

青岛地区3家“三甲”医院ICU耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌碳青霉烯酶基因型研究^Δ

宋晓萍^{1*}, 张宁欣², 王健¹, 朱元祺³, 杨德胜^{1#}(1. 青岛市海慈医疗集团检验科, 山东青岛 266033; 2. 青岛市海慈医疗集团院感科, 山东青岛 266033; 3. 青岛大学医学院附属医院检验科, 山东青岛 266071)

中图分类号 R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)04-0478-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.04.12

摘要 目的:分析青岛地区3家“三甲”医院重症监护病房(ICU)耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌碳青霉烯酶的基因型,为临床防控和治疗耐药菌感染提供参考。方法:收集2013年1月—2016年6月青岛地区3家“三甲”综合性医院ICU分离的耐亚胺培南肺炎克雷伯菌(IRKP)、耐亚胺培南铜绿假单胞菌(IRPA)、耐亚胺培南鲍曼不动杆菌(IRAB)各60株,采用纸片扩散法进行药敏试验;采用Carba NP试验确证其碳青霉烯酶表型;采用聚合酶链反应法扩增其碳青霉烯酶基因,应用双脱氧链终止法进行双向测序,并与GenBank数据库进行Blast比对。结果:3种耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌对哌拉西林、头孢唑林、亚胺培南西司他丁钠、庆大霉素等大部分临床常用抗菌药物的耐药率均较高,但对多黏菌素B敏感(耐药率均为0)。180株耐药菌株中,A、B、D类碳青霉烯酶阳性菌株分别有52、13、39株,检出率分别为28.89%、7.22%、21.67%。检出KPC-2、IMP-1、VIM-2、OXA-23基因的分别有52株(IRKP)、4株(IRPA)、8株(IRPA 7株、IRAB 1株)、39株(IRAB),检出率分别为28.89%、2.22%、4.44%、21.67%;未检出IMP-2、VIM-1、NDM-1、OXA-24、OXA-58基因。Blast比对结果显示,上述检出基因与GenBank数据库中的已知基因100%同源。结论:该地区3家“三甲”医院ICU耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌的耐药情况严重,对大多数临床常用抗菌药物的敏感度均较低。检出的主要基因型包括KPC-2(肺炎克雷伯菌)、OXA-23(鲍曼不动杆菌)、IMP-1和VIM-2(铜绿假单胞菌)。

关键词 青岛地区;“三甲”医院;重症监护病房;耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌;碳青霉烯酶;Carba NP试验;KPC基因;VIM基因;NDM基因;OXA基因

Study on Carbapenemase Genotype of Imipenem-resistant Gram-negative Bacilli in Intensive Care Unit of 3 Third Grade Class A Hospitals from Qingdao Area

SONG Xiaoping¹, ZHANG Ningxin², WANG Jian¹, ZHU Yuanqi³, YANG Desheng¹(1. Dept. of Laboratory, Qingdao Hiser Medical Group, Shandong Qingdao 266033, China; 2. Dept. of Hospital Infection Control, Qingdao Hiser Medical Group, Shandong Qingdao 266033, China; 3. Dept. of Laboratory, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Shandong Qingdao 266071, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To analyze carbapenemases genotype of imipenem-resistant Gram-negative bacilli in intensive care unit (ICU) of 3 third grade class A hospitals from Qingdao area, so as to provide reference for drug-resistant bacteria infection prevention and treatment in clinic. **METHODS:** From Jan. 2013 to Jun. 2016, each 60 strains of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (IRKP), imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (IRPA) and imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (IRAB) were collected from 3 third grade class A hospitals from Qingdao area. Drug sensitivity test was performed by using Kirby-Bauer method. Phenotypes of carbapenemases were determined by Carba NP trial. PCR was applied to amplify carbapenemase gene; Sanger sequencing method was adopted for bi-directional sequencing; Blast comparison with GenBank database was conducted. **RESULTS:** Three kinds of imipenem-resistant Gram-negative bacilli showed high drug resistance to majority commonly used antibiotics as piperacillin, cefazolin, imipenem and cilastatin sodium, gentamicin, etc., but were sensitive to polymyxin B (resistance rate of 0). Among 180 drug-resistant strains, there were 52 strains of class A carbapenems, 13 strains of class B carbapenems and 39 strains of class D carbapenems; the detection rates of them were 28.89%, 7.22% and 21.67%, respectively. There were 52 strains of KPC-2 gene (IRKP), 4 strains of IMP-1 gene (IRPA), 8 strains of VIM-2 gene (7 strains of IRPA, 1 strain of IRAB), 39 strains of OXA-23 gene (IRAB); the detection rates of them were 28.89%, 2.22%, 4.44%, 21.67%; all strains were not detected IMP-2, VIM-1, NDM-1, OXA-24, OXA-58 genes. Results of Blast comparison showed that above detected genes were absolutely homology with the corresponding genes in GenBank database. **CONCLUSIONS:** Drug resistance of imipenem-resistant Gram-negative bacilli in ICU of 3 third grade class A hospitals is serious in this region, which are

