

· 临床论著 ·

自动细菌鉴定药敏系统对肺炎克雷伯菌 产碳青霉烯酶菌株的检测评价

杨婧 张彭 褚美玲 马均 任微 于静波 薛文成

【摘要】目的 本研究旨在探讨自动细菌鉴定药敏仪器对碳青霉烯非敏感肺炎克雷伯菌株的检测效果,并对其实用性、可靠性做出初步评价。**方法** 采用改良Hodge试验对菌株进行产碳青霉烯酶筛选,同时与常规药敏实验筛选的可能产碳青霉烯酶实验菌株对照,对可疑菌株进行相关耐药基因PCR扩增、测序,以此结果作为标准来判断上述试验的敏感性和特异性。**结果** 研究期间临床共检出87株可疑产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌株,经Hodge试验初筛、PCR扩增证实产KPC酶的菌株40株,待测序确认6株;无VIM和IMP基因型;VITEK2专家系统提示碳青霉烯酶表型的敏感性87.0%,特异性92.7%。**结论** VITEK2自动药敏鉴定仪因其对低水平耐药的产碳青霉烯酶菌株检测效果欠佳,敏感性和特异性不高,在筛选产碳青霉烯酶菌株时需谨慎使用。

【关键词】 碳青霉烯酶;肺炎克雷伯菌;耐药表型

Evaluation of carbapenemases resistance phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates detected by automated microbial identification system YANG Jing, ZHANG Peng, CHU Mei-ling, MA Jun, REN Wei, YU Jing-bo, XUE Wen-cheng. General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110840, China

Corresponding author: XUE Wen-cheng, Email: 13309884078@189.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of automated bacterial identification system to identify carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* isolates and to make a preliminary evaluation of its practicality and reliability. **Methods** Total of 87 *K. pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to carbapenems were evaluated. Antimicrobial susceptibility was performed by VITEK2. The carbapenemase resistance phenotype of the isolates resistant to carbapenem was screened by modified Hodge test and identified by VITEK2 automated microbial identification and susceptibility instrument. The carbapenemase-encoding genes were identified by PCR and amplicon sequencing. **Results** Among 87 isolates, 40 isolates were determined as KPC positive by PCR, 6 isolates were waiting for confirmation by sequencing. There was no VIM or IMP gene. Based on the results of PCR, the sensitivity and specificity value for “flagging” a likely carbapenemase was 87.0% and 92.7% by VITEK 2, respectively. **Conclusions** The sensitivity and specificity of VITEK2 to identify the carbapenemases was not high, due to its poor detection for low-level resistant carbapenemase isolates. This means the method should be used cautiously.

【Key words】 Carbapenemases; *Klebsiella pneumoniae*; Phenotype of resistance

碳青霉烯类抗菌药物是目前临床治疗常见革兰阴性杆菌多重耐药菌株感染最有效的药物,近年来耐碳青霉烯类抗生素的菌株的流行已日趋严重,院内感染重要病原菌肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kpn)也出现了耐碳青霉烯类药物不敏感株^[1-2]。临

床标本中产碳青霉烯酶菌株的筛查首先依赖于自动化细菌药敏仪器,为了能更好地检测到这类产酶菌株,美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)对碳青霉烯类药敏折点进行了修改,并详细地规定了需进一步用辅助实验来筛选该酶的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值和纸片扩散法抑菌圈范围^[3]。那么,自动细菌药敏分析仪器对产碳

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.05.008

基金项目: 辽宁省科技攻关计划(No. 2011225021)

作者单位: 110840 沈阳市, 沈阳军区总医院检验科

通讯作者: 薛文成, Email: 13309884078@189.cn

青霉烯酶菌株的检测能力究竟处于何种状况, 本文结合近年来的临床实践对此进行评估。

资料与方法

一、研究对象

1. 菌株来源: 收集2011年9月至2012年12月本院不同患者共49株肺炎克雷伯菌, 另收集同期沈阳市其他医院38株产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌, 以上共87株分离株均用于本实验。

2. 质控菌株: 大肠埃希菌ATCC 25922、Hodge阳性的肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705、Hodge阴性的肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706各1株。

二、主要仪器和主要试剂

Roche 480 II 实时荧光定量PCR仪(瑞士 Roche 公司), 超速离心机(美国Tomos公司); 法国生物梅里埃VITEK2 COMPACT自动鉴定仪等。

