

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 18. 007

宁夏某医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌临床分布及分子机制研究*

茆永娟¹, 伏 慧^{2,3}, 赵 梅^{2,3}, 贾 伟^{2,3△}

1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院医学实验中心, 宁夏银川 750004;
3. 宁夏临床病原微生物重点实验室, 宁夏银川 750004

摘 要:目的 分析宁夏地区某三甲综合医院临床标本分离耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的分布及耐药情况,了解该院 CRE 耐药基因的主要流行现状,为临床抗感染治疗及医院感染防控提供参考。**方法** 收集 2017 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日住院患者临床分离的 CRE 菌株,利用自动化仪器进行细菌鉴定和药物敏感性试验(简称药敏试验)检测,利用改良碳青霉烯酶灭活(mCIM)试验联合乙二胺四乙酸-碳青霉烯酶灭活(eCIM)试验检测耐药菌的表型,并采用 PCR 检测 ESBLs (blaSHV、blaTEM)、碳青霉烯酶 (blaKPC、blaNDM、blaVIM、blaIMP、blaOXA-48)共 7 种主要的耐药基因,最后对数据进行统计分析。**结果** 临床标本共收集 CRE 菌株 77 株,主要为肺炎克雷伯菌 52 株、大肠埃希菌 25 株;标本来源主要为痰液、无菌中段尿及血液等;标本来源科室主要为肝胆外科、重症监护室(ICU)和急诊科;药敏试验表明 77 株耐药菌对 β -内酰胺类药物的耐药率均大于 95.00%,对喹诺酮类抗菌药物耐药率均为 75.00%左右;mCIM 试验阳性有 58 株,eCIM 试验阳性有 35 株、阴性有 23 株。应用 PCR 检测耐药基因,ESBLs 以 blaTEM 为主,检出率为 49.35%,blaSHV 检出率为 23.38%;碳青霉烯酶基因以 blaNDM 为主,检出率为 36.36%,其余 blaKPC、blaOXA-48 阳性率分别为 24.68%、15.58%,未检测到 blaVIM 和 blaIMP 基因。测序发现 28 株 blaNDM 阳性菌中有 10 株为 blaNDM-1,18 株为 blaNDM-5。**结论** 宁夏某医院 CRE 耐药基因检出率较高,CRE 对常用抗菌药物耐药率高,应多部门联动加强对 CRE 的监测与防控,合理应用抗菌药物。

关键词:耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 耐药性; NDM; mCIM; eCIM

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)18-2615-05

Clinical distribution and molecular mechanism of bacteria of carbapenem-resistant enterobacteriaceae in a hospital of Ningxia*

MAO Yongjuan¹, FU Hui^{2,3}, ZHAO Mei^{2,3}, JIA Wei^{2,3△}

1. College of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China;
2. Medical Experimental Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China;
3. Ningxia Key Laboratory of Clinical Pathogenic Microorganisms, Yinchuan, Ningxia 750004, China

Abstract: Objective To analyze the distribution and drug resistance status of bacteria of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) isolated from clinical specimens in a class 3A general hospital of Ningxia area, and to understand the main epidemic status quo of CRE resistance genes in this hospital to provide reference for clinical anti-infective treatment and prevention and control of nosocomial infections. **Methods** The CRE strains clinically isolated from the hospitalized patients from January 1, 2017 to December 31, 2018 were collected. The bacterial identification and drug susceptibility test were performed by using the automated instruments. The phenotype of drug-resistant bacteria was detected by using the modified carbapenem inactivation method (mCIM) in combination with ethylenediaminetetraacetic acid-modified carbapenem inactivation method (eCIM). Seven major resistance genes were detected by polymerase chain reaction (PCR): ESBLs genes (blaSHV, blaTEM) and carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaIMP, blaOXA-48). Finally, the data were statistically analyzed. **Results** A total of 77 CRE strains were isolated from clinical specimens, including 52 strains of *Klebsiella pneumoniae* and 25 strains of *Escherichia coli*. The specimen sources

