

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.20.014

159 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床特征和耐药性分析

张 慧¹, 王 健^{2△}, 吴晓燕¹, 张金业¹, 刘继斌³, 林 兰¹

(1. 江苏省南通市肿瘤医院检验科 226000; 2. 江苏省南通市第三人民医院检验科 226000;

3. 江苏省南通市肿瘤医院研究所 226000)

摘要:目的 分析耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的临床分布特征及耐药性,为指导临床合理用药提供依据。**方法** 收集 2014 年 7 月至 2017 年 6 月南通市肿瘤医院和南通市第三人民医院临床标本中分离的 CRE,采用 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统对上述菌株进行鉴定,K-B 纸片扩散法对亚胺培南进行复核,改良 Hodge 试验确认 CRE 的产酶情况,并对结果进行分析。**结果** 共收集 CRE 159 株,主要是肺炎克雷伯菌肺炎亚种(132 株)和大肠埃希菌(22 株);47.80% 来源于呼吸道痰液标本,23.90% 来源于尿液标本;66.67% 的标本分布在重症监护室,其次是肿瘤科,占 16.35%。药敏结果显示 CRE 除了对阿米卡星耐药率较低(23.90%),对其他抗菌药物均表现出较高的耐药率,均>70.00%。**结论** CRE 高耐药性比较明显,并且其临床分布及标本来源较为广泛,应加强抗菌药物的管理和合理使用,加强医院感染的预防和控制,避免医院内感染的暴发流行。

关键词:耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 药敏试验; 耐药性**中图分类号:**R378.8**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)20-3050-04

Analysis on clinical characteristics and drug resistance in 159 strains of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteria

ZHANG Hui¹, WANG Jian^{2△}, WU Xiaoyan¹, ZHANG Jinye¹, LIU Jibin³, LIN Lan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Nantong Municipal Tumor Hospital,

Nantong, Jiangsu 226000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nantong Municipal

Third People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226000, China; 3. Scientific Research Institute, Nantong Municipal Tumor Hospital, Nantong, Jiangsu 226000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the clinical distribution characteristics and drug resistance in 159 strains of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) bacteria in order to provide a basis for clinical rational drug use. **Methods** The CRE strains isolated from the clinical samples in the Nantong Municipal Tumor Hospital and Nantong Municipal Tumor Hospital from July 2014 to June 2017 were collected and identified by using the VITEK-2 compact full-automatic microorganism analysis system. The Kirby-Bauer method was used to conduct the re-examination on imipenem. The CRE producing enzyme situation was verified by using the modified Hodge test (MHT). The the results were analyzed. **Results** A total of 159 strains of CRE were collected, which were mainly Klebsiella pneumoniae (132 strains) and Escherichia coli (22 strains); 47.80% were derived from the respiratory tract sputum samples, 23.90% were derived from the urinary samples; 66.67% of samples were distributed in the ICU, followed by the oncology department, accounting for 16.35%. The drug susceptibility test results showed that CRE had lower resistance rate to amikacin (23.90%), and had higher resistance to other antibacterial drugs (>70.00%). **Conclusion** The higher drug resistance of CRE is obvious, its clinical distribution and sample sources are abroad. Therefore the management and rational use of antibacterial drugs should be strengthened, the prevention and control of nosocomial infection should be strengthened to avoid the outbreak of nosocomial infections.

Key words: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteria; drug susceptibility test; drug resistance

肠杆菌科细菌是临床上易分离到的重要病原菌之一,它可以引起呼吸道感染、败血症、泌尿道感染、脑膜炎、医源性感染等^[1-2]。碳青霉烯类药物曾被临床用来治疗产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和 β -内酰

胺酶(AmpC)肠杆菌科细菌,是最受临床医师青睐的药物。但随着医学科学的发展,各种先进的医疗技术和设备的使用,抗菌药物的广泛应用,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)尤其是大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药率呈逐渐上升趋势,这给临床的治疗带来了挑战^[3]。本研究通过对南通市肿瘤医院和南通市第三人民医院近 3 年 CRE 的耐药情况进行分析,以为临床合理选用抗菌药物提供参考,为做好医院感染的监测提供依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集南通市肿瘤医院与南通市第三人民医院 2014 年 7 月至 2017 年 6 月从临床各类感染性标本如痰、静脉全血、胆汁、尿液等分离检出的 CRE 共 159 株,所有耐药菌株均由 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统进行细菌鉴定和药敏试验,同时亚胺培南采用 K-B 法复核,药敏纸片购自英国 OXOID 公司。

