

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001808

阴沟肠杆菌对碳青霉烯酶类抗生素耐药机制的研究

叶敏纳, 张晓兵

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究碳青霉烯类高水平耐药的阴沟肠杆菌临床分离株对碳青霉烯类耐药主要机制。**方法:**筛选对碳青霉烯类高水平耐药的阴沟肠杆菌临床分离株 21 株,同时采用微量肉汤稀释法测定这些细菌对不同抗生素的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),改良 Hodge 实验、Carba NP 试验检测是否产碳青霉烯酶;PCR 检测碳青霉烯酶类型(*bla*KPC、*bla*IMP、*bla*NDM、*bla*VIM、*bla*IMI、*bla*SPM、*bla*NDMOXA-23、*bla*NDMOXA-24、*bla*NDMOXA-48、*bla*NDMOXA-58)。**结果:**药敏试验显示碳青霉烯类高水平耐药阴沟肠杆菌具有多重耐药性。改良 Hodge 实验、Carba NP 试验阳性率分别为 61.9%(13/21)、90.5%(19/21);PCR 扩增碳青霉烯酶基因,21 株试验阴沟肠杆菌 19 株有扩增产物,IMP、KPC、NDM 阳性率分别为 23.8%(5/21)、9.5%(2/21)、61.9%(13/21),其中一株阴沟肠杆菌既产 IMP 又产 NDM。**结论:**产碳青霉烯酶是临床分离碳青霉烯类高水平耐药阴沟肠杆菌的主要耐药机制,应当引起院感控制人员的高度重视。

【关键词】阴沟肠杆菌;碳青霉烯酶基因**【中图分类号】**R446.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-06-31Mechanism of drug resistance of *Enterobacter cloacae* to carbapenem

Ye Mingna, Zhang Xiaobing

(Department of Clinical Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the mechanism of clinical isolates of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. **Methods:** Antimicrobial susceptibility test was done on 21 strains of *Enterobacter cloacae* by Kirby-Bauer method. The minimal inhibitive concentrations (MICs) of these antimicrobial agents were determined by microdilution broth dilution method. A modified Hodge test and Carba NP test were used to detect the presence of carbapenemase. The genotype of KPC, IMP, NDM, VIM, IMI, SPM, OXA-23, OXA-24, OXA-48 and OXA-58 was tested by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** Clinical isolates of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* were multi-drug resistance. The positive rate of modified Hodge test and Carba NP test were 61.9%(13/21), 90.5%(19/21), respectively. Carbapenemase genes were positive in 19/21 strains of *Enterobacter cloacae* by PCR. The positive rate of IMP, KPC and NDM were 23.8%(5/21), 9.5%(2/21) and 61.9%(13/21), respectively, in which one strain was both IMP and NDM positive. **Conclusion:** Production of carbapenemases is the main mechanism of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*, which should arouse the attention of staff in hospital infection-control department.

【Key words】*Enterobacter cloacae*; carbapenemases

阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*, EC)是院内感染和社区获得性感染的重要病原菌。阴沟肠杆菌为肠杆菌属细菌,本身低产 AmpC 酶,导致其对青霉素类、一、二代头孢菌素和头霉素类天然耐药。三代头孢菌素和含酶抑制剂的复合抗生素可用于首

次分离的阴沟肠杆菌治疗,但 3 代头孢菌素和含酶抑制剂的复合抗生素可诱导该菌高产 AmpC 酶,导致临床选择碳青霉烯类抗生素治疗。碳青霉烯类抗生素的暴露,有可能导致阴沟肠杆菌对该类抗生素非敏感率增加,实际上本院耐药监测的结果也是这样。过去研究表明,阴沟肠杆菌对碳青霉烯类耐药主要是由于 AmpC 酶合并膜孔蛋白丢失,或者其他原因所致。本院研究也表明产碳青霉烯酶不是阴沟肠杆菌阴沟肠杆菌对碳青霉烯类耐药的主要原因^[1]。随

作者介绍:叶敏纳, Email: 394762638@qq.com,

研究方向:临床微生物。

通信作者:张晓兵, Email: xhpg85@aliyun.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.1015.012.html>
(2018-07-05)

