

DOI:10.13350/j.cjpb.200923

• 临床研究 •

住院患者血流感染革兰阴性菌分布特征和耐药性及耐药菌株碳青霉烯酶基因检测*

更藏达杰¹, 张斌^{2**}

(1. 青海省人民医院医学检验科, 青海西宁 810007; 2. 青海省中医院检验科, 青海西宁 810000)

【摘要】 目的 检测和分析住院患者血流感染的革兰阴性菌分布特征、耐药性及耐药菌株碳青霉烯酶基因携带情况。

方法 选择2017年1月—2019年12月住院的血流感染患者186例,检测感染革兰阴性菌分布特征,通过药敏试验检测主要革兰阴性菌的耐药情况,PCR检测耐碳青霉烯类菌株碳青霉烯酶基因携带情况。 **结果** 186例血流感染患者血液标本中分离出革兰阴性菌106株,其中肺炎克雷伯菌占28.30%(30/106)、大肠埃希菌占26.42%(28/106)、不动杆菌占14.15%(15/106)、铜绿假单胞菌占9.43%(10/106)、肠杆菌占7.55%(8/106)、其他细菌占14.15%(15/106);药敏试验检测肺炎克雷伯菌对阿米卡星、头孢哌酮—舒巴坦钠、哌拉西林—他唑巴坦、甲氧苄啶—磺胺甲恶唑以及厄他培南、亚胺培南、美罗培南耐药率低于50.0%,大肠埃希菌对阿米卡星、头孢哌酮—舒巴坦钠、哌拉西林—他唑巴坦以及厄他培南耐药率低于50.0%,不动杆菌对多种抗菌药物的耐药率高于50.0%,铜绿假单胞菌、肠杆菌对多种抗菌药物的耐药率低于50.0%;25株耐碳青霉烯类菌株中有19株检出碳青霉烯酶基因,KPC、OXA23、OXA51和NDM基因检出率分别为44.0%(11/25)、32.0%(8/25)、28.0%(7/25)和4.0%(1/25)。 **结论** 革兰阴性菌为住院患者血流感染的主要致病菌,耐药菌有集中于肺炎克雷伯菌和不动杆菌的趋势,携带KPC和OXA23基因可能是耐药菌耐碳青霉烯类的主要机制。

【关键词】 血流感染; 革兰阴性菌; 药敏试验; 碳青霉烯酶基因; 耐药基因

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2020)09-1107-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2020 Sep; 15(9): 1107-1110.]

Distribution characteristics, drug resistance, and prevalence of carbapenemase genes in Gram-negative bacteria in patients with a bloodstream infection

GengZangDaJie¹, ZHANG Bin² (1. Department of Medical Laboratory, Qinghai People's Hospital, Qinghai, Xining 810007, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Qinghai Provincial Hospital of Chinese Medicine, Qinghai, Xining 810000, China)***

【Abstract】 **Objective** To detect and analyze the distribution characteristics, drug resistance, and prevalence of carbapenemase genes in Gram-negative bacteria in inpatients with a bloodstream infection. **Methods** Subjects were 186 inpatients with a bloodstream infection from January 2017 to December 2019. In accordance with conventional methods, 186 blood samples from patients with a bloodstream infection were isolated and cultured. The species and distribution of Gram-negative bacteria were determined by an automated microbial identification system and its matching identification card. The distribution characteristics of Gram-negative bacteria were determined. The drug resistance of predominant Gram-negative bacteria was determined using a drug sensitivity test, and carbapenem-resistant strains were tested for carbapenemase genes using PCR. **Results** One hundred and six strains of Gram-negative bacteria were isolated from blood samples from 86 patients with a bloodstream infection. Of those, *Klebsiella pneumoniae* accounted for 28.30% (30/106), *Escherichia coli* accounted for 26.42% (28/106), *Acinetobacter* accounted for 14.15% (15/106), *Pseudomonas aeruginosa* accounted for 9.43% (10/106), *Enterobacteriaceae* accounted for 7.55% (8/106), and other bacteria accounted for 14.15% (15/106). The results of drug sensitivity testing were as follows. The resistance of *K. pneumoniae* to amikacin, cefoperazone sulbactam sodium, piperacillin tazobactam, trimethoprim sulfamethoxazole, ertapenem, imipenem, and meropenem was lower than 50.0%. The resistance of *E. coli* to amikacin, cefoperazone/sulbactam sodium, piperacillin tazobactam, and ertapenem was lower than 50.0%. The resistance of *Acinetobacter* to multiple antibiotics was higher than 50.0%. The resistance of *P. aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* was lower than 50.0%. Carbapene-

