

网络出版时间: 2017-6-16 11:46:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170616.1146.016.html>

产 KPC 肺炎克雷伯菌检测方法构建与耐药机制

马永驰¹, 潘亚萍², 余婷婷³, 王丽红³, 沈继录², 操乐杰¹

摘要 目的 探讨产肺炎克雷伯型碳青霉烯酶(KPC)肺炎克雷伯菌检测方法以及肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制、可能的治疗药物。方法 选取 K-B 法证实的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 36 株纳入本研究, 使用改良 Hodge 试验、Carba NP 试验对菌株进行验证, 随后采用 PCR 扩增、产物琼脂糖凝胶电泳实验, 并对电泳阳性条带进行基因测序鉴定。结果 K-B 法药敏试验显示 36 株耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌, 随后行 Hodge 验证, 33 株(91.7%)是产 KPC 肺炎克雷伯菌, 对碳青霉烯类耐药而对替加环素及米诺环素仍然敏感。对 Hodge 试验阳性 33 株再行 Carba NP 试验确证, 其中 27 株(81.8%)阳性, 6 株(18.2%)阴性; 对 Hodge 试验阳性 33 株行 PCR 扩增及电泳实验, 共有 27 株出现目标条带(340 bp)提示阳性, 与 Carba NP 试验结果相一致。对出现目标条带的 27 株肺炎克雷伯菌再进行 KPC-2 耐药基因 PCR 扩增产物测序, 均为 KPC-2 型耐药基因。结论 K-B 法药敏试验加随后改良 Hodge 试验验证对于筛查、发现 KPC 肺炎克雷伯菌具有较高的符合度, 为发现 KPC 肺炎克雷伯菌有效筛查方法。K-B 法药敏试验证实对 KPC 肺炎克雷伯菌, 替加环素等可能是有效治疗的药物之一。Hodge 试验检测的 KPC 肺炎克雷伯菌, 存在 12.1%(6/33)的假阳性率。Carba NP 试验及 PCR 扩增检测一致性好, 具有确证产 KPC 肺炎克雷伯菌作用。随后的测序研究结果表明检测出的 KPC 肺炎克雷伯菌均为 KPC-2, 该型是引起肺炎克雷伯菌对碳青霉烯酶耐药的主要机制。

关键词 碳青霉烯酶; 肺炎克雷伯菌; Hodge 试验; Carba NP 试验; 耐药基因

中图分类号 R 378.99+6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1173-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.016

肺炎克雷伯菌属于革兰阴性菌, 在自然界中有着广泛分布, 是重要致病菌之一^[1-2]。碳青霉烯类

抗生素属于 β -内酰胺类抗生素, 因其具有较广的抗菌谱和较强的抗菌活性在临床上被广泛使用^[3-4], 产肺炎克雷伯型碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC)首先发现存在于肠杆菌科的多个菌属当中, 耐药肺炎克雷伯菌治疗难度增加的主要原因是因为产 KPC^[5-6], 当采用临床常规的药敏检测方法进行检测时常有漏检发生^[7], 从而导致其在医院内的感染难以控制。因此要治疗该菌感染、抑制其传播的前提是能够做到正确、有效、及时地检测出产 KPC 的肺炎克雷伯菌^[8-9]。为此, 该研究探讨检测产 KPC 肺炎克雷伯菌的方法, 并对其可能的耐药机制进行了分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取 2014 年 1 月~12 月安徽医科大学附属省立医院南区感染办收集对碳青霉烯类耐药的肺炎克雷伯菌 36 株作为研究对象, 存于 -80℃ 冰箱, 同一患者无重复分离株。其中来自痰液 26 株、创面分泌物 3 株、尿液及腹腔引流液各 2 株、血液 3 株。采用大肠埃希菌 ATCC25922 为质控标准菌株, 该菌株为实验室常规保存菌株。

