

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.05.009

◇ 临床医学 ◇

203株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌临床分布特征及耐药基因型分析

余亚辉, 韩媛媛, 柴杰, 荣令

作者单位: 亳州市人民医院检验科, 安徽 亳州 236800

通信作者: 荣令, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为细菌耐药机制, E-mail: rongling751006@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(81571528)

摘要:目的 探讨医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的分布特征、耐药特点及耐药基因型,为临床CRE感染治疗提供理论依据。**方法** 收集2016年1月至2018年9月亳州市人民医院临床分离的CRE菌株,应用Vitek 2-Compact全自动微生物分析仪对细菌进行鉴定和药敏试验。采用荧光定量PCR方法检测5种耐药基因KPC、IMP、VIM、NDM-1和OXA-48在CRE菌株中的表达。**结果** 共分离203株CRE菌株,其中2016年全年CRE菌检出46株,检出率为0.59%(46/7849),2017年全年CRE菌检出84株,检出率为0.93%(84/9011),2018年1月至9月CRE菌检出73株,检出率为1.33%(73/5473);标本类型以痰液标本为主,占71.43%(145/203);临床科室分布以儿科为主,占30.05%(61/203);细菌种类以肺炎克雷伯菌为主,占57.14%(116/203)。药敏结果提示CRE对碳青霉烯类抗菌药物亚胺培南耐药率为100.0%,对厄他培南的耐药率为82.27%,对头孢唑林耐药率为95.07%,对喹诺酮类药物耐药率分别为左氧氟沙星44.33%,环丙沙星19.24%;对阿米卡星的敏感率最高,为77.34%。203株CRE菌株中NDM-1基因扩增阳性的菌株有78株,占38.42%,KPC基因阳性共有49株,占24.14%;其中NDM-1和HPC同时阳性者19例,占9.36%;IMP基因阳性共有56株,占27.59%;OXA-48基因阳性共有20株,占9.85%;未扩增出VIM耐药基因。**结论** CRE菌耐药严重,耐药基因以NDM-1为主,临床医生应加强耐药监测,合理选择抗菌药物。

关键词: 肠杆菌科; 基因,MDR; β 内酰胺酶类; 碳青霉烯酶; 耐药基因; 临床分布

Analysis of clinical distribution and drug resistance genotyping of 203 carbapenem enterobacteriaceae strains

SHE Yahui, HAN Yuanyuan, CHAI Jie, RONG Ling

Author Affiliation: Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Bozhou, Bozhou, Anhui 236800, China

Abstract: Objective To investigate the distribution, drug resistance and genotype of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) in hospitals, and to provide theoretical basis for clinical treatment of CRE infection. **Methods** CRE strains collected from January 2016 to September 2018 were identified by Vitek 2-Compact automatic microbiological analyzer. The expression of five resistance genes KPC, IMP, VIM, NDM-1 and OXA-48 in CRE strain was detected by fluorescence quantitative PCR. **Results** A total of 203 strains of CRE were isolated. Among them, 46 strains of CRE were detected in 2016, the detection rate was 0.59% (46/7849), 84 strains were detected in 2017, the detection rate was 0.93% (84/9011), and 73 strains were detected from January to September 2018, and the detection rate was 1.33% (73/5473). The specimen type was mainly sputum specimens, accounting for 71.43% (145/203). The clinical department was mainly pediatric, accounting for 30.05% (61/203), the bacterial species were mainly *Klebsiella pneumoniae*, accounting for 57.14% (116/203). The drug sensitivity results suggested that the resistance rate of CRE to the antimicrobial drug imipenem was 100.0%, the resistance rate to ertapenem was 82.27%, and the resistance rate to cefazolin was 95.07%. The drug resistance rate to levofloxacin and ciprofloxacin was 44.33% and 19.24% respectively, for the highest of which was amikacin, 77.34%. Among the 203 CRE strains, 78 strains were positive for NDM-1 gene amplification, accounting for 38.42%. 49 strains were positive for KPC gene amplification, accounting for 24.14%. Among them, 19 cases were NDM-1 and HPC positive at the same time, accounting for 9.36%. 56 strains were positive for IMP gene, accounting for 27.59%. 20 strains were positive for OXA-48 genes, accounting for 9.85%. VIM resistance gene was not amplified. **Conclusion** The drug resistance of CRE bacteria is severe, and NDM-1 is the main drug resistance gene. Clinicians should strengthen drug resistance monitoring and select antibiotics reasonably.