* **【基金项目】** 青海省基础研究计划项目(No. 2019-ZJ-7087)。

** **【通讯作者】** 张斌, E-mail: 344251196@qq.com

【作者简介】 更藏达杰(1980-), 男, 青海海东人, 本科, 主治医师, 主要从事免疫方面的研究。E-mail: gzdj2002@163.com

mase genes were detected in 19 of 25 carbapenem-resistant strains. The KPC gene was detected in 44.0% (11/25), the OXA23 gene was detected in 32.0% (8/25), the OXA51 was detected in 28.0% (7/25), and the NDM gene was detected in 4.0% (1/25). **Conclusion** Gram-negative bacteria were the main pathogens causing a bloodstream infection in inpatients. Drug-resistant bacteria tended to be *K. pneumoniae* and *Acinetobacter*. The KPC and OXA23 genes may be the main mechanism of carbapenem resistance.

【Key words】 bloodstream infection; Gram negative bacteria; drug sensitivity test; carbapenemase gene; drug resistance gene

血流感染是医院感染中比较严重的感染性疾病, 主要由病原菌及其毒素侵入血流而引起, 包括败血症、菌血症等, 其发病率随着近年来创伤性诊疗技术、侵入性操作的增加而升高, 死亡率亦高居不下^[1-2]。而随着外科手术时间延长, 免疫抑制剂、广谱抗菌药物、激素类药物在临床基础疾病方面的广泛应用, 耐药菌株增多, 使血流感染治疗难度增大, 患者死亡风险增加。碳青霉烯类抗菌药物包括厄他培南、亚胺培南、美罗培南等, 曾为临床治疗鲍曼不动杆菌感染的首选药物, 但近年来碳青霉烯类耐药率同样逐年升高, 对血流感染的治疗带来困难^[3]。因此, 定期检测细菌耐药情况, 有助于准确掌握本地区血流感染病原菌分布和耐药情况, 并为治疗药物的选择提供依据, 对医院感染的防控同样具有积极意义。本研究通过检测分析住院患者血流感染的革兰阴性菌种类及其分布特征, 耐药性及耐药菌株碳青霉烯酶基因携带情况, 为该病的预防和治疗提供参考。

对象与方法

1 病例

选取 2017 年 1 月—2019 年 12 月本院发生血流感染的住院患者 186 例, 所有患者均符合中华医学会检验医学分会《临床微生物学血培养操作规范》^[4] 和《血流感染实验诊断与临床诊治》^[5] 中的相关诊断标准, 血液标本均经血培养分离出革兰阴性菌, 且患者至少伴有下述症状及体征的一项: ①体温 $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或者 $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$, 且伴有寒颤; ②存在入侵门户或者迁徙病灶; ③存在全身感染中毒症状却无明显感染病灶; ④收缩压 $< 90\text{ mmHg}$, 或收缩压较健康状态下降幅度 $\geq 40\text{ mmHg}$ 。本研究获医院伦理委员会审查批准, 患者及其家属均自愿签署知情同意书。

2 主要仪器和试剂

MH 琼脂为英国 OXOID 公司生产; 革兰阴性菌鉴定卡和药敏纸片为法国梅里埃公司生产; PCR 试剂盒购于宝生物工程(大连)公司; 其他生物试剂均购自厦门泰京生物技术有限公司。