1.2 方法 采用改良 Hodge 试验对 CRE 产酶进行确证:大肠埃希菌(ATCC25922)调制成 0.5 麦氏浓度菌液,菌液稀释 10 倍后,均匀涂布 M-H 平板,厄他培南(10 μg)贴于中间,用无菌接种环挑取试验菌株 CRE 自纸片外缘向平板边缘划线 20 mm,平板置于 35℃孵箱培养 24 h,抑菌圈内出现矢状生长为阳性,肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 为阳性质控菌,肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 为阴性质控菌。

1.3 统计学处理 采用 WHONET5.6 软件对本研究数据进行统计分析,药敏结果参照 2016 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)标准。

2 结 果

2.1 CRE 细菌菌株分布情况 共收集 CRE 159 株,主要是肺炎克雷伯菌肺炎亚种(132 株)和大肠埃希菌(22 株)。见表 1。

表 1 CRE 分布情况及构成比		
菌株	株数(n)	构成比(%)
肺炎克雷伯菌肺炎亚种	132	83.02
大肠埃希菌	22	13.83
普城沙雷菌	1	0.63
产气肠杆菌	1	0.63
产酸克雷伯菌	1	0.63
斯氏普雷威登斯菌	1	0.63
奇异变形杆菌	1	0.63
共计	159	100.00

2.2 CRE 菌株标本来源分布情况 47.80%的 CRE 菌株来源于呼吸道痰液标本,23.90%来源于尿液标本。见表 2。

表 2 CRE 标本来源分布情况及构成比		
标本类型	株数(n)	构成比(%)
痰液	76	47.80
中段尿液	38	23.90
胆汁	15	9.43
胸腹腔积液	11	6.92
静脉全血	7	4.40
其他	12	7.55
注:其他标本包含脑脊液、分泌物、脓液、引流液等		

2.3 CRE 细菌来源的科室分布情况 66.67%的标本分布在重症监护室(ICU),其次是肿瘤科,占 16.35%。见表 3。

表 3 CRE 科室分布情况及构成比		
科室	株数(n)	构成比(%)
ICU	106	66.67
肿瘤科	26	16.35
综合内科	8	5.03
普外科	10	6.29
老年康复科	6	3.77
传染病科	1	0.63
骨科	2	1.26

2.4 CRE 菌株耐药性分析 CRE 对临床上的常见抗菌药物高度耐药,对阿米卡星的耐药率小于 30.00%,其余抗菌药物的耐药率均>70.00%。见表 4。

表 4 159 株 CRE 耐药性分析[n(%)]			
抗菌药名	所有菌株 (n=159)	肺炎克雷伯菌 (n=132)	大肠埃希菌 (n=22)
氨苄西林	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
氨苄西林/舒巴坦	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
哌拉西林/他唑巴坦	152(95.60)	129(97.72)	18(100.00)
头孢唑林	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
头孢曲松	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
头孢替坦	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
头孢他啶	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
头孢吡肟	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
氨基曲南	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
亚胺培南	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
阿米卡星	38(23.90)	32(24.24)	1(4.55)
庆大霉素	113(71.07)	94(71.21)	16(72.73)
妥布霉素	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
环丙沙星	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
左氧氟沙星	159(100.00)	132(100.00)	22(100.00)
复方磺胺甲噁唑	146(91.82)	119(90.15)	22(100.00)

3 讨 论

近十年来在临床上由于 CRE 引起的耐药特征为多重耐药或是泛耐药, 所以其引起的感染往往是致命性的, 这引起了临床的高度重视^[4]。在报道的这些耐药菌株中以肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌为主, 本研究共检出 159 例 CRE, 其中位于前两位的是肺炎克雷伯菌肺炎亚种(132 例, 占 83.02%)、大肠埃希菌(22 例, 占 13.83%), 这与国内相关报道一致^[5-6]。呼吸道的痰液标本 76 株(47.80%)是 CRE 主要来源, 其次是尿道, 中段尿检出 38 株(23.90%), 其他如胸腹腔积液、脓液、胆汁等无菌部位也有检出 CRE。科室分布特点: 106 株来自 ICU(66.67%), 26 株来自肿瘤科(16.35%), 8 株来自综合内科(5.03%), 10 株来自普外科(6.29%), 6 株来自老年康复科(3.77%)等。本研究中, 肺炎克雷伯菌的株数远大于大肠埃希菌的分离株数, 其原因如下: 一是临床标本中呼吸道来源的送检量大, 而呼吸道的病原菌主要是肺炎克雷伯菌。二是这些 CRE 菌株主要来自 ICU, 据患者病历显示, 这些患者多有严重的基础疾病, 有多发部位感染倾向, 使用抗菌药物周期长; CRE 菌株其次来自肿瘤科, 肺癌是全球发病率最高的肿瘤, 肺癌合并肺部病原菌感染患者居多, 肿瘤患者又多处于晚期, 免疫功能极度低下, 住院病程长、频率高、放化疗次数多, 且多数患者还要接受各种操作治疗, 如气管插管、气管切开、留置导尿等, 都为 CRE 的定植和感染提供了易感因素。这与其他相关研究中的报道相符^[7-8]。