* 基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金项目(2017A0330)。

作者简介:茆永娟,女,在读硕士研究生,研究方向为临床病原微生物耐药性研究。△ 通信作者, E-mail: 13519299090@126.com。

were mainly sputum,sterile mid-section urine and blood, etc. The main sources of the department were the hepatobiliary surgery, intensive care unit (ICU) and emergency department. The drug susceptibility tests showed that the resistance rates of 77 resistant bacteria to β -lactams were greater than 95.00%,and the resistance rates to quinolones were about 75.00%. Fifty-eight strains were positive for the mCIM test,35 strains were positive for the eCIM test and 23 strains were negative. In the application of PCR for detecting the resistance genes,ESBLs was mainly blaTEM with a detection rate of 49.35% and the detection rate of blaSHV were 23.38%. Carbapenemase genes were mainly blaNDM with a detection rate of 36.36%. The positive rates of remaining blaKPC and blaOXA-48 were 24.68% and 15.58%,respectively. And blaVIM and blaIMP genes were not detected. Sequencing found that 10 strains of the 28 blaNDM-positive bacteria were blaNDM-1 and 18 strains were blaNDM-5. **Conclusion** The detection rate of CRE genes in a hospital of Ningxia is high,and CRE has a high resistance rate to commonly used antibacterial drugs. The multi-departments should be jointly linked to strengthen the monitoring and prevention of CRE,and rational use of antibacterial drugs.

Key words:carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; drug resistance; NDM; mCIM; eCIM

20 世纪 80 年代后期耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 (CRE)出现以后,已经在所有有人居住的大陆上发现了 CRE,并且这些微生物引起的感染发生率在 21 世纪的前 20 年中稳步增加^[1-2],是对公共卫生的最重大威胁之一^[3]。为了解宁夏地区某三甲综合医院临床标本分离的 CRE 的分布及耐药情况,了解该医院 CRE 耐药基因的主要流行现状,本研究对住院患者临床分离的 CRE 菌株耐药情况进行分析,并对耐药基因进行检测,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集 2017 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日宁夏地区某三甲综合医院住院患者临床分离的 CRE 菌株。CRE 纳入标准参见 2015 年美国疾病控制与预防中心颁布的标准 (《医疗机构 CRE 防控指南》)。剔除同一患者相同部位分离的重复菌株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA 2146,均购自上海汉尼生物技术有限公司。

1.2 仪器与试剂 M-H 肉汤培养基和 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定仪为法国生物梅里埃公司产品;引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Premix Taq、DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;药敏纸片购自英国 Oxoid 公司;抗菌药物标准品购自大连美仑生物技术有限公司;乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)购自天津市大茂化学试剂公司。

1.3 细菌鉴定及药敏试验 使用 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司)及其配套革兰阴性菌鉴定卡进行细菌鉴定和药敏检测。药敏结果判断标准严格按照美国临床和实验室

标准化协会(CLSI)2018 年标准进行判读。质控菌株药敏结果在控,研究菌株结果方可纳入数据分析。所得结果用 Whonet5.6 软件进行分析。

1.4 表型试验和 PCR 耐药基因扩增及 blaNDM 亚型鉴定 将收集的每株 CRE 菌株同时进行改良碳青霉烯酶灭活(mCIM)试验和乙二胺四乙酸-碳青霉烯酶灭活(eCIM)试验联合检测。其中当 mCIM 试验结果为阳性时 eCIM 试验结果才有意义;当 mCIM 试验结果为阴性时,eCIM 试验结果不作解释,具体方法及结果判读标准参照 CLSI 2018 年文件标准。采用煮沸法提取菌株 DNA 模板,通过参照相关文献报道及 NCBI 网站设计并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物,详见表 1。对常见的耐药基因 ESBLs (blaSHV、blaTEM)、碳青霉烯酶(blaKPC、blaNDM、blaVIM、blaIMP、blaOXA-48)进行 PCR 扩增。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。其中,基因型 KPC、NDM 阳性对照菌分别为本研究中经测序确认耐药基因的 7、27 号菌,基因型 SHV、TEM、OXA-48 的阳性对照菌为 31 号菌,阴性对照均为质控菌大肠埃希菌 ATCC 25922。