^Δ 基金项目:青岛经济技术开发区重点科技发展计划项目(No.2013-1-82)

* 主管技师, 硕士。研究方向:病原生物学。电话:0532-8377285。E-mail:qdhcexp@163.com

通信作者:副主任技师。研究方向:病原生物学。电话:0532-8377176。E-mail:13963983209@126.com

nearly no-sensitive to most of commonly used antibiotics in clinic. Main genotypes included KPC-2 (*K. pneumoniae*), OXA-23 (*A. baumannii*) and IMP-1 and VIM-2 (*P. aeruginosa*).

KEYWORDS Qingdao area; Third grade class A hospital; Intensive care unit; Imipenem-resistant Gram-negative bacilli; Carbapenemases; Carba NP test; KPC gene; VIM gene; NDM gene; OXA gene

耐碳青霉烯类抗菌药物的菌株是目前全球抗感染治疗的最大威胁,因其碳青霉烯酶的编码基因大多数由质粒介导,可在细菌之间水平转移,导致了菌株耐药基因的进化,使其在多个国家和地区爆发流行^[1]。美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)2015年版药敏标准引入 Carba NP 试验^[2],这是一种新型的碳青霉烯酶表型检测方法。本研究中采用 Carba NP 试验替代以往的改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶表型的筛查,旨在对青岛地区3家“三甲”医院重症监护病房(Intensive care unit, ICU)临床分离的耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌的耐药特征、碳青霉烯酶表型及基因型进行研究,为临床防控和治疗耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌感染提供理论依据,也为革兰氏阴性杆菌对亚胺培南耐药机制的深入研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

收集2013年1月—2016年6月青岛地区3家“三甲”综合性医院ICU临床分离的耐亚胺培南肺炎克雷伯菌(Imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, IRKP)、耐亚胺培南铜绿假单胞菌(Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, IRPA)和耐亚胺培南鲍曼不动杆菌(Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, IRAB)各60株,共180株(排除同一患者检出的重复菌株)。菌株均来自于患者的血液标本。用无菌镊子夹取纸片刮取已纯化的上述菌株菌落4~5个,放入冻存管内,密封后贴上标签,置于-20℃冰箱中冷冻保存。

1.2 材料

WITEK[®]2 Compact全自动微生物鉴定系统及配套GNI鉴定卡(法国生物梅里埃公司);MIT-P型多点接种仪(日本Sakuma公司);Tanon EPS-100型电泳仪(北京原平皓生物技术有限公司);PTC-200型扩增仪(美国伯乐公司);GelDoc 2000型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);ABI377型全自动DNA测序仪(美国ABI公司);Vortex-Gebie 2型涡旋振荡器(美国SI公司)。

药敏试验所用的19种抗菌药物药敏纸片均购自英国Oxoid公司;10 mmol/L七水硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)溶液、0.5%酚红溶液、0.1 mol/L氢氧化钠(NaOH)溶液、0.003 mol/L乙二胺四乙酸(EDTA)溶液、他唑巴坦对照品(批号:160211;纯度: $\geq 98\%$)均购自上海恒远生物科技有限公司;注射用亚胺培南西司他丁钠(美国Merck Sharp & Dohme Corp.,注册证号:国药准字J20130123,规格:亚胺培南500 mg和西司他丁500 mg);细菌总蛋白抽提试剂(美国Thermo公司);哥伦比亚血琼脂、5%马血平板(法国生物梅里埃公司);聚合酶链反应(Poly-

merase chain reaction, PCR)试剂盒(批号:160113)、DNA凝胶回收试剂盒(批号:160223)均购自大连TaKaRa生物工程有限公司;引物由南京金思瑞生物科技有限公司合成。质控菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)由国家卫生计生委临床检验中心提供。

