

某儿童医院临床分离碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药性及产酶流行机制研究

刘健龙¹, 宋春荣¹, 李先斌¹, 胡琼¹, 唐喜春¹, 李军²

1. 湖南省儿童医院检验中心, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008

摘要: **目的** 了解某儿童医院临床分离耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CR-KP)的耐药特性及产碳青霉烯酶流行情况的研究。**方法** 采用法国生物梅里埃 Vitek 2 Compact 仪器对收集菌株进行鉴定及药敏试验,药敏结果判断参照 2018 版 CLSI;改良碳青霉烯酶灭活试验(modified carbapenem inactivation method, mCIM)及 EDTA 改良碳青霉烯酶灭活试验(modified carbapenem inactivation method, eCIM)实验进行表型确认;PCR 法检测碳青霉烯酶基因,产物测序,结果采用 BLAST 软件与 Genbank 上已公布的序列进行比对分析。**结果** 共收集到 44 株 CR-KP,其中 43 株产金属酶菌株对哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟及厄他培南均耐药,对左氧氟沙星和阿米卡星全部敏感,此外携带 blaNDM-1 基因对亚胺培南均耐药,携带 blaIMP 基因耐药率为 83.3%;碳青霉烯酶表型检测:44 株细菌的 mCIM 实验全部阳性,其中 43 株的 eCIM 阳性,1 株(KP-9)为阴性,产金属酶的阳性率为 97.7%;耐药基因检测结果显示,31 株携带 blaNDM-1 基因,12 株携带 blaIMP 基因,1 株(KP-9)携带 blaKPC 基因,与金属酶表型初筛实验结果相符。**结论** 该儿童医院临床分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制以产酶为主,尤其是 NDM-1 型金属酶;体外药敏实验发现对阿米卡星及左氧氟沙星敏感,对头孢菌素类及碳氢酶烯类药物耐药。

关键词: 儿童;肺炎克雷伯菌;耐药性;新德里金属 β -内酰胺酶 I 型

中图分类号:R378 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2020)06-0755-03 **DOI:**10.3969/j.issn.1006-3110.2020.06.034

近年来,随着碳青霉烯类抗生素在临床上的广泛应用,对其耐药的肠杆菌科细菌不断出现,尤其是 CR-KP,已在世界上多个国家及地区被检出,且检出呈上升趋势,给临床抗感染治疗带来了极大的挑战^[1]。对于儿童而言,由于其自身免疫特性,可供使用的抗菌药物种类有限,导致碳青霉烯类抗生素的广泛使用,故 CR-KP 的检出形势较成人更加严峻^[2]。因此,本研究拟对 2018 年 1—4 月某儿童医院临床分离的 CR-KP 进行耐药机制和药敏结果分析,以期临床抗感染治疗以及预防其传播提供实验依据,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2018 年 1—4 月某儿童医院临床分离的非重复性肠杆菌科菌 1 141 株,采用 Vitek 2 Compact 进行鉴定。质控菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705/1706 和大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.2 主要试剂和仪器 DNA marker D2000(大连宝生

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81702068);湖南省自然科学基金项目(2017JJ3478)

作者简介:刘健龙(1978-),男,湖南湘乡人,副主任技师,主要从事临床微生物研究工作。

通信作者:李军, E-mail:lijun198412@126.com。

物公司),引物和 5×TBE 电泳缓冲液(上海生工公司),2×Taq PCR Master Mix 试剂(北京百泰克公司);ABI2720 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),Hoefer PS2A200 水平电泳仪(美国 Hoefer 公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),InGenius 凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司),美罗培南药敏纸片(10 μ g)(英国 OXIOD 公司),哥伦比亚血平板、M-H 平板(法国梅里埃公司),胰蛋白胨大豆肉汤(上海科玛嘉微生物技术有限公司),Vitek 2 Compact(法国生物梅里埃公司)。

1.3 药敏试验 仪器法(Vitek 2 Compact)测定 8 种药物的敏感实验,结果根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2018 版标准进行判断。

1.4 改良碳氢酶灭活试验检测金属 β -内酰胺酶 按照 CLSI2018 版标准进行 mCIM 联合 eCIM 实验,分别以肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705/1706 做为阳性和阴性质控菌株:(1)mCIM 实验:用 1 μ l 的接种环取待测菌落于 2 ml 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)中,并将美罗培南(10 μ g)药敏纸片浸没在 TSB 菌悬液中;(35±2)℃培养 4 h±15 min;在取出 TSB 中的药敏纸片之前,用标准菌株 ATCC25922 配制 0.5 麦氏单位的菌悬液,按纸片扩散法的步骤于 15 min 内在 M-H 平板上涂布上述菌悬液,取出 TSB 中的药敏纸片,贴在涂布