表 1 耐药基因引物序列、产物长度和退火温度

基因型	引物序列(5'-3')	退火温度	产物长度
		(℃)	(bp)
SHV	F:ATGCGTTATATTCGCCTGTG	56	861
	R:TTAGCGTTGCCAGTGCTCGAIC		
TEM	F:GAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGC	56	858
	R:TACCAATGCTTAATCAGTGAGGC		
KPC	F:ATGTCACGTATCGCCGTCT	56	893
	R:TTTTCAGAGCCTTACTGCC		
NDM	F:ATGGAATTGCCCAATATTATGC	56	813
	R:TCAGCGCAGCTTGTCGG		

续表 1 耐药基因引物序列、产物长度和退火温度			
基因型	引物序列(5′-3′)	退火温度 产物长度	
		(℃)	(bp)
VIM	F:TTATGGAGCAGCAACGATGT	55	920
	R:CAAAAGTCCCGCTCCAACGA		
IMP	F:TGAGCAAGTTATCTGTATTC	55	740
	R:TTAGTTGCTTGGTTTTGTATG		
OXA-48	F:GCGTGGTTAAGGATGAACAC	57	438
	R:CATCAAGTTCAACCCAACCG		

2 结 果

2.1 CRE 菌株的鉴定结果及科室分布 共收集到 CRE 菌株 77 株,其中肺炎克雷伯菌 52 株(67.53%)、大肠埃希菌 25 株(32.47%)。77 株耐药菌主要来自肝胆外科、重症监护室(ICU)和急诊科,分别占 25.97%、14.29%和 11.69%。见表 2。

表 2 CRE 菌株科室来源分布

科室	<i>n</i>	构成比(%)
肝胆外科	20	25.97
ICU	11	14.29
急诊科	9	11.69
神经外科	7	9.09
烧伤与整形美容科	4	5.19
新生儿科	4	5.19
感染疾病科	4	5.19
胃肠外科	2	2.60
泌尿外科	2	2.60
心内科	2	2.60
小儿外科	2	2.60
康复科	2	2.60
儿科重症监护	1	1.30
呼吸与危重症医学科	1	1.30
其他	6	7.79

2.2 CRE 菌株标本来源分布情况 77 株 CRE 菌株标本来源主要为痰液、无菌中段尿、血液、胆囊及胰腺引流液等,见表 3。

表 3 CRE 菌株标本来源分布

标本来源	<i>n</i>	构成比(%)
痰液	29	37.66
无菌中段尿	10	12.99
血液	10	12.99
胆囊引流液	7	9.09
胰腺引流液	7	9.09
皮肤破溃分泌物	5	6.49

续表 3 CRE 菌株标本来源分布		
标本来源	<i>n</i>	构成比(%)
腹腔引流液	5	6.49
肝脓肿穿刺液	2	2.60
胸腔引流液	1	1.30
十二指肠引流液	1	1.30

2.3 CRE 菌株对临床常用抗菌药物的药敏结果 CRE 对常用抗菌药物耐药率均较高,对 β-内酰胺类药物的耐药率均大于 95.00%,对喹诺酮类抗菌药物耐药率均在 75.00%左右,对氨基糖苷类抗菌药物耐药率也较高,其中对阿米卡星的耐药率最低(19.48%)、敏感率最高(79.22%)。CRE 菌株对常见抗菌药物耐药性见表 4。

表 4 CRE 菌株对抗菌药物的药敏情况[n(%)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药
亚胺培南	0(0.00)	0(0.00)	77(100.00)
头孢曲松	0(0.00)	0(0.00)	77(100.00)
头孢呋辛	0(0.00)	0(0.00)	77(100.00)
氨苄西林/舒巴坦	0(0.00)	0(0.00)	77(100.00)
头孢唑啉	1(1.30)	0(0.00)	76(98.70)
头孢他啶	1(1.30)	0(0.00)	76(98.70)
哌拉西林	0(0.00)	1(1.30)	76(98.70)
头孢吡肟	3(3.90)	0(0.00)	74(96.10)
哌拉西林/他唑巴坦	0(0.00)	8(10.39)	69(89.61)
氨曲南	9(11.69)	0(0.00)	68(88.31)
环丙沙星	12(15.58)	3(3.90)	62(80.52)
左氧氟沙星	15(19.48)	4(5.19)	58(75.32)
庆大霉素	29(37.66)	1(1.30)	47(61.04)
复方磺胺甲噁唑	37(48.05)	0(0.00)	40(51.95)
妥布霉素	26(33.77)	16(20.78)	35(45.45)
呋喃妥因	16(20.78)	30(38.96)	31(40.26)
阿米卡星	61(79.22)	1(1.30)	15(19.48)

