

· 基础论著 ·

检测产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌常用药物敏感试验方法的比较

赵书平 姜梅杰 宗桂珍

【摘要】 目的 比较几种常用的检测产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌药物敏感试验方法的检出率。**方法** 采用 PCR 技术及序列分析判定产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌;采用纸片扩散法、VTKTU 2 Compact AST-GN13 药敏板、ATB G-5 药敏板和 WalkAway 96 PLUS NC31 药敏板分别检测菌株对碳青霉烯酶类抗菌药物的耐药性。**结果** 纸片扩散法检出 8 株(72.7%)产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌对亚胺培南耐药,AST-GN13 药敏板、ATB G-5 药敏板和 NC31 药敏板均检出 3 株(27.7%)对亚胺培南耐药;纸片扩散法检出 11 株(100%),G-5 药敏板检出 7 株(63.6%)对美罗培南耐药;纸片扩散法和 AST-GN13 药敏板均检出 11 株(100%)对厄他培南耐药。KPC 阳性基因测序结果为 KPC-2 型碳青霉烯酶。**结论** 纸片扩散法经济、方便,对碳青霉烯酶类抗菌药物耐药性检出率高,是筛查产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的最佳方法。

【关键词】 克雷伯菌,肺炎;碳青霉烯酶;药物敏感试验

Comparison of drug sensitivity tests by detecting carbapenemase KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*

ZHAO Shu-ping, JIANG Mei-jie, ZONG Gui-zhen. Central Hospital of Tai'an, Tai'an 271000, China

Corresponding author: ZHAO Shu-pin, Email: dczhshp@126.com

【Abstract】 Objective To compare the detection rates of different methods on detecting carbapenemase KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** PCR and sequence analysis were applied to determine carbapenemase KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Disk diffusion method, VTKTU 2 Compact AST-GN13 panel, ATB G-5 panel and Walk Away 96 PLUS NC31 panel were applied to detect drug resistance of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* to carbapenems, respectively. **Results** Total of 8 strains (72.7%) KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to imipenem were detected by disk diffusion method; 3 strains (27.7%) resistant to imipenem were detected by AST-GN13 panel, ATB G-5 panel and NC31 panel, respectively; 11 strains (100%) resistant to Meropenem were detected by disk diffusion method; 7 strains (63.6%) resistant to Meropenem were detected by ATB G-5 panel; 11 strains (100%) resistant to Ertapenem were detected by disk diffusion method and AST-GN13 panel. KPC positive gene sequencing showed that carbapenem was KPC-2. **Conclusions** Disk diffusion method has the highest detection rate of carbapenems which is economical and is convenient, and is considered to be the best method for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* screening.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; Carbapenemase; Drug sensitivity test

肺炎克雷伯菌已成为诱发医院内感染的主要病原菌之一。有报道显示碳青霉烯类抗菌药物是治疗肠杆菌科细菌严重感染的最有效的 β -内酰胺类抗菌药物^[1]。由于本地区同时产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌阳性检出率较高,因此碳青霉烯类抗菌药物治疗多药耐药肺炎克雷伯菌引起的感染在临床上较常见。近年来发现了产 KPC (*Klebsiella*

pneumoniae carbapenemase, KPC) 型碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌^[2-6],为及时准确地筛查出此类菌株,指导临床治疗中正确使用抗菌药物,本研究对已证实产 KPC 型碳青霉烯菌的肺炎克雷伯菌采用常用的药敏试验方法进行比较以筛选产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的最佳方法,报道如下。

材料与方法

一、菌株来源

收集 2006 年 6 月至 2010 年 6 月本院临床分离的经 PCR 技术及序列分析证实的产 KPC 型肺炎克雷伯菌 11 株,其中分离自痰液 9 株、分泌物 1 株、血

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.002

基金项目:泰安市科技局计划课题(20074039)

作者单位:271000 泰安市,山东泰安市中心医院检验科(赵书平、姜梅杰),药政科(宗桂珍)

通讯作者:赵书平,Email:dczhshp@126.com

液1株。标准菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。KPC 阳性标准菌株由沈继博士惠赠。

二、主要试剂

血琼脂培养基、MH 琼脂培养基、药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品。PCR 检测试剂 *Taq* 酶、Buffer、dNTP 及相关材料均为大连宝生物工程有限公司产品,引物由该公司合成。ATB G-5 为法国 Biomerieux 半自动细菌鉴定及药敏分析仪肠杆菌科药敏板,AST-GN13 为法国 Biomerieux 公司 VTKTU 2 Compact全自动细菌鉴定及药敏分析仪药敏板,NC31 为德国西门子公司 WalkAway 96 PLUS 全自动细菌鉴定及药敏分析仪药敏板。

三、药物敏感试验

药物敏感性根据 2010 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)的标准进行抗菌药物判读^[7]。纸片扩散法测定菌株对亚胺培南、美罗培南、厄他培南等抗菌药物的耐药性;VTKTU 2 Compact AST-GN13 药敏板检测菌株对亚胺培南、美罗培南和厄他培南的耐药性;ATB G-5 药敏板检测菌株对亚胺培南和美罗培南的耐药性;WalkAway 96 PLUS NC31 药敏板检测菌株对亚胺培南的耐药性。各药物敏感试验严格按照操作规程进行。