药敏结果显示, 本研究中 159 株 CRE 对临床上的常见抗菌药物高度耐药, 对阿米卡星的耐药率小于 30.00%, 其余抗菌药物的耐药率均大于 70.00%, 其中对庆大霉素、复方磺胺甲噁唑等的耐药率相比其他抗菌药物稍低, 这与诸多相关报道中统计结果相似^[9-10]。本研究中大肠埃希菌对各种抗菌药物的耐药率与肺炎克雷伯菌基本一致, 二者对头孢类药物 100.00% 耐药, 这可能与临床长期、广泛使用碳青霉烯类药物相关。CRE 的耐药机制主要包括产碳青霉烯酶, 外膜蛋白的缺失或改变, ESBLs 或 AmpC 酶的表达和主动外排泵。其中产碳青霉烯酶是细菌耐药的主要机制^[11]。有研究表明, 我国 CRE 主要是产 KPC 酶和 IMP 酶, 同一医院菌株间具有较高的同源性^[12]。本研究中 CRE 对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林、氨曲南等 100.00% 耐药, 表明菌株的耐药原因主要为产碳青霉烯酶。这与汤英贤等^[13]的研究结果大致相同。其次肺炎克雷伯菌的耐药可能还与整合酶基因 I 类整合子, 以及孔膜蛋白表达下降和缺失有关^[14]。与此相关机制有待后续研究。阿米卡星属氨基糖苷类衍生物, 高效、广谱抗菌, 有研究调查

发现阿米卡星对氨基糖苷类灭活酶有较高的稳定性, 抗菌活性强, 5 年平均耐药率小于 10.00%, 但阿米卡星和其他氨基糖苷类药物相似, 存在耳毒性及肾毒性, 临床上不作为常规用药^[15]。对于 CRE 引起的严重感染, 建议采用联合用药治疗, 研究表明阿米卡星联合多黏菌素、替加环素对 CRE 的治疗有一定效果^[16-17]。

综上所述, 本研究中临床分离的 CRE 主要以肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌为主, 主要集中在 ICU、肿瘤科等科室。提示临床需进一步加强对抗菌药物的科学、合理应用, 遵循抗菌药物用药指征, 同时医院应加强院内感染的监管, 提高医护人员院内感染意识, 注意手部卫生, 做好标准预防。但由于技术开展有限, 未能对试验菌株进行脉冲凝胶电泳分析检测产酶菌的同源性, 这将是本研究微生物检验工作和细菌基因检测技术努力的方向。

参考文献

- [1] NORDMANN P, NAAS T, POIREL L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.
- [2] NORDMANN P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge[J]. Med Mal Infect, 2014, 44(2): 51-56.
- [3] ADLER M, ANJUM M, ANDERSSON D I, et al. Influence of acquired β -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in Escherichia coli[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(1): 51-59.
- [4] DAIKOS G L, MARKOGIANNAKIS A, SOULI M, et al. Blood stream infections caused by carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: a clinical perspective[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012, 12(10): 1393-1404.
- [5] 陆文香, 许倩, 钟桥, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌临床感染现状分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(13): 1861-1863.
- [6] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2012 年中国 CHINET 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的分布特点和耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 382-386.
- [7] 梁训宏, 吴劲松, 程锦娥, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床分布特点及耐药性分析[J]. 中国实用医药, 2017, 12(15): 4-7.
- [8] 由晓颜, 孔繁荣, 苏维奇. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床分布特点及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(4): 601-603.
- [9] 赵鹤进, 宋晓光. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的临床分布及耐药性研究[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(1): 105-107.
- [10] 黄莹, 赵智丽, 刘江红, 等. 25 株肠杆菌科菌株对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性分析[J]. 抗感染药学, 2017, 14(2): 289-290.