1.3 药敏试验

所有操作均严格按照《全国临床检验操作规程》(第3版)^[3]进行。采用全自动微生物鉴定系统及配套GNI卡进行菌种鉴定;采用纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)进行药敏试验,其结果判定参照CLSI 2015年的标准^[2]。

1.4 碳青霉烯酶表型筛查试验

采用Carba NP法,具体步骤参考文献[4]。配制A、B、C、D 4种溶液。其中,A液:取0.5%酚红溶液2 mL,加至纯水16.6 mL中,加入10 mmol/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液180 mL,使用0.1 mol/L NaOH溶液调pH值至 7.8 ± 0.1 ;B液为A液+亚胺培南西司他丁钠(后者最终质量浓度为6 mg/mL);C液为A液+亚胺培南西司他丁钠+他唑巴坦(亚胺培南西司他丁钠、他唑巴坦的最终质量浓度分别为6、4 mg/mL);D液为A液+亚胺培南西司他丁钠+EDTA(亚胺培南西司他丁钠、EDTA的最终质量浓度分别为6 mg/mL、0.003 mol/L)。用1 μ L取菌环从血平板上挑取受试菌株(已于37℃下培养24 h),加至含细菌总蛋白抽提试剂100 μ L的检测管A~D中,振荡混匀5 s。将A、B、C、D液各100 μ L依次加至上述检测管中,于37℃下孵育,每10 min观察并记录颜色变化,直至孵育2 h结束。当检测管内液体颜色由红色或红橙色变为浅橙色、深黄色或黄色时,为碳青霉烯酶表型筛查阳性。具体判定标准^[4]——B、D检测管颜色发生改变,而A、C检测管颜色不变,则为A类碳青霉烯酶;B、C检测管颜色发生改变,而A、D检测管颜色不变,则为B类碳青霉烯酶;B、C、D检测管颜色发生改变,而A检测管颜色不变,则为D类碳青霉烯酶。

1.5 碳青霉烯酶基因型检测

采用煮沸法提取细菌DNA,采用PCR法对碳青霉烯酶基因进行扩增。OXA-23、OXA-24、OXA-58反应条件及引物参照文献[5],IMP、VIM反应条件及引物参照文献[6];KPC-2、NDM-1反应条件及引物参照文献[7],各基因PCR引物序列与扩增产物长度见表1。OXA-23、OXA-24、OXA-58扩增条件为94℃预变性5 min;94℃变性1 min,57℃退火40 s,72℃延伸45 s,共30个循环;72℃再延伸7 min。IMP、VIM扩增条件为94℃预变性3 min;94℃变性1 min,57℃退火1 min,72℃延伸2 min,共35个循环;72℃再延伸7 min。KPC-2、NDM-1扩

增条件为94℃预变性5 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃再延伸10 min。所有扩增产物均经琼脂糖凝胶电泳后置凝胶成像系统上观察。

表1 PCR引物序列与扩增产物长度

Tab 1 PCR primer sequence and the length of amplified products

类型	基因	引物序列	扩增产物长度, bp
A类碳青霉烯酶	KPC-2	上游: 5'-TGTAAGTTACCGCGCTGAGG-3'	585
		下游: 5'-CCAGACGACGGCAGTATGTCAT-3'	
B类碳青霉烯酶	IMP-1	上游: 5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'	587
		下游: 5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	
	IMP-2	上游: 5'-AGCGTGTCCCATGTAC-3'	678
		下游: 5'-GTTTTATGTCTATGCTTCC-3'	
	VIM-1	上游: 5'-CAAAAGTCCCCTCCAACA-3'	920
		下游: 5'-TTATGGAGCAGCAACGATGT-3'	
	VIM-2	上游: 5'-TGCAACTTCATGTTATGCCG-3'	865
		下游: 5'-AAAGTTATGCCGCACTCACC-3'	
	NDM-1	上游: 5'-CAGCACACTTCTATCTC-3'	292
		下游: 5'-CCGCAACCATCCCCTCTT-3'	
D类碳青霉烯酶	OXA-23	上游: 5'-GATGTGTCATAGTATTCGTCGT-3'	1 058
		下游: 5'-TCACAACAATAAAAGCACTGT-3'	
	OXA-24	上游: 5'-ATGAAAAATTTATACTTCTATATTCAGC-3'	825
		下游: 5'-TTAA ATGATTCGAAGATTTCTAGC-3'	
	OXA-58	上游: 5'-ACGATTCTCCCTCTGCGC-3'	500
		下游: 5'-CGATCAGAATGTTCAAGCGC-3'	