着临床碳青霉烯类高水平耐药的阴沟肠杆菌分离逐渐增加,其耐药机制可能发生改变,本文对医院收集的对碳青霉烯类高水平耐药的阴沟肠杆菌进行介导碳青霉烯类药物耐药基因的相关研究,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

阴沟肠杆菌源自 2015 年 1 月至 2016 年 4 月临床分离株(同一患者只留取初次分离株)。全部菌株均使用 VITEK-2 compact 全自动微生物鉴定系统鉴定菌种。

1.2 抗菌药物敏感性试验

用 VITEK-2 compact 测定左氧氟沙星、环丙沙星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、氨曲南、头孢他啶、哌拉西林、头孢曲松、亚胺培南、厄他培南等抗菌药物的敏感性。筛选厄他培南最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC) $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 或亚胺培南 MIC $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ 的菌株作为本实验研究对象。采用微量肉汤稀释法测定菌株对左氧氟沙星、环丙沙星、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、头孢曲松、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、妥布霉素的 MIC 值。药敏纸片:为英国 Oxoid 公司产品。MH 培养基由重庆庞通医疗器械有限公司提供。根据美国 CLSI 2016 年版标准进行敏感性判断。

1.3 改良 Hodge 试验

按照 CLSI2016 标准进行,0.5 麦氏浊度单位大肠埃希菌 ATCC 25922 菌液稀释 10 倍后均匀涂布 MH 平板,贴美罗培南(10 μg)纸片,接种待检细菌自纸片外缘向平板边缘划直线,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16~18 h 后观察结果,美罗培南抑菌圈内出现待检菌矢状生长者为产碳青霉烯酶菌株。

1.4 Carba NP 试验

取 21 株待测菌株,无菌生理盐水乳化后超声破壁法提取酶粗提物备用。按表 1 配置检测液 A、检测液 B,备用。取微孔板,每个菌株做 A、B 2 孔,分别向 2 孔中加入 50 μL 酶粗提物和 50 μL 对应的检测液 A、B。混匀,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中孵育,孵育 2 h。结果判定参照 CLSI 2016 标准,A 孔为红色,B 孔由红色变为黄色或橙黄色,Carba NP 试验阳性,阳性结果说明该待测菌株产碳青霉烯酶;A 孔为红色,B 孔为红色,Carba NP 试验阴性,阴性结果说明该待测菌株不产碳青霉烯酶。

表 1 Carba NP 试验检测液 A、B 配置

检测液成分	检测液 A	检测液 B
亚胺培南	0.0 mL	6.0 mg
0.54%酚红+1 mmol/L ZnSO ₄ , pH7.8(10 $\times$)	0.1 mL	0.1 mL
去离子水	0.9 mL	0.9 mL

1.5 耐药基因检测

以煮沸法制备细菌总 DNA。用 PCR 方法检测 KPC、IMP、NDM、VIM、IMI、SPM、OXA-23、OXA-24、OXA-48 和 OXA-58 型碳青霉烯酶的编码基因。引物序列由上海生工生物公司合成。引物序列详见表 2。各靶基因 PCR 扩增体系:每反应体系 P1、P2 引物各 0.5 mmol/L, dNTPs 各 200 mmol/L, KCl 10 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5%, BSA 0.02% (wt/vol), Taq DNA pol 1U。总反应体积 20 μL (其中模板液 5 μL)。PCR 扩增产物 >500 bp 热循环参数:93 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 然后 93 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、6 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 循环 35 个周期, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长至 5 min。PCR 扩增产物 <500 bp 热循环参数:93 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 然后 93 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 循环 35 个周期, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长至 5 min。扩增产物作 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶电泳成像仪下观察, 并记录结果。扩增产物送上海英捷维基公司测序后在 NCBI 上使用 BLAST 程序比对, 确定碳青霉烯酶的类型。

