

产 KPC 酶肺炎克雷伯菌耐药情况及基因型分析

靳颖 刘锦 王俊妨 周鑫

作者单位:300162 天津市,武警后勤学院附属医院检验科

【摘要】 目的 分析我院产 KPC 酶肺炎克雷伯菌的耐药性及基因型。**方法** 收集 2012 年 2 月至 2013 年 5 月期间分离自我院临床科室的对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌 9 株,采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行细菌鉴定及药敏试验,采用改良 Hodges 试验对 KPC 酶表型进行检测,采用 PCR 法对菌株的 KPC 酶基因型进行检测。**结果** 所分离的 9 株肺炎克雷伯菌对所选用的 19 种抗生素均 100.0% 耐药,有 7 株改良 Hodges 试验呈现阳性结果,阳性率 77.8%。9 株肺炎克雷伯菌均扩增出 KPC 目的基因条带,且均为 KPC-2 型基因。**结论** 产 KPC 酶肺炎克雷伯菌耐药形势严峻,合理使用抗菌药物,加强感染者的消毒与隔离,是控制此类细菌感染的有效措施。

【关键词】 肺炎克雷伯菌;肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶;耐药性;抗生素

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.04.009

The resistance condition and genotype of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC

JIN Ying, LIU Jin, WANG Jun-fang, et al. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Logistical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China

【Abstract】 Objective To analyze the drug resistance and genotype of *Klebsiella pneumoniae* which producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). **Methods** 9 strains *Klebsiella pneumoniae* resistant to imipenem were isolated from February 2012 to May 2013 in our hospital. Identification of bacteria and drug sensitive test were done by VITEK 2 Compact automatic microbiological assay system. The phenotype of KPC was detected by modified Hodges test and the genotype of KPC was detected by PCR method. **Results** The isolated 9 strains were all resistant to 19 kinds of antibiotics. There were 7 strains shown positive by Hodges test, and the positive rate was 77.8%. The 9 strains *Klebsiella pneumoniae* were all had KPC gene, and were all KPC-2 gene. **Conclusion** The resistance condition of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC is austerly. Using antibacterials rationally, reinforcing disinfection and isolation of infected person are the utility measures for controlling this kind of bacterial infections.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; Drug resistance; Antibiotics

碳青霉烯类抗菌药物抗菌谱广,抗菌活性强,尤其适用于治疗由产超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum β lactamases, ESBLs)和头孢菌素酶(ampC class C β -lactamase, AmpC)肺炎克雷伯菌引起的严重感染。但随着碳青霉烯类抗菌药物在临床上的广泛使用,对其敏感性降低的肺炎克雷伯菌已经在全球范围内广泛出现,且菌株的种类正在增加,随时可能引起医院感染的暴发和流行^[1-3]。由于肺炎克雷伯菌是临床上常见的医院感染菌,其对碳青霉烯类抗菌药物的敏感性降低甚至产生耐药给临床抗感染治疗带来了极大的困难。本文对我院 2012 年 2 月至 2013 年 5 月期间分离的 9 株对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌的耐药情况及肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC)基因

进行检测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2012 年 2 月至 2013 年 5 月期间分离自我院临床科室的对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌 9 株,去除同一患者相同部位的重复菌株。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 均购自卫生部临检中心。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪、细菌鉴定卡、药敏卡均为法国生物梅里埃公司产品,5700 型 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司。DNA 提取试剂购自上海 Sangon 公司,引物合成以及 PCR 扩增产物测序均由上海生工生物工程有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定及药敏试验 所有标本按《全国临床检验操作规程》第 3 版规定进行分离接种。所有菌株经法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统及其配套革兰阴性菌鉴定卡进行细菌鉴定。药物敏感性试验选择的抗菌药物包括氨苄西林、头孢唑林、头孢曲松、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢西丁、替卡西林/棒酸、阿莫西林/克拉维酸、阿米卡星、庆大霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、氨曲南、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、美罗培南、妥布霉素、复方新诺明。药敏结果判定参照 CLSI2010 年版标准进行。

