次研究的 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌均携带 KPC 耐药基因。

2.5 基因测序 在 PCR 扩增产物中任取 3 个阳性扩增产物由上海生工生物工程股份有限公司用 ABI-PRISM3730 型测序仪进行双向测序,测序结果经 BLASTn(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn)比对,与美国 Genbank 上已登录基因号(KT001100.1)相同,证实为 KPC-2 型。PCR 产物部分序列见图 3。



1: KPC 阴性对照; 2: KPC 阳性对照; 3: KPC 阳性标本;
4: KPC 阳性标本; 5: KPC 阳性标本

图2 KPC 基因扩增结果

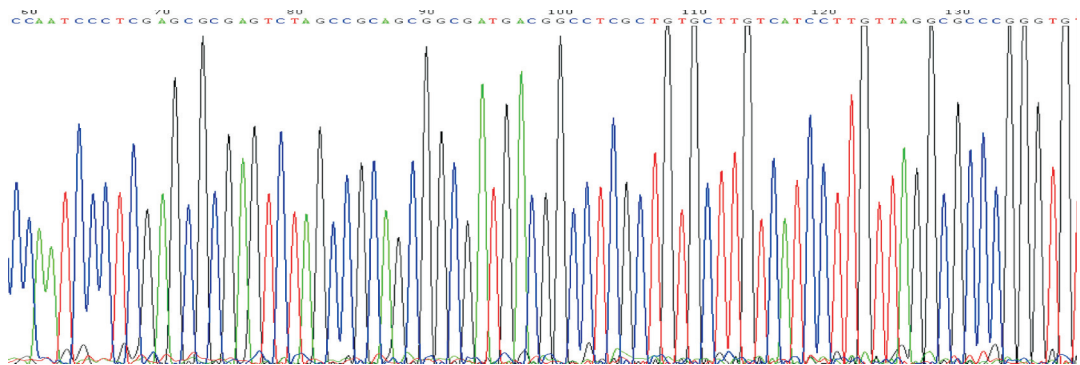


图3 KPC 序列图

改良 Hodge 试验是 CLSI 推荐的用于筛查 KPC 基因型碳青霉烯酶的方法,本研究中,改良 Hodge 试验和 KPC 基因检测的结果完全一致,符合率 100%,说明改良 Hodge 试验敏感度较高,可用于对怀疑产碳青霉烯酶细菌的表型检测。耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对大多数抗菌药物耐药,仅有少数抗菌药物,如氨基糖苷类、氟喹诺酮类、黏菌素和替加环素能在体外发挥抗菌作用^[7]。本研究中的 42 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌改良 Hodge 试验均为阳性,药敏结果显示,亚胺培南、左氧氟沙星、头孢曲松、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、氨曲南、哌拉西林/他唑巴坦、环丙沙星等全部耐药,仅替加环素、阿米卡星、妥布霉素、复方新诺明、庆大霉素存在活性,这给临床的治疗带来了极大的困难。追溯来源发现这些细菌主要来自于 ICU 或由 ICU 转出的病人标本中,疑有高度的同源性,需使用脉冲场凝胶电泳对耐药菌株进行同源性分析并证实。

目前,碳青霉烯类抗生素作为临床抗感染治疗的一线药物,正面临着严峻的考验。临床一旦出现耐碳青霉烯类肠杆菌细菌就意味着有效的抗菌治疗

3 讨论

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药物的机制目前认为主要有两大类:一为膜孔蛋白表达质和/或量的缺失合并对碳青霉烯类抗菌药物有微弱水解活性的 β -内酰胺酶的过表达;另一机制是获得具有编码碳青霉烯类抗菌药物水解活性的碳青霉烯酶基因^[4]。肠杆菌科细菌产生碳青霉烯酶是其对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制,KPC 是近年发现的一种新型碳青霉烯酶,能够水解碳青霉烯类、青霉素类、头孢霉素类和氨曲南等抗菌药物,其中,KPC-2 主要见于我国华东地区^[6]。本研究中 42 株细菌 KPC 基因检出率 100%,经测序后确认是 KPC-2,表明目前我院主要流行 KPC-2。

药物很少,甚至无药可用,因此临床医生应谨慎、合理地使用该抗菌药物。由于耐药基因可以在不同菌株、菌种和菌属间传递,造成耐药性的传播,因此,我们应该密切关注耐碳青霉烯类细菌耐药情况的变化,一旦发现该类细菌出现,应及时采取有效的控制措施,加强医院环境中的消毒隔离,及时隔离相关耐药基因阳性的病人,加强医护人员无菌操作技术,以减少和控制医院内交叉感染,防止耐药基因蔓延。当然这些措施的实施需要投入大量的人力物力,需要医院的临床医护人员、院感科、微生物室等人员共同努力、相互沟通和共同协作才能更好地实现。

【参考文献】

- [1] 衣美英,李杰,王靖,等.耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌的耐药机制和同源性研究[J].中国感染与化疗杂志,2012,12(4):297.
- [2] 刘原,谭湘淑,韩新鹏.西安地区耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶及同源性研究[J].中国感染与化疗杂志,2009,9(1):37.
- [3] 俞刚,张肖,沈静,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 KPC 和 NDM-1 β 内酰胺酶耐药基因的研究[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(1):38.