表 2 PCR 引物序列、所在位置及预计产物长度

目标基因	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
<i>bla_{KPC}</i>	F:TCGCCGTCTAGTTCTGCTGTCTT R:CCGCGCAGACTCCTAGCCTAA	965
<i>bla_{IMP}</i>	F:ATGAGCAAGTTATCTGTATTCTTTAT R:TTAGTTGCTTAGTTTGTATGGTTT	741
<i>bla_{NDM}</i>	F:TCACCGAGATTGCCGAGCGA R:GGCAGTCGCTTCCAACGGT	457
<i>bla_{VIM}</i>	F:GGTCGCATATCGCAACGCAGT R:CGGCGACTGAGCGATTTTTC	636
<i>bla_{IMI}</i>	F:CCATTACCCATCACAAAC R:CTACCGCATAATCATTTTC	440
<i>bla_{SPM}</i>	F:CTGCTTGGATTTCATGGGCGC R:CCTTTTCCGCGACCTTGATC	783
<i>bla_{OXA-23}</i>	F:ACTTGCTATGTGTTGCTTCTCTT R:TTCAGCTGTTTTAATGATTTCATCA	797
<i>bla_{OXA-24}</i>	F:CGATCAGAATGTTCAAGCGC R:ACGATTCTCCCTCTCGGC	559
<i>bla_{OXA-48}</i>	F:TTGGTGGCATCGATTATCGG R:GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	744
<i>bla_{OXA-58}</i>	F:CGATCAGAATGTTCAAGCGC R:ACGATTCTCCCTCTCGGC	529

2 结果

2.1 21 株碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌来源以及对常用抗生素药敏情况

21 株碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌来源分布情况:10 株

来源于痰液、5 株来源于尿液、3 株来源于穿刺液,其余 3 株分别来源于导管、血液和脑脊液。21 株碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌对常用抗生素药敏情况见表 3,药敏结果显示对常用抗生素耐药率都非常高,均为多重耐药菌株。

表 3 21 株阴沟肠杆菌对 12 种抗菌药物的 MIC($\mu\text{g/mL}$)

抗生素	MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀
亚胺培南	1~128	16	64
美罗培南	1~128	16	64
厄他培南	0.5~128	8	32
头孢他啶	8~ ≥ 512	64	128
头孢曲松	4~ ≥ 512	64	256
头孢吡肟	2~512	32	128
哌拉西林/他唑巴坦	128/4~ $\geq 512/4$	256/4	$>512/4$
哌拉西林	128~ ≥ 512	256	>512
环丙沙星	1~64	4	32
左氧氟沙星	2~64	8	64
庆大霉素	2~ ≥ 512	64	256
妥布霉素	2~ ≥ 512	64	128

2.2 改良 Hodge 试验结果

改良 Hodge 试验结果:21 株阴沟肠杆菌 13 株阳性,阳性率为 61.9%。如图 1 所示。

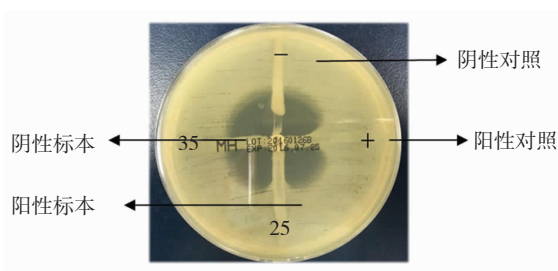


图 1 改良 Hodge 实验

2.3 Carba NP 试验结果

Carba NP 试验结果:21 株阴沟肠杆菌 19 株阳性,阳性率为 90.5%。如图 2 所示。

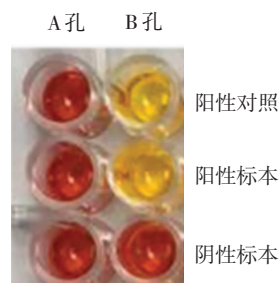


图 2 Carba NP II 试验

2.4 碳青霉烯酶耐药基因检测结果

21 株碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌碳青霉烯酶基因检测结果见表 4,有 19 株阴沟肠杆菌出现阳性,其中有 1 株阴沟肠杆菌既产 IMP-8 又产 NDM-1。