1.3.2 改良 Hodges 试验 改良 Hodges 试验检测产碳青霉烯酶表型确证试验参照 CLSI2010 年版标准进行。制备直径 90 mm、厚 4 mm 的 M-H 琼脂平板，采用直接菌落悬液法用生理盐水制备 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌(ATCC25922)悬液，1:10 稀释后均匀涂布在 M-H 琼脂平板上，中间贴 10 μg/片的厄他培南纸片，将临床分离的肺炎克雷伯菌从纸片边缘向外划直线，35℃ 培养过夜，抑菌圈内细菌呈矢状生长者为 KPC 酶阳性。阳性对照为携带 blaKPC-2 碳青霉烯酶基因大肠埃希菌接合子，阴性对照为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.3.3 KPC 酶基因检测 质粒 DNA 提取步骤按照 Sangon 公司提供的试剂盒说明书进行。根据 GenBank 公布的 KPC 酶的 DNA 序列，利用 Primer Premier 5.0 软件自行设计引物，并由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列上游：5'-ATGTCAGTGTATCGCCGTCT-3'，下游：5'-TTACGTCCCGTTGACGC-3'，产物片段大小为 882 bp。PCR 反应体系：ExTaq 酶 0.25 μl，10×buffer 5 μl，dNTP 4 μl，模板 DNA 2 μl，上下游引物各 1 μl，ddH₂O 36.75 μl，总体积 50 μl。PCR 扩增条件为：95℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 30 s，56℃ 退火 30 s，68℃ 延伸 45 s，40 个循环，最后 72℃ 延伸 5 min。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 配置 0.5×TBE 的电泳液，加入溴化乙啶 1 μl，制成 1% 的琼脂糖凝胶。取 1 μl 溴酚蓝染料，5 μl PCR 扩增产物充分混匀后进行电泳，维持恒定电压 110 v，电泳时间 40 min。PCR 阳性产物送上海生工生物有限公司进行测序，测序结果在 GenBank 数据库中比对查询。

1.4 统计学处理 采用 WHONET 5.4 统计软件进行数据的检测录入、数据处理与药物敏感性结果的统计分析。

2 结果

2.1 药物敏感性试验结果 分离的 9 株肺炎克雷伯菌对所选用的 19 种抗生素耐药率均为 100.0%，结果见表 1。

表 1 9 株肺炎克雷伯菌对 19 种抗生素的耐药情况[n(%)]

抗生素	株数	耐药率
氨苄西林	9	9(100.0)
头孢唑林	9	9(100.0)
头孢曲松	9	9(100.0)
头孢他啶	9	9(100.0)
头孢噻肟	9	9(100.0)
头孢吡肟	9	9(100.0)
头孢西丁	9	9(100.0)
替卡西林/棒酸	9	9(100.0)
阿莫西林/克拉维酸	9	9(100.0)
阿米卡星	9	9(100.0)
庆大霉素	9	9(100.0)
左氧氟沙星	9	9(100.0)
环丙沙星	9	9(100.0)
氨曲南	9	9(100.0)
哌拉西林/他唑巴坦	9	9(100.0)
亚胺培南	9	9(100.0)
美罗培南	9	9(100.0)
妥布霉素	9	9(100.0)
复方新诺明	9	9(100.0)

2.2 改良 Hodges 试验结果 检出的 9 株肺炎克雷伯菌中有 7 株改良 Hodges 试验呈现阳性结果，阳性率 77.8%(7/9)。

2.3 KPC 酶基因检测结果 9 株肺炎克雷伯菌均扩增出 KPC 目的基因条带，经 Blast 工具进行基因比对分析，均为 KPC-2 型基因。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱见图 1。

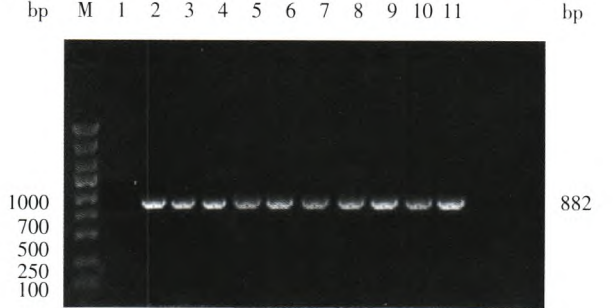


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱
注：M:Marker;1:阴性对照;2:阳性对照;3~11:9 株肺炎克雷伯菌 KPC 酶阳性结果

3 讨论

碳青霉烯类抗菌药物是治疗多重耐药肺炎克雷伯菌感染的一线用药，但是随着其使用量的快速增

长, 对其敏感性降低的肺炎克雷伯菌已在世界多个国家蔓延。自 2011 年 Yigit 等^[4]首次报道从肺炎克雷伯菌中分离出 KPC-1 型后, 短短几年时间内, 该菌在美国东北部各州蔓延, 甚至在局部地区造成暴发流行^[5]。我国各地也时有报道^[6-8]。

