

我院耐碳青霉烯类抗菌药物革兰氏阴性杆菌的分离及其产金属β-内酰胺酶情况分析

郑光敏*, 庞菲, 李玮, 霍建敏, 杨建军(甘肃省第二人民医院老年科, 兰州 730000)

中图分类号 R378.99 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)11-1482-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.11.12

摘要 目的:为我院临床合理应用抗菌药物提供参考。方法:对我院2013年5月—2015年12月住院患者感染革兰氏阴性杆菌的耐药及产金属β-内酰胺酶(MBLs)情况进行回顾性分析。结果:我院2013—2015年共检出革兰氏阴性杆菌2 089株,其中肠杆菌科细菌1 456株(69.70%)、非发酵菌633株(30.30%),以大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和阴沟肠杆菌为主。共检出耐碳青霉烯类菌株406株(19.44%),包括非发酵菌367株、肠杆菌科细菌39株。耐碳青霉烯类菌株对16种抗菌药物的耐药率均大于50%,而非耐碳青霉烯类菌株的耐药率相对较低;除氨曲南外,耐碳青霉烯类菌株对其余15种抗菌药物的耐药率均显著高于非耐碳青霉烯类菌株,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。共检出产MBLs耐药菌株36株(8.87%),包括产MBLs耐药铜绿假单胞菌13株、产MBLs耐药鲍曼不动杆菌23株;未检出产MBLs耐药肠杆菌科细菌。结论:我院革兰氏阴性杆菌以肠杆菌科细菌为主;耐碳青霉烯类菌株以非发酵菌为主,耐药率普遍高于非耐碳青霉烯类菌株;产MBLs情况较为严重,且产酶菌株均为非发酵菌。临床应加强病原菌耐药性及产酶菌株的监测,避免不合理应用抗菌药物而造成耐药菌株的产生与传播。

关键词 革兰氏阴性杆菌;碳青霉烯类;耐药性;金属β-内酰胺酶

Isolation of Carbapenems-resistant Gram-negative Bacillus and Analysis of Producing Metallo-β-lactamase
ZHENG Guangmin, PANG Fei, LI Wei, HUO Jianmin, YANG Jianjun (Dept. of Geriatrics, Gansu Provincial Second People's Hospital, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for rational use of antibiotics in the clinic of our hospital. METHODS: Drug resistance of Gram-negative bacillus in the inpatients of our hospital were analyzed retrospectively during May 2013-Dec. 2015 as

- 中的临床效果分析[J]. 现代养生, 2016(12):34.
- [2] Braga M, Ljungqvist O, Soeters P, et al. ESPEN guidelines on parenteral nutrition: surgery[J]. *Clin Nutr*, 2009, 28(4):378-386.
- [3] Rousseau AF, Lossner MR, Ichai C, et al. ESPEN endorsed recommendations: nutritional therapy in major burns[J]. *Clin Nutr*, 2013, 32(4):497-502.
- [4] 中华医学会. 维生素矿物质补充剂在炎症性肠病防治中的临床应用:专家共识[J]. 中华临床营养杂志, 2013, 21(4):252-256.
- [5] 贾鑫磊, 钱素云, 曾健生, 等. 危重症患儿血清维生素A水平变化及意义[J]. 山东医药, 2016, 56(20):36-38.
- [6] Gaby AR. Nutritional treatments for acute myocardial infarction[J]. *Altern Med Rev*, 2010, 15(2):113-123.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:77-78、114-115、154-157.
- [8] 钟华荪, 张振路. 静脉输液治疗护理学[M]. 3版. 北京:人民军医出版社, 2014:4、71-72、379.
- [9] 梁光荣, 唐巧金, 刘莉萍, 等. 注射用水溶性维生素在输液中与常用药物配伍的稳定性考察[J]. 中国药房, 2010, 21(26):2456-2458.
- [10] 姜文清, 金鹏飞, 朱峰, 等. HPLC同时测定多维元素片中维生素B₁、维生素C、维生素B₆和烟酰胺的含量[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(14):1122-1125.
- [11] 徐丽华, 卞晓洁. 安达美在不同溶液中的稳定性研究[J]. 护理学杂志, 2010, 25(13):90-92.
- [12] Hewitt D, Alvarez M, Robinson K, et al. Mixed-mode and reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodologies to study composition and base hydrolysis of polysorbate 20 and 80[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(15):2138-2145.
- [13] 盛巧云. 静脉炎的相关因素和临床干预[J]. 大家健康(学术版), 2016, 10(3):290-291.
- [14] 王冰, 张梅英. 防范静脉输液中不溶性微粒危害的研究进展[J]. 上海护理, 2009, 9(1):63-66.
- [15] 侯鹏高, 吕长准. 静脉输液不溶性微粒污染途径及控制方法研究进展[J]. 医学信息, 2011, 24(9):1236-1237.
- [16] 徐学君, 徐德琴, 汪滢, 等. 加药环境与加药器具对输液不溶性微粒污染的影响[J]. 中国药事, 2007, 21(11):888-890.
- [17] 刘兴, 李世东. 静脉输液调配中心环境与自然环境输液调配后不溶性微粒数量对比研究[J]. 药学研究, 2014, 33(3):176-178.
- [18] 陈秋云, 何锦文, 黄赛玲. 不同静脉药物配置环境药液质量的对比研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(1):30-32.