电泳完成后,回收纯化的DNA片段,使用全自动DNA测序仪,采用双脱氧链终止法(Sanger测序法)进行双向序列测定。测序由上海英骏生物技术有限公司完成,测序结果在GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中进行Blast对比分析。

1.6 数据处理

采用WHONET 5.4软件对药敏试验数据进行处理。

2 结果

2.1 180株ICU耐药菌株对常用抗菌药物的耐药情况

在检测的19种临床常用抗菌药物中,IRKP除对头孢哌酮钠舒巴坦钠和多黏菌素B的敏感度相对较高(耐药率分别为50.00%、0)外,对其余17种抗菌药物的耐药率均 $\geq 70\%$;IRPA除对头孢哌酮钠舒巴坦钠、阿米卡星、环丙沙星和多黏菌素B的敏感度相对较高(耐药率 $\leq 55.00\%$)外,对其余多种抗菌药物的耐药率均在65%以上;IRAB对其中11种抗菌药物耐药(耐药率=100%),仅对头孢哌酮钠舒巴坦钠和多黏菌素B的敏感度相对较高(耐药率分别为53.33%、0),详见表2。

2.2 碳青霉烯酶表型筛查结果

180株耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌碳青霉烯酶表型筛查结果显示,A类酶阳性菌株有52株,B类酶阳性菌株有13株,D类酶阳性菌株有39株,总检出率分别为28.89%、7.22%、21.67%;其余76株菌株碳青霉烯酶表型筛查结果均呈阴性,详见表3。

2.3 碳青霉烯酶基因检测结果

检测结果显示,共有52株菌株(IRKP)检出KPC-2基

表2 180株ICU耐药菌株对常用抗菌药物的耐药情况 [株(%), n=60]

Tab 2 Drug resistance of 180 drug-resistant strains to commonly used antibiotics [strain(%), n=60]

抗菌药物	IRKP	IRPA	IRAB
哌拉西林	60(100)	59(98.33)	60(100)
哌拉西林钠他唑巴坦钠	51(85.00)	49(81.67)	52(86.67)
头孢哌酮钠舒巴坦钠	30(50.00)	23(38.33)	32(53.33)
头孢唑林	58(96.67)	60(100)	60(100)
头孢唑肟钠	58(96.67)	60(100)	60(100)
头孢噻肟钠	52(86.67)	-	60(100)
头孢他啶	54(90.00)	52(86.67)	60(100)
头孢曲松钠	50(83.33)	-	56(93.33)
头孢吡肟	46(76.67)	41(68.33)	52(86.67)
氨基糖苷类	60(100)	44(73.33)	-
亚胺培南西司他丁钠	60(100)	60(100)	60(100)
美洛培南	60(100)	59(98.33)	60(100)
庆大霉素	58(96.67)	51(85.00)	60(100)
妥布霉素	54(90.00)	52(86.67)	60(100)
阿米卡星	42(70.00)	31(51.67)	52(86.67)
环丙沙星	58(96.67)	33(55.00)	60(100)
左氧氟沙星	48(80.00)	43(71.67)	58(96.67)
复方磺胺甲噁唑	60(100)	-	60(100)
多黏菌素B	0(0)	0(0)	0(0)

注:“-”为天然耐药

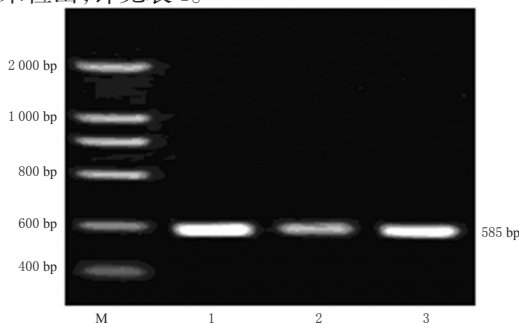
Note:“-” means natural resistance

表3 180株耐药菌株碳青霉烯酶表型筛查结果 [株(%)]

Tab 3 Results of carbapenemase phenotype screening of 180 drug-resistant strains [strain(%)]

碳青霉烯酶表型	IRKP(n=60)	IRPA(n=60)	IRAB(n=60)	总检出(n=180)
A类	52(86.67)	0(0)	0(0)	52(28.89)
B类	0(0)	12(20.00)	1(1.67)	13(7.22)
D类	0(0)	0(0)	39(65.00)	39(21.67)
合计	52(86.67)	12(20.00)	40(66.67)	104(57.78)

