

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.024

耐碳青霉烯酶肠杆菌科细菌血流感染的基因分析

陈建平¹, 朱菁¹, 黄旭², 梅亚宁^{3△}

1. 江苏省南京市六合区人民医院检验科, 江苏南京 211500; 2. 南京医科大学
附属儿童医院检验科, 江苏南京 210029; 3. 南京医科大学第一附属医院/江苏省人民医院
检验学部, 江苏南京 210029

摘要:目的 探讨血流感染中临床分离的耐碳青霉烯酶肠杆菌科细菌相关耐药基因及临床药物敏感性, 为血流感染临床治疗和医院内感染控制提供依据。方法 收集 2016 年 1—12 月南京医科大学第一附属医院血流感染分离的 16 株耐碳青霉烯酶肠杆菌科细菌, 采用改良碳青霉烯酶检测试验(改良 Hodge 试验)检测碳青霉烯酶表型, 采用 PCR 法检测碳青霉烯酶基因, 采用微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度(MIC)。结果 16 株临床分离菌株中, 12 株为肺炎克雷伯菌, 4 株为大肠埃希菌。改良 Hodge 试验阳性率为 87.50%(14/16)。全部菌株均携带肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC-2)基因。全部菌株对亚胺培南、美罗培南、氨曲南耐药率为 100.00%, 对多黏菌素, 替加环素灵敏度为 100.00%。结论 本次分离的肠杆菌科细菌所产碳青霉烯酶的基因型均为 KPC-2, 对于耐碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌感染治疗可以应用替加环素和(或)多黏菌素联合其他药物联合治疗。临床医护人员应该加强耐碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的感染控制监测, 控制其在院内传播。

关键词:碳青霉烯酶耐药; 肠杆菌科细菌; 耐药基因; 医院内感染

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)12-1715-04

Genetic analysis of bacterial bloodstream infection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae

CHEN Jianping¹, ZHU Jing¹, HUANG Xu², MEI Yaning^{3△}

1. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Liuhe, Nanjing, Jiangsu 211500, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University/Jiangsu Province Hospital, Nanjing, Jiangsu 210029, China

Abstract:Objective To explore the drug-resistance genes and drug sensitivity of carbapenase resistant Enterobacteriaceae isolated clinically in bloodstream infection, and to provide a basis for the clinical treatment of bloodstream infection and control of hospital infection. **Methods** Sixteen strains of Enterobacteriaceae were isolated from the blood specimen of the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University from January to December, 2016. Improvement Hodge's test was used carbon alkene enzyme phenotypes. Polymerase chain reaction was used to detect drug-resistance genes and micro broth dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration. **Results** Twelve strains of sixteen clinical isolates were Klebsiella pneumoniae and four strains were Escherichia coli. The positive rate of improvement Hodge's test was 87.50% (14/16). All strains carried Klebsiella pneumoniae carbapenamase (KPC-2) genes. The drug resistance rate of all strains to imipenem, meropenem and aztreonam was 100.00%, and the sensitivity to polymyxin and tigecycline was 100.00%. **Conclusion** The genotypes of carbapenems produced by the isolated Enterobacteriaceae bacteria were all KPC-2. For the treatment of carbapenase resistant Enterobacteriaceae infection, treatment scheme can be referred to tigecycline or polymyxin combination with other drugs. Clinical staffs should strengthen infection monitoring of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in hospitals and control its spread in hospitals.

Key words: carbapenase resistance; Enterobacteriaceae; drug-resistance genes; hospital infection

在我国, 肠杆菌科细菌感染不断增加, 已成为医院内感染的主要病原菌, 其导致的血流感染也逐年增加。引起血流感染的肠杆菌科细菌有大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、产酸克雷伯菌、产气肠杆菌

等, 其中以大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌感染最常见^[1-2]。这类菌株易出现耐药菌株, 尤其是耐碳青霉烯酶的菌株, 其导致的血流感染严重且预后较差^[3]。本文收集 2016 年 1—12 月南京医科大学第一附属医