淮南地区早孕妇女 TORCH 9 项调查分析

李杨亮

[摘要] **目的:**探讨淮南地区孕早期妇女 TORCH 9 项抗体检查状况。**方法:**应用化学发光法检测 273 例孕早期妇女血清 TORCH 9 项抗体。**结果:**孕早期妇女血清 TORCH 9 项检测中 IgG 阳性率以 HSV- I / II 最高, IgM 阳性率以 TOX 最高;不同年龄组孕早期妇女 TORCH 抗体-IgM 阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$);2014、2015 和 2016 年 3 年间差异无统计学意义($P > 0.05$);不同季节 TORCH 抗体-IgM 阳性率差异有统计学意义,冬季阳性率 12.50% 和春季 14.08% 阳性率高于夏秋季($P < 0.05$),夏季的阳性率 1.79% 最低。**结论:**淮南地区孕早期妇女存在一定的 TORCH 阳性率,具有季节性特点,冬、春季节积极监测和预防先天性 TORCH 感染是非常必要的。

[关键词] 妊娠并发症;孕早期;TORCH;化学发光法;淮南

[中图分类号] R 714.25 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.03.031

Investigation of the nine parameters of TORCH in early pregnant women in Huainan

LI Yang-liang

(Department of Clinical Laboratory, Xinhua Hospital of Xinhua Medical Group, Huainan Anhui 232052, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the TORCH infection condition in early pregnant women in Huainan. **Methods:** The nine parameters of TORCH in 273 early pregnant women were detected using chemiluminescence (CLIA). **Results:** The positive rates of HSV- I / II IgG and TOX IgM were the highest in the nine parameters of TORCH in the early pregnancy women. There were no significant difference in the positive rates of TORCH-IgM in different ages pregnant women, and during 2014 to March 2016 ($P > 0.05$). There was significant difference in the positive rates of TORCH-IgM in different seasons ($P < 0.05$), the positive rates of TORCH-IgM in Winter (12.50%) and Spring (14.08%) were the highest, and the positive rate of TORCH-IgM in Summer was the lowest (1.79%). **Conclusions:** TORCH-infection in pregnant women in Huainan can be found, which has the seasonal characteristics. It is necessary to monitor and prevent the congenital TORCH infection in Winter and Spring.

[Key words] complication of pregnancy; early pregnancy; TORCH; chemiluminescence; Huainan

TORCH 是指弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒 I、II 型这 5 种病原体集合的缩略词,可导致先天性宫内感染及围生期感染概率,从而引起围生儿畸形。孕妇感染后绝大多数无明显症状,但若引发宫内感染,可导致胎儿自然流产、胎儿畸形、死胎、新生儿死亡、CMV 涵体病等,婴儿即使幸存也可能留下严重的智力低下、耳聋、失明等^[1]。国外报道^[2],由 TORCH 感染致胎儿、新生儿畸形占活产儿的 0.5% ~ 2.5%。目前国内监测 TORCH 指标多采用酶联免疫吸附实验法 (ELISA),本文对淮

南地区 273 例早孕孕妇采用高灵敏度、高特异性的全自动化学发光仪进行检测,主要观察其中 9 项,即 TOX IgG、TOX IgM、RV IgG、RV IgM、CMV IgG、CMV IgM、HSV- IgG、HSV- I / II IgM、HSV- II IgG,现对检测结果逐一分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象 在我院妇产科门诊进行产前检查的本地孕妇 273 例,年龄 19 ~ 45 岁,所有孕妇均于妊娠 20 周前取样检测。

1.2 方法 采集空腹静脉血 4 mL,即时分离血清,采用新产业 Maglumi 1000 型全自动化学发光仪及配套厂家试剂进行检测,质量控制采用厂家配套质

[收稿日期] 2016-08-19

[作者单位] 淮南新华医疗集团新华医院 检验科,安徽 淮南 232052

[作者简介] 李杨亮(1982-),男,主管检验师。

[4] 万芳,陈恒,柯茂彬,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌表型检测及其耐药性研究[J].检验医学与临床,2015,12(10):1369.

[5] 沈瀚,宁明哲,周万青,等.亚胺培南不敏感大肠埃希菌碳青霉烯酶基因的检测[J].国际检验医学杂志,2013,34(6):643.

[6] 宁明哲,沈瀚,印玉炜,等.南京地区耐亚胺培南肠杆菌科细菌碳青霉烯酶及整合子调查[J].中华医院感染学杂志,2012,22

(19):4181.

[7] 汪玥,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.

(本文编辑 刘璐)