1.2 试剂与仪器 超净工作台(苏净公司安泰集团); 电热恒温培养箱(江苏东台县电器厂); XK96-B 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司); 微量移液器(德国 EPPENDORF 公司); 麦氏比浊仪(法国 BIOMERIEUX 公司); 水平 HE120 型电泳槽与 EPS300 电泳仪(上海天能科技有限公司); JY2002 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司); 冷冻高速离心机(上海力申科学仪器有限公司); 紫外线凝胶成像系统(美国 BIO-RED 公司); TC-512 梯度 PCR 仪(英国 TECHNE 公司); -80℃ 超低温冰箱(日本 SANYO 公司); -20℃ 冰箱(中国海尔公司); 雷磁 PHSJ-4F 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); M-H 琼脂粉、阿米卡星、米诺环素、亚胺培南、美罗培南药物纸片(英国 OXOID 公司); 血平板、M-H 平板(合肥天达诊断试剂公司); PCR 试剂、酚红、硫酸锌七水化合物、氢氧化钠、核酸染料(上海生工生物工程公司); 引物由上海生工生物工

2017-03-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171618)

作者单位: 安徽医科大学附属医院¹ 呼吸内科、³ 感染办, 合肥 230001

² 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 马永驰, 男, 主治医师, 硕士研究生;

操乐杰, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sycaolejie@163.com

程公司合成;细菌蛋白裂解液(上海赛默飞公司);亚胺培南(杭州默沙东制药公司,亚胺培南/西司他汀效价按亚胺培南量计)。

1.3 方法

1.3.1 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药表型的筛选

采用 K-B 法药敏试验:① 制备菌液:挑取肺炎克雷伯菌菌落,用无菌生理盐水调至 0.5 麦氏单位浊度的菌液(相当于 1.5×10^8 CFU/ml);② 接种平板:用无菌棉拭子蘸取制备好的菌液,然后在试管壁挤压,去除多余的菌液,涂布整个 M-H 平板表面,旋转平板 60° ,重复两次,最后用棉拭子涂布平板四周边缘一圈;③ 贴纸片:室温干燥 3~5 min,用纸片分配器或无菌镊子将药敏纸片 MEM、厄他培南、米诺环素、替加环素贴在琼脂平板表面,每张纸片的间距 > 24 mm,纸片中心距平板边缘 > 15 mm;④ 孵育: 35°C , 16~24 h;⑤ 记录药敏结果;⑥ 分析药敏结果。

1.3.2 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌株确证实验 采用改良 Hodge 试验:① 用无菌生理盐水将质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 调成 0.5 麦氏单位菌液,并用生理盐水 1:10 进行稀释;② 用棉签蘸取菌液涂布于 M-H 平板上,干燥 3~5 min,将美罗培南纸片贴于平板中央;③ 将上述经表型筛选菌株用接种环以纸片为中心向平板边缘划一接种线(一平板可划 4 条测菌线),过夜孵育;④ 记录实验结果;⑤ 分析实验结果。

1.3.3 Carba NP 试验检测碳青霉烯酶 准备实验试剂耗材:① 临床实验室实验级纯水;② 亚胺培南粉末;③ 细菌蛋白提取液(in TRIS HCl buffer, pH 7.4);④ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分子量 286);⑤ 酚红粉末;⑥ 1 mol/L NaOH 溶液;⑦ 10% HCl 溶液;⑧ 1.5 ml 微量离心管;⑨ 1 μl 接种环;⑩ 微量离心管。

配制所需试剂:① 10 mmol/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液:称取 1.4 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,然后加入 500 ml 实验级纯水中,混匀后放置于室温 1 年;② 0.5% 的酚红试剂:称取 1.25 g 酚红粉末,加入 250 ml 实验级纯水中,混匀(注意使用前要摇匀),室温存放 1 年;③ 0.1 N NaOH 溶液:加 20 ml 1 N NaOH 溶液到 180 ml 纯水中,室温摇匀,室温存放 1 年;④ 溶液 A 液:在 25~50 ml 的烧杯中,加 2 ml 0.5% 的酚红溶液到 6.6 ml 纯水中,再加入 180 μl 10 mmol/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液,用 0.1 N NaOH 或 10% HCl 溶液将 pH 调至 (7.8 ± 0.1) ,然后置于小瓶中,避光存放于 $4 \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏 2 周,注意溶液为红色或橘红色,其他