院住院患者血流感染中分离无重复的亚胺培南和(或)美罗培南耐药的菌株,并对其进行碳青霉烯酶的检测,了解这些菌株相关耐药基因携带和药物敏感性,为临床治疗提供依据。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用 WHONET5.6 软件,收集 2016 年 1—12 月南京医科大学第一附属医院住院患者血流感染共分离到的 16 株耐碳青霉烯酶菌。其中 4 株为大肠埃希菌,12 株为肺炎克雷伯菌。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706。收集研究菌株对应患者的基本资料,包括年龄、科室、临床诊断、抗菌药物使用时间、入院到分离耐碳青霉烯酶肠杆菌科细菌(CRE)时间、侵入性操作、治疗药物、转归。研究菌株编号 1—16,分别对应菌株保存编号 X020E6、X008C6、X011A9、X008F5、X016D4、X009J5、X009H5、X010F7、X015C8、X010E2、X010F1、X009A5、X015B9、X021C4、X021E4、X017G1。

1.2 仪器与试剂 美罗培南、亚胺培南、氨曲南等为中国药品生物制品检定所产品,替加环素 E-test 条、药敏纸片、MH 琼脂、MH 肉汤为英国 Oxoid 公司产品,GNI 细菌检定卡和 VITEK2-Compact 全自动微生物鉴定仪为法国生物梅里埃公司产品,PCR 检测试剂盒和 DNA Marker 为武汉谷歌生物科技有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 CRE 初筛 用 Vitek2-Compact 全自动细菌鉴定仪对血流感染中的 CRE 进行初筛。

1.3.2 改良 Hodge 试验 参照 2016 年美国临床和实验室标准协会(CLSI)M100-S26 文件中肠杆菌科菌产碳青霉烯酶的改良 Hodge 试验进行^[4]。

1.3.3 耐药酶基因检测 耐药酶基因检测采用 PCR 法,引物序列和扩增产物长度见表 1。实验方法参考文献^[5]。

1.3.4 微量肉汤稀释法 用微量肉汤稀释法检测 16 株菌株对美罗培南、亚胺培南、多黏菌素、替加环素、氨曲南的敏感性,判读及结果解释参照 2016 年美国 CLSI M100-S26 文件进行。替加环素采用美国食

品药品管理局(FDA)推荐的解释标准进行判读,最低抑菌浓度(MIC)≤2.0 mg/L 为敏感,4.0 mg/L 为中介,MIC≥8.0 mg/L 为耐药。

2 结果

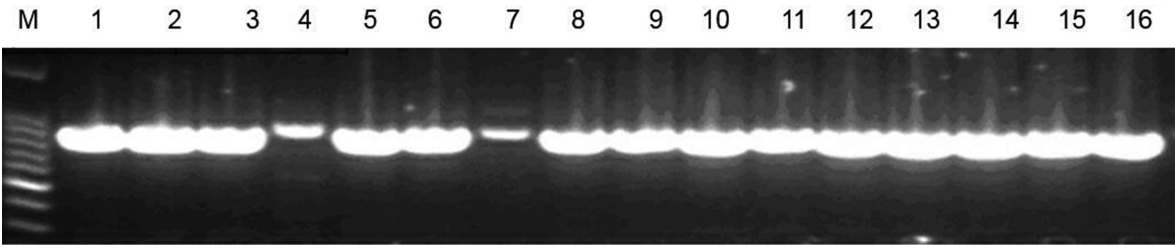
2.1 患者高危因素 16 株研究菌株患者年龄大于 60 岁的占 87.50%(14/16),重症监护病房(ICU)患者占 43.75%(7/16),长期使用抗菌药物患者占 68.75%(11/16),长期住院患者占 56.25%(9/16),有侵入性操作治疗患者占 68.75%(11/16)。见表 2。