Key words: Enterobacteriaceae; Genes,MDR; beta-Lactamases; Carbapenemases; Resistance gene; Clinical distribution

碳青霉烯类抗菌药物是治疗由多重耐药肠杆菌科细菌引起的感染的有效药物,尤其适用于产超广谱 β 内酰胺酶(ESBLs)和AmpC β 内酰胺酶(AmpC酶)的病原菌引起的严重感染。然而,世界范围的碳青霉烯类耐药正挑战着碳青霉烯类抗生素用于严重感染的治疗^[1-3]。耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenem resistant Enterobacteriaceae, CRE)的出现,引发了全世界的关注^[4]。为了解医院CRE细菌的分布和耐药情况,本研究通过对CRE菌株进行统计分析,并采用分子生物学方法检测耐药基因在CRE菌株中的表达,对CRE细菌分布及耐药特点进行总结,为指导临床合理选择抗菌药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集2016年1月至2018年9月亳州市人民医院门诊及住院病人分离的非重复耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌203株,采用Vitek 2-Compact全自动微生物分析仪进行鉴定,金黄色葡萄球菌ATCC25923和大肠埃希菌ATCC25922为质控菌株(本室保存)。因本研究主要涉及细菌学故免除了医院伦理委员会的审查。

1.2 主要仪器和试剂 全自动微生物分析仪(法国梅里埃生物公司),DNA提取试剂盒(宝生物工程有有限公司),实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司),SYBR Green荧光染料(美国ABI公司),电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。参照文献^[5]设计引物,并由上海生工生物技术有限公司合成,见表1。

表1 碳青霉烯酶耐药基因PCR引物序列及产物长度

基因	序列(5'-3')	产物长度/bp
NDM	正向引物:GATCCTCAACTGGATCAAGC	128
	反向引物:CATTGGCATAAGTCGCAATC	
KPC	正向引物:ATATCTGACAACAGGCATGAC	95
	反向引物:CCAACTCCTCAGCAACAAA	
VIM	正向引物:TCTCCAGCAGCACTTTCATGAC	124
	反向引物:GTGGGAATCTCGTTCCCTC	
IMP	正向引物:GGCTTAATTCTCGATCTATCCC	114
	反向引物:CTAGCCAATAGTAACTCCGC	
OXA	正向引物:AGGCACGTATGAGCAAGATG	189
	反向引物:TGGCTTGTGTTGACAATACGC	

1.3 细菌鉴定和药物敏感性试验 采用Vitek 2-Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统对细菌进行鉴定及药敏分析。抗菌药物包括:呋喃妥因、左氧氟沙星、头孢唑林、头孢曲松、环丙沙星、哌拉西林/他唑巴坦、厄他培南、头孢替坦、头孢他啶、氨苄西林、哌拉西林、妥布霉素、磺胺甲噁唑、丁胺卡

那霉素、氨基糖苷、庆大霉素和氨苄西林/舒巴坦。以大肠埃希菌ATCC25922为质控菌株,结果判断和分析参照2012年CLSI颁布的标准进行。改良Hodge试验参照文献^[6]进行。

1.4 荧光定量PCR扩增碳青霉烯酶耐药基因 采用DNA提取试剂盒提取CRE菌株基因组DNA,根据表1中的引物,采用SYBR Green染料法进行实时荧光定量PCR检测碳青霉烯酶耐药基因,配制20 μ L反应体系:2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,正向引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L,反向引物(10 μ mol/L) 1.0 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 6.0 μ L,总计20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C,10 min,1个循环。94 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,60 s,共40个循环。待扩增反应结束后,调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为循环阈值(Cycle threshold, Ct),并调节阈值范围判断结果,以Ct值<35判断为阳性表达。