表 4 常见碳青霉烯酶耐药基因检测结果

编号	标本种类	MIC($\mu\text{g/mL}$)			改良 Hodge 试验	Carba NP 试验	碳青霉烯酶基因
		ETP	IPM	MEM			
1	痰	4	8	8	+	+	<i>bla</i> _{IMP-8}
2	痰	8	8	8	+	+	<i>bla</i> _{IMP-8}
3	痰	16	32	32	+	+	<i>bla</i> _{IMP-8}
4	痰	16	64	32	+	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
5	痰	8	4	8	+	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
6	尿	16	32	16	+	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
7	痰	8	16	16	+	+	<i>bla</i> _{KPC-2}
8	尿	32	64	64	-	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
9	引流液	8	8	8	+	+	<i>bla</i> _{KPC-2}
10	冲洗液	8	4	4	+	+	<i>bla</i> _{IMP-4}
11	痰	8	4	4	-	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
12	尿	16	>128	>128	+	+	<i>bla</i> _{NDM-1} 、 <i>bla</i> _{IMP-8}
13	尿	16	32	32	+	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
14	脑脊液	8	4	4	-	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
15	痰	8	16	4	-	-	阴性
16	分泌物	32	64	64	-	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
17	尿	32	64	64	-	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
18	痰	4	4	2	-	-	阴性
19	导管	32	32	32	+	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
20	血	4	16	16	-	+	<i>bla</i> _{NDM-1}
21	痰	32	32	32	+	+	<i>bla</i> _{NDM-1}

注:ETP:厄他培南;IPM:亚胺培南;MEM:美罗培南;+:阳性;-:阴性

3 讨论

随着广谱抗生素的广泛应用,细菌的耐药性已成为全球医学界关注的问题。在所有 β -内酰胺类抗生素中,碳青霉烯类抗生素具有最广泛的抗菌活性,它对革兰阴性菌产生的超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、AmpC 酶都很稳定,是治疗革兰阴性杆菌感染的最后一道防线。随着应用的增加,对其耐药的报道也日渐增多。临床上对碳青霉烯类抗生素耐药的细菌常见为非发酵菌如鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌等,但随着碳青霉烯类抗生素的暴露日益增加,肠杆菌科细菌对碳青霉烯类非敏感也渐渐增多,主要有肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌和弗氏枸橼酸杆菌等^[2]。革兰阴性菌对碳青霉烯类耐药机制主要有:产碳青霉烯酶、产 ESBLs 或 AmpC 酶合并膜孔蛋白的缺失、泵出机制、青霉素结合蛋白的改变^[3]。阴沟肠杆菌对碳青霉烯类耐药机制以往主要是由于 AmpC 酶合并膜孔蛋白丢失,本院研究也表明产碳青霉烯酶不是阴沟肠杆菌对碳青霉烯类耐药的主要原因。一般说来,非产碳青霉烯酶的因素导致碳青霉烯类耐药是低水平耐药,但是临床

碳青霉烯类高水平耐药的阴沟肠杆菌分离逐渐增加,其耐药机制可能发生改变。产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌(Carbapenemases-producing Enterobacteriaceae, CPE)在碳青霉烯耐药的肠杆菌科(Carbapenem-resistance Enterobacteriaceae, CRE)中被归类于危险性更大的细菌。本实验研究是为了解我院阴沟肠杆菌对碳青霉烯类耐药机制是否发生改变,为医院感染的控制提供更加有力的证据。