颜色时不可用;⑤ 溶液 B 液:用 A 液配制成亚胺培南终浓度为 6 mg/ml 的溶液 $4 \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏 3 d。

实验步骤和结果分析标准参照 2015 年美国临床和实验室标准协会文件更新要点^[10]。

1.3.4 DNA 制备与 PCR 检测 KPC 酶基因 取平板单个菌落研磨于装有灭菌去离子水的 EP 管中,用比浊仪调至 0.5 麦氏, 100°C 煮沸 10 min,用低温超速离心机 12 000 r/min,离心 10 min,将上清液移至新的无菌 EP 管中, -20°C 保存备用。

1.3.5 对产碳青霉烯酶 DNA 模板进行 PCR 扩增

步骤:① 在无菌洁净的 PCR 管中依次加入以下溶液: Sterilized ddH₂O 22 μl 、2 \times PCR Master 25 μl 、DNA 模板 1 μl 、上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μl 、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μl ,所加溶液终体积为 50 μl ;② 充分混匀后短暂离心(闪离 Flash);③ 将反应管置于 PCR 仪中反应,PCR 反应条件依据表 1 所示。

引物稀释: KPC-qcA、KPC-qcB、KPC-gpA、KPC-gpB 每光密度引物闪离后分别加 56、67、49、52 μl 的缓冲液配成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的贮存液。

100 $\mu\text{mol/L}$ 的贮存液稀释成 10 $\mu\text{mol/L}$ 的使用液: 10 μl 100 $\mu\text{mol/L}$ 的贮存液 + 90 μl ddH₂O = 100 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 的使用液。

表 1 PCR 反应条件

反应程序	反应温度($^\circ\text{C}$)	反应时间(s)	循环周期(个)
预变性	95	600	1
变性	95	30	30
退火	55	30	30
延伸	72	30	30
最终延伸	72	300	1
保存	4	-	-

1.3.6 琼脂糖凝胶电泳实验 实验步骤:① 1% 琼脂糖凝胶配制:称取 0.7 g 琼脂糖倒入三角烧瓶中,加入 $1 \times$ TAE 缓冲液 70 ml,置微波炉完全融化,取出摇匀,冷却至 60°C ,加 EB 母液(10 mg/ml 至终浓度 0.5 $\mu\text{g/ml}$,即 100 ml 琼脂糖溶液中加入 10 mg/ml 的 EB 母液 5 μl);② 灌胶:插入梳子,缓慢加入冷却至 60°C 的已加 EB 的琼脂糖溶液,如有气泡用牙签挑破,特别是梳子下;将凝胶放入电泳槽中,凝胶点样端需靠近负极,加入 $1 \times$ TAE 缓冲液至电泳槽,缓冲液刚没过凝胶表明即可;③ 加样:将 PCR 产物加入凝胶的点孔(记录点样顺序),在点样的第一孔加入 5 μl DNA Marker;④ 电泳:接通电源,加样点在负极,电压不超过 5 V/cm,电压约 110 V,电流 40 mA 以上,50 mA 左右,当溴酚蓝染料移动到据凝胶

前沿 1~2 cm 处,停止电泳;⑤ 观察结果并拍照。

1.3.7 KPC 耐药基因 PCR 扩增产物测序 煮沸法提取细菌 DNA,PCR 方法扩增 KPC 及其他常见的碳青霉烯耐药基因 如 NDM-1、SME、OXA-48、GES、VIM、IMP 等,PCR 扩增引物条件参考文献^[9]。PCR 反应体系共 50 μ l, 25 μ l PCR mix 试剂, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ l,DNA 模板 1 μ l,双蒸水 22 μ l。反应参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C、30 s,55 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、50 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,经凝胶成像系统显像观察结果。KPC 耐药基因 PCR 扩增产物送上海生工生物工程有限公司进行测序,以基因测序结果在 GenBank 查询比对结果作为金标准。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件处理本研究所有数据,组间灵敏度、特异度的差异采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 药敏试验结果 所收集的耐药肺炎克雷伯菌 36 株,其中 33 株是碳青霉烯酶耐药菌株,详见表 2。

