

肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶的检测及基因型分析

董大光, 王 健, 潘亚萍, 沈继录, 徐元宏

摘要 目的 分析耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的耐药情况,检测常见的碳青霉烯酶的发生情况及基因型别,为临床治疗该类菌提供依据。方法 采用VITEK-2型全自动微生物检测系统进行细菌鉴定和药敏试验;改良Hodge试验(MHT)、Carba NP试验和改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)对碳青霉烯酶进行表型检测,EDTA协同试验检测金属酶;并采用聚合酶链反应(PCR)方法检测KPC碳青霉烯酶耐药基因,以及ERIC-PCR对耐药株的同源性分析。结果 药敏试验显示25株CRKP仅对复方新诺明和米诺环素敏感率较高;MHT试验、Carba NP试验和mCIM试验结果一致,24株(96%)CRKP产碳青霉烯酶,1株CRKP未检出碳青霉烯酶,协同试验未检测出B类碳青霉烯酶(金属酶);25株CRKP中有23株检测出blaKPC-2基因;ERIC-PCR分型可分为8型,其中II型为主要的流行株,共14株,I型3株,III型和VII型各2株,IV、V、VI、VIII型各1株。结论 CRKP多药耐药情况严重,其碳青霉烯酶以产KPC-2型为主;改良Hodge试验、Carba NP试验和mCIM试验结果与PCR法有高度的一致性,且快速、简单,为临床提供了可靠的筛选方法。

关键词 肺炎克雷伯菌;碳青霉烯酶;改良Hodge试验;Carba NP试验;改良碳青霉烯灭活试验;耐药性

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1721-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.014

肺炎克雷伯菌是临床分离及医院感染的重要致病菌之一,随着 β -内酰胺类及氨基糖苷类等广谱抗菌素的广泛使用,细菌易产生超广谱 β -内酰胺酶和头孢菌素酶以及氨基糖苷类修饰酶,尤为严重的是对碳青霉烯类抗生素耐药的肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的持续增加^[1-2],给临床抗感染治疗带来了极大的挑战。该文收集了25株CRKP,对耐药性、耐药基因进行检测以及流行状况进行了初步分析,以探究CRKP

的耐药机制及其流行情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 收集2016年1月~12月安徽医科大学第一附属医院分离的25株对碳青霉烯类具有很强耐药性的肺炎克雷伯菌,将之作为本次研究的对象,并且做到同一个患者没有重复分离株。采用质控标准菌株大肠埃希菌 ATCC25922。

1.1.2 仪器 全自动的Vitek 2 Compact微生物系统和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱均购自法国生物梅里埃公司;GeneAmp970基因扩增仪购自美国PE公司。

1.1.3 试剂 血平板、麦康凯平板、MH平板等培养基购自合肥天达诊断试剂有限公司;药敏纸片购自英国OXOID公司;亚胺培南粉末购自国药集团国瑞药业有限公司;细菌蛋白抽提液购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

1.1.4 引物 标志物DL2000、Ex Taq DNA聚合酶试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖、引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司;引物序列: F: 5'-TCTGGACCGCTGGGAGCTGG-3'; R: 5'-TGC-CCGTTGACGCCCAATCC-3'。片段大小为510 bp。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定和药敏实验 细菌鉴定和药敏试验采用VITEK-2 Compact全自动微生物分析系统,部分药物补充K-B法,具体标准参照CLIS 2016推荐的方法。

1.2.2 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌表型筛选

1.2.2.1 改良Hodge试验(modified Hodge test, MHT) 把0.5麦氏浊度的大肠杆菌ATCC 25922的悬浮液1:10稀释后均匀涂布于药敏试验平板上。于平板正中央贴10 μ g/片美罗培南药敏纸片,将待测菌挑取出来,自纸片外缘向平板边缘划线接种待检菌,经35 $^{\circ}$ C培养过夜后判定效果。

1.2.2.2 Carba NP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) 试验 制备A液(含0.1 mmol/L硫酸锌的酚红溶液)和B液(A液中加入6 mg/ml亚胺培南)。

2018-06-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81171618)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介: 董大光,男,硕士研究生;

沈继录,男,副主任技师,硕士生导师,责任作者, E-mail:

shenjilu@126.com

分别标记 1.5 ml 离心管为 a、b,每管中加入 100 μl 细菌蛋白抽提液,从 37 °C 培养 24 h 血平板上挑取受试菌株,振荡混匀 5 s,a 管中加入 100 μl A 液,b 管中加入 100 μl B 液,涡旋振荡混匀,置于 37 °C 孵箱,每 0.5 h 观察记录颜色变化至孵育 2 h 结束。