(收稿日期:2016-04-06 修回日期:2017-02-11)

(编辑:张元媛)

* 主任医师。研究方向:临床老年学、医院感染学。电话:0931-4924027。E-mail:lwbcz2015@sina.com

well as the situation of producing metallo- β -lactamase (MBLs). RESTUTS: A total of 2 089 strains of Gram-negative bacillus were detected in our hospital during 2013-2015, among which there were 1 456 strains of enterobacteria (69.70%) and 633 strains of non-fermentative bacteria, mainly involving *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacter cloacae*. A total of 406 strains of carbapenems-resistant bacteria were detected (19.44%), including 367 strains of non-fermentative bacteria and 39 strains of enterobacteria. The resistant rates of carbapenems-resistant strains to 16 antibiotics were all higher than 50%, but those of non-carbapenems-resistant strains were in relative low level. Except for aztreonam, resistant rates of carbapenems-resistant strains to other 15 antibiotics were all higher than those of non-carbapenems-resistant strains, with statistical significance ($P < 0.05$). A total of 36 strains of producing MBLs were detected (8.87%), including 13 strains of producing MBLs drug-resistant *P. aeruginosa* and 23 strains of producing MBLs drug-resistant *A. baumannii*; producing MBLs drug resistant enterobacteria had not been found. CONCLUSIONS: Gram-negative bacillus are mainly enterobacteria in our hospital; carbapenems-resistant strains are mainly non-fermentative bacteria, resistant rate of them are commonly higher than that of non-drug-resistant strain. The situation of producing MBLs is serious, and enzyme producing strains are mainly non-fermentative bacteria. It is necessary to strengthen drug resistance of pathogen and enzyme producing strain monitoring, avoid the generation and spreading of drug-resistant strains due to irrational use of antibiotics.

KEYWORDS Gram-negative bacillus; Carbapenems; Drug resistance; Metallo- β -lactamase

引起人类感染的革兰氏阴性杆菌主要包括肠杆菌科细菌和非发酵细菌(如铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等),是医院感染的常见病原菌^[1]。由于抗菌药物的不合理应用与滥用,产酶菌株日益增多,且耐药情况极为严峻,特别是产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、头孢菌素酶(AmpC)和金属 β -内酰胺酶(MBLs)等菌株所致的感染逐年增加,给临床治疗带来了极大困难^[2]。碳青霉烯类抗菌药物是治疗多重耐药革兰氏阴性杆菌的有效药物,对肠杆菌科细菌具有较强的体外抑制作用。近年来,随着碳青霉烯类药物在临床的广泛应用,致使革兰氏阴性杆菌对碳青霉烯类药物的耐药率也在不断升高^[3]。笔者对我院2013—2015年住院患者感染革兰氏阴性杆菌的耐药及产MBLs的情况进行回顾性分析,为我院临床合理应用抗菌药物提供参考。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

菌株来源于我院2013年5月—2015年12月住院患者送检的临床标本,包括痰液、咽拭子、胆汁、尿液、脓液、灌洗液和血液等。排除同一标本检出的重复菌株。

1.2 仪器与试剂

ATB 1525型全自动微生物鉴定仪及药敏分析系统(法国生物梅里埃公司);血平板(批号:130722)、麦康凯平板(批号:131028)由郑州安图生物工程股份有限公司提供;M-H平板(批号:201503118)、O-F糖管系列(批号:130522、130412、130812、130822、130508、131102等)、炭末明胶微量管(批号:131012),以及哌拉西林、头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢哌酮钠舒巴坦钠、环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、亚胺培南、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑、氨基曲南、哌拉西林钠他唑巴坦钠、氨苄西林钠舒巴坦钠、头孢西丁、头孢噻肟等药敏纸片和0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)均由杭州天和微生物试剂