因,4株(IRPA)检出IMP-1基因,8株(IRPA 7株、IRAB 1株)检出VIM-2基因,39株(IRAB)检出OXA-23基因(电泳图见图1~图4),检出率分别为28.89%、2.22%、4.44%和21.67%;IMP-2、VIM-1、NDM-1、OXA-24和OXA-58基因均未检出,详见表4。

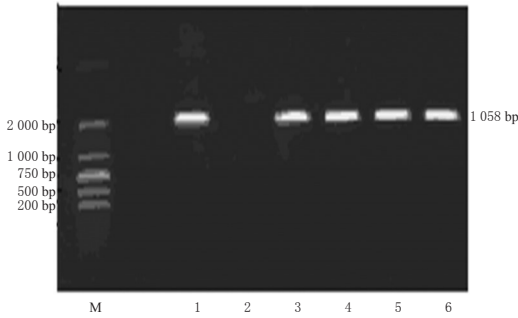


注:M: DNA分子标记;1. KPC-2阳性对照;2~3. KPC-2阳性扩增产物

Note: M: DNA marker; 1. KPC-2 positive control; 2-3. KPC-2 positive amplification products

图1 KPC-2扩增产物电泳图

Fig 1 Electropherogram of KPC-2 gene amplified products

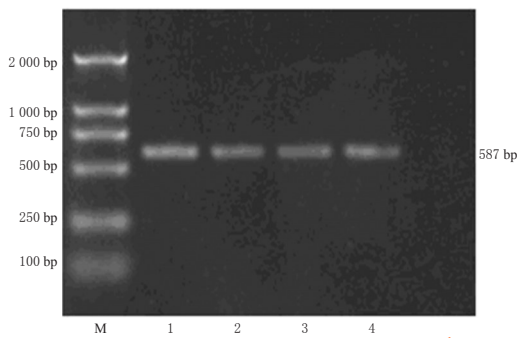


注: M. DNA 分子标记; 1. *OXA-23* 阳性对照; 2. *OXA-23* 阴性扩增产物; 3~6. *OXA-23* 阳性扩增产物

Note: M. DNA marker; 1. *OXA-23* positive control; 2. *OXA-23* negative amplification products; 3-6. *OXA-23* positive amplification products

图2 *OXA-23* 扩增产物电泳图

Fig 2 Electropherogram of *OXA-23* gene amplified products

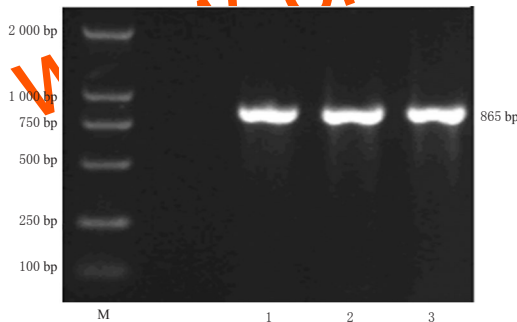


注: M. DNA 分子标记; 1. *IMP-1* 阳性对照; 2~4. *IMP-1* 阳性扩增产物

Note: M. DNA marker; 1. *IMP-1* positive control; 2-4. *IMP-1* positive amplification products

图3 *IMP-1* 扩增产物电泳图

Fig 3 Electropherogram of *IMP-1* gene amplified products



注: M. DNA 分子标记; 1. *VIM-2* 阳性对照; 2~3. *VIM-2* 阳性扩增产物

Note: M. DNA marker; 1. *VIM-2* positive control; 2-3. *VIM-2* positive amplification products

图4 *VIM-2* 扩增产物电泳图

Fig 4 Electropherogram of *VIM-2* gene amplified products

2.4 PCR产物测序结果

采用简单随机抽样法选取2个*KPC-2*、2个*OXA-23*、1个*IMP-1*和1个*VIM-2*阳性扩增产物进行序列测定及比对。Blast 比对结果显示, *KPC-2*、*OXA-23*、*IMP-1*和

VIM-2 基因与 Genbank 数据库中的已知基因 100% 同源。

表4 180株耐药菌株碳青霉烯酶耐药基因检测结果[株(%)]

Tab 4 Results of carbapenemase gene detection of 180 drug-resistant strains [strain(%)]

