

## • 检验技术与方法 •

## 肠杆菌科产碳青霉烯酶菌株筛选试验方法的研究

吕金娥<sup>1</sup>, 许云敏<sup>2</sup>, 杜艳<sup>2</sup>

(1. 云南省曲靖市第二人民医院检验科 655000; 2. 昆明医学院第一附属医院检验科 650031)

**摘要:**目的 评价肠杆菌科产碳青霉烯酶菌株纸片扩散初筛试验与改良 Hodge 试验的符合性, 为基层实验室常规开展产碳青霉烯酶菌株检验提供依据。方法 收集临床分离的 34 株对碳青霉烯类抗生素敏感性降低的分离株, 采用纸片扩散法检测其对厄他培南、亚胺培南、美罗培南的耐药性; 通过改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶。结果 34 株临床分离株经纸片扩散法检测对厄他培南为全部耐药; 对美罗培南 29 株耐药, 5 株敏感; 对亚胺培南 25 株耐药, 1 株中介, 8 株敏感。通过改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶 34 株菌中有 21 株阳性; 厄他培南、美罗培南、亚胺培南耐药株与 Hodge 试验阳性株的符合率分别为 61.8%、72.4%、80.8%。结论 以亚胺培南作为初筛底物对筛选产碳青霉烯酶菌株的特异度更高, 亚胺培南耐药菌株应高度怀疑是产碳青霉烯酶株。

关键词: 肠杆菌科; 碳青霉烯酶; 耐药性; 筛选试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)11-1356-01

肠杆菌科细菌如肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌是医院感染的主要条件致病菌, 而碳青霉烯类抗生素是治疗革兰阴性杆菌感染特别是肠杆菌科细菌最强效的  $\beta$ -内酰胺类药物<sup>[1]</sup>。目前产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌已在很多国家出现和被报道, 产碳青霉烯酶菌株感染造成的暴发流行, 使临床抗感染治疗面临严峻挑战。诊断微生物学实验室, 需要快速的检测方法检测产碳青霉烯酶菌株, 及时检测并报告给临床医生, 为合理使用抗生素、控制医院感染和流行病学提供实验室依据。

## 1 材料与试验方法

**1.1 材料** 收集自 2010 年 12 月至 2011 年 8 月从临床分离的对碳青霉烯类抗生素敏感性降低的肠杆菌科细菌 34 株(22 株肺炎克雷伯菌、6 株阴沟肠杆菌、2 株大肠埃希菌、4 株弗氏柠檬酸杆菌)。

**1.2 仪器与试剂** MH 琼脂为郑州安图生物有限公司生产, 美罗培南为日本住友制药株式会社产品, 亚胺培南和厄他培南均为美国默沙东公司产品。

**1.3 质控菌株** 大肠埃希菌 ATCC25922, 铜绿假单胞菌 ATCC27853, 肺炎克雷伯菌 ATCCBAA-1706; 以肺炎克雷伯菌 ATCCBAA-1705 为阳性质控菌, 每周进行 1 次室内质控。

## 1.4 方法

**1.4.1 表型筛选试验** 将碳青霉烯类抗生素敏感性降低的菌株, 采用 K-B 纸片扩散法, 挑一定量的细菌配成浊度为 0.5 麦氏单位的菌液, 均匀涂布于 MH 琼脂平板上, 室温干燥 3~5 min。贴亚胺培南、美罗培南和厄他培南三种纸片, 各纸片中心大于 24 mm, 纸片距离平板边缘应大于 15 mm。置 35 °C 孵育 16~18 h 后读取结果, 判断标准参照临床实验室标准化协会(CLSI)2010 年标准。

**1.4.2 表型确证试验** 使用无菌生理盐水将大肠埃希菌 ATCC25922 菌悬液浊度调至 0.5 麦氏单位, 并进行 1:10 稀释, 将菌液接种在 MH 琼脂平板上, 干燥 3~10 min, 在平板中心贴 10  $\mu$ g 厄他培南纸片, 用 10  $\mu$ L 接种环挑取 3~5 个待测分离菌株从纸片的边缘画线到平板的边缘, 过夜培养, 若出现苜蓿叶状抑菌环则为碳青霉烯酶表型阳性。

## 2 结果

**2.1** 对碳青霉烯类抗生素敏感性降低的 34 株分离菌株中, 采用纸片扩散法测定对厄他培南全部耐药; 对美罗培南 29 株耐药, 5 株敏感; 对亚胺培南 25 株耐药, 1 株中介, 8 株敏感。

**2.2** 对碳青霉烯类抗生素敏感性降低的 34 株分离株采用改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶, 以厄他培南作为底物, 34 株菌

中有 21 株 Hodge 试验阳性。Hodge 试验阳性菌株与厄他培南、美罗培南、亚胺培南耐药的符合率分别为 61.8%、72.4%、80.8%。

## 3 讨论

对碳青霉烯类抗生素敏感性降低的肠杆菌科细菌已在全球范围广泛出现, 国内也有多家医院相继分离到产 KPC-2 型酶的肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、黏质沙雷菌, 甚至在某些病房出现了局部流行。

产碳青霉烯酶的菌株正逐年增加, 但不同的药敏试验方法对碳青霉烯酶介导的碳青霉烯类抗生素的耐药检出率存在很大差异, 其主要原因是产碳青霉烯酶菌株存在明显的接种效应<sup>[2]</sup>, 而不同的药敏试验方法接种的菌量不同。本研究对碳青霉烯类抗生素敏感性降低的 34 株菌, 经纸片扩散法检测发现对厄他培南全部耐药; 对美罗培南 29 株耐药, 5 株敏感; 对亚胺培南 25 株耐药, 1 株中介, 8 株敏感。经改良 Hodge 试验检测有 21 株 Hodge 试验阳性; 与厄他培南, 美罗培南、亚胺培南耐药菌株的符合率分别为 61.8%、72.4%、80.8%。研究结果显示亚胺培南耐药株与 Hodge 实验结果的符合率最高, 特异性明显优于厄他培南和美罗培南。

Pasteran 等<sup>[3]</sup>用亚胺培南初筛产碳青霉烯酶细菌, 其敏感度为 100.0%, 特异度为 95.5%。本研究结果显示采用纸片扩散法检测亚胺培南耐药株经以厄他培南作为底物的改良 Hodge 试验证实检出率很高, 亚胺培南耐药菌株可作为高产碳青霉烯酶株的一个早期预测指标, 以供临床医生选用抗生素作为参考。基层实验室可以用亚胺培南作为纸片扩散法检测产碳青霉烯酶株初筛实验的底物, 有条件的情况下再送二级实验室做确认。

## 参考文献

- [1] 叶素娟, 杨青, 俞云松. 2005 年中国 CHINET 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(4): 283-286.
- [2] 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.
- [3] Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(6): 1631-1639.