有限公司提供。质控菌株铜绿假单胞菌 ATCC 27853、大肠埃希菌 ATCC 25922、粪肠球菌 ATCC 33186、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、产MBLs铜绿假单胞菌阳性对照菌株均由甘肃省卫生计生委临床检验中心提供。

1.3 方法

1.3.1 菌株的分离与鉴定 参照《临床微生物学和微生物检验》(第4版)^[4],取标本接种于血平板、麦康凯平板、O-F糖管或炭末明胶微量管中,于35℃下孵育24 h后,分离出疑似菌株,采用革兰染色、生化反应及ATB 1525型全自动微生物鉴定仪进行菌种鉴定。

1.3.2 药敏试验 采用纸片扩散(K-B)法进行药敏试验。结果参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)(2012年版)^[5]的规则和标准进行判读。

1.3.3 耐碳青霉烯类菌株的筛选试验 采用K-B法。配制0.5麦氏浊度单位的疑似菌株菌液,均匀涂布于M-H平板上,将亚胺培南药敏纸片贴于平板上,于37℃下孵育24 h,观察抑菌环直径。若亚胺培南抑菌环直径 < 16 mm,则怀疑该菌株耐碳青霉烯类药物,详见图1。

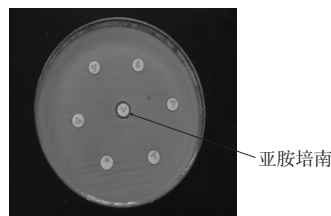


图1 筛选试验

Fig 1 Screening test

1.3.4 MBLs表型的确定(EDTA增强试验)^[6] 采用K-B法。配制0.5麦氏浊度单位的疑似菌株菌液,将其均匀涂布于M-H平板上,将亚胺培南药敏纸片贴于平板上,在距其10~15 mm周围贴1张空白纸片,取0.5 mol/L EDTA 0.4 μ L滴加于空白纸片上,于37℃下孵育24 h。若亚胺培南药敏纸片靠近含EDTA空白纸片的一侧出

现抑菌环扩大或“匙孔”现象(见图2),则判定该菌产MBLs。

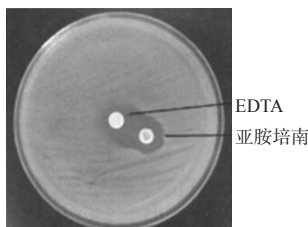


图2 EDTA增强试验(阳性)

Fig 2 EDTA enhancement test(positive)

1.4 数据处理

采用WHONET 5.6软件对药敏试验结果进行分析,采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 革兰氏阴性杆菌的分离情况

2013—2015年,我院共检出革兰氏阴性杆菌2 089株,其中肠杆菌科菌株1 456株(69.70%),非发酵菌633株(30.30%);分离率排名前5位的细菌依次为大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和阴沟肠杆菌,详见表1。

表1 革兰氏阴性杆菌的种类及构成比[株(%)]

Tab 1 Types and constituent ratio of Gram-negative bacillus[strain(%)]

菌种	非耐碳青霉烯类	耐碳青霉烯类	合计
肠杆菌科细菌	1 417(97.32)	39(2.68)	1 456(69.70)
大肠埃希菌	578(98.46)	9(1.54)	587(28.10)
肺炎克雷伯菌	259(90.56)	27(9.44)	286(13.69)
阴沟肠杆菌	185(98.93)	2(1.07)	187(8.95)
枸橼酸杆菌属*	141(100)	0(0)	141(6.75)
产气肠杆菌	138(99.28)	1(0.72)	139(6.65)
奇异变形杆菌	69(100)	0(0)	69(3.30)
沙雷杆菌	47(100)	0(0)	47(2.25)
非发酵菌	266(42.02)	367(57.98)	633(30.30)
铜绿假单胞菌	138(44.66)	171(55.34)	309(14.79)
鲍曼不动杆菌	128(56.63)	98(43.36)	226(10.82)
嗜麦芽窄食单胞菌	0(0)	98(100)	98(4.69)