耐药基因	IRKP(n=60)	IRPA(n=60)	IRAB(n=60)	总检出(n=180)
<i>KPC-2</i>	52(86.67)	0(0)	0(0)	52(28.89)
<i>IMP-1</i>	0(0)	4(6.67)	0(0)	4(2.22)
<i>IMP-2</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>VIM-1</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>VIM-2</i>	0(0)	7(11.67)	1(1.67)	8(4.44)
<i>NDM-1</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>OXA-23</i>	0(0)	0(0)	39(65.00)	39(21.67)
<i>OXA-24</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>OXA-58</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

3 讨论

本研究以2013年1月—2016年6月青岛市的3家“三甲”综合性医院ICU临床分离的180株耐亚胺培南菌株为研究对象,这3家医院从地域上包含了该市的市南区、市北区、黄岛区和崂山区,基本可体现该地区的流行趋势。亚胺培南于1985年经美国FDA批准上市,是第1个获批用于临床的碳青霉烯类药物,也是目前临床应用最广泛的碳青霉烯类药物;随着其临床使用的日益广泛,耐亚胺培南菌株的分离率逐年增高^[8]。本研究显示,3家医院ICU分离的耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌的耐药情况严重,其中IRKP对除头孢哌酮钠舒巴坦钠、多黏菌素B外的其他临床常用药物的耐药率均 $\geq 70%$,IRPA对除头孢哌酮钠舒巴坦钠、阿米卡星、环丙沙星、多黏菌素B外的其他临床常用药物的耐药率均在65%以上,而IRAB对除头孢哌酮钠舒巴坦钠、多黏菌素B等11种临床常用药物均耐药,这与胡付品等^[9]的报道基本一致。本研究显示,临床分离出的180株耐亚胺培南菌株均对多黏菌素B敏感(耐药率=0)。多黏菌素B是1947年首次成功分离的肽类抗菌药物,主要作用于细菌细胞膜,为慢效杀菌剂,其不良反应(肾毒性和神经毒性)明显,但由于其抗菌作用强且不易产生耐药性,故当菌株对其他抗菌药物耐药或疗效不佳时,可选用多黏菌素B;此外,因其肾毒性大,故重症患者尤其是肾功能不全者应在密切监测血肌酐和尿素氮水平的情况下谨慎使用^[9]。

碳青霉烯酶是能够水解碳青霉烯类药物的一类 β -内酰胺酶,包括Ambler分子分类中的A、B、D三大类(*KPC-2*型A类酶基因, *IMP-1*、*IMP-2*、*VIM-1*、*VIM-2*、*NDM-1*型B类酶基因, *OXA-23*、*OXA-24*、*OXA-58*型D类酶基因),故本研究针对上述三大类碳青霉烯酶的主要基因型分别设计了9组引物进行PCR扩增。

肺炎克雷伯菌对亚胺培南的耐药机制呈现多样化特点,主要包括产碳青霉烯酶、产头孢菌素酶(AmpC酶)或超广谱 β -内酰胺酶(Extended-spectrum-beta-lactamases, ESBLs)合并膜孔道蛋白缺失、主动外排泵增强致外排量增多等^[10],其中产*KPC*型碳青霉烯酶是导致肺炎

克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药的主要原因^[11]。该类酶能水解包括青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类以及 β -内酰胺酶抑制剂在内的多种抗菌药物^[11]。*KPC*基因共有11种分型(1~11),以*KPC-2*最为常见^[12]。临床分离的耐药菌株常规进行*KPC-2*基因筛查可为该类菌株防控措施的制订提供参考,对本地区流行病学的调查具有重大意义^[12]。本研究中,60株IRKP经Carba NP试验进行碳青霉烯酶表型筛查,有52株菌株呈A类酶阳性,基因扩增结果显示52株菌株均携带*KPC-2*基因,这与赵晓杰、张丽等^[13-14]的报道基本相符。

铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药机制复杂,主要包括产碳青霉烯酶、外膜孔蛋白D₂(Outer membrane porin D₂, OprD₂)缺失或表达减少、生物膜的形成、药物主动外排泵的过度表达等,产生碳青霉烯酶是铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的重要机制,其中B类 β -内酰胺酶是铜绿假单胞菌产生的最主要的碳青霉烯酶^[15]。B类 β -内酰胺酶又称金属 β -内酰胺酶(Metallo-beta-lactamase, MBL),简称金属酶,该类酶由染色体、质粒或转座子介导,能水解除单环 β -内酰胺类药物以外的几乎所有 β -内酰胺类药物,其活性不被常见的 β -内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸、他唑巴坦、舒巴坦)所抑制,但可被EDTA、巯基乙酸等抑制。因此,MBL可使包括青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类以及克拉维酸、他唑巴坦和舒巴坦等 β -内酰胺酶抑制剂在内的临床常用药物产生耐药。由于目前尚缺乏有效的酶抑制剂,MBL已成为临床抗感染治疗的一大棘手问题^[16]。本研究中,60株IRPA经Carba NP试验进行碳青霉烯酶表型筛查,有12株菌株呈B类酶阳性,检出率为20.00%(12/60);经PCR扩增后,MBL基因阳性的有11株,其中4株为*IMP-1*,7株为*VIM-2*,而*IMP-2*、*VIM-1*、*NDM-1*均未检出,提示MBL的产生是本地区铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的重要机制之一,且基因型以*IMP-1*和*VIM-2*为主。携带这2种基因的耐药菌株除对亚胺培南西司他丁钠耐药外,对其他常用抗菌药物也表现出高度的耐药性。但12株B类酶阳性菌株中,有1株并未检出具体的耐药基因,考虑其他类型MBL编码基因(*SPM*、*GIM*、*SIM*等)存在的可能。同时本研究还发现,有一部分耐药菌株虽对亚胺培南西司他丁钠耐药,但Carba NP试验及相关耐药基因检测均为阴性(药敏试验结果显示所有IRPA均对亚胺培南西司他丁钠耐药,但并非所有菌株都产碳青霉烯酶),提示本地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌株可能还存在其他的耐药机制(如OprD₂缺失或表达减少、生物膜的形成、药物主动外排泵的过度表达等)^[15],故有待于进一步的研究。

鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药机制包括产碳青霉烯酶、青霉素结合蛋白改变、药物主动外排泵的过度表达、膜孔道蛋白的缺失等,而碳青霉烯酶的产生是其中最主要的耐药机制,鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶主要为B和D类^[17]。本研究经Carba NP试验确证60株IRAB中,有39株呈D类酶阳性,扩增结果显示其均携带

*OXA-23*基因;有1株呈B类酶阳性,携带*VIM-2*基因;而*OXA-24*、*OXA-58*、*IMP-1*、*IMP-2*、*NDM-1*均未检出。提示*OXA-23*基因及其编码的碳青霉烯酶可能是本地区鲍曼不动杆菌对亚胺培南药物耐药的重要机制之一,这与文献[18-19]报道一致。携带*OXA-23*及*VIM-2*基因的鲍曼不动杆菌除对亚胺培南西司他丁钠耐药外,对其他药物也表现出较强的耐药性。

本课题组采用Carba NP试验进行碳青霉烯酶表型筛查,该方法较改良Hodge试验具有如下优势:一方面,试验操作简便、检测快速、费用少,且对人员、技术要求不高,有助于该法在各类实验室的普及;另一方面,该法具有更高的敏感度和特异性,检测结果更为可靠^[20]。Carba NP试验有利于产酶菌株的早发现、早防范,可在医院感染的控制中发挥独特的作用。耐药基因的水平散播是耐药菌株临床分离率骤增的重要原因,临床感染和控制部门应加强监控与防范耐亚胺培南菌株在医院的爆发和流行。

综上所述,该地区3家“三甲”医院ICU耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌的耐药情况严重,对绝大多数临床常用抗菌药物的敏感度均较低。碳青霉烯酶基因的存在及其编码的碳青霉烯酶是革兰氏阴性杆菌对亚胺培南耐药的重要机制之一,其中*KPC-2*和*OXA-23*分别是肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶基因型,而*IMP-1*和*VIM-2*则是铜绿假单胞菌的碳青霉烯酶基因型。本研究发现,尚有部分耐亚胺培南菌株碳青霉烯酶表型筛查及基因检测结果均为阴性,提示可能还存在其他耐药机制,仍有待于后续深入研究。