有标准菌株 ATCC25922 的 M-H 平板上;培养 18~24 h 后,测量抑菌圈直径大小。(2)eCIM 实验:对于每一株待测菌株都标识第二支含 2 ml TSB 试管,加入 20 μ l 0.5M EDTA 溶液于 2 ml TSB 中,EDTA 终浓度为 5 mM;余下步骤同上述 mCIM 实验步骤;mCIM 和 eCIM 试管平行进行。(3)结果判读:金属 β -内酰胺酶阳性:eCIM 与 mCIM 结果相比较,美罗培南抑菌圈的直径相差 ≥ 5 mm;金属 β -内酰胺酶阴性:eCIM 与 mCIM 结果相比较,美罗培南抑菌圈的直径相差 ≤ 4 mm。

1.5 耐药基因检测 根据文献设计引物^[3],引物序列见表 1。PCR 反应体系为 25 μ l,10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ l,包括 2 \times TaqPCR Master Mix 12.5 μ l,无菌双蒸水 8.5 μ l,DNA 模板 2 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 sec,退火温度(见表 1)30 sec,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 sec,共 35 个循环;最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。结果采用 BLAST 软件与 Genbank 上已公布的序列进行比对分析。

表 1 PCR 检测所用引物

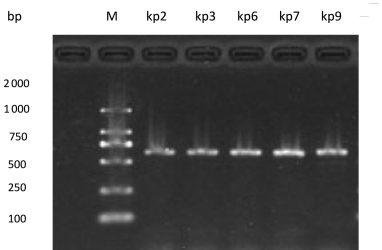
引物名称	引物序列 5'→3'	退火温度 ($^{\circ}$ C)	产物大小 (bp)
blaNDM-1	F:GGTTTGGCGATCTGCTTTTC R:CGGAATGGCTCATCACGATC	55	621
blaKPC	F:CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R:CTTGTCATCCTGTTAGGCG	55	798
blaIMP	F:GGAATAGACTGGCTTAATCTC R:GGTTTAAAYAAAACAACCACC	52	232

2 结果

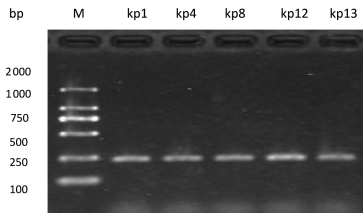
2.1 CR-KP 检出情况及临床特征 1 141 株肠杆菌科细菌中共检出 44 株 CR-KP,检出率为 3.8%。标本来源包括痰液标本,血液标本,尿液标本,分泌物标本等,科室分布主要是呼吸内科,ICU 等。

2.2 碳青霉烯类表型检测 44 株细菌的 mCIM 实验全部阳性;其中 43 株的 eCIM 阳性,阳性率为 97.7%。

2.3 耐药基因检测 31 株细菌携带 blaNDM-1 基因,12 株细菌携带 blaIMP 基因,1 株(KP-9)细菌携带 blaKPC 基因(见图 1、图 2)。



注:M, DNA marker;kp1-kp4,kp6-kp9,kp12-kp13,待测菌株。
图 1 部分肺炎克雷伯菌 blaNDM-1PCR 电泳图



注:M, DNA marker;kp1-kp4,kp6-kp9,kp12-kp13,待测菌株。
图 2 部分肺炎克雷伯菌 blaIMP-1PCR 电泳图

2.4 药敏实验结果 结果显示,耐药基因为 NDM-1 和 IMP 的 43 株菌对哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟及厄他培南均耐药;而对阿米卡星和左氧氟沙星则全部敏感;31 株 blaNDM-1 对亚胺培南全部耐药,12 株 blaIMP 对亚胺培南耐药率为 83.3%。见表 2。

表 2 43 株耐药基因为 NDM-1 和 IMP 株的耐药率(%)

基因型	菌株数	TZP	AMK	LVX	CAZ	SCF	CIP	ETP	IPM
blaNDM-1	31	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
blaIMP	12	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3

注:TZP:哌拉西林/他唑巴坦;AMK:阿米卡星;LVX:左氧氟沙星;CAZ:头孢他啶;SCF 头孢哌酮/舒巴坦;CIP:头孢吡肟;ETP:厄他培南;IPM:亚胺培南。

3 讨论

肠杆菌科细菌的泛耐药问题已经变成全世界广泛关注的问题,特别是在过去的 10 年里,世界范围内 CP-KP 急剧增长,对病人的生命健康构成严重威胁,引起临床的高度重视^[4]。从 2005—2014 年,我国对亚胺培南和美罗培南耐药的肺炎克雷伯菌株分别从 2.4% 增长到 10.5%,从 2.6% 增长到 13.4%^[5]。CPKP 的感染是很难控制的,因为它通过可转移质粒传播碳青霉烯耐药基因^[6]。因此,定期对临床分离的 CRE 菌株进行监测,特别对 CR-KP 的监测及其产酶的流行机制的研究,对于指导临床合理使用抗生素、预防和控制耐药菌株的播散流行具有非常重要的意义。