2.2 改良 Hodge 试验、Carba NP 试验检测肺炎克雷伯菌结果 36 株行 Hodge 确证试验有 33 株为阳性结果(图 1),Hodge 试验阳性 33 株再行 Carba NP 试验(依次标号 1、2、3...33),其中 6 株阴性(第 5、6、21、22、28、29 株),27 株阳性,Carba NP 试验结果解析依照图 2 所示。

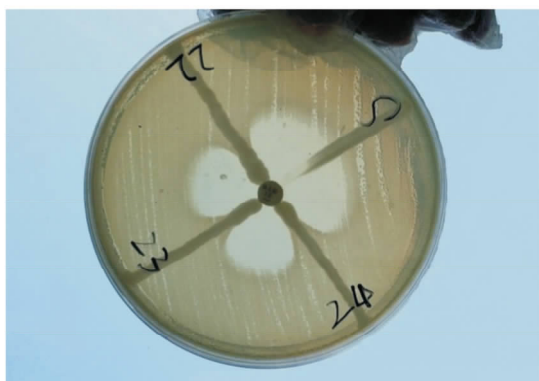


图 1 改良 Hodge 试验结果

2.3 电泳图片及 KPC-2 耐药基因 PCR 扩增产物测序图 对 Hodge 试验阳性 33 株肺炎克雷伯菌行 PCR 扩增及电泳图(图 3),其中 27 株出现目标条带(340 bp),对出现目标条带的 27 株肺炎克雷伯菌再进行 KPC-2 耐药基因 PCR 扩增产物测序,均为 KPC-2 型耐药基因(图 4)。



图 2 Carba NP 试验结果解析

表 2 药敏结果抑菌圈直径(mm)

菌株 编号	抗菌药物			
	美罗培南	厄他培南	米诺环素	替加环素
1	17	17	18	18
2	6	6	16	16
3	6	6	20	19
4	27	28	21	19
5	12	7	20	21
6	22	15	22	20
7	6	6	20	22
8	6	6	17	18
9	6	6	19	19
10	6	6	18	19
11	6	6	15	19
12	6	6	20	18
13	14	10	17	20
14	10	13	19	18
15	7	7	18	18
16	10	7	22	20
17	6	6	15	19
18	6	6	22	18
19	6	6	19	19
20	6	6	17	19
21	14	14	19	17
22	13	12	19	22
23	15	15	21	19
24	6	6	14	14
25	8	7	21	19
26	6	6	21	19
27	10	7	19	19
28	16	12	22	23
29	6	6	19	17
30	6	6	19	19
31	25	28	17	17
32	6	6	20	16
33	6	6	16	19
34	6	6	19	16
35	6	6	21	19
36	28	26	17	16
平均直径	10.2	9.6	18.8	18.9

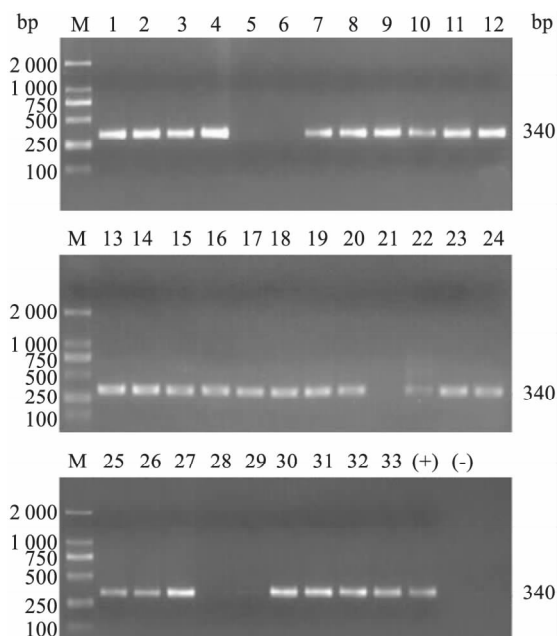


图3 基因PCR电泳图

M: DL 2 000 DNA Marker; (+): 阳性对照; (-): 阴性对照; 1 ~ 33 泳道编号: 细菌菌株号; 其中第 5、6、21、22、28、29 泳道检测结果为阴性