2 结果

2.1 CRE细菌检出率 从2016年1月至2018年9月对我院分离出的肠杆菌科细菌进行耐药分析,剔除同一病人同一部位分离的重复菌株,共发现203株对CRE亚胺培南或厄他培南耐药的菌株,所有菌株均采用改良Hodge试验进行产碳青霉烯酶检测验证。2016年肠杆菌科分离的菌株数7 849株,分离CRE菌46株,CRE菌检出率为0.59%(46/7 849);2017年肠杆菌科分离的菌株数9 011株,分离CRE菌84株,CRE菌检出率为0.93%(84/9 011);2018年1至9月肠杆菌科分离的菌株数5 473株,分离CRE菌73株,CRE菌检出率为1.33%(73/5 473)。2016年1月至2018年9月CRE菌总体检出率为0.91%(203/22 333)。

2.2 CRE菌株标本来源分布情况及构成比 203株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌标本来源不同临床科室,以痰液标本为主,占71.43%(145/203);其次为中段尿液标本,占14.78%(30/203);第三为分泌物标本,占5.42%(11/203),三者占总数的91.63%(186/203),见表2。

表2 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌标本来源分布情况及构成比

标本来源	菌株数	构成比/%
痰液	145	71.43
中段尿液	30	14.78
分泌物	11	5.42
静脉全血	7	3.45
脓液	6	2.95
胸腹水	4	1.97

2.3 CRE 细菌临床科室分布情况 临床科室分布以儿科为主,占 30.05%(61/203);其次是重症监护室,共分离出 44 株,占 21.67%(44/203);泌尿外科、血液科、急诊科和呼吸科分别占 12.81%(26/203)、9.36%(19/203)、8.87%(18/203)和 8.87%(18/203),其他科室共 17 株,占 8.37%(17/203),具体见表 3。

表 3 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌临床科室分布情况及构成比

科室	菌株数	构成比/%
儿科	61	30.05
重症监护室	44	21.67
泌尿外科	26	12.81
血液科	19	9.36
急诊科	18	8.87
呼吸科	18	8.87
肿瘤科	6	2.95
内分泌科	5	2.46
康复科	3	1.48
神经外科	2	0.99
消化科	1	0.49

2.4 CRE 细菌种类分布情况 在 203 株 CRE 菌株中,以肺炎克雷伯菌为主,占 57.14%(116/203),其次大肠埃希菌,占 25.62%(52/203),第三为产气肠杆菌,占 9.85%(20/203),具体见表 4。

表 4 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌种类分布及构成比

病原菌	菌株数	构成比/%
肺炎克雷伯菌	116	57.14
大肠埃希菌	52	25.62
产气肠杆菌	20	9.85
阴沟肠杆菌	9	4.43
产酸克雷伯菌	6	2.96

2.5 CRE 细菌药物敏感性 203 株耐 CRE 细菌对 18 种常用抗菌药物的药敏结果中,CRE 耐药率超过 50.00% 的抗菌药物有 12 种,占总数的 66.7%;对大部分 β 内酰胺类药物呈现高度耐药,对亚胺培南的耐药率达到 100.00%,对厄他培南的耐药率为 82.27%;对头孢唑林耐药率为 95.07%,对阿米卡星的敏感率最高,为 77.34%;对第三代头孢菌素(头孢吡肟,头孢曲松和头孢他啶)的普遍耐药率均在 75.00% 以上,对环丙沙星和庆大霉素的敏感性较好,敏感率均在 60.00% 以上。见表 5。

2.6 CRE 细菌耐碳青霉烯酶基因检测 203 株 CRE 菌株中 NDM-1 基因扩增阳性的菌株有 78 株,占 38.42%,KPC 基因阳性共有 49 株,占 24.14%;其中 NDM-1 和 HPC 同时阳性者 19 例,占 9.36%;IMP