四、耐药基因的检测

KPC1-4 引物参照文献设计^[8],KPC1-4 上游引物:5'-GCGGAACCATTCGCTAAACTC-3'; KPC1-4 下游引物:5'-CGCCCAACTCCTTCAGCAACA-3',产物长度为 340 bp;反应条件:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 60 s,35 个循环。产物在含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,用凝胶成像系统观察结果。将 KPC 阳性基因 PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果在 GenBank 查询比对。

结 果

一、四种药敏方法检测产 KPC 型碳青霉烯酶菌株对亚胺培南、美罗培南和厄他培南的耐药率

4 种药敏方法中,纸片扩散法检出 8 株菌株

(72.7%)对亚胺培南耐药,3 株(27.3%)对亚胺培南中介;VTKTU 2 Compact AST-GN13 药敏板、ATB G-5 药敏板和 WalkAway 96 PLUS NC31 药敏板均检出 3 株(27.3%)对亚胺培南耐药,其余 8 株敏感;纸片扩散法检出 11 株(100%)对美罗培南耐药,ATB G-5 药敏板检出 7 株(63.6%)对美罗培南耐药;纸片扩散法和 AST-GN13 药敏板均检出 11 株(100%)对厄他培南耐药。4 种常用药敏方法检测菌株对亚胺培南、美罗培南和厄他培南的药敏情况,详见表 1。

二、KPC 耐药基因检测结果

11 株肺炎克雷伯菌 KPC 基因均为阳性,对 11 株 KPC 基因 PCR 扩增产物进行测序,测序结果数据在 GenBank 中进行比对,结果显示 11 株 KPC 基因均为 KPC-2 型碳青霉烯酶(图 1)。

讨 论

随着抗菌药物的大量使用,近年来临床中对各类抗菌药物耐药的细菌迅速增多。碳青霉烯类抗菌药物已成为临床治疗肠杆菌科细菌引起严重感染的首选药物,但近年来相继发现了对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌,因此对此类抗菌药物敏感性降低的肠杆菌科细菌的出现给临床治疗带来了很大的困扰。Yong 等^[9]首次报道产 DN1-1 菌株,该菌株对所有 β-内酰胺类抗菌药物均耐药,仅对黏菌素敏感。2008 年有研究报道英国、印度分别发现了携带 DN1-1 的肠杆菌科细菌^[10],有报道称产 DN1-1 菌株可以通过质粒实现菌株之间的水平传播,部分菌株可克隆传播^[11]。本研究仅对 KPC 型碳青霉烯酶进行了研究,国内 Wei 等^[2]首先报道了产 KPC-2 型的肺炎克雷伯菌,随后有产 KPC-2 型肠杆菌科细菌的报道^[12-14],有报道显示产 KPC-2 型黏质沙雷菌、肺炎克雷伯菌多在同一病房流行^[12]。为及时检测出产 KPC 酶菌株,正确指导临床使用抗菌药物,防止产 KPC 型碳青霉烯酶菌株在院内传播,应首先检测细菌对各种碳青霉烯类抗菌药物的耐药性。但不同药敏试验方法所测试碳青霉烯类抗菌药

表 1 4 种药敏方法检测产 KPC 型碳青霉烯酶菌株对抗菌药物的药敏情况[株数(%)]

药敏方法	亚胺培南			美罗培南			厄他培南		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
AST-GN13 药敏板	3/11(27.3)	0/11(0.0)	8/11(72.7)	-	-	-	11/11(100.0)	0/11(0.0)	0/11(0.0)
ATB G-5 药敏板	3/11(27.3)	0/11(0.0)	8/11(72.7)	7/11(63.7)	0/11(0.0)	4/11(36.7)	-	-	-
NC31 药敏板	3/11(27.3)	0/11(0.0)	8/11(72.7)	-	-	-	-	-	-
纸片扩散法	8/11(72.7)	3/11(27.3)	0/11(0.0)	11/11(100.0)	0/11(0.0)	0/11(0.0)	11/11(100.0)	0/11(0.0)	0/11(0.0)