表 1 引物序列和产物

基因	引物序列(5′-3′)	产物大小(bp)
IMP	F:CTACCGCAGCAGAGTCTTTG	587
	R:AACCAGTTTTCCTTACCAT	
SME	F:AACGGCTTCATTTTGTTTAG	830
	R:GCTTCGCAATAGTTTATCA	
VIM	F:AGTGGTGAGTATCCGACAG	261
	R:ATGAAAGTGCGTGAGAC	
IMI	F:CCATTCACCCATCACAAAC	440
	R:CTACCGCATAATCATTTGC	
SHV	F:TGCGCAAGCTGCTGACCAGC	305
	R:TTAGCGCTGCCAGTGCTCGA	
GES	F:ATGCGCTTCATTACGCAC	846
	R:CTATTTGTCCGTGCTCAGG	
VEB	F:GCGGTAATTTAACCAGA	961
	R:GCCTATGAGCCAGTGTT	
NDM	F:GGGCCGTATGAGTGA	758
	R:GAAGCTGAGCACCGCATTAG	
OXA-1	F:CTGTGTTTGTGGTTTCGCAAG	440
	R:CTTGCTTTTATGCTTGATG	
OXA-10	F:GTCTTTCAAGTACGGCATTA	822
	R:GATTTTCTTAGCGGCAACTTA	
KPC-2	F:ACAGTGGTTGGTAATCCATGC	811
	R:GCTACACCTAGCTCCACCTTC	

2.2 改良 Hodge 试验结果 16 株菌株进行改良 Hodge 试验,12 株肺炎克雷伯菌改良 Hodge 试验阳性,4 株大肠埃希菌中有 2 株改良 Hodge 试验为阳性,2 株为阴性。

2.3 耐药基因检测结果 耐药基因的检测结果见图 1。16 株 CRE 菌株的耐药基因均为肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC-2)基因。



注:M 为 DNA Marker;泳道 1—16 为目的基因。

图 1 KPC-2 基因扩增产物电泳图

表 2 患者临床信息

菌株号	年龄 (岁)	科室	临床诊断	抗菌药物使用	入院到分离 CRE	侵入性	治疗药物	转归
				时间(d)	时间(d)	操作		
1	73	肾移植中心	心跳呼吸骤停	20	22	有	替加环素、亚胺培南、舒普生	好转
2	78	监护病房	重症肺炎、高血压	25	26	有	比阿培南、舒普生	死亡
3	47	胰腺中心I	胰头腺癌	23	27	有	舒普生	转院
4	62	肾移植中心	膀胱癌	—	1	无	亚胺培南、凯斯	放弃治疗
5	91	消化内镜病房	胆道感染	15	17	无	亚胺培南、丁胺卡那	痊愈
6	78	消化科病区	化脓性胆管炎、十二指肠乳头癌	4	4	无	硫酸庆大霉素、头孢地噻钠	好转
7	62	肝脏外科I病区	肝腺癌	30	2	有	凯斯、舒普生	好转
8	73	老年 ICU	脓毒败血症、胆道感染	1	3	有	亚胺培南、哌拉西林钠/他唑巴坦钠	痊愈
9	87	老年内分泌科I病区	2 型糖尿病	22	21	有	亚胺培南	死亡
10	63	普外科 ICU 病区	重症急性胰腺炎、感染性休克、呼吸衰竭	17	17	有	美罗培南、舒普生	放弃治疗
11	84	老年 ICU	肺部感染、冠心病、心房颤动	12	15	有	左氧氟沙星、美罗培南	好转
12	87	老年 ICU	肺部感染、肾衰竭、冠心病	30	11	有	美罗培南	好转
13	70	急诊监护病区	多发伤、肺部感染	—	1	无	舒普生	转院
14	33	胰腺中心I	胰腺假性囊肿、胰腺外伤	19	11	有	亚胺培南	痊愈
15	82	老年 ICU	肺部感染、I型呼吸衰竭	35	21	有	亚胺培南	痊愈
16	64	本部综合病区	肺部感染、高血压	16	20	无	替加环素、亚胺培南	痊愈

注：—表示未使用抗菌药物。

2.4 微量肉汤稀释法结果 用微量肉汤稀释法检测 16 株 CRE 对抗菌药物的敏感性,结果显示,16 株菌株对美罗培南、亚胺培南、氨曲南耐药,对多黏菌素,替加环素敏感。见表 3。

表 3 16 株菌株抗菌药物 MIC 值(mg/L)