2.4 改良 Hodge 试验、改良 Hodge 试验 + Carba NP 试验检测结果比较 改良 Hodge 试验及随后的 Carba NP 试验、测序确证使用对产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌检测特异性较使用改良 Hodge 试验特异性明显提高,后者存在 12.1% (6/33) 的假阳性率,两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.17, P < 0.05$),见表 3。

3 讨论

近年来抗菌药物的大量使用,是临床中对各类抗菌药物耐药的细菌迅速增多的主要原因之一^[9]。

表 3 改良 Hodge 试验、Carba NP 及测序验证检测结果比较 (n = 36)

项目		Carba NP 及测序验证		合计
		+	-	
改良 Hodge	+	27	6	33
试验	-	0	3	3
合计		27	9	36

在临床治疗肠杆菌科细菌引起严重感染中碳青霉烯类抗菌药物是首选,但近年来研究^[10]表明肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物具有明显的耐药性,这给临床治疗带来了相当大的难度。

赵建萍等^[11]比较 K-B 法耐亚胺培南抑菌圈直径与随后 KPC 肺炎克雷伯菌 PCR 检测结果相比,发现与 ESBLs 阴性肺炎克雷伯菌抑菌圈平均直径 28.8,产 KPC 肺炎克雷伯菌直径明显缩小,平均直径 19.5,提示产 KPC 肺炎克雷伯菌抑菌圈直径更小。本研究 K-B 法药敏试验亚胺培南抑菌圈直径 10.2,比替加环素抑菌环直径 18.9 显著缩小,与其结果相似。同时,采用 K-B 法药敏试验显示 36 株肺炎克雷伯菌对美罗培南、厄他培南耐药,而对米诺环素以及替加环素仍然敏感,说明治疗产碳青霉烯酶菌株仍然可选用替加环素等来治疗^[12]。

有报道^[13]对采用仪器法和纸片扩散法检测产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌对美罗培南和亚胺培南的耐药率差异较大,虽然纸片扩散法是目前对产 KPC 型碳青霉烯酶菌株进行筛查的最优方法,但两种方法依然存在一定的局限性,时常有漏检发生^[14-15],这就需要验证手段。本研究针对 K-B 法药敏试验阳性结果,随后行 Hodge 试验证实 33 株是阳性结果,两者的一致率达 91.7%,说明 K-B 法药敏试验作为初筛手段存在 8.3% 假阳性率,但是有方便、价廉优点。章如玲等^[16]对 26 例产碳青霉烯