1.2.2.3 改良碳青霉烯灭活试验(modified Carbapenem inactivation method,mCIM) 取 1 μl 接种环的过夜培养纯菌落于 2 ml TSB 肉汤中,震荡混匀,每管菌悬液放入一张含 10 μg 美罗培南的无菌纸片,(35 ± 2) °C 孵育 4 h 后,用 0.5 麦氏浊度的大肠埃希 ATCC 25922 菌悬液(直接菌悬法)涂布平板,干燥 3 ~ 10 min,将美罗培南纸片从 TSB 肉汤中取出贴于已涂布有大肠埃希菌 ATCC25922 的 MH 平板上。倒置平板,孵育 18 ~ 24 h 后量取抑菌圈直径。

1.3 金属酶表型 EDTA 协同试验 准备 MH 药敏琼脂平皿和待测菌,将过夜待测菌用无菌生理盐水调至 0.5 麦氏浊度的菌悬液,将菌液均匀涂布于 MH 平皿上,静置 10 min 待干燥,将 10 μg/片亚胺培南贴在 MH 平皿上,距其 1 cm 处贴一张 EDTA(吸附有 0.5 mol/L EDTA 10 μl)纸片。35 °C 培养 18 ~ 24 h 后观察结果。

1.4 产肺炎克雷伯菌型碳青霉烯酶基因检测 采用煮沸裂解法提取总 DNA 为模板。blaKPC 基因扩增 扩增条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,如此循环 33 次;最后在 72 °C 下延伸 5 min。对 PCR 产物进行电泳分析。上海生工公司对扩增产物进行测序,对测序结果进行比对。

1.5 耐药菌株同源性分析 煮沸法制备细菌 DNA,ERIC-PCR 的引物序列 ERIC1: ATGTAAGCTC-CTGGGGATTAC; ERIC2: AAGTAAGTGACTGGGGT-GAGCG。扩增条件是:95 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 1 min,35 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,如此循环 20 次,接着 94 °C 变性 1 min,42 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,如此循环 35 次,最后在 72 °C 延伸 5 min。取出扩增产物 10 μl,加入到 1.5% 琼脂糖凝胶里,开始电泳分析。判定标准为主要的条带位置和数量相同为同一基因型。

1.6 统计学处理 使用 WHONET 5.6 软件对 K-B 法的药敏结果和仪器法最小抑制浓度(MIC)药敏结果进行数据处理及分析。

2 结果

2.1 药物敏感实验结果 所分离的 25 株肺炎克

雷伯菌中,复方新诺明和米诺环素的耐药率较低,分别为 28% 和 4%。其他抗生素(头孢菌素、喹诺酮类、青霉素类、青霉素/青霉素酶抑制剂、氨曲南等)均高度耐药。见表 1。

表 1 25 株耐碳氢酶类菌对 18 种抗菌药物的耐药率

抗菌药物	耐药		敏感	
	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)
亚胺培南	25	100	0	0
美罗培南	25	100	0	0
头孢吡肟	24	96	0	0
阿米卡星	18	72	7	28
环丙沙星	24	96	1	4
妥布霉素	21	84	4	16
庆大霉素	21	84	4	16
哌拉西林/他唑巴坦	25	100	0	0
头孢呋辛	25	100	0	0
氨曲南	25	100	0	0
头孢他啶	25	100	0	0
哌拉西林	25	100	0	0
左氧氟沙星	24	96	1	4
头孢噻肟	25	100	0	0
头孢哌酮/舒巴坦	21	84	4	16
复方新诺明	7	28	18	72
米诺环素	1	4	23	92
呋喃妥因	23	92	1	4

2.2 MHT 试验、Carba NP 试验和 mCIM 试验结果 对 25 株肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶表型检测,3 种试验结果相同,24 株 CRKP 阳性,阳性率为 96%,阴性株为同一标本。见图 1 ~ 3。

2.3 EDTA 协同试验 亚胺培南-EDTA 协同试验检测 25 株耐药菌株的金属酶表型,没有发现阳性菌株。见图 4。

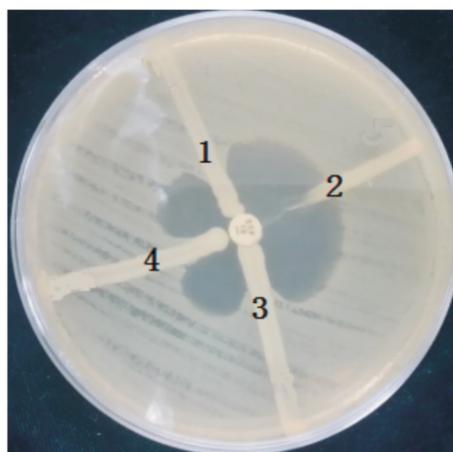


图 1 改良 Hodge 试验碳青霉烯酶检测结果
1: 阳性质控菌 ATCC BAA1705; 2: 阴性质控菌株 ATCC BAA1796; 3、4: 受试菌株,阳性结果