注: * 枸橼酸杆菌属包括弗劳地枸橼酸杆菌、杨格氏枸橼酸杆菌和异型枸橼酸杆菌,由于检出量较少,故用“枸橼酸杆菌属”代表

Note: Folic acid bacillus genus includes *Citrobacter freundii*, *Yang's citrate coli* and *Citrobacter diversus*; because of less detected amount, folic acid bacillus genus is used as representative

由表1可见,2 089株革兰氏阴性杆菌中,非耐碳青霉烯类菌株1 683株,占80.56%;耐碳青霉烯类菌株406株(含对碳青霉烯类天然耐药的嗜麦芽窄食单胞菌98株),占19.44%。406株耐药菌株以非发酵菌为主,共367株;其次为肠杆菌科细菌,共39株。

2.2 耐碳青霉烯类与非耐碳青霉烯类菌株的耐药情况

药敏试验结果显示,除氨曲南外,耐碳青霉烯类菌株对其余15种抗菌药物的耐药率均明显高于非耐碳青霉烯类菌株,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中,耐碳青霉烯类菌株对16种抗菌药物的耐药率均大于50%,且对妥布霉素、氨苄西林钠舒巴坦钠和头孢曲松的耐药率大于90%;非耐碳青霉烯类菌株的耐药率相对较低,对大部分常用抗菌药物的耐药率均小于60%,详见表2。

表2 2 089株革兰氏阴性杆菌对16种抗菌药物的耐药率
Tab 2 Resistant rate of 2 089 strains of Gram-negative bacillus to 16 kinds of antibiotics

抗菌药物	非耐碳青霉烯类菌株(n=1 683)		耐碳青霉烯类菌株(n=406)	
	耐药株数	耐药率, %	耐药株数	耐药率, %
妥布霉素	923	54.84	384	94.58*
哌拉西林	917	54.49	341	83.99*
氨苄西林钠舒巴坦钠	841	49.97	398	98.03*
头孢吡肟	504	29.95	255	62.81*
头孢他啶	771	45.81	306	75.37*
氨曲南	1 009	59.95	224	55.17*
阿米卡星	451	26.80	216	53.20*
复方磺胺甲噁唑	1 029	61.14	345	84.97*
头孢曲松	1 230	73.08	389	95.81*
左氧氟沙星	741	44.03	269	66.26*
环丙沙星	777	46.17	300	73.89*
头孢唑肟	989	58.76	345	84.98*
头孢哌酮舒巴坦钠	673	39.99	251	61.82*
哌拉西林钠他唑巴坦钠	756	44.92	308	75.86*
头孢西丁	1 060	62.98	365	89.90*
头孢噻肟	1 041	61.85	345	84.98*

注: 与非耐碳青霉烯类菌株比较, * $P < 0.05$

Note: vs. non-carbapenems-resistant strains, * $P < 0.05$

2.3 耐碳青霉烯类菌株产MBLs的检出结果

406株耐碳青霉烯类革兰氏阴性杆菌中,共检出产MBLs耐药菌株36株,检出率为8.87%。其中产MBLs耐药铜绿假单胞菌13株,产MBLs耐药鲍曼不动杆菌23株,均为非发酵菌;未检出产MBLs耐药肠杆菌科菌株。

3 讨论

近年来,临床抗感染治疗面临的挑战不断增加,细菌耐药问题日益严重。革兰氏阴性杆菌是医院感染的主要病原菌,其耐药性呈上升趋势,已受到越来越广泛的重视^[7]。碳青霉烯类药物是一类高效广谱的 β -内酰胺类抗菌药物,对大多数 β -内酰胺酶稳定,与第三代头孢菌素类抗菌药物无交叉耐药,可有效抑制大多数革兰氏阴性杆菌的生长^[8]。亚胺培南和美罗培南是治疗革兰氏阴性杆菌感染的主要碳青霉烯类药物,可有效治疗产EBSLs和持续高产AmpC的革兰氏阴性杆菌感染,已成为重症监护室防治该类细菌感染的主要药物^[9]。但随着亚胺培南和美罗培南在临床上的广泛应用,革兰氏阴性杆菌对此类药物的耐药率也呈逐年上升趋势^[10]。

