

• 临床检验研究 •

肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的检测

李 岷, 赵苏瑛, 曹慧玲

(江苏省中医院检验科, 南京 210029)

摘要:目的 调查本院肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的情况。方法 收集 2010 年 1~5 月临床分离的肠杆菌科细菌, 采用 K-B 纸片法进行药敏试验, 以三代头孢菌素、亚胺培南、美罗培南为检测药物, 筛选出可能产碳青霉烯酶的菌株 120 株, 采用改良的 Hodge 试验进行确证。结果 在 120 株耐一种或多种三代头孢菌素, 提示可能产生碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌中, 通过表型确证试验确证为阳性的细菌有 4 株, 肺炎克雷伯菌 2 株, 大肠埃希菌 1 株, 弗劳地枸橼酸杆菌 1 株。结论 表型确证试验阳性的细菌中, 如需准确辨别亚型, 最好用分子生物学方法检测基因序列。

关键词:肠杆菌科; 碳青霉烯酶; 表型确证试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)16-1836-01

Detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae

Li Min, Zhao Suying, Cao Huiling

(Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Nanjing City, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the situation of carbapenemases producing in Enterobacteriaceae. **Methods** Clinical isolation and analysis of Enterobacteriaceae were performed from January to May in 2010. K-B disk sensitivity test was conducted, using the third generation of cephalosporins, imipenem and meropenem as the detected antibiotics. Modified Hodge test was carried out to confirm the results. **Results** In 120 strains, which were resistant to at least one kind of the third generation of cephalosporins, which might indicate carbapenemase producing in Enterobacteriaceae, there were 4 strains that could be confirmed by phenotypic confirmatory test. Among the 4 strains, confirmed by phenotypic confirmatory test, 2 strains were *Klebsiella pneumoniae*, 1 strain was *Escherichia coli* and 1 strain was *Citrobacter freundii*. **Conclusion** For accurate identification of subtype, molecular biology method was preferred to analyze gene sequence.

Key words: enterobacteriaceae; carbapenemases; phenotypic confirmatory test

近年来,临床上对碳青霉烯类耐药的细菌多为非发酵菌如鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌等,肠杆菌科细菌很少见。但近年来,出现了越来越多的对碳青霉烯类抗菌剂耐药的肠杆菌科细菌,引起了世界各国抗感染专家和临床微生物工作者的极大关注^[1]。在美国,甚至报道有碳青霉烯类抗菌剂耐药的肺炎克雷伯菌流行^[2]。根据 2009 年临床实验室标准化委员会(CLSI)规定,肠杆菌科细菌初筛试验阳性,即对 1 种或多种头孢菌素耐药而碳青霉烯类药物在敏感范围内,提示可产生碳青霉烯酶。本研究以本院 2010 年分离 120 株初筛试验阳性的肠杆菌科细菌为研究对象,检测碳青霉烯酶产生情况。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集本院 2010 年 1~5 月临床标本中分离出的耐一种或多种三代头孢菌素、亚胺培南和美罗培南敏感的肠杆菌科细菌 120 株,无重复株。其中大肠埃希菌 82 株,肺炎克雷伯菌 29 株,产酸克雷伯菌 4 株,阴沟肠杆菌 3 株,产气肠杆菌 2 株,弗劳地枸橼酸杆菌 2 株。标本来源痰液标本 36 份、尿液标本 69 份、生殖道分泌物标本 10 份、血标本 4 份、引流液 1 份。所有菌株均经 API20E 鉴定。

1.1.2 抗菌剂药敏纸片 头孢他啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南纸片均为英国 Oxoid 公司产品。

1.1.3 MH 琼脂 博赛生物技术股份有限公司生产。

1.1.4 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922 和肺炎克雷伯菌 ATCCBAA-1705 为阳性对照菌株。肺炎克雷伯菌 ATCC700603 为阴性对照菌株。

1.2 方法

1.2.1 碳青霉烯酶初筛试验 采用 K-B 纸片琼脂扩散法,对多种三代头孢菌素和亚胺培南、美罗培南进行药敏实验,根据 CLSI

标准进行判断,挑选一种或多种三代头孢菌素耐药、亚胺培南和美罗培南敏感,提示可能产生碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌。