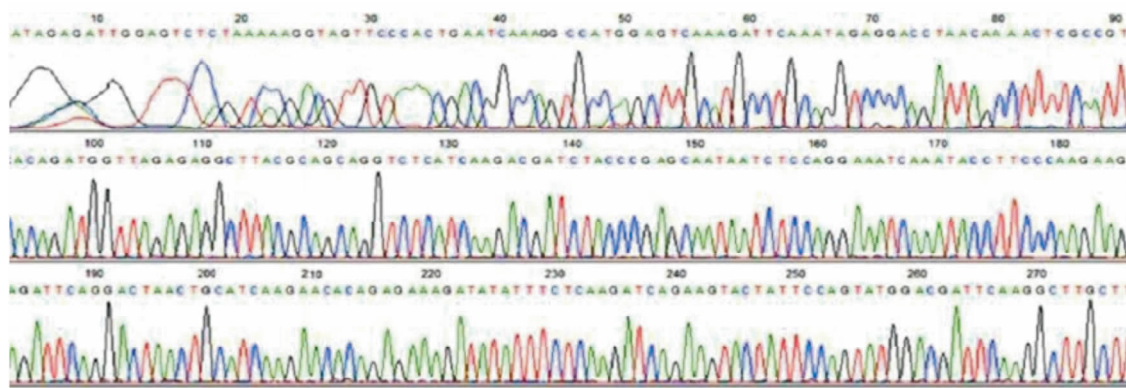


图4 KPC-2 耐药基因 PCR 扩增产物测序图

酶肺炎克雷伯菌分别进行 ESBLs、Hodge 试验及 PCR 检测等来确证 KPC 肺炎克雷伯菌,发现仅 50% 产 KPC 耐药菌呈 Hodge 试验阳性,提示根据 Hodge 试验做出 KPC 肺炎克雷伯菌判断会存在漏诊可能。本研究对 Hodge 试验阳性 33 株再行 Carba NP 试验及 PCR 确证,其中 6 株阴性,27 株阳性占 87.9%,与储雯雯等^[17]报道的 93.2% 阳性率相似。说明对于 Hodge 试验阳性只能是高度怀疑是产 KPC 肺炎克雷伯菌,有 12.1% (6/33) 的假阳性率,但其价廉、便捷,仍然是发现产 KPC 肺炎克雷伯菌的常用方法,尤其是在条件稍差的基层医院。

对 Hodge 试验阳性 33 株行 PCR 扩增及电泳图片,共有 27 株出现目标条带 (340 bp),对出现目标条带的 27 株肺炎克雷伯菌再行 KPC 耐药基因 PCR 扩增产物测序,证实均为 KPC-2 型耐药基因,与 Carba NP 实验结果相一致。提示 Carba NP 对于确证产 KPC 肺炎克雷伯菌非常可靠,但不能判断何种基因型导致区域 KPC 感染及是否存在区域内一种 KPC 感染播散。

目前国内已有相关产 KPC-2 型的肺炎克雷伯菌以及产 KPC-2 型肠杆菌科细菌的相关报道^[18]。梁慧等^[19]对产 KPC 型碳青霉烯酶肠杆菌科细菌感染的临床和微生物学特点的研究发现抗生素滥用是其产生的根源,临床上应严格控制碳青霉烯类抗生素的使用,通过加强医院感染控制措施来防止和减少此类耐药菌在医院内的传播。肺炎克雷伯菌以及产 KPC-2 型黏质沙雷菌多在同一病房进行感染传播也使肺炎克雷伯菌对各种碳青霉烯类抗菌药物耐药性的检测显得尤为重要^[20-21]。本研究 33 例耐碳氢烯类菌株均来源于 1 个科室,27 例证实为产 KPC 肺炎克雷伯菌,随后 PCR 检测及序列分析显示均产生 KPC-2 基因,是否存在科内 KPC-2 小范围传播需要进一步调查。

综上所述,采用改良 Hodge 试验 + Carba NP 试验检测产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌灵敏度,是临床显示 KPC 肺炎克雷伯菌的有效途径。KPC-2 是本院存在碳青霉烯酶耐药的主要机制,临床上不仅要治疗该菌感染,也要加强防控抑制其传播。当然,前提是建立筛查、确证方法,能够做到正确、有效、及时地对产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌进行发现。

参考文献

[1] 邹颖,徐晓刚,郭庆兰,等.革兰阴性杆菌血流感染的病原菌

分布、耐药性及碳青霉烯酶基因的检测与分析[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(2):214-20.