目前, 在世界范围内出现的碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低甚至耐药的肺炎克雷伯菌, 常对多种常规抗菌药物亦具有很强的耐药性, 这给临床抗感染治疗带来了极大的困难。有研究^[9]结果显示, ICU 内碳青霉烯类抗菌药物耐药株感染患者的病死率高于敏感菌感染者 3 倍。本文研究中所收集的 9 株肺炎克雷伯菌均为多重耐药菌, 对所选用的 19 种常用抗生素均表现为 100% 耐药, 表明临床可选用的抗菌药物非常有限。目前, 对常规抗菌药物全部耐药的菌株尚无较好的治疗方案, 但替加环素和多黏菌素 B 治疗此类菌株有较高的敏感率, 提示这两种药物或可用于临床治疗产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌所致感染^[10]。

目前, 多种检测 KPC 型酶的表型检测方法已建立, 其中以 CLSI 推荐的改良 Hodges 试验为主, 其原理是待测菌产生的碳青霉烯酶水解灭活琼脂中的碳青霉烯类抗生素, 从而使原本被抑制的大肠埃希菌得以继续生长。有研究^[11]结果显示, 该方法检测肠杆菌科细菌 KPC 型酶的灵敏度和特异性均大于 90%。本文研究中, 9 株肺炎克雷伯菌 KPC 酶表型阳性率为 77.8%, 有 2 株菌株 KPC 酶表型为阴性, 是否与相关文献^[12]报道的最低抑菌浓度较高的菌株表现为阳性, 而最低抑菌浓度较低的菌株表现为阴性有关, 尚有待进一步研究。

本文研究采用 PCR 法对我院分离的 9 株对亚胺培南耐药的肺炎克雷伯菌进行了 KPC 酶基因型检测, 经过测序和比对, 发现 9 株菌株均携带 KPC-2 型基因, 提示在 2012 年 2 月至 2013 年 5 月期间, 我院产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌的感染率较高, 但由于本文研究所选菌株均为对亚胺培南耐药菌株, 有可能提高了产 KPC 酶菌株的检出率, 但同时也提示我院产 KPC 酶菌株的感染情况已不容忽视。本文研究并未对分离出的菌株的同源性进行分析, 因此, 无法得出该 9 株菌株是否属于同一克隆, 有待进一步研究探讨。

目前, 临床有关产 KPC 酶菌株引起感染的治疗资料不多, 临床可供选择的抗菌药物也非常有限, 积极地预防和控制是减少产 KPC 酶菌株传播的关键。美国疾病预防控制中心新发布了控制耐碳青霉烯类

肠杆菌科细菌 (carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 的指南^[13], 更新的指南推荐了一组急性期和长期使用的核心护理措施, 包括: 1) 提高手卫生; 2) 对 CRE 定植或感染患者应进行接触预防; 3) 必要时, 将患者和医务人员进行隔离; 4) 减少侵入性医疗设备的使用; 5) 促进抗生素使用的管理; 6) 筛查 CRE 高风险患者。还可进行额外的措施: 1) 积极监测 CRE 耐药性; 2) 使用洗必泰浸泡或擦洗。

综上所述, 我院产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌引起的感染情况已不容乐观, 该类菌株对碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低, 且均为泛耐药菌株。合理使用抗菌药物、做好重点科室多重耐药菌感染者的消毒与隔离, 是控制此类感染的有效措施。

4 参考文献

- 1 Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*, 2010, 15: 19711.
- 2 Landman D, Urban C, Backer M, et al. Susceptibility profiles, molecular epidemiology, and detection of KPC-producing *Escherichia coli* isolates from the New York City vicinity. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 4604-4607.
- 3 Liu YF, Yan JJ, KO WC, et al. Characterization of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* isolates from a university hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61: 1020-1023.
- 4 Yigit H, Quanan AM, Rasheed JK, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 3881-3889.
- 5 Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*, 2005, 165: 1430-1435.
- 6 Liu YF, Yah JJ, Ko WC, et al. Characterization of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* isolates from a university hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61: 1020-1023.
- 7 Li G, Wei Q, Wang Y, et al. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30: 575-580.
- 8 Shi DS, Wang WP, Kuai SG, et al. Identification of bla (KPC-2) on different plasmids of three *Morganella morganii* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 31: 797-893.
- 9 Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular charac-

- terization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis, 2010, 50: 364-373.
- 10 Zhang R, Cai JC, Zhou HW, et al. Genotypic characterization and in vitro activities of tigecycline and polymyxin B for Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems. J Med Microbiol, 2011, 60: 1813-1819.
- 11 Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol, 2012, 50: 477-479.
- 12 杨金辉, 吕媛. 中国肺炎克雷伯菌碳青霉烯类抗生素耐药现状和流行病学分析. 中国临床药理学杂志, 2012, 28: 323-326.
- 13 Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, 2012(in USA).