种基因型的慢性乙型肝炎患者临床表现差异明显。慢性乙型肝炎患者中 B 型比例明显高于其他两种型别^[11]。目前大多数的临床医师已经将 HBV 基因型的检测纳入乙型肝炎患者肝细胞性肝癌发生和治疗预后的观测指标,以帮助其在工作中选择最佳的治疗方案,指导预防肝癌。HBV 基因型的检测显得尤为重要。

HBV 基因型检测的方法采用基因型特异性引物 PCR 法。根据不同 HBV 基因型存在的差异序列设计一系列特异性引物。PCR 扩增后可得到不同长度的片段,以此进行分型。在此过程中,HBV DNA 的提取是关键步骤。如何成功提取 HBV DNA 成为检测基因分型中起决定性作用的一步。磁珠是一种壳/核结构的微球,核由铁、钴、镍的氧化物组成,壳由高分子材料组成,并根据需要在磁性纳米壳外包被不同的高分子材料。用于血中 HBV DNA 检测的磁珠在化学合成中利用专利技术进行了特殊的表面修饰,使其具有对 DNA 的高特异性吸附能力。此外磁珠吸附免去了传统浓缩提取中核酸沉淀步骤,减少了 DNA 的丢失。

本文就磁珠法提取的 HBV DNA 结合 PCR 荧光探针法检测 HBV 基因分型与传统煮沸法提取的 HBV DNA 进行比较,包括基因型检出率、各型的比例,以及与 HBV DNA 水平的关系等。从以上数据可以看出,磁珠法提取的 HBV DNA 表现出良好的检测性能,更符合临床的要求。

参考文献

[1] OTT J J, STEVENS G A, GROEGER J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection; New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity [J]. Vaccine, 2012, 30(12): 2212-2219.

[11] LITTLE M L, QIN X, ZERR D M, et al. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(1): 52-57.

[12] 张丽娟. 碳青霉烯类肠杆菌细菌的耐药基因研究 [J]. 中国社区医师, 2017, 33(3): 5-7.

[13] 汤英贤, 温伟洪, 李玉珍, 等. 某医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染情况分析 [J]. 现代医院, 2017, 17(12): 1838-1843.

[14] 罗洪英, 余水泉. 耐碳青霉烯类抗菌药物的耐药性及其相关影响因素 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15(4): 492-495.

[2] LIANG X F, BI S L, YANG W Z, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China; declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination [J]. Vaccine, 2009, 27(47): 6550-6557.

[3] LIANG X, BI S, YANG W, et al. Evaluation of the impact of hepatitis B vaccination among children born during 1992-2005 in China [J]. J Infect Dis, 2009, 200(1): 39-47.

[4] 叶扬, 李俊洁, 吕惠伶, 等. 血清 HBsAg 定量和 HBV-DNA 检测慢性乙肝患者核苷酸类药物耐药变异的比较研究 [J/CD]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 13(96): 7-8.

[5] 周晨浩, 任宁. 乙型肝炎病毒基因分型与肝细胞癌发生发展的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(11): 1688-1694.

[6] 李可可, 刘莹, 姚品芳, 等. 中国人群乙型肝炎病毒基因分型不同方法和标准的比较 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(16): 2306-2316.

[7] SOZZI V, WALSH R, LITTLEJOHN M, et al. In vitro studies show that sequence variability contributes to marked variation in hepatitis B virus replication, protein expression, and function observed across genotypes [J]. J Virol, 2016, 90(22): 10054-10064.

[8] MAHMOOD M, ANWAR M A, KHANUM A, et al. Distribution and clinical significance of hepatitis B virus genotypes in Pakistan [J]. BMC Gastroenterol, 2016, 16(16): 104-110.

[9] 高海彦, 张会玲, 王文斌, 等. 慢性乙型肝炎感染者基因型分布与 HBV DNA 关系的初步探讨 [J]. 卫生职业教育, 2015, 33(7): 142-143.

[10] 赵洪灿, 裘春宁, 项国谦, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者病毒基因型分布及其与肝纤维化和肝细胞癌的关系 [J]. 中华临床感染病杂志, 2013, 6(3): 157-161.

[11] 贾冬青. 基因型检测对乙型肝炎感染程度的诊断效果 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12(23): 3536-3537.

(收稿日期: 2018-02-06 修回日期: 2018-04-09)

(上接第 3052 页)

[15] 詹玲玲, 陈约慧, 周蓓蓓, 等. 2010—2014 年临床分离的肠杆菌科细菌对阿米卡星耐药性的变迁 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 24(26): 3622-3624.

[16] VAN DUIN D, KAYE K S, NEUNER E A, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(2): 115-120.

[17] 徐英春, 肖永红, 卓超, 等. 中国碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的流行病学和防控策略 [J]. 中国执业药师, 2013, 10(4): 3-8.

(收稿日期: 2018-01-30 修回日期: 2018-04-03)