

· 论 著 ·

用改良 Hodge 试验检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌

杨 燕, 孙长贵, 陈 坚, 熊 敏, 成 军

[摘要] **目的** 了解分离的肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶情况, 为临床正确选择抗菌药物提供依据。**方法** 采用 K-B 纸片扩散法检测并筛选厄他培南和美罗培南, 以抑菌环直径分别为 19 ~ 21 mm 和 16 ~ 21 mm 的菌株作为待测菌, 进行改良的 Hodge 试验。**结果** 390 株肠杆菌科细菌中筛选出 55 株可疑产碳青霉烯酶菌株, 对可疑菌株进行改良的 Hodge 试验, 阳性率 21.82% (12/55)。**结论** 碳青霉烯类抗生素敏感折点附近的肠杆菌科细菌有近 1/5 菌株产碳青霉烯酶, 临床微生物学实验室应执行改良 Hodge 试验, 以确保药敏试验结果的准确性。

[关键词] 肠杆菌科; 碳青霉烯酶; 抗生素; 敏感性

[中图分类号] R378.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)03-0223-03

Detection of carbapenemase in isolates of Enterobacteriaceae by the modified Hodge test

YANG Yan, SUN Chang-gui, CHEN Jian, XIONG Min, CHENG Jun. Department of Clinical Laboratory, 117 Hospital of PLA, Hangzhou, Zhejiang 310013, China

[Abstract] **Objective** To investigate carbapenemase production in isolates of Enterobacteriaceae isolated from our hospital and provide a correct choice of antibiotic for the clinician. **Methods** Antibiotic susceptibility test was performed by K-B method. Strains showing zones of inhibition 19 – 21 mm with Ertapenem or 16 – 21 mm with Meropenem were screened as suspicious carbapenemase producing ones and tested for carbapenemase by the modified Hodge test. **Results** 55 of 390 strains of Enterobacteriaceae were suspected of possessing carbapenemases, which revealed 21.82% positive rate in the modified Hodge test. **Conclusion** Nearly one-fifth of strains of Enterobacteriaceae whose carbapenems zones of inhibition were nearby susceptible break point generated carbapenemase. The modified Hodge test should be done to ensure the accuracy of the sensitivity test.

[Key words] Enterobacteriaceae; carbapenemase; antibiotic; sensitivity

碳青霉烯类抗生素为广谱 β -内酰胺类抗生素, 对革兰阴性菌和革兰阳性菌均具有很强的抗菌活性, 属于繁殖期杀菌剂, 对多种 β -内酰胺酶高度稳定, 在临床上大部分被用于多重耐药菌株引起的严重感染, 尤其用于产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 和 (或) 去阻遏表达 β -内酰胺酶 (AmpC) 的革兰阴性杆菌引起的感染的治疗^[1]。近年来, 碳青霉烯类抗生素耐药肠杆菌科细菌所致感染爆发的报道呈现上升趋势^[2-3], 给抗感染治疗带来重大挑战^[4]。碳青霉烯类抗生素的耐药机制之一是与菌株产生碳青霉烯酶有关, 碳青霉烯酶不仅能水解碳青霉烯类抗生素, 对其他 β -内酰胺类抗生素也具有水解作用。产生该类酶的菌株药敏试验理论上应表现对碳青霉烯类药物耐药, 但事实上, 有部分产酶菌株可表现敏感, 此种情况尤其在自动化检测体系中易被忽视, 从而

导致治疗失败。为了解临床分离的肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶情况, 我们用改良的 Hodge 试验对碳青霉烯类抗生素敏感折点附近的肠杆菌科细菌进行碳青霉烯酶检测, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株 390 株肠杆菌科细菌为我院 2005 年 6 月至 2008 年 6 月从临床送检标本中分离所得。其中大肠埃希菌 237 株、克雷伯菌 51 株、肠杆菌 27 株、变形杆菌 48 株、枸橼酸杆菌 3 株、沙雷菌 24 株; 无重复分离菌株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 和产 TEM-5 型肺炎克雷伯菌。

1.2 试剂 MH 琼脂为杭州天和微生物试剂公司产品。美罗培南、厄他培南、氨曲南、头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸、阿米卡星、妥布霉素和环丙沙星纸片为 Oxoid 公司产品。GNI 细菌鉴定卡为生物梅里埃公司产品。

1.3 仪器设备 Vitek 32 全自动微生物鉴定仪为

作者简介: 杨 燕 (1980-), 女, 浙江嘉兴人, 本科, 主管技师, 从事临床微生物室检验工作

作者单位: 310013 浙江杭州, 解放军 117 医院检验科

通讯作者: 孙长贵, E-mail: SunCgui@163.com

生物梅里埃公司产品,PHW-165Q 型恒温培养箱为宁波自动化仪表研究所产品。

1.4 药物敏感性试验及待测菌株的筛选 使用标准的 K-B 纸片琼脂扩散法检测肠杆菌科细菌对两种碳青霉烯类抗生素的耐药性。按照 CLSI(美国临床和实验室标准化协会) M100-S19 文件推荐,筛选厄他培南抑菌圈直径在 19 ~ 21 mm 或美罗培南抑菌圈直径在 16 ~ 21 mm 的肠杆菌科细菌,进行改良 Hodge 试验。