图2 Carba NP 试验碳青霉烯酶检测结果

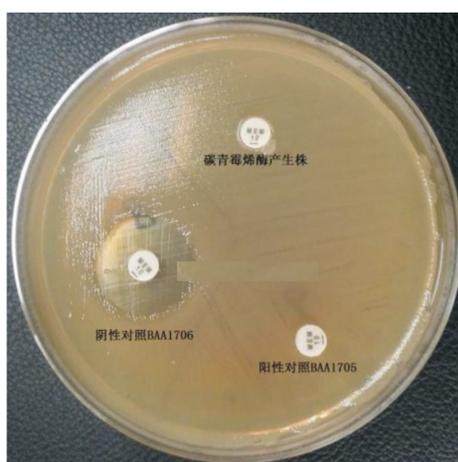


图3 改良碳青霉烯灭活试验碳青霉烯酶检测结果



图4 EDTA 协同试验检测结果

2.4 KPC 酶基因检测结果 24 株碳青霉烯酶表型试验阳性的 CRKP 进行 PCR 扩增, DNA 产物进行测序对比, 结果显示均为 KPC-2 型基因, 1 株碳青霉烯酶表型检测的阴性株 KPC 酶基因检测结果为阴性。见图 5。

2.5 ERIC-PCR 基因分型 25 株 CRKP 主要分为 8 型, 其中 I 型 3 株, II 型最多共 14 株, III 型和 VII 型

各 2 株, IV、V、VI、VIII 型各 1 株。见图 6。

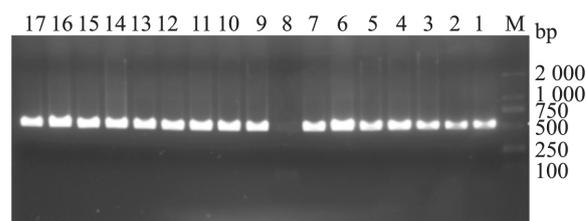


图5 部分临床菌株 KPC 基因电泳图

M: Marker; 8 号株的 KPC 基因阴性, 其他菌株均为阳性

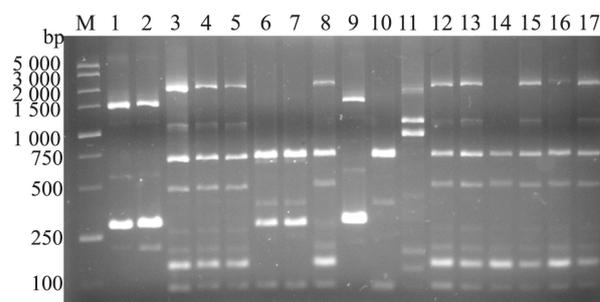


图6 部分临床菌株 ERIC-PCR 基因分型图谱

M: Marker; 1、2、9 为 I 型; 3、4、5、8、12、13、15、17 为 II 型; 6、7 为 III 型; 10 为 IV 型; 11 为 V 型; 14 为 VI 型; 16 为 VII 型

3 讨论

肺炎克雷伯菌在临床和医院感染中是重要的致病菌, 对外界有强烈的抵抗力。我院 25 株 CRKP 药敏结果显示, 复方新诺明的敏感率为 72%, 对米诺环素的敏感率为 92%, 其他抗菌药物均高度耐药。提示 CRKP 常常伴随对其他抗生素也耐药, 形成多重耐药, 给临床抗感染治疗带来极大困难, 而临床治疗 CRKP 感染可以选用四环素类抗生素和复方新诺明。

CLSI 在 2009 年推荐了 MHT 试验, 该实验用于检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的表型, 是一种常规的方法。2015 年时, CLSI 引进了 Carba NP 试验, 该实验除可用于检测肠杆菌科, 还可以检测铜绿假单胞菌和不动杆菌属碳青霉烯酶的表型^[3]。mCIM 是由 Van et al^[4] 发现的快速检测碳青霉烯酶的实验, 并于 2017 年 CLSI 新指南推荐采用 mCIM 检测碳青霉烯酶。它们共同优点在于使用简便, 并且成本很低, 检测具有很高的准确率, 因此, 适合临床微生物室开展, 被广泛用于检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌。唐海玲等^[5] 通过与 PCR 法比较, 用 Carba NP 试验方法, 筛查多重耐药革兰阴性杆菌产碳青霉烯酶, 具有 97.06% 的敏感性和 100% 特异性, 效果很