1.2.2 改良 Hodge 试验^[3] (1)用大肠埃希菌 ATCC25922 (指示菌)在肉汤或生理盐水制备 0.5 麦氏单位标准菌悬液(使用直接菌落悬液法或生长法),再用盐水或肉汤 1:10 稀释。按常规纸片扩散法程序接种 MH 琼脂,在平板表面放置一张美罗培南纸片使平板干燥 3~10 min。(2)使用 10 μL 接种环或拭子,挑取在血琼脂平板过夜生长的 3~5 个试验菌落或质控菌株,从纸片边缘向外划直线接种,划线至少有 20~25 mm 长。35℃ 孵育 16~20 h 后检查 MH 琼脂,在抑菌环与试验菌株或质控菌株划线交叉处出现增强生长为产碳青霉烯酶阳性,无增强生长为产碳青霉烯酶阴性,见图 1。



图 1 临床分离株改良 Hodge 试验

2 结果

在筛选的 120 株肠杆菌科细菌中,都是对一种或多种三代头孢菌素耐药,但亚胺培南和美罗培南均在敏感范围内。对这些可能产生碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌,通过改良 Hodge 试验进行确证试验后,发现阳性结果的菌株有 4 株,其中肺炎克雷伯菌 2 株,大肠埃希菌 1 株,弗劳地枸橼(下转第 1838 页)

素和 IL-10 呈明显负相关($r = -0.815, P < 0.05$)。

表 2 不同程度 HIE 患儿的血清脂联素和 IL-10 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脂联素(mg/L)	IL-10(μ g/L)
健康对照组	30	41.22 \pm 5.20	17.11 \pm 10.02
轻度组	11	37.54 \pm 6.60	37.06 \pm 7.23
中度组	33	24.07 \pm 6.91	50.20 \pm 9.27
重度组	16	18.01 \pm 5.41	58.32 \pm 11.14
F	—	85.21	74.09
P	—	<0.01	<0.01

—:无数据。

3 讨 论

脂联素是新近发现的由脂肪细胞分泌的特异性蛋白,参与胎儿生长发育的调节^[3]。在诸多脂肪细胞因子中脂联素的血浆水平最高,其在血管功能调控中发挥重要作用^[4]。脂联素具有促进缺氧缺血状态下血管再生的功能。这种功能可能是通过单磷酸腺苷激活蛋白激酶信号转导通路来实现的。本研究显示,HIE 组出生 24 h 内血清脂联素水平低于健康对照组;血清脂联素水平随 HIE 加重而降低,各组比较差异均有统计学意义。提示脂联素可以反映 HIE 患儿脑损伤的程度,对病情的监测有一定的意义。

HIE 的炎症反应是一个极为复杂的过程,多种免疫细胞和免疫因子参与其中。IL-10 是一种单链糖蛋白,相对分子质量(35~40) $\times 10^3$,要由 Th2 细胞产生。IL-10 是细胞免疫反应抑制剂,参与 HIE 的病理生理过程。IL-10 在体外可抑制白细胞和小胶质细胞分泌 IL-1、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等细胞因子,抑制白细胞聚集和趋化因子的产生^[5],并能减轻大脑缺血后的迟发性损伤,提示 IL-10 具有神经保护作用^[6]。IL-10 可抑制氧自由基的合成从而起到保护作用^[7]。故测定 IL-10 对病情的监测具有一定意义^[8]。本研究显示,HIE 组出

生 24 h 内血清 IL-10 水平高于健康对照组;血清 IL-10 水平随 HIE 加重而增高,各组比较差异均有统计学意义;提示血清 IL-10 可反映了 HIE 患儿脑损伤的程度,对病情的监测有一定的意义。

本研究显示,HIE 患儿重度组、中度组、轻度组血清脂联素和 IL-10 均呈显著负相关。说明 HIE 患儿血清 IL-10 等细胞因子水平的升高刺激了脂联素参与抗感染反应,从而导致脂联素水平降低。因此,血清脂联素和 IL-10 可作为临床早期判断 HIE 患儿的疗效和判定病情严重程度的实验室指标。