1.5 改良的 Hodge 试验(MHT)^[5] 将 10 倍稀释的 0.5 麦氏浊度大肠埃希菌 ATCC 25922 悬液均匀涂布于 MH 琼脂平板,使平板干燥 3 ~ 10 min,于平板中央贴一片厄他培南或美罗培南纸片。用 10 μl 接种环或拭子,挑取血琼脂平板过夜生长的 3 ~ 5 个待测菌落或质量控制菌株悬液,从纸片边缘到平板边缘的方向划直线接种。划线至少有 20 ~ 25 mm 长。35℃ 培养 16 ~ 20 h。若待测菌产生碳青霉烯酶,其接种线与大肠埃希菌 ATCC 25922 抑菌环交界处会产生朝向抑菌圈内增强生长现象,即 MHT 阳性;反之则为阴性。见图 1。

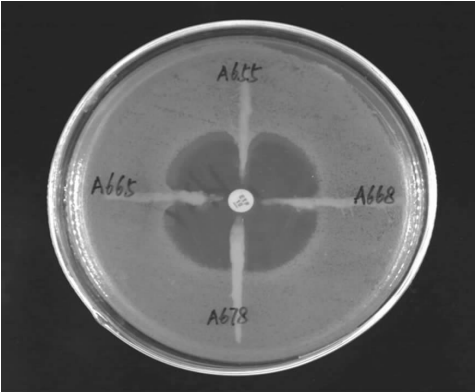


图 1 改良 Hodge 试验结果

A665 和 A655 号大肠埃希菌为 MHT 阳性菌株, A668 和 A678 号大肠埃希菌为 MHT 阴性菌株

1.6 ESBLs 检测 采用 CLSI M100-S19 文件推荐方法^[5]。

1.7 质量控制 用大肠埃希菌 ATCC 25922 进行常规纸片扩散法药敏试验质量控制,两种碳青霉烯类抗生素对质控菌株的抑菌环结果均在 CLSI 的允许范围内。改良的 Hodge 试验质量控制,用 MHT 阳性菌株肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 和 MHT 阴性菌株肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 进行。

2 结 果

2.1 药敏试验筛选结果 K-B 纸片琼脂扩散法检

测 390 株肠杆菌科细菌,筛选得到厄他培南抑菌环直径在 19 ~ 21 mm 或美罗培南抑菌环直径在 16 ~ 21 mm 的肠杆菌科细菌 55 株,其中大肠埃希菌 22 株,克雷伯菌 12 株,肠杆菌 10 株,变形杆菌 9 株,沙雷菌 2 株。

2.2 改良 Hodge 试验结果 55 株待测菌株,MHT 阳性 12 株,其中大肠埃希菌 9 株,阴沟肠杆菌 2 株,肺炎克雷伯菌 1 株。MHT 阳性菌株的碳青霉烯类抗生素抑菌圈直径结果见表 1。

表 1 MHT 阳性菌株碳青霉烯类抗生素抑菌圈直径(mm)

菌株编号	细菌名称	美罗培南	厄他培南
A206	大肠埃希菌	21.0	21.0
A245	大肠埃希菌	24.5	19.5
A454	大肠埃希菌	22.5	20.5
A583	大肠埃希菌	24.0	20.0
A621	大肠埃希菌	23.0	20.0
A645	大肠埃希菌	30.5	19.0
A655	大肠埃希菌	21.0	22.0
A658	大肠埃希菌	25.0	20.0
A665	大肠埃希菌	20.0	17.0
C291	肺炎克雷伯菌	25.0	20.0
E40	阴沟肠杆菌	23.0	19.0
E45	阴沟肠杆菌	23.0	20.5

2.3 MHT 阳性菌株药敏试验结果及产生 ESBL 情况 12 株 MHT 阳性菌株均产 ESBL;对部分抗生素敏感试验结果见表 2。

3 讨 论

碳青霉烯酶是具有强大水解能力的 β-内酰胺酶,能水解青霉素、头孢菌素、单环内酰胺类及碳青霉烯类抗生素。碳青霉烯酶属于 Ambler 分子分类法的 A 类、B 类和 D 类 β-内酰胺酶。A 类和 D 类酶的活性部位具有丝氨酸;B 类酶即金属 β-内酰胺酶,其活性部位具有锌离子。A 类酶包括阴沟肠杆菌的 IMI 21 和 NMC 2A 酶、粘质沙雷菌中由染色体介导的 NMC 2A、Sme 21、Sme 22、Sme 23、IMI 21 酶,以及肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌中质粒介导的 KPC 1、GES 22 酶。其中以肺炎克雷伯菌 KPC 酶传播最广,多见于肠杆菌科细菌,最早分离于肺炎克雷伯菌,由质粒编码介导。A 类酶可被克拉维酸和他唑巴坦等 β-内酰胺抗生素所抑制。D 类酶由 OXA 型酶组成,多见于鲍曼不动杆菌。金属酶多见于铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌、鲍曼不动杆菌和沙雷菌等^[2]。