- [2] Wang L, Li Y, Duan J. Biodegradation of 2-methylquinoline by *Klebsiella pneumoniae* TJ-A isolated from acclimated activated sludge [J]. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2014,49(1):27-38.
- [3] Lübbert C, Becker-Rux D, Rodloff A C, et al. Colonization of liver transplant recipients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with high infection rates and excess mortality: a case-control analysis [J]. Infection, 2014, 42(2):309-16.
- [4] 徐小芳,王蓉,叶顾萍,等.肺炎克雷伯菌耐药率与抗菌药物使用强度的相关性研究[J].中国药物应用与监测,2016,13(1):44-8.
- [5] Tripathy S, Sen R, Padhi S K, et al. Upregulation of transcripts for metabolism in diverse environments is a shared response associated with survival and adaptation of *Klebsiella pneumoniae* in response to temperature extremes [J]. Funct Integr Genomics, 2014, 14(3):591-601.
- [6] 张丽,张小兵,杨维青,等.广东省东莞地区发现 1 株耐产 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(6):465-8.
- [7] 王菊梅,张洪球,陆军,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因检测及同源性分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(23):5281-4.
- [8] Orsi G B, Bencardino A, Vena A, et al. Patient risk factors for outer membrane permeability and KPC-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolation: results of a double case-control study [J]. Infection, 2013,41(1):61-7.
- [9] 简雪峰,程国平,王媛媛,等.产 KPC-2 酶肺炎克雷伯菌毒力、血清型及基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(23):5285-7.
- [10] 杨晨,胡仁静,胡锡池,等. MLST 在碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学分析中的应用[J].中华医院感染学杂志,2016,26(23):5514-6.
- [11] 赵建萍,黄金伟,陈丽珠,等.亚胺培南对肺炎克雷伯菌抑菌圈直径与 KPC 型碳青霉烯酶检测[J].中国卫生检验杂志,2010,20(3):567-9.
- [12] 王辉,俞云松,王明贵,等.替加环素体外药敏试验操作规程专家共识[J].中华检验医学杂志,2013,36(7):584-7.
- [13] 赵书平,姜梅杰,宗桂珍.检测产 KPC 型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌常用药物敏感试验方法的比较[J].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2012,6(2):93-6.
- [14] Rettedal S, Høyland Löhr I, Natås O, et al. Risk factors for acquisition of CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during an outbreak in a neonatal intensive care unit in Norway [J]. Scand J Infect Dis, 2013,45(1):54-8.
- [15] 张顺,黄左安,胡珊珊,等.耐药基因与管家基因的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌亲缘关系研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(3):485-7.
- [16] 章如玲,卢玲玲,涂斐佩,等.肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因分布与耐药相关性研究[J].中国卫生检验杂志,2016,26(3):

- 442-6.
- [17] 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.
- [18] 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):245-7.
- [19] 梁慧,彭国均,张薇,等.产KPC型碳青霉烯酶肠杆菌科细菌感染的临床和微生物学特点[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(2):143-6.
- [20] 陈璐,李凌竹,冷应蓉,等.重症监护病房医院感染耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌耐药基因的研究与分析[J].中国药物应用与监测,2016,13(1):52-5.
- [21] 扈会整,任超杰,吴斌艳,等.碳青霉烯酶在黏质沙雷菌中的耐药基因研究[J].中国卫生检验杂志,2015,25(24):4338-9,4346.

The establishment of detection methods and analysis of drug resistance mechanism of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*

Ma Yongchi¹, Pan Yaping², She Tingting³, et al

(¹Dept of Respiratory Medicine, ³Dept of Hospital Infections Control,

The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Clinical Laboratories, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To establish the detection methods of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and the resistance mechanism of *Klebsiella pneumoniae* to carbapenem antibiotics, and possible therapeutic drugs. **Methods** Obtained 36 strains of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* identified by K-B method for the study. Carbapenemase production was confirmed by modified Hodge test and Carba NP test. The resistant genes were detected by PCR. The drug resistance genes of molecular epidemiology characteristics were analyzed by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction. **Results** A total of 36 strains of *Klebsiella pneumoniae* showed a high level resistance to carbapenems, but susceptibility to the tigecycline. The 33 strains of 36 strains (91.7%) with resistance to carbapenems were positive in modified Hodge test, and which 27 strains (87.9%) were validated positive by Carba NP experiment, 6 strains were negative. The 33 strains positive with modified Hodge test were detected by PCR amplification and electrophoresis images, a total of 27 strains of target strip (340 bp), the target band of the 27 strains of *Klebsiella pneumoniae* and the KPC-2 gene PCR gene sequencing, whole were KPC-2 type resistance gene, which was consistent with the experimental results of Carba NP. PCR detection and sequence analysis showed that all the positive strains with KPC-2 gene. **Conclusion** K-B method of drug sensitivity test plus subsequent improved Hodge test to verify the screening, find KPC *Klebsiella pneumoniae* has a high degree of compliance, which is effective screening method to find KPC *Klebsiella pneumoniae*. The tigecycline may be a valuable drug for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by the evidence of K-B method. There is a false positive rate of 12.1% (6/33) in the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in the Hodge test. The Carba NP test and PCR amplification show highly conformity in a definite diagnosis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. The KPC-2 type of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is the main reason to cause the bacterial resistance to carbapenems.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; Hodge test; Carba NP test; carbapenemase; KPC-2