所有培养基均由天津金章公司生产, 常规药敏实验用仪器原装配套试剂, 美罗培南等药敏纸片, 由英国OXOID公司生产。PCR扩增试剂盒购自大连宝生物公司(TaKaRa), 批号(lot): B1101AA。

三、主要方法

1. 改良Hodge试验: 依据文献2009版CLSI推荐方法完成^[3]。

2. PCR扩增检测耐药基因: (1) 细菌DNA模板制备采用加热煮沸法。①将过夜培养的待测细菌刮取1~2接种环菌落, 加入含200 μl双蒸水的EP管中; ②将菌落和双蒸水混匀后, 100 °C加热煮沸10 min; ③以13 000 r/min(离心半径r = 7.3 cm)转速离心10 min, 抽取上清液约100 μl作为细菌DNA

的模板, 并将其置于-20 °C冰柜保存备用。

(2) 引物设计: 参考文献^[4]及Pubmed数据库比对分析证实, 见表1。

(3) PCR扩增: 体系选用大连宝生物试剂盒, 采用50 μl的反应体系: rTaq 25 μl、上下游引物各2 μl、DNA模板5 μl、双蒸水16 μl。PCR反应条件: 94 °C预变性10 min, 共25个扩增循环, 每个循环包括: 94 °C变性1 min, 55 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min。为防循环中产物延伸不够充分, 最后72 °C保持7 min, 使产物延伸完整。

(4) PCR基因测序: 由北京中科希林生物科技有限责任公司测序部完成。

结 果

一、仪器法检测碳青霉烯类药物药敏结果

本院临床分离的49株肺炎克雷伯菌在常规药敏试验(迪尔药敏鉴定系统)中出现对碳青霉烯类药物不敏感或纸片法复核时抑菌圈中有散在菌落生长的情况。为实验样本量考虑, 同时收集了辽宁省其他医院碳青霉烯类药物耐药菌株38株。

VITEK2 COMPACT自动微生物鉴定药敏仪器专家系统可提示耐药表型检测, 严格按照仪器操作规范要求, 对上述87株实验菌株进行药敏检测, 菌悬液浊度取标准要求0.50~0.63麦氏浊度。该系统对87株实验菌株与碳青霉烯类药物相关耐药表型的提示结果见表2。

二、改良Hodge试验结果

87株待测菌中改良Hodge试验阳性的菌株有47株阳性。本实验阳性菌株分别是(6、8、9、10、12、13、14、21、35、50~87号)。本实验选取10号菌株代表如图1。

三、碳青霉烯酶基因检测结果

经PCR扩增及测序证实KPC基因检测阳性结果共40株。本实验中表型推导为金属β-内酰胺酶6株, 金属β-内酰胺酶VIM、IPM基因检测均为阴性, KPC引物PCR扩增出500 bp左右的产物(目标片段约1000 bp), 见图2。连续送测序3次, 均未

表1 KPC及两种金属型碳青霉烯酶的引物

引物	碱基序列(5' → 3')
Imp-f	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC
Imp-r	GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT
VIM-f	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG
VIM-r	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA
blaKPC-f	CCTCGTCATCCGCAGACCAAC
blaKPC-r	CGCGCAGACTCCTAGCCTAAA

注: Imp、VIM: B类碳青霉烯酶中的两种类型; blaKPC: 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶

表2 实验菌株VITEK2药敏耐药表型提示碳青霉烯类药物耐药表型

菌株编号	耐药表型
6、8、9、10、13、14	获得性头孢菌素酶(除外ACC-1)+超广谱β-内酰胺酶+不渗透性(头霉素类)
12、28、4、50~87	碳青霉烯耐药(不渗透性)+超广谱β-内酰胺酶+碳青霉烯酶(metallo或KPC)
21、35	获得性头孢菌素酶(除外ACC-1)+超广谱β-内酰胺酶+不渗透性(头霉素类)+超广谱β-内酰胺酶+碳青霉烯酶(metallo或KPC)

注: metallo: 金属β内酰胺酶, KPC: 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶



注：阳性对照肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705；阴性对照肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706；10号为实验菌株