菌株号	美罗培南	亚胺培南	多黏菌素	替加环素	氨曲肼
1	>128	>128	0.50	0.50	>128
2	>128	128	1.00	0.12	>128
3	>128	128	2.00	0.50	>128
4	>128	>128	1.00	0.25	>128
5	128	128	1.00	0.25	>128
6	32	8	1.00	0.25	>128
7	64	64	1.00	0.12	>128
8	4	4	0.25	0.12	>128
9	>128	128	2.00	0.25	>128
10	>128	>128	1.00	1.00	>128
11	128	>128	2.00	0.50	>128
12	>128	>128	1.00	0.50	>128
13	>128	128	1.00	0.50	>128
14	>128	>128	1.00	0.50	>128
15	>128	>128	1.00	0.50	>128
16	>128	>128	0.50	0.25	>128

3 讨 论

肠杆菌科细菌是社区和医院获得性感染中最常见的病原菌,可引起下呼吸道、消化道、泌尿道、血液、手术切口等多种部位感染。有研究报道,在院内血流感染中前 3 位的病原菌依次为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌^[6]。目前,KPC-2 基因型酶在我国的浙江、上海、江苏、湖南、北京、山东等多省市均有报道,其中长江三角洲地区报道最多^[7]。本研究中,16 株可疑产碳青霉烯类菌均含 KPC-2 基因,表明 KPC-2 是南京医科大学第一附属医院血流感染患者耐碳青霉烯酶肠杆菌科的主要基因型,与以往文献报

道相似^[8]。医务人员应对 CRE 菌株的传播与感染提高警惕,尽早采取措施监测患者感染菌的耐药情况,加强对此类患者的管理,减少其与其他患者接触的机会,切断感染途径。

耐碳青霉烯酶肠杆菌科的临床治疗一直是个难题,CRE 几乎对所有 β-内酰胺抗菌药物耐药,同时携带有其他耐药机制,对氨基糖苷、喹诺酮类也耐药,对多黏菌素和替加环素具有较高的体外敏感性^[7],这与本研究中药敏结果一致。我国广泛耐药革兰阴性菌感染诊治专家共识建议使用以多黏菌素和(或)替加环素为基础的联合用药方案治疗 CRE 细菌感染^[9]。本研究中,有替加环素联合亚胺培南治疗,也有亚胺培南单独治疗,还有美罗培南联合左氧氟沙星治疗,临床均显示预后良好。

CRE 引起的感染对患者威胁越来越大,目前缺乏确认有效的治疗药物,所以医院内感染控制显得尤为重要。有研究表明,CRE 的易感因素有疾病危重、入住 ICU、长期使用抗菌药物、有侵入性操作等^[7]。本研究中的 CRE 病例 7 株分布在 ICU,概率为 43.75%,其他病例也主要分布在外科,这与以往文献报道一致^[10]。面对 CRE 的威胁,医疗机构应了解患者感染 CRE 的危险因素,采取相应的干预措施,包括手卫生、接触隔离、医务人员培训、最低限度使用侵入性操作、检出 CRE 时实验室及时通知医护人员、促进抗菌药物管理、保持环境卫生等^[11]。

CRE 的血流感染给患者治疗带来了极大的困难,同时也给医院内感染防控提出了挑战。CRE 的处理要从整体、全局出发,注重抗菌药物合理使用、病原菌检测、耐药菌监测、患者管理等^[12]。因此,加强 CRE 的监测,严格执行抗菌药物合理使用的管理规定,同时加强医院内感染预防与控制,避(下转第 1722 页)

次,并形成报告。

本研究发现,自动审核的标本通过率在 2018 年 2 月为 87.47%,即 100 份报告单中仅有 13 份需要人工判断审核,工作人员可以集中精力详细分析结果,甚至主动联系临床进行沟通,及时将异常情况通知临床医生,极大地提升了检验服务质量。由于科室人员减少,生化报告审核人员由原来 2 人减少为 1 人,仍可高质量地完成门诊日均 700 人份的报告审核工作。

统计显示,本检验医学中心 2017 年 8 月,即自动审核前的人工报告审核时间中位数为 80.00 min,2018 年 2 月采用自动审核后的 TAT 中位数为 44.70 min,提示实行自动审核之后每月审核时间逐渐缩短,门诊患者拿到报告更快,就医体验更好。

当然,本检验医学中心建立的自动审核规则还不能完全替代人工审核。例如,目前检验结果不能根据临床病历、诊断进行判断,检验结果日间差异不能在系统中给予提示,一些糖耐量或激发试验还不能合并为一份报告并判断。因此,仍需不断完善、不断优化自动审核规则,使之更好适应临床工作。

参考文献

[1] 冯强. 临床生化检验结果的自动审核[J]. 国际医学检验杂志, 2015, 36(4): 547-548.