(收稿日期: 2013-10-29)

(本文编辑: 李霖)

(上接第 240 页)

检组间差异无统计学意义, 相对应的 MPV 值两组间比较差异也无统计学意义。因此不能单纯的以血清 Hcy 和 MPV 升不升高来诊断脑梗死, 必须结合影像学和临床表现综合判断。由于本文研究没有将被研究者年龄进行严格细分, 而将血清 Hcy 正常值统一定为 0~20 $\mu\text{mol/L}$, 因此脑梗死组中高 Hcy 者所占比率仅为 31%, 若将血清 Hcy 正常值定为 0~15 $\mu\text{mol/L}$, 则高 Hcy 者所占比率可达 65% 左右, 这与国内的研究^[10]结果基本吻合。

本文研究发现, 脑梗死患者血清 Hcy 和 MPV 水平明显高于健康体检组, 这与国内章成国等^[10]的研究结果一致。但是 MPV 的具体测定值与国内钱月华等^[7]研究报告差别有点大, 这可能与血细胞分析仪品牌不同, 参考值不一致有关系, 但与健康体检组的统计学差异是显而易见的。可见两者在脑梗死的发生、发展过程中均起着重要的作用, 且两项指标作为动脉粥样硬化的危险因素已经被普遍接受。

本文研究对脑梗死组的血清 Hcy 和 MPV 水平进行相关性分析, 发现两者呈正相关, 可见在一定范围内, MPV 水平随血清 Hcy 的增高而增大, 而 MPV 的增大又反过来影响血清 Hcy 的代谢。这可能是由于 Hcy 通过损伤内皮细胞途径引起动脉粥样硬化, 而动脉粥样硬化又引起一系列反应, 促使血小板聚集、释放, 进而又介导内皮细胞的黏附功能, 进一步引起内皮细胞的损伤, 促使血栓形成, 最终导致脑梗死的发生。因此, 对于脑梗死患者必须定期监测血清 Hcy 和 MPV 水平来观察和控制病情。

综上所述, 血清 Hcy 和 MPV 的联合检测, 对于诊断脑梗死的发生和病情的判断有积极意义。

4 参考文献

- 1 林东, 袁璧钗, 黄晓新. 血浆同型半胱氨酸水平与脑梗死的临床相关性研究. 新医学, 2010, 41: 305-306.
- 2 Tseng YL, Chang YY, Liu JS, et al. Association of plasma homocysteine concentration with cerebral white matter hyperintensity on magnetic resonance images in stroke patients. J Neurol Sci, 2009, 284: 36-39.
- 3 史玉水, 刘槐, 罗曼, 等. 探讨脑梗死患者血小板相关性参数的检测意义. 实用检验医师杂志, 2011, 3: 43-45.
- 4 T O'Mally, P Langhorne, RA Elton, et al. Platelet size in stroke patients. Stroke, 1995, 26: 995-999.
- 5 蔡美琴, 程盈盈. 血浆同型半胱氨酸与脑梗死的关系. 实用医学杂志, 2010, 26: 4382-4383.
- 6 邓旭, 贾德志. 血同型半胱氨酸检测的临床意义. 检验医学与临床, 2013, 10: 2037-2039.
- 7 钱月华, 闻爱斌, 刘俊慧. 脑梗死患者血小板参数的水平观察和初步分析. 检验医学与临床, 2009, 6: 577-578.
- 8 滕海英, 曹丽霞, 孟兰芳. 脑梗死患者血小板体积及分布宽度相关性探讨. 中国社区医师(医学专业), 2012, 14: 27.
- 9 闫伟, 李斌, 张周良, 等. 探讨血小板相关参数变化及 D 二聚体对诊断脑梗死的临床意义. 中国血液流变学杂志, 2010, 20: 658-659.
- 10 章成国, 邵燕, 胡学强, 等. 血浆同型半胱氨酸与脑梗死关系的研究. 临床神经病学杂志, 2004, 17: 364-266.

(收稿日期: 2013-09-12)

(本文编辑: 张志成)