碳青霉烯酶的实验室检测主要有改良 Hodge 试验、Carba NP 试验结果和分子生物学方法,一般认为,分子生物学方法是检测耐药菌株产碳青霉烯酶金标准。本实验从临床分离到 21 株阴沟肠杆菌,药物敏感试验结果显示对碳青霉烯类耐药,且均为多重耐药菌株。本实验 21 株阴沟肠杆菌改良 Hodge 试验和 Carba NP 试验结果显示,阳性率分别为 61.9% (13/21)、90.5% (19/21)。经分子生物学方法检测有 19 株阴沟肠杆菌产碳青霉烯酶,以分子生物学方法为金标准,本试验测定 21 株阴沟肠杆菌结果显示,改良 Hodge 试验和 Carba NP 试验的敏感率分别为 68.4% (13/19)、100% (19/19),特异性均为 100% (2/2)。本实验改良 Hodge 试验敏感性较 Carba NP 试验低,主要是检测 NDM-1 型碳青霉烯酶出现假阴性,与文献报道一致^[4]。本实验只有 2 株阴沟肠杆菌产 KPC-2,改良 Hodge 试验均为阳性。有文献研究表明,改良 Hodge 试验对于 A 类碳青霉烯酶,尤其是 KPC 酶检测其特异性和灵敏度均较高^[5]。Carba NP 试验在 2012 年由法国学者首次提出^[6],由于其较改良 Hodge 试验敏感性和特异性均较高,方便快捷,且不需要昂贵的仪器设备,2015 年 CLSI 标准引入该实验,作为肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属细菌产碳青霉烯酶的表型确证试验,主要用于流行病学研究和感染控制^[7]。

21 株阴沟肠杆菌扩增 10 种常见碳青霉烯酶(KPC、IMP、NDM、VIM、IMI、SPM、OXA-23、OXA-24、OXA-48 和 OXA-58)基因,结果有 19 株扩增阳性,其中 IMP、KPC、NDM 阳性率分别为 23.8% (5/21)、9.5% (2/21)、61.9% (13/21),其中 1 株阴沟肠杆菌既产 IMP 又产 NDM。扩增阳性产物测序结果表明:产 IMP-4、IMP-8、KPC-2、NDM-1 的阴沟肠杆菌分别有 1 株、4 株、2 株和 13 株,其中 1 株阴沟肠杆菌既产 IMP-8 又产 NDM-1,可以看出我院主要产 NDM-1 为主,这与其他地区有所不同^[8-9],值得高度重视。在 2010 年首次报道 NDM-1 以来^[10],产 NDM-1 型

碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌越来越受到关注,本实验室曾经报道过产 NDM-1 的阴沟肠杆菌^[11],在中国大陆地区目前产 NDM-1 的阴沟肠杆菌有零星的报道^[12-13],但类似本实验这样以 NDM-1 型碳青霉烯酶为主要耐药机制的阴沟肠杆菌还少有报道,应该引起高度重视,加强耐药监测,严格控制医院感染,避免产 NDM-1 型碳青霉烯酶的阴沟肠杆菌的暴发流行。

参 考 文 献

- [1] 蒲妹丽,徐绣宇,史静,等. 碳青霉烯类非敏感阴沟肠杆菌耐药基因检测及流行病学分析[J]. 第三军医大学学报,2015,37(14): 1442-1448.
- [2] 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.
- [3] 莫春花,孙珊. 阴沟肠杆菌耐碳青霉烯类抗生素的耐药机制研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2013,24(3): 371-373.
- [4] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemase in Enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol, 2012, 50(2): 477-479.
- [5] Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2723-2725.
- [6] Delphine G, Poirel L, Nordmann P, et al. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(9): 1503-1507.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement[M]. Wayne, PA: CLSI, 2015.
- [8] 胡雪,林迪,陈坚,等. 碳青霉烯类药物非敏感肠杆菌科细菌基因型研究[J]. 临床检验杂志,2013,31(10): 736-739.
- [9] 林伯熹,李彬,刘秀琴,等. 碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(2): 194-199.
- [10] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, 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] Dai W, Sun S, Yang P, et al. Characterization of carbapenemases, extended spectrum β -lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing[J]. Infect Genet Evol, 2013, 14: 1-7.
- [12] 曹丽军,李慧卿,耿凤珍,等. 两株携带 NDM-1 型金属 β -内酰胺酶阴沟肠杆菌的临床特征研究[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(23): 5305-5325.
- [13] 刘鹏飞,陈佑明,孙恒彪,等. 阴沟肠杆菌耐药性分析及 NDM-1 基因检测[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(21): 5204-5206.

(责任编辑:方济)