表 5 203 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌对常用抗菌药物的药敏率

抗菌药物	敏感(S)		中介(I)		耐药(R)	
	株数	敏感率/%	株数	中介率/%	株数	耐药率/%
亚胺培南	0	0.00	0	0.00	203	100.00
哌拉西他唑巴坦	17	8.37	19	9.36	167	82.27
左旋氧氟沙星	98	48.28	15	7.39	90	44.33
头孢唑林	10	4.93	0	0.00	193	95.07
头孢吡肟	48	23.65	0	0.00	155	76.35
头孢曲松	33	16.26	1	0.49	169	83.25
环丙沙星	127	62.56	37	18.20	39	19.24
哌拉西林/他唑巴坦	29	14.29	24	11.82	150	73.89
厄他培南	35	17.24	1	0.49	167	82.27
头孢替坦	41	20.20	50	24.63	112	55.17
头孢他啶	27	13.30	1	0.49	175	86.21
哌拉西林	24	11.82	5	2.46	174	85.72
妥布霉素	73	35.96	50	24.63	80	39.41
磺胺甲噁唑	100	49.26	2	0.99	101	49.75
阿米卡星	157	77.34	4	1.97	42	20.69
氨基糖苷类	50	24.63	0	0.00	153	75.37
庆大霉素	130	64.04	5	2.46	68	33.50
氨基糖苷类/舒巴坦	7	3.45	5	2.46	191	94.09

基因阳性共有 56 株,占 27.59%;OXA-48 基因阳性共有 20 株,占 9.85%;未扩增出 VIM 耐药基因。见表 6。

表 6 203 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌碳青霉烯酶基因检测阳性率

基因名称	菌株数	阳性率/%
NDM-1	78	38.42
KPC	49	24.14
IMP	56	27.59
OXA-48	20	9.85
VIM	0	0.00

3 讨论

肠杆菌科细菌尤其是大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌,是常见社区获得性感染的病原菌。随着肠杆菌科细菌中多重耐药的急剧增多,由这些多重耐药菌引起的感染性疾病治疗的抗生素选择受到了限制,而这正威胁着公众的健康。

本研究结果显示,2016 年 1 月至 2018 年 9 月从我院住院病人分离 CRE 菌 203 株,CRE 菌总体检出率为 0.91%,高于东莞地区 0.28% 的 CRE 检出率^[7],同时我院每年 CRE 的检出率从呈现逐年递增的趋势,给临床治疗带来了极大的困难,应引起充分重视。CRE 菌主要来自痰液标本,占 71.43%,大部分

来源于重症监护室,这可能由于此类病人病情严重,多次进行各种侵入性操作如气管插管、插入呼吸机等,加上大量使用各类抗菌药物,甚至滥用,造成病人免疫力低下,造成人体正常菌群破坏,增加了耐药性CRE菌感染的机会。

CRE细菌从科室分布来看主要来自儿科,占30.05%,这与周静芳等^[8]报道的结果一致,一方面可能是因为儿科是我院特色科室,住院病人多,另一方面可能间接反映我院儿科用药不规范,应根据临床药敏结果合理用药。CRE细菌来自11个不同的临床科室,6种不同的临床标本,提示CRE细菌可引起多部位的感染。CRE菌株中以肺炎克雷伯菌为主,占57.14%,与丁卉等^[9]报道结果一致,提示临床分离出肺炎克雷伯菌时应根据药敏结果合理用药。

药敏结果分析发现,203株CRE菌对大多数抗菌药物耐药率较高,对头孢唑林耐药率为95.07%,在临床治疗时应避免选用该类药物。对阿米卡星的敏感率最高,为77.34%,可能是该类药物具有较强耳毒性和肾毒性,临床上该类药物使用较少,耐药发生少。鉴于其良好的敏感性,在安全情况下可优先考虑使用该类药物。对环丙沙星和庆大霉素的敏感性较好,敏感率均在60.0%以上。