参考文献

- [1] 田恬,周宏艳,李改莲,等.尿 S100B 蛋白和乳酸/肌酐比值对新生儿缺氧缺血性脑病预后判断的价值[J].中国新生儿科杂志,2008,23(3):141-144.
- [2] 肖昕,王冬菊.新生儿缺氧缺血性脑病国内外诊断标准的比较[J].实用儿科临床杂志,2006,21(2):127-128.
- [3] 郑俊虎,宋春梅,郑路颖,等.大于胎龄儿脐血脂联素水平测定及其临床意义[J].实用儿科临床杂志,2007,22(8):589-590.
- [4] 冯晔,施圣云,周晓玉.缺氧缺血性脑病新生儿血清脂联素、白细胞介素-6 变化的意义[J].实用儿科临床杂志,2008,23(18):1425-1426.
- [5] 牛文强.IL-10 基因 1082A/G 多态性与前列腺癌的发生及其进展的相关性分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(1):42-43.
- [6] 蒋红侠,王军,张绍美.新生儿缺氧缺血性脑病血清 IL-10、NSE 变化及临床意义[J].江苏医药,2007,33(6):544.
- [7] 王军,蒋红侠,杨丽娟,等.参麦注射液对缺氧缺血性脑病新生儿血清白细胞介素-10、酸性钙结合蛋白-100 β 水平的影响[J].实用儿科临床杂志,2008,23(2):148-149.
- [8] 刘克宇,张重梅,宋庆云,等.新生儿缺氧缺血性脑病血清 IL-10、MCP-1 变化及临床意义[J].疑难病杂志,2011,10(1):13-15.

(收稿日期:2011-05-09)

(上接第 1836 页)

酸杆菌 1 株。这些阳性菌株对三代和四代头孢菌素全部耐药,亚胺培南和美罗培南的抑菌圈直径均在 16~22 mm 之间,见表 1。

表 1 碳青霉烯酶阳性菌株对不同药物的抑菌圈直径(mm)

菌种	头孢他啶	头孢噻肟	头孢曲松	头孢吡肟	亚胺培南	美罗培南
大肠埃希菌	9	7	6	10	19	19
肺炎克雷伯菌	13	9	6	13	22	20
肺炎克雷伯菌	13	8	6	14	21	20
弗劳地枸橼酸杆菌	6	8	8	13	19	16

3 讨 论

碳青霉烯类抗菌剂是控制临床致病菌感染最有效的药物之一,但近几年对该类抗菌剂耐药的菌株不断增多,给临床治疗带来困难。主要机制之一是碳青霉烯酶导致碳青霉烯类抗菌剂耐药^[4]。随着碳青霉烯类抗菌剂在临床上的使用增加,对碳青霉烯类不敏感的肠杆菌科细菌正在逐渐增加。KPC (klebsiella pneumoniae carbapenemase) 酶是近年发现的一种新型碳青霉烯酶,属于 Bush 分类的 2f 组, Ambler 分类的 A 类,能够水解碳青霉烯类、青霉素类、头孢菌素类和氨基糖苷类等抗菌剂。A 类碳青霉烯酶中以 KPC 型碳青霉烯酶最常见,产酶菌主要为肺炎克雷伯菌,其次为产酸克雷伯菌、大肠埃希菌、弗劳地枸橼酸杆菌、肠杆菌属、沙门菌属、沙雷菌属^[5],已有 5 个 KPC 亚型被国内外研究发现,中国主要以产 KPC-2 型酶为主^[6]。国外有报道产 KPC 碳青霉烯酶的菌株既可表现为对碳青霉烯类抗菌剂耐药也可表现为中介或敏感性的降低,这就导致 KPC 酶容易被漏检或误检为其他类型的 β -内酰胺酶^[7]。本

试验中 4 株确证试验阳性的菌株对三代头孢菌素全部耐药,亚胺培南、美罗培南的抑菌圈直径均在 16~22 mm 的敏感范围内。说明即使碳青霉烯类药物体外药敏实验敏感,但证明产碳青霉烯类酶,其治疗肠杆菌科细菌的感染临床疗效不能确定。

参考文献

- [1] 齐艳,俞云松. KPC 型碳青霉烯酶研究进展[J]. 现代实用医学,2010,22(5):485-486.
- [2] Bratu S, Landam D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae in New York city: a new threat to our antibiotic armamentarium[J]. Arch Intern Med, 2005, 165(12):1430-1435.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S19 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- [4] 陈振华,刘文恩. 碳青霉烯酶研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(8):841-843.
- [5] Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8):2723-2725.
- [6] 李金钟,刘利平. KPC 碳青霉烯酶及检测的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(4):357-359.
- [7] 苏丹虹,李敏亮,金光耀,等. 肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌产 KPC 酶的检测研究[J]. 中国抗生素杂志,2009,34(11):684-687.

(收稿日期:2011-05-09)