表 2 部分抗菌药物对 MHT 阳性菌株的抑菌圈直径 (mm)

抗菌药物种类	菌株编号											
	A206	A245	A454	A583	A621	A645	A655	A658	A665	C291	E40	E45
阿米卡星	7	11	20	15	22	7	17	13	17	7	7	7
妥布霉素	7	7	19	9	14	7	11	7	10	7	7	7
环丙沙星	7	10	7	7	13	7	7	7	7	7	7	10
氨曲南	21	11	20	14	13	12	10	7	7	7	7	7
头孢噻肟	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	10
头孢噻肟/克拉维酸	24	12	25	12	23	10	25	8	22	19	12	19
头孢他啶	22	10	22	16	16	7	14	7	7	7	7	7
头孢他啶/克拉维酸	25	11	23	22	24	14	22	15	19	13	10	18

本研究根据 CLSI 推荐^[5],选择厄他培南抑菌环在 19~21mm 或美罗培南抑菌环在 16~21mm 的肠杆菌科细菌作为待测菌,旨在检出表型试验敏感而非耐药的产酶菌株,以确保药敏试验结果准确,为临床正确用药提供依据。从本研究 MHT 阳性结果来看,符合厄他培南筛选条件的 MHT 阳性株占总阳性株的 83.33% (10/12),符合美罗培南筛选条件的 MHT 阳性株占总阳性株的 25% (3/12)。提示厄他培南筛选的指示效果高于美罗培南,临床实验室应尽可能考虑用厄他培南纸片进行筛选试验。

研究结果表明,我院肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶以大肠埃希菌较为多见,占 MHT 阳性菌的 75% (9/12),其次为阴沟肠杆菌和肺炎克雷伯菌。因此,临床实验室应在进行常规药敏试验时,应加强对这类菌株产碳青霉烯酶的监测。

本次研究中改良 Hodge 试验阳性的菌株均产 ESBL。由于碳青霉烯类抗生素为治疗产 ESBL 肠杆菌科细菌引起的严重感染的一线药物^[6],所以临床实验室对 ESBL 阳性菌进行改良 Hodge 试验检测其是否产碳青霉烯酶很重要。

对于 MHT 阳性而对碳青霉烯类抗生素表型试验敏感的肠杆菌科细菌,CLSI 建议在报告结果前,应执行 MIC 试验,如对任一种碳青霉烯类药物敏感(厄他培南 MIC≤2 μg/ml、美罗培南 MIC≤4 μg/ml 或亚胺培南 MIC≤4 μg/ml),只报告碳青霉烯类药物的 MIC,无需解释结果。报告中可作如下注释,“此菌株被证明产碳青霉烯酶。用碳青霉烯类药物治疗药敏试验对碳青霉烯类药物敏感但体外试验证明产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌引起的感染,其临床疗效尚不明确。”

抗生素是临床治疗感染性疾病的最有力武器^[7],抗生素的滥用导致耐药菌株日趋增多、耐药程度日趋增强,迫使我们进一步合理使用抗生素。以亚胺培南和美罗培南为代表的碳青霉烯类抗

生素为治疗重度感染的一线经验治疗药物^[8],然而碳青霉烯类抗生素药敏试验敏感但产碳青霉烯酶的菌株引起的临床感染,给临床治疗带来较大的困扰。临床微生物学实验室应建立测试碳青霉烯酶方法,及时准确的报告结果。

改良的 Hodge 试验,可用于检测碳青霉烯类抗生素敏感的菌株产碳青霉烯酶的情况,在检测肠杆菌科细菌时具有 90% 以上的敏感性和特异性^[5],但此法为一种表型试验,不能将碳青霉烯酶分型。对于 MHT 试验阳性菌株的基因分型,还有赖于 PCR 进行基因检测。

【参考文献】

[1] Peirano G, Seki LM, Passos VLV, et al. Carbapenem-hydrolysing β-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil[J]. Antimicrob Chemother, 2009,63(2):265-268.

[2] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev,2007,20(3):440-458.

[3] Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, et al. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008,52(3):1028-1033.

[4] Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat[J]. JAMA,2008,300(24):2911-2913.

[5] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009,29(3):1-149.

[6] Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) [J]. Clin Microbiol Infect, 2000,6(9):460-463.

[7] 王菁平,丁蓉蓉. 试论医务人员合理用药[J]. 东南国防医药, 2009,11(4):353-355.

[8] 夏云,曹何,张晓恒,等. 革兰阴性杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药率的变化及用量的关系[J]. 临床检验杂志, 2010,28(3):237-238.

(收稿日期:2010-10-08;修回日期:2010-11-20)
(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)