2.4 CRE 菌株表型试验与耐药基因检测结果 将 77 株 CRE 菌株进行 mCIM 与 eCIM 联合试验并对耐药基因进行 PCR 扩增,其结果见表 5、图 1、图 2。77 株 CRE 中,58 株 mCIM 试验阳性,即产碳青霉烯酶,其中 35 株 eCIM 试验阳性,即产金属 β-内酰胺酶;23 株 eCIM 试验阴性,即产丝氨酸碳青霉烯酶。PCR 扩增耐药基因结果中,ESBLs 基因以 blaTEM 为主,检出率为 49.35%,blaSHV 检出率为 23.38%;碳青霉烯酶基因以 blaNDM 为主,检出率为 36.36%,其余 blaKPC、blaOXA-48 阳性率分别为 24.68%、15.58%,未检测到 blaVIM 和 blaIMP 基因。另外,有 5 株同时携带 blaKPC、blaSHV 和 blaTEM 基因型;2 株同时携带 blaNDM、blaSHV 和 blaTEM 基因型;2 株同时携带

blaNDM、blaKPC、blaOXA-48 和 blaTEM 基因型;还有 1 株同时含有 blaKPC、blaOXA-48、blaSHV 和 blaTEM 基因型。对携带 blaNDM 耐药基因的阳性

产物经测序和比对后,发现有 10 株为 blaNDM-1,18 株为 blaNDM-5。

表 5 CRE 菌株 mCIM 联合 eCIM 试验及耐药基因扩增结果

病原菌	PCR 扩增结果[n(%)]							表型试验(n)			
	ESBLs		碳青霉烯酶					mCIM		eCIM	
	TEM(+)	SHV(+)	NDM(+)	KPC(+)	OXA-48(+)	VIM(+)	IMP(+)	+	-	+	-
肺炎克雷伯菌	26(50.00)	18(34.62)	14(26.92)	17(32.69)	9(17.31)	0(0.00)	0(0.00)	42	10	21	21
大肠埃希菌	12(48.00)	0(0.00)	14(56.00)	2(8.00)	3(12.00)	0(0.00)	0(0.00)	16	9	14	2
合计	38(49.35)	18(23.38)	28(36.36)	19(24.68)	12(15.58)	0(0.00)	0(0.00)	58	19	35	23