碳青霉烯酶是一种能水解亚胺培南或美罗培南等抗菌药物的 β -内酰胺酶,它包括A、B、D三类酶,其中A类为KPC酶^[10],B类为IMP和VIM金属酶^[11],D类为OXA-48型酶^[12]。2009年,一种新型的金属 β -内酰胺酶,被命名为新德里- β -内酰胺酶-1(NDM-1),从1例印度裔瑞典男性尿路感染的病人尿液标本中分离的肺炎克雷伯菌检测出^[13]。自从NDM-1的首次报道后,这一重要的碳青霉烯酶在多个国家的多种革兰阴性杆菌中检测出,代表了一新的挑战向感染性疾病的治疗^[14-15]。研究表明,编码碳青霉烯酶的基因通常和其他耐药基因位于可移动的质粒上,这便利了多重耐药基因转移至其他细菌^[16]。本研究中采用荧光定量PCR技术对CRE菌株耐药菌株基因型进行检测,比常规PCR和电泳相结合的方法更为方便,且结果容易判断,适合大规模样本检测。CRE菌株NDM-1基因阳性的菌株有78株,占38.42%,KPC基因阳性共有49株,占24.14%,提示我院CRE菌以NDM-1和KPC基因型为主,今后的研究工作应对其同源性进行分析,判断有无院内传播流行。

综上,我院CRE菌耐药较为严重,耐药基因以NDM-1和KPC为主,临床医生应加强耐药监测,合理选择抗菌药物,防止耐药株在院内传播流行。

参考文献

- [1] 张艳君,秦琴,李虎,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的分布特点与耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(2):245-247.
- [2] 赵慧铮,师志云,李刚,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药性分析与分子流行病学研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(3):494-497.
- [3] 吴娜,田素飞,褚云卓,等.东北5家医院碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌耐药基因的分析[J].中华传染病杂志,2017,35(6):357-363.
- [4] ESER F, YILMAZ GR, GÜNER R, et al. Risk factors for rectal colonization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital: a case-control study from Turkey [J]. Turk J Med Sci, 2019, 49(1):341-346.
- [5] LEE TD, ADIE K, MCNABB A, et al. Rapid detection of kpc, ndm, and oxa-48-like carbapenemases by real-time pcr from rectal swab surveillance samples [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(8): 2731-2733.
- [6] 刘彩霞,严春,李方去,等.儿科耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌携带 β -内酰胺酶基因的调查[J].疾病监测,2015,30(1):67-70.
- [7] 胡继华,梁振刚,郭主声,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的现状研究[J].中华医院感染学杂志,2017,27(4):725-728.
- [8] 周静芳,凌勇,刘伟江,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的感染特征和危险因素分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(1):16-19.
- [9] 丁卉,吴大盈,江丽莉,等.我院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染特点及碳青霉烯酶基因型分析[J].中华全科医学,2017,15(9):1549-1552.
- [10] ADAMS-HADUCH JM, POTOSKI BA, SIDJABAT HE, et al. Activity of temocillin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(6):2700-2701.
- [11] 谢宁,郭斌,蔡燕,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药基因研究[J].中华医院感染学杂志,2015,25(24):5555-5558.
- [12] LUNHA K, CHANAWONG A, LULITANOND A, et al. High-level carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with a novel OmpK36 variant and low-level, carbapenem-resistant, non-porin-deficient, OXA-181-producing *Escherichia coli* from Thailand [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(2): 221-226.
- [13] 梅艳芳,刘盼盼,王莲慧,等.新德里金属 β -内酰胺酶亚型在碳青霉烯类耐药肠杆菌中分布及分子流行病学研究[J].中华医院感染学杂志,2017,27(2):241-246.
- [14] KARABAY O, ALTINDIS M, KORUGLU M, et al. The carbapenem-resistant enterobacteriaceae threat is growing: ndm-1 epidemic at a training hospital in turkey [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2016, 15:6.
- [15] CIZMECI Z, AKTAS E, OTLU B, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48-endemic area [J]. J Chemother, 2017, 29(6):344-350.
- [16] AL-AGAMY MH, ALJALLAL A, RADWAN HH, et al. Characterization of carbapenemases, ESBLs, and plasmid-mediated quinolone determinants in carbapenem-insensitive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh hospitals [J]. J Infect Public Health, 2018, 11(1):64-68.

(收稿日期:2019-01-28,修回日期:2019-03-23)