本研究收集 2018 年 1—4 月某儿童医院临床分离的非重复性肠杆菌科菌 1 141 株,共检出 44 株 CR-KP,检出率为 3.8%,明显低于全国的 10.5%~13.4% 的检出率,说明该儿童医院的肺炎克雷伯对碳氢酶烯类的药敏敏感性还比较高。此外,从药敏结果来看,产金属酶的 43 株菌对哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟及厄他培南均耐药;而对阿米卡星和左氧氟沙星则全部敏感;31 株 blaNDM-1 对亚胺培南全部耐药,12 株 blaIMP 对亚胺培南耐药率为 83.3%。从体外实验来看,阿米卡星和左氧氟沙星对这些肺炎克雷伯菌基本敏感。但是,氨基糖苷类和

氟喹诺酮类药物由于肾毒性、耳和软骨毒性在儿童患者中应用受到了限制。目前认为 CR-KP 感染的治疗,联合用药要优于使用单药,儿童治疗虽缺乏相关研究,却可以借鉴成人治疗的经验,但需要做药物剂量及品种上的调整。有报道显示儿童使用多黏菌素其神经毒性以及肾毒性的发生概率要低于成人,认为多黏菌素在儿童中使用较为安全^[7];也有研究证实包括碳青霉烯类在内与替加环素或多黏菌素的联合治疗方案失败率最低^[8]。所以针对儿童 CR-KP 的感染,可根据药敏结果,来选择适当可行的抗生素使用方案。

细菌对碳青霉烯类抗生素耐药是多种机制共同参与的结果,其中最主要的原因是产碳青霉烯酶。本研究 44 株 CR-KP 进行了碳青霉烯表型及碳氢酶烯酶基因检测,结果发现表型检测结果与耐药基因检测结果一致,44 株 CR-KP 的耐药表型均为产碳氢酶烯酶,并且发现有 43 株均产金属酶。其中的 31 株细菌携带 blaNDM-1 基因,12 株细菌携带 blaIMP 基因,1 株(KP-9)细菌携带 blaKPC 基因。其中 NDM-1 和 IMP 都属于金属酶,其能水解的底物包括青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类药物,不水解氨基糖苷;而 KPC 属于丝氨酸酶,水解底物包括所有类型的 β -内酰胺类药物^[9]。从此次耐药基因的检测结果来看,该儿童分离的 CR-KP 产 NDM-1 和 IMP 型金属酶是这 44 株细菌对碳青霉烯类抗生素耐药最主要的机制。而 NDM-1 的检出率为 70.5%,这与国内某大型儿童医院报道的 77.3%NDM-1 型肺炎克雷伯菌检出率一致^[10],说明在国内,儿童感染的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药基因型以金属酶为主,尤其是 NDM-1 型。

金属酶的活性位点需要锌离子的参与,故称为金属 β -内酰胺酶,它属于 Bush 分类的 3 组、Ambler 分类的 B 类。自 2008 年首次发现 NDM-1 后,它的突变亚型也相继被报道。迄今为止已报道的来自不同国家的不同菌株之间,至少有 17 种不同的 blaNDM 基因型在氨基酸的一个或两个残基位置上有所不同。blaNDM-1 由质粒编码,可以通过水平基因转化结合到其他微生物中,从而增加了致病微生物耐药菌株的出现^[11],有研究报道^[12]大多数产金属酶菌株常伴有 ESBL,这也是氨基糖苷不能被金属酶水解但是抗菌活性低下的主要原因。所以,如何加强泛耐药菌的监控,

特别是监测 CR-KP 的流行产酶机制,提高抗生素的使用水平,并且做好院内感染防控工作,防止 CR-KP 株的播散,是摆在临床医务工作者面前的亟需解决的难题。

参考文献

- [1] 黄洪琳,易斌. 长期住院老年患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2017,24(4):76-79.
- [2] 祝俊英,王春,孙燕,等. 儿童患者中分离的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌 分子流行病学分析及耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016,16(5):578-582.
- [3] 胡咏梅,邹明祥,李军,等. 同一患者不同部位分离耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药机制研究及同源性分析[J]. 临床检验杂志, 2017,35(7):511-517.
- [4] Lee BY, Bartsch SM, Wong KF, et al. The potential trajectory of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, an emerging threat to health-care facilities, and the impact of the centers for disease control and prevention toolkit[J]. Am J Epidemiol, 2016,183(5):471-479.
- [5] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005-2014[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(1):S9-S14.
- [6] Gupta N, Limbago BM, Patel JB, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(1):60-67.
- [7] Tzouveleakis L, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4):682-707.
- [8] Karli A, Pakso MS, Karadag A, et al. Colistin use in pediatric intensive care unit for severe nosocomial infections; experience of an university hospital [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2013, 12(1):32-32.
- [9] Bryan P White, Smit Patel, Janice Tsui, et al. Adding double carbapenem therapy to the armamentarium against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bloodstream infections[J]. Infect Dis (Lond) 2019; 51(3):161-167.
- [10] Zhu J, Sun L, Ding B, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(4):611-618.
- [11] Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of new delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health[J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1):101.
- [12] Akova M, Daikos GL, Tzouveleakis L, et al. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing gram-negative bacteria[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(5):439-448.

收稿日期:2019-07-29