注:“-”表示未能检测

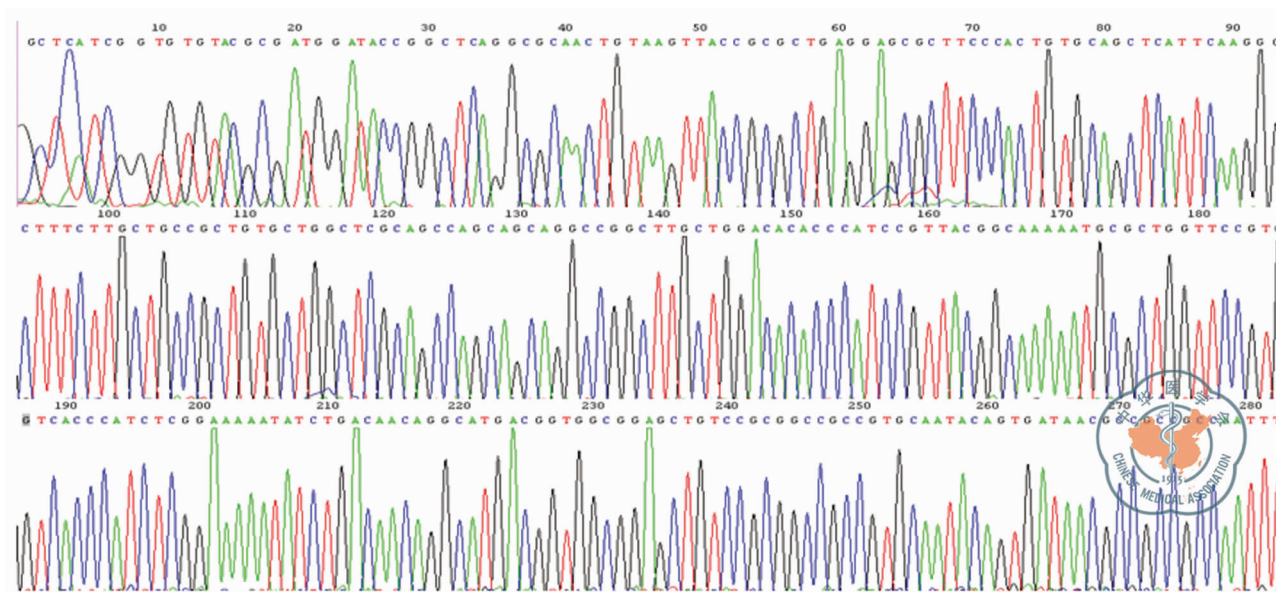


图 1 KPC-2 基因 PCR 产物测序图

物不同。商品化的药敏检测方法中,药敏板测试的碳青霉烯类抗菌药物不完全相同,且抗菌药物浓度梯度也存在一定差异。本研究结果显示,采用纸片扩散法和仪器法检测产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率有很大差异。纸片扩散法经济、方便,能同时检测产 KPC 型碳青霉烯酶菌株对亚胺培南、美罗培南和厄他培南耐药性,并且能根据 CLSI 修订的新标准进行抗菌药物判读,是筛查产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的最佳方法。机器法中 VTKTU 2 Compact 自动化仪器 AST-GN13 药敏板能检测菌株对厄他培南和亚胺培南的耐药性;ATB 半自动化仪器 ATB G-5 药敏板能检测菌株对美罗培南和亚胺培南的耐药性;WalkAway 96 PLUS 自动化仪器 NC31 药敏板能检测菌株对亚胺培南的耐药性。以上方法均存在一定的局限性。本研究结果显示,厄他培南是检测产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的最好筛查药物。由于筛查产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的关键是检测菌株对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性,因而必须选择最佳的药敏试验方法,才能提高检测产 KPC 型碳青霉烯酶菌株对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率。本研究提示,临床微生物室应对多药耐药的肺炎克雷伯菌检测菌株对厄他培南的 MIC 值或抑菌圈直径,以防止产 KPC 型碳青霉烯酶菌株的漏检。

参 考 文 献

- 1 Rahal JJ. The role of carbapenems in initial therapy for serious Gram-negative infections. *Crit Care*, 2008, 12 (Suppl 4): S5.
- 2 Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51 (2): 763-765.
- 3 Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50 (9): 3098-3101.
- 4 张幸国, 杜小幸, 张荣, 等. 发现一株产 KPC-2 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌. *中华检验医学杂志*, 2006, 29 (9): 824-826.
- 5 Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45 (4): 1151-1161.
- 6 Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50 (8): 2880-2882.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twentieth informational supplement. USA. 2010.
- 8 沈继录, 朱德妹, 吴卫红, 等. 革兰阴性杆菌碳青霉烯酶产生与细菌耐药性关系的研究. *中华检验医学杂志*, 2008, 31 (4): 408-414.
- 9 Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53 (12): 5046-5054.
- 10 Umarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10 (9): 597-602.
- 11 刘亚丽, 王辉. 新型金属 β 内酰胺酶-1 的发现及其研究进展. *中华检验医学杂志*, 2010, 33 (12): 1112-1115.

- 12 张嵘, 蔡加昌, 周宏伟, 等. 肠杆菌科细菌中质粒介导的 KPC-2 型碳青霉烯酶的检测. 中华检验医学杂志, 2008, 31(10): 1134-1141.
- 13 Cai JC, Zhou HW, Zang R, et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(6): 2014-2018.
- 14 Shen P, Wei Z, Jiang Y, et al. Novel genetic environment of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(10): 4333-4338.

(收稿日期: 2011-06-13)

(本文编辑: 孙荣华)

赵书平, 姜梅杰, 宗桂珍. 检测产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌常用药物敏感试验方法的比较[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(2): 93-96.