图1 改良Hodge试验阳性结果示意图

能顺利测序，此6株疑为非特异扩增或其他原因。其他40株菌株的PCR产物条带约1200 bp，随机挑取2株送检测序，结果与Pubmed核酸数据库中通道号FJ853623.1 blaKPC-2 gene等多株Kpn菌株的blaKPC-2序列最大一致度为99%（覆盖率99%）。测序与BLAST数据库KPC-2序列99%一致。

四、自动细菌鉴定系统检测碳青霉烯酶结果

假定6、8、9、10、13、14等6株菌株PCR结果成立，以PCR方法为金标准，在现有的检测结果包括VIM、IPM、KPC等碳青霉烯酶基因为前提，不考虑未检测的NDM、OXA-48等基因情况下，VITEK2自动鉴定仪器提示碳青霉烯酶耐药表型灵敏度87.0%，特异性92.7%。

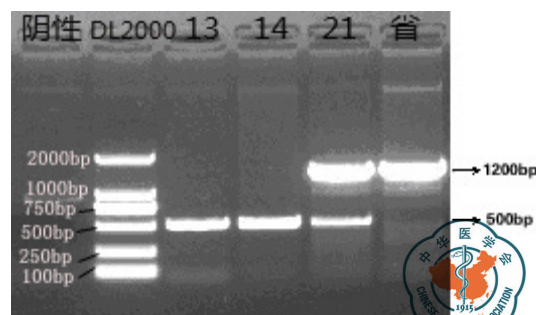
五、VITEK 2仪器对6株实验菌耐药表型误鉴定评估

鉴于VITEK 2系统对6、8、9、10、13、14等菌株的耐药表型鉴定提示结果与改良Hodge试验的实验结果有较大出入，为探究原因，重新对上述6株实验菌株在VITEK 2自动微生物鉴定药敏仪器复查，实验过程分别取不同浊度的菌悬液进行药敏鉴定。第一组严格按照仪器操作规范要求，菌悬液浊度取标准要求的0.50~0.63麦氏浊度。另一组菌悬液取0.65~0.70麦氏浊度对照进行实验。系统对实验菌株与β-内酰胺酶、碳青霉烯酶等相关耐药表型的提示结果见表3。结果显示，稍高于标准菌悬液浊度组均对产碳青霉烯酶进行了提示，而标准浊度组仅1例提示。

表3 VITEK 2对不同菌悬液浊度实验菌株β-内酰胺酶类耐药表型的鉴定

菌液浊度（麦氏浊度）	耐药表型	菌株数
0.50~0.63	提示表型1	1
	提示表型2	5
	提示表型1	6
0.65~0.70	提示表型1	6

注：提示表型1：碳青霉烯耐药（外膜渗透性改变）；超广谱β-内酰胺酶+碳青霉烯酶（metallo或KPC）；提示表型2：获得性头孢菌素酶（除外ACC-1）+超广谱β-内酰胺酶+不渗透性（头霉素类）



注：DL2000：DNA Marker；13、14非典型条带（约500 bp）；21号双带；省：辽宁省其他医院菌株

图2 肺炎克雷伯菌blaKPC基因PCR扩增产物电泳图

讨 论

VITEK 2自动细菌鉴定药敏仪器是世界上应用最广的微生物鉴定仪器，该仪器专家系统可提示细菌中可能存在的已知耐药表型。本研究中使用VITEK 2对收集的87株菌株进行药敏和鉴定，结果提示碳青霉烯酶耐药表型敏感性为87.0%，特异性为92.7%。国外Woodford等^[5]报道，BD Phoenix、VITEK 2、MicroScan NM36和MicroScan NBC39 Automated，这4种自动药敏仪都可以检测对碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌，4种方法检测碳青霉烯酶的敏感度和特异度分别是：BD Phoenix（100%、0%）、MicroScan NM36（82%、6%）、MicroScan NBC39（85%、19%）、VITEK 2（74%、38%）。本文报道的敏感性与文献基本符合，特异性有差异，可能与试验中所收集到的耐药菌株种类构成有关。