参考文献

- [1] GUPTA N, LIMBAGO BM, PATEL JB, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(1): 60-67.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement: M100-S25*[S]. 2015-01-30.
- [3] 卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 715-9201.
- [4] 何京, 于宏伟, 冯军花, 等. CarbaNP试验用于检测产碳青霉烯酶菌株的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2016, 36(2): 285-289.
- [5] JEON BC, JEONH SH, BAE IK, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2241-2245.
- [6] 侯盼飞, 应春妹, 汪雅萍, 等. 耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌产 β -内酰胺酶研究[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 10(4): 285-289.
- [7] 何京, 于宏伟, 冯军花, 等. Carba NP试验用于检测产碳青霉烯酶菌株的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2016, 36(2): 155-158.
- [8] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013年中国CHINET细菌耐

儿科临床药师药学服务的成本-效益分析[△]

陈敏^{1,2*}, 张伶俐^{1,2#}, 张川^{1,2}, 黄亮^{1,2}, 胡志强³(1.四川大学华西第二医院药学部/循证药学中心,成都610041; 2.出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室,成都610041; 3.四川省肿瘤医院药学部,成都610041)

中图分类号 R956 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)04-0483-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.04.13

摘要 目的:评价儿科临床药师为住院患儿提供药学服务的经济性。方法:采用成本-效益分析方法。采集某项儿科临床药师干预住院患儿药物治疗的随机对照试验数据,研究对象为某院因呼吸系统、神经系统和消化系统疾病入院的0~18岁患儿;试验组患儿在常规医疗服务基础上接受儿科临床药师提供的药学服务,对照组患儿仅接受常规医疗服务;成本指标为临床药学服务成本,效益指标为降低的住院费用和药品费用,计算两组患儿的效益-成本比,并对结果进行敏感度分析。结果:与对照组比较,试验组患儿的住院费用和药品费用分别降低30.0%和33.7%,临床药学服务成本为184.1元/人,效益-成本比分别为9.45和4.61(均大于1),具有经济性。敏感度分析支持成本-效益分析结果。结论:儿科临床药师为住院患儿提供药学服务具有积极的经济效果。

关键词 临床药师;药学服务;儿童;成本-效益分析;药学服务成本;经济学评价

Cost-benefit Analysis of Pharmaceutical Care Provided by Pediatric Clinical Pharmacists

CHEN Min^{1,2}, ZHANG Lingli^{1,2}, ZHANG Chuan^{1,2}, HUANG Liang^{1,2}, HU Zhiqiang³(1. Dept. of Pharmacy/Evidence-based Pharmacy Center, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Pharmacy, Sichuan Tumor Hospital, Chengdu 610041, China)

药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.

[9] KALLEL H, BAHLOUL M, HERGAFI L, et al. Colistin as a salvage therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria in the ICU[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 28(4): 366-369.

[10] 杨丽君, 陈坚, 杨燕, 等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌基因型检测和同源分析[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(4): 318-323.

[11] MA L, SIU LK, LIN JC, et al. Updated molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* in Taiwan: first identification of KPC-2 or NDM-1-producing *E. coli* in Taiwan[J]. *BMC Infect Dis*, 2013. DOI: 10.1186/1147-2334-13-599.

[12] 刘婧娴, 俞静, 刘瑛. 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药基因及流行病学研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(1): 91-96.

[13] 赵晓杰, 邓丽华, 施德仕, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(17): 3851-3859.

[14] 张丽, 朱元祺, 张小兵, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(23): 5734-5736.

[15] 肖增璜, 石磊, 彭毅, 等. 耐亚胺培南的铜绿假单胞菌整合子基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(3): 160-163, 171.

[16] 胥琳琳, 陈宗宁. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药性分析及金属β-内酰胺酶的检测[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(5): 558-559.

[17] 毛璞, 邱桂霞, 叶丹, 等. 重症监护病房碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌耐药机制及同源性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(6): 449-452.

[18] 杨毓芳, 许小敏, 陈琳, 等. 鲍氏不动杆菌医院感染株耐碳青霉烯类药物的耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(7): 904-907.

[19] 邓德耀, 袁文丽, 吴迪, 等. 重症监护病房耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型的检测[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(7): 62-66.

[20] VASOO S, CUNNINGHAM SA, KOHNER PC, et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(9): 3097-3101.

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373381);四川大学华西第二医院新芽基金项目(No.kx034)

* 主管药师, 硕士。研究方向:循证临床药学。电话:028-85503057。E-mail:cdcm1229@163.com

通信作者:主任药师,教授,博士。研究方向:循证临床药学与药事管理学研究及实践、循证决策与管理。电话:028-85503057。E-mail:zhlingli@sina.com

(收稿日期:2017-02-27 修回日期:2017-12-12)

(编辑:张元媛)