好。同时文献^[6]也表明 Carba NP 试验在检测 KPC、NDM、VIM、IMP、SPM 和 SME 型碳青霉烯酶方面具有较好的敏感性(>90%)和特异性(>90%)。Tijet et al^[7]用 mCIM 与 Carba NP 两种方法检测 182 株肠杆菌科细菌,两者均可有效地检测出碳青霉烯酶。余佳佳等^[8]用 mCIM 以 154 株临床分离的肠杆菌科细菌为对象,筛查出了产碳青霉烯酶的细菌,将其与 MHT 结果进行比较发现,mCIM 具有符合率和特异性高、结果易于观察等优势。该实验 25 株 CRKP 分别进行 Hodge、Carba NP 和 mCIM 试验,结果发现三组试验结果相同,有 24 株阳性,占总数的 96%,非常接近储雯雯等^[9]报道的阳性率 93.2%。碳青霉烯酶筛选试验阳性的 24 株 CRKP 进行 PCR 扩增和电泳分析,共出现 23 个目标带,PCR 扩增产物测序结果都是 KPC-2 型耐药基因,1 株 PCR 阴性的菌株耐药机制有待于进一步深入研究。

MHT 试验不足之处是其特异度表现上不够,尤其在弱阳性菌株检测时,很难分析 Hodge 试验的结果。Carba NP 试验可以快速检测碳青霉烯酶的类型,但需要特殊的试剂以及无法检测某些碳青霉烯酶(如染色体编码的 OXA 型碳青霉烯酶),在检测 OXA-232 型碳青霉烯酶存在一定的假阴性。且目前 CLSI 只有肠杆菌科细菌标准的 mCIM。同种细菌在金属酶的特异性作用下可能会出现不同的金属酶基因,检测相应的基因就需要设计不同的引物,且只能检测已知耐药基因,因此耗时长。因此我们主要采用 EDTA 作为酶抑制剂,结果发现金属酶检测试验结果均为阴性,可能产其他型酶,有待检测。

25 株 CRKP 主要来自 ICU 和血液内科,且标本类型主要为血液标本。通过 ERIC-PCR 分型 25 株肺炎克雷伯菌可分为 8 个亚型: I 型 3 株, II 型 14 株, III 型和 VII 型各 2 株, IV、V、VI、VIII 型各 1 株。该 8 个型别分布于多个科室,未呈现出集中于某个科室。

综上所述, MHT 试验、Carba NP 试验和 mCIM 试验,对于碳青霉烯酶的筛查均快捷、简单、易行。此外,我院产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的基因型主要为 KPC-2,其耐药形式严重,而四环素类药物对其有良好的体外抗菌活性。因此临床要加强防范,合理应用抗生素治疗该菌的感染及监控耐药株的传播。

参考文献

- [1] Tängdén T, Giske C G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control [J]. J Intern Med, 2015, 277(5): 501–12.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481–91.
- [3] Clinical and Laboratory Standard S Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. M100-S27 [S]. CLSI, 2015: 109–14.
- [4] Van D Z K, De H A, Pluister G N, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0123690.
- [5] 唐海玲, 陈定强, 黄丽燕, 等. Carba NP 试验检测多重耐药革兰阴性杆菌产碳青霉烯酶效果分析 [J]. 热带医学杂志, 2017, 17(8): 1007–11.
- [6] Mitra S, Kazi M, Panchal M, et al. Evaluation of Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae [J]. Indian J Med Microbiol, 2015, 33(4): 603–6.
- [7] Tijet N, Patel S N, Melano R G. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test [J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(1): 274–6.
- [8] 余佳佳, 刘瑛, 俞静, 等. 碳青霉烯类抗菌药物灭活试验筛查产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的效能评价 [J]. 检验医学, 2017, 32(7): 628–32.
- [9] 储雯雯, 刘周, 杨凯, 等. 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌耐药机制及分子流行病学研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(6): 809–13.