[2] 温冬梅. 临床生化免疫项目自动审核规则的制定及应用[J]. 临床检验杂志, 2010, 12(3): 36.

[3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床实验室定量检验结果的自动审核: WS/T 616-2018[S]. 中国标准出

版社, 2018.

[4] 杨大千, 胡长爱, 邢美园, 等. 临床决策支持在检验结果自动审核和解释中的应用评价[J]. 中国数字医学, 2014, 9(10): 45-47.

[5] 夏良裕, 程歆琦, 刘茜. 临床实验室生化免疫项目自动审核程序的建立与应用[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(8): 617-621.

[6] 陆学军, 李传保, 刘梦欣, 等. 血液细胞分析流水线自动审核规则制定和确认[J]. 现代医学检验杂志, 2017, 32(3): 157-161.

[7] 陆怡德, 施新明, 杨帆, 等. 临床化学审核规则的制定及计算机自动确认的应用[J]. 检验医学, 2011, 26(4): 277-280.

[8] 杨勇, 贾延伟, 曹伟, 等. 生化检验结果自动审核规则的制定及其应用[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2): 152-155.

[9] 李广权, 周卫东. LIS 系统的优化改进在实验室管理中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 250-252.

[10] 张成岗, 王雅娜. 检验科 LIS 系统应用体会[J]. 内蒙古医学杂志, 2012, 44(5): 147-148.

[11] 谢志雄, 张阳根. 重视检验结果审核在质量控制过程中的作用[J]. 实用医技杂志, 2017, 14(19): 2597-2598.

[12] 陆怡德, 施新明, 杨帆, 等. 临床化学审核规则的制定及计算机自动确认的应用[J]. 检验医学, 2011, 26(4): 277-280.

[13] 杨勇, 贾延伟, 曹伟, 等. 生化检验结果自动审核规则的制定及其应用[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2): 152-155.

(收稿日期: 2019-08-14 修回日期: 2020-03-15)

(上接第 1717 页)

免 CRE 在院内传播和不断演变。

参考文献

[1] 田磊, 陈中举, 孙自镛, 等. 2005—2014 年 CHINET 肠杆菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3): 275-283.

[2] 徐安, 卓超, 苏丹虹, 等. 2005—2014 年 CHINET 克雷伯菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3): 267-274.

[3] 王莉洁, 梁志欣, 喻航, 等. 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌血流感染的临床特征及耐药性比较[J]. 解放军医学院学报, 2017, 38(4): 306-308, 316.

[4] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S26[S]. Wayne, PA: CLSI, 2016.

[5] 杨丽君, 陈坚, 杨燕, 等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌基因型检测和同源性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(4): 318-323.

[6] 赵春江, 陈宏斌, 王辉, 等. 2013 年全国 13 所教学医院院内血流感染及院内获得性肺炎和院内获得性腹腔感染常见病原菌分布和耐药性研究[J]. 中华医学杂志, 2015, 95

(22): 1739-1746.

[7] 徐英春, 肖永红, 卓超, 等. 中国碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的流行病学和防控策略[J]. 中国执业药师, 2013, 10(4): 3-8.

[8] WEI Z Q, DU X X, YU Y S, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 763-765.

[9] GROPU C W, GUAN X, HE L, et al. Laboratory diagnosis, clinical management and infection control of the infections caused by extensively drug-resistant gram-negative bacilli: a Chinese consensus statement [J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(Suppl 1): S15-S25.

[10] 史玮炀, 刘洋, 韩逸超, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的分子流行病学分析[J]. 检验医学, 2018, 1(1): 37-43.

[11] 王明贵. 广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制: 中国专家共识[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(1): 88-89.

[12] 肖婷婷, 肖永红. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染治疗策略研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(1): 1-5.

(收稿日期: 2019-08-10 修回日期: 2020-03-04)