文献报道的4种仪器很难将产超广谱β-内酰胺酶（extended-spectrum β-lactamases, ESBLs）或高产头孢菌素酶（AmpC β-lactamases, AmpC）合并外膜孔蛋白缺失的菌株与产碳青霉烯酶的菌株分开，原因是VITEK 2等自动药敏仪器仅依据该菌株对碳青霉烯类药物是否耐药进行初步判断。本试验中VITEK 2仪器提示的12、28、49号三株可疑产碳青霉烯酶的菌株，仅有12号Hodge试验阳性，28、49号则为阴性，但12号菌株的3种碳青霉烯酶耐药基因检测结果均为阴性，同时检测结果显示该菌株产ESBLs，推测可能为产ESBLs合并外膜蛋白缺失菌

株,有待进一步研究。

本试验87株待测菌中Hodge试验阳性的菌株有47株,46株经PCR证实产碳青霉烯酶,敏感性100%,特异性97.6%。国外一些研究报道也证实改良Hodge试验的特异性不高^[6-7],与本研究结果相符。

具体分析VITEK 2仪器未提示产碳青霉烯酶菌株发现,6株可疑产金属 β -内酰胺酶(metallo- β -lactamase, MBL)的菌株(Hodge试验、抑制剂法、PCR扩增均阳性)对美罗培南、亚胺培南MIC值较低,标准VITEK 2药敏试验方法将其鉴定为敏感,而仪器只有对碳青霉烯类药物药敏结果非敏感的菌株才会提示产碳青霉烯酶。针对此现象的进一步研究表明,适当提高实验菌悬液浊度至0.65~0.70麦氏浊度,可增加仪器对低MIC值产碳青霉烯酶菌株的检出率。分析产生上述现象的原因,推测与VITEK 2对菌株药敏检测原理有关:VITEK 2通过监测培养液中细菌生长的动态曲线计算最终MIC值,如果细菌生长速度较慢,动态监测的生长曲线斜率不能达到阳性判断阈值,就可能产生假阴性结果。

综上,由于本研究样本中不同耐药表型菌株构成比例差异较大,所含的耐药基因型种类较少,实验结果存在偏颇的可能性,但可以确定的是,自动细菌鉴定仪器在产碳青霉烯酶菌株的筛查中确实存在缺陷,在产碳青霉烯酶菌株流行病学调查中应当采用其他更为可靠的检测方法进行筛查,比如美罗培南联合多种抑制剂的检测方法^[8-11]或质谱分析^[12]。

参考文献

- 1 Elizabeth B, Hirsch L, Vincent H, et al. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob*

- Chemother,2010,65(6):1119-1125.
- 2 Essayagh T, Karimou A, Elhamzaoui S. Carbapenemases among *Klebsiella pneumoniae*: sensitivity, E-test and Hodge test. *Ann Biol Clin (Paris)*,2012,70(3):299-304.
- 3 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI document [M100-S19]. 2009.
- 4 Jiang Y, Yu DL, Wei ZQ, et al. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. *Antimicrob Agents Chemother*,2010,54(9):3967-3969.
- 5 Woodford N, Eastaway AT, Ford M, et al. Comparison of BD phoenix, Vitek 2, and automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*,2010,48(8):2999-3002.
- 6 Carvalhaes CG, Picao RC, Nicoletti AG, et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother*,2010,65(2):249-251.
- 7 Essayagh T, Karimou A, Elhamzaoui S, et al. Carbapenemases among *Klebsiella pneumoniae*: sensitivity, E-test and Hodge test. *Ann Biol Clin (Paris)*,2012,70(3):299-304.
- 8 Doyle D, Peirano G, Lascos C, et al. Laboratory Detection of *Enterobacteriaceae* That Produce Carbapenemases. *J Clin Microbiol*,2012,50(12):3877-3881.
- 9 Dortet L, Poirel L, Nordmann P, et al. Rapid identification of carbapenemase types in *enterobacteriaceae* and *pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*,2012,56(12):6437-6441.
- 10 Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P, et al. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagno Microbiol and Infec Dis*,2012,74(1):88-90.
- 11 Nordmann P, Girlich D, Poirel L, et al. Detection of carbapenemase producers in *enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. *Clin Microbiol*,2012,50(8):2761-2764.
- 12 Dubois D, Grare M, Prere MF, et al. Performances of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol*,2012,50(8):2568-2677.

(收稿日期: 2013-04-19)

(本文编辑: 李卓)

杨婧, 张彭, 褚美玲, 等. 自动细菌鉴定药敏系统对肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶菌株的检测评价[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(5): 661-664.