注: + 表示阳性; - 表示阴性; 当 mCIM 试验为阴性时, eCIM 结果不作解释。

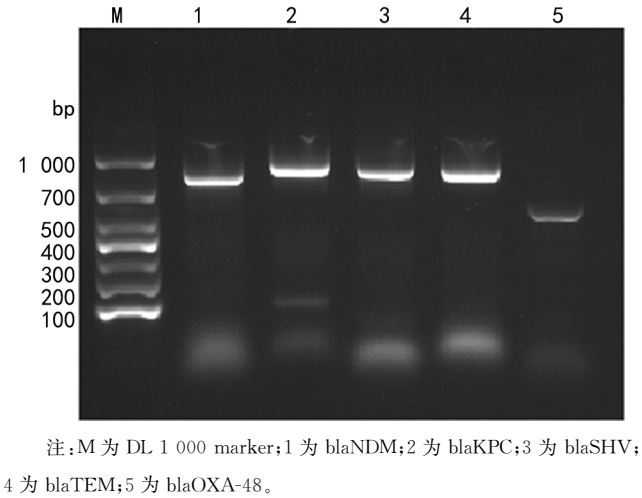


图 1 CRE 耐药基因部分扩增结果

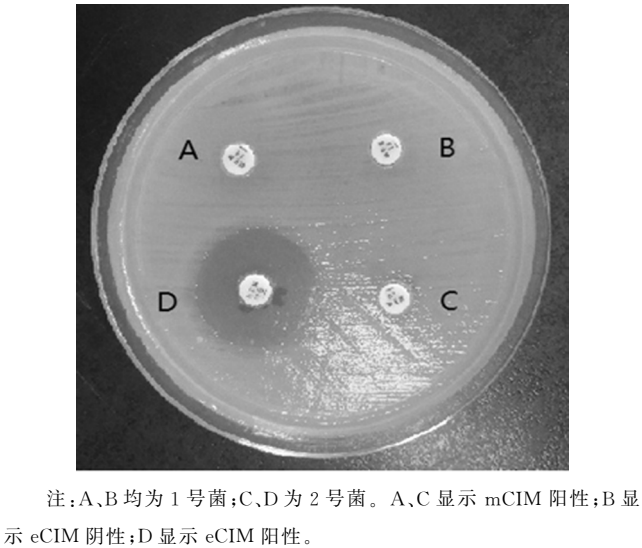


图 2 mCIM 试验与 eCIM 试验部分结果

3 讨 论

本研究收集宁夏地区某三甲综合医院 77 株 CRE 菌株,菌株主要以肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌为主。标本来源主要为痰液、无菌中段尿、血液、胆囊及胰腺引流液等,科室分布主要集中在肝胆外科、ICU 和急

诊科,另外烧伤与整形美容科、神经外科、新生儿科、感染疾病科等科室均有 CRE 菌株检出。本研究结果显示,检出的 CRE 菌株以肺炎克雷伯菌居多,原因可能有:第一,临床标本中来源于呼吸道的送检量大,而存在于呼吸道的病原菌以肺炎克雷伯菌为主;第二,这些 CRE 菌株主要来自肝胆外科及 ICU,据患者病历资料显示,这些患者多有严重的基础疾病,免疫功能极度低下,有多部位感染倾向,使用抗菌药物种类多且周期长,并且多数患者还要接受各种有创操作性治疗,如气管切开、气管插管、中心静脉置管、留置导尿管等,这些都为 CRE 的定植和感染提供了易感条件。这与其他相关研究中的报道相符^[4-5]。

本研究对 CRE 进行药敏试验,结果显示 77 株 CRE 菌株对临床上的常用抗菌药物明显耐药,对 β-内酰胺类药物的耐药率均大于 95.00%,对喹诺酮类抗菌药物耐药率均在 75.00%左右,对氨基糖苷类抗菌药物也有一定的耐药率。目前,多黏菌素 E 被视为 CRE 菌株感染治疗中最后的选择,但耐药基因 mcr-1 的出现使临床治疗更为棘手^[6]。下一步本课题组会对临床菌株进行 mcr-1 的 PCR 检测,明确其临床分布,为研发有效的各类碳青霉烯酶抑制剂并解决肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的现状提供可靠依据。

本研究通过对 CRE 进行耐药基因检测,发现 ESBLs 基因中 blaTEM(49.35%)检出率较高,blaSHV 检出率为 23.38%;碳青霉烯酶基因以 blaNDM 为主,检出率为 36.36%,其余 blaKPC(24.68%)、blaOXA-48(15.58%)均有检出,而未检测到 blaVIM 和 blaIMP 基因。该结果表明宁夏某三甲综合医院 CRE 的 ESBLs 基因以 blaTEM 为主;主要的碳青霉烯酶基因为 blaNDM,与我国大部分地区^[7-8]以 KPC 基因型流行为主不同,分析其原因可能与菌株来源和地理条件等因素有关^[9]。说明细菌的耐药性具有地域差

异性,不同地区耐药基因分布不同,因此,应该根据当地耐药菌的耐药特点来合理选择抗菌药物。另外,在本研究中,碳青霉烯酶基因 blaNDM 检测出 blaNDM-1 和 blaNDM-5 两种亚型,且以 blaNDM-5 亚型为主。2010 年 KUMARASAMY 等^[10]首次报道了 NDM-1 的出现,NDM-1 是目前临床上最重要的金属酶之一,能水解除氨曲南以外的所有 β -内酰胺类抗菌药物。自 NDM-1 被报道以后,世界各地现已报道有 17 种 NDM 亚型,不同 NDM 亚型在酶活性和致病性上可能有差别。2016 年我国首次报道了产 NDM-5 的大肠埃希菌^[11],之后陆续出现关于 blaNDM-5 型耐药基因的报道,不同的 blaNDM 亚型由于其个别碱基的不同,可能导致其水解活性的差异。blaNDM 亚型的出现表明 blaNDM 可能正处于快速进化过程中而导致其广泛传播。