Detection of carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and analysis of the drug resistant genes

Dong Daguang, Wang Jian, Pan Yaping, et al

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) to clinical common antibiotics, and to detect the common methods for detection of carbapenemases, in order to provide the basis for the clinical treatment of such bacteria. **Methods** These clinical strains identification and antibiotic suscep-

网络出版时间: 2018-09-25 14:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.015.html>

肝细胞生长因子对小鼠巨噬细胞 M1、M2 亚型极化的影响

圣波¹ 胡泽平¹ 郭影¹ 顾奕玥¹ 王云飞¹ 周青² 汪渊²

摘要 目的 探讨体外条件下肝细胞生长因子(HGF)对小鼠巨噬细胞 M1、M2 亚型极化的影响。方法 体外培养 RAW264.7 巨噬细胞,分为 M ϕ 组(RAW264.7 细胞)、M1 组(M1 型巨噬细胞)及 M2 组(M2 型巨噬细胞),M1 组以干扰素- γ (IFN- γ)联合细菌脂多糖(LPS)诱导极化,M2 组以白介素-4(IL-4)诱导极化,其中 M1 组和 M2 组在诱导极化的同时分别予以 0.1、1.0、10.0 ng/ml HGF 处理。MTT 法检测 HGF 对 M ϕ 、M1 及 M2 组巨噬细胞的增殖情况;Western blot 法和细胞免疫荧光法分别检测 M1 型标志物精氨酸酶 II(Arg II)、诱导性一氧化氮合酶(iNOS)及 M2 型标志物精氨酸酶 I(Arg I)的蛋白表达;ELISA 法检测细胞上清中 IL-6、

IL-10 的浓度。结果 HGF 对 M ϕ 组及 M1、M2 组均无明显的增殖抑制作用;与 M ϕ 组相比,M1 组 Arg II、iNOS、IL-6 及 M2 组 Arg I、IL-10 的表达水平均明显升高($P < 0.05$)。不同浓度的 HGF 干预后,与 M1 组相比,HGF 各干预组 Arg II、iNOS、IL-6 的表达明显降低($P < 0.05$);与 M2 组相比,HGF 各干预组 Arg I、IL-10 的表达明显升高($P < 0.05$),且 1.0、10.0 ng/ml HGF 处理组呈剂量依赖性($P < 0.01$)。结论 体外条件下,HGF 抑制 RAW264.7 细胞向 M1 型极化,促进其向 M2 型极化。

关键词 肝细胞生长因子;巨噬细胞;极化;炎症
中图分类号 R 392

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1725-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.015

2018-05-29 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1508085MH168);安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目(编号:2016B097);安徽省卫生计生委中医药科研课题项目(编号:2014zy23);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20123420120005);安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012A147)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

²安徽医科大学分子生物学实验室,合肥 230032

作者简介:圣波,男,硕士研究生;

胡泽平,男,主任医师,教授,责任作者,E-mail: 1431318679@qq.com

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是间质细胞趋化的多功能生长因子,可作用于多种类型的细胞,在细胞增殖、运动与迁移、抗凋亡、抗纤维化和调节免疫等方面发挥重要的生物学功能^[1]。最近研究^[2]表明:HGF 具有很强的抗炎作用,增加其表达可能有抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作用。AS 是发生在动脉血管壁的慢性炎症性疾病,炎症反应是其突出的促发因素。其中,巨

tibility test were carried out with the automatic VITEK2 system. Modified Hodge test (MHT), Carbapenemase Normann-Poirel (Carba NP) test and modified Carbapenem inactivation method (mCIM) were used to detect carbapenemase phenotype of carbapenems. The carbapenem class B enzymes (metallo) was tested by EDTA/IMP for joint experiments. KPC carbapenemase resistance gene was detected by PCR and the homology of resistant strains was analyzed by ERIC-PCR. **Results** Drug sensitivity test showed that 25 strains of CRKP had a higher susceptibility to sulfamethoxazole and minocycline. It showed that the test results were the same through comparing MHT, Carba NP test and mCIM. 24 strains (96%) of CRKP contained carbapenemase. One strain of CRKP did not detect carbapenemase. Synergy experiment to test 25 strains of CRKP were not found metal enzyme-positive strains. 23 strains of CRKP carrying blaKPC-2 gene were identified by PCR. ERIC-PCR results showed that 25 strains of CRKP were divided into 8 types, the main epidemic strain was type II, 14 strains belonged to type II. Genotype I had 3 isolate, genotype III and genotype VII each had 2 strains, genotype IV, V, VI and VIII each had 1 isolate. **Conclusion**

The multi-drug resistance of CRKP is serious and carbapenemase is mainly produced KPC-2 type in CRKP. MHT, Carba NP test and mCIM can rapidly and simply screening the carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, and the result is highly consistent with PCR method, so as to provide reliable methods for clinical screening.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase; modified Hodge test; Carba NP test; modified carbapenem inactivation method; drug resistance