本研究共检出革兰氏阴性杆菌2 089株,含肠杆菌科细菌1 456株(69.70%)、非发酵菌633株(30.30%);以

大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和阴沟肠杆菌为主。其中耐碳青霉烯类菌株406株(19.44%),以非发酵菌为主,主要包括耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(55.35%)和耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(43.36%)。药敏试验结果显示,除氨基糖苷类外,耐碳青霉烯类菌株对常用抗菌药物的耐药率均明显高于非耐碳青霉烯类菌株,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。检出产MBLs耐药菌株36株(8.87%),分别为产MBLs耐药铜绿假单胞菌13株、产MBLs耐药鲍曼不动杆菌23株;未检出产MBLs耐药肠杆菌科菌株。非发酵菌是医院感染的常见致病菌,老年人、儿童及免疫功能低下者为其易感染人群^[1]。该类细菌耐药机制复杂,具有产酶、改变药物靶位、生成外排泵、减少膜通透性等多种耐药机制^[12-13]。虽然碳青霉烯类药物对质粒介导的产ESBLs菌株、染色体及质粒介导的产AmpC菌株均具有高度稳定性,但可被MBLs水解灭活,造成病原菌对其耐药^[13]。产碳青霉烯酶是革兰氏阴性杆菌产生耐药的重要机制,在各种碳青霉烯酶中水解活性最强的是MBLs。MBLs是少数依赖金属离子(Zn^{2+})以发挥催化活性的酶类,不能被常用的酶抑制剂如克拉维酸、他唑巴坦抑制,且可水解除了单环类抗菌药物以外的所有 β -内酰胺类药物,使致病菌对青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物耐药;同时,耐药基因可在革兰氏阴性杆菌中广泛传播,给临床抗感染治疗造成极大困难^[14]。

综上所述,我院革兰氏阴性杆菌以肠杆菌科细菌为主,主要包括大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌和阴沟肠杆菌等;耐碳青霉烯类菌株以非发酵菌为主,且耐药率普遍高于非耐药菌株;产MBLs情况较为严重,且产酶菌株均为非发酵菌。临床应加强病原菌耐药性及产酶菌株的监测,避免不合理使用抗菌药物而造成耐药菌株的产生与传播。但本研究由于试验条件所限,并未对耐药菌株进行耐药基因检测,有待后续研究予以完善。

参考文献

[1] 曾章锐,邵海枫. 革兰氏阴性杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(5): 536-541.

[2] 张黎明,朱珊珊,郭玲娇,等. 台州地区临床分离的革兰阴性杆菌对亚胺培南耐药率的变迁[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(12): 1573-1575.

[3] 韦柳华,黄志卓,李梦薇,等. 耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(8): 1920-1922.

[4] 张卓然. 临床微生物学和微生物检验[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 134-178.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational*[S]. 2012-01-30.

[6] 李艳华,刘文恩,简子娟,等. 铜绿假单胞菌耐药性分析及金属酶基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(1): 43-46.

[7] 张姝,莫非,黄志卓,等. 2009年贵州省6家教学医院革兰氏阴性杆菌耐药性分析[J]. 中国药房, 2011, 22(30): 2816-2818.

[8] 刘丽娟. 革兰氏阴性菌对碳青霉烯类及氨基糖苷类抗生素耐药性变迁[D]. 芜湖: 皖南医学院, 2015.

[9] 王靖,李杰,李春英,等. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌 β -内酰胺酶检测和基因分型[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(3): 201-203.

[10] 周文聪,饶冠利,吴晓燕. 耐碳青霉烯类的革兰氏阴性杆菌耐药性及产金属酶分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(12): 3401-3403.

[11] 李岷宁,黄校樑,仇杭佳. 非发酵菌感染临床特点及耐药情况[J]. 现代预防医学, 2016, 143(1): 144-147.

[12] 何卡乐,黄月莹,张涛,等. 我院2008-2012年临床分离细菌分别和耐药性监测[J]. 中国药房, 2014, 25(25): 2429-2431.

[13] 陈子晞,陈方慧. 主动外排系统介导细菌对替加环素产生耐药的机制研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(21): 2010-2013.

[14] 付玉梅,杨晓仪,梁慧芬,等. 社区感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属酶的筛选及基因分析[J]. 广东医学, 2013, 34(12): 1880-1882.

(收稿日期:2016-04-14 修回日期:2016-11-15)

(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心期刊, 欢迎投稿、订阅