本研究根据 CLSI 建议,首次将 eCIM 与 mCIM 联合试验对 CRE 菌株进行表型检测,结果显示 77 株 CRE 菌株中有 58 株产碳青霉烯酶,其中有 35 株产金属 β -内酰胺酶,23 株产丝氨酸碳青霉烯酶。同时参考碳青霉烯酶基因的基因型检测方法,两者检测结果相比较有差异。分析其原因:一方面可能表型试验存在假阳性与假阴性结果;另一方面本研究仅检测了 5 种常见的碳青霉烯酶耐药基因,可能耐药基因型覆盖面不全面,所以有待后续研究从基因水平进一步完善。本研究中,产金属 β -内酰胺酶的 CRE 构成比较丝氨酸碳青霉烯酶偏高,然而目前临床上抑制 β -内酰胺酶的主要药物有克拉维酸、舒巴坦、三唑巴坦,但其仅对几种丝氨酸类碳青霉烯酶有抑制作用。目前,新型抗菌药物头孢他啶/阿维巴坦对大多数 ESBLs、丝氨酸 β -内酰胺酶、头孢菌素 β -内酰胺酶有抑制活性,但对新德里金属 β -内酰胺酶没有活性^[12]。因此,通过表型试验初步检测区分产金属 β -内酰胺酶和丝氨酸碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌,对于制订合理优先使用抗菌药物管理计划有重要意义,可为新药的合理使用提供依据。

综上所述,CRE 感染已是临床面临的较为棘手的问题之一,本研究通过对 CRE 的临床分布、耐药基因分型和耐药特征等进行分析检测,为全面了解医院肠杆菌科细菌的流行现状及耐药机制提供了依据,也为今后临床上更有效地控制 CRE 引起的感染暴发和流行提供更可靠的治疗依据。

参考文献

[1] LOGAN L K, WEINSTEIN R A. The epidemiology of

carbapenem-resistant enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace[J]. J Infect Dis, 2017, 215 (Suppl 1): S28-S36.

[2] GUPTA N, LIMBAGO B M, PATEL J B, et al. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: epidemiology and prevention[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(1): 60-67.

[3] REES C A, NASIR M, SMOLINSKA A, et al. Detection of high-risk carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae and enterobacter cloacae isolates using volatile molecular profiles[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13297-13309.

[4] 张慧, 王健, 吴晓燕, 等. 159 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床特征和耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(20): 3050-3052.

[5] 由晓颜, 孔繁荣, 苏维奇. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床分布特点及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(4): 601-603.

[6] ERFANIMANESH S, HASHEMI A. Global dissemination of the mcr-1 gene[J]. Archives Pediatric Infect Dis, 2016, 4(3): e38581.

[7] 王素梅, 张健东, 王宇凡, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(17): 2566-2570.

[8] 申振华, 申洁心, 楚洪久, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌的耐药机制及基因分型的研究[J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2019, 8(4): 226-227.

[9] CHITNIS A S, CARUTHERS P S, RAO A K, et al. Outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae at a long-term acute care hospital: sustained reductions in transmission through active surveillance and targeted interventions[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2012, 33 (10): 984-992.

[10] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10 (9): 597-602.

[11] ZHANG L P, XUE W C, MENG D Y. First report of new delhi metallo- β -lactamase 5 (NDM-5)-producing Escherichia coli from blood cultures of three leukemia patients [J]. Int J Infect Dis, 2016, 42: 45-46.

[12] 张敬霞, 贾天野, 张树永, 等. 头孢他啶/阿维巴坦对耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的体外抗菌活性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(9): 1109-1116.

(收稿日期: 2019-12-24 修回日期: 2020-06-22)