全自动微生物鉴定仪购于法国梅里埃公司(型号: VTIEK-32); 多点接种仪购于英国 DENLEY 公司(型号: A400); PCR 扩增仪和凝胶成像系统购于美国

Bio-Rad 公司。

3 方法

3.1 细菌的分离鉴定及药敏试验 按常规方法对送检的 186 例血液感染患者的血液标本进行细菌的分离、培养, 并通过全自动微生物鉴定仪及其配套的鉴定卡进行鉴定, 统计革兰阴性菌种类及分布情况。质控菌株为本院留存的大肠埃希菌(ATCC 25922)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。采用纸片法测定主要革兰阴性菌对常用抗菌药物的耐药性, 参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2012 年标准判读结果, 其中对亚胺培南、美罗培南、厄他培南中任何一种碳青霉烯类抗菌药物表现为中介或者耐药的判为耐碳青霉烯类菌株。

3.2 碳青霉烯酶基因检测 每株耐碳青霉烯类菌挑取 1~2 个菌落, 放置于培养管中, 加入 500 μl pH 8.0 左右的 TE 溶液, 混匀; 将上述溶液加热至 100 $^{\circ}\text{C}$, 并保持 10 min, 然后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷却, 再以 5 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 1 min, 收集上清液作为细菌 DNA 的模板。

碳青霉烯酶基因检测均采用 PCR 法。反应总体积为 50 μl , 其中 10 \times buffer 缓冲液 5 μl , dNTP 4 μl , Taq 酶 0.25 μl , 上、下引物各 1 μl (20 $\mu\text{mol/L}$), 模板 DNA 4 μl , 用双蒸馏水(ddH₂O)补足至 50 μl 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。取 5 μl PCR 扩增产物与 6 \times 上样缓冲液 1 μl 混匀, 经 1.2% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 35 min, 溴乙锭染色 20 min, 流水漂洗后在凝胶成像分析系统上观察结果, 出现目的条带判为阳性。阳性 PCR 产物送至生工生物(上海)测序, 测序结果和 GenBank 中的核苷酸序列进行同源性比对。

引物应用 DNASTAR 7.1 软件自行设计, 由生工生物(上海)有限公司合成。KPC: 5'-CGTCTAGT-TCTGCTGTCTTG-3'; 5'-CTTGTCATCCTTGT-TAGGCG-3'。产物 151 bp。NDM: 5'-GGTTTG-GCGATCTGGTTTTC-3'; 5'-CGGAATGGCT-CATCACGATC-3'。产物 261 bp。OXA23: 5'-GATCGGATTGCAGAACCAGA-3'; 5'-

ATTTCTGACCGCATTTCCAT-3'。产物 501 bp。
OXA51:5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3';5'-TGGATTGCACTTCATCTTCG-3'。产物 353 bp。

3.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。计量资料数据用($\bar{x} \pm s$)表示,进行 *t* 检验;计数资料用百分比(%)表示,进行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 血流感染的革兰阴性菌分布特征

186 例血流感染患者的临床标本共分离出革兰阴性菌 106 株,其中肺炎克雷伯菌占 28.30%(30/106),大肠埃希菌占 26.42%(28/106),不动杆菌、铜绿假单胞菌以及肠杆菌分别占 14.15%(15/106)、9.43%(10/106)和 7.55%(8/106);伯克霍尔德菌属、沙雷氏菌、变形杆菌、嗜水气单胞菌等共 15 株,占 14.15%(15/106)(表 1)。

表 1 血流感染的革兰阴性菌种类及构成

Table 1 Distribution Characteristics of gram negative bacteria in patients with bloodstream infection

革兰氏阴性菌 Gram negative bacteria(n=106)	株数 No. of plants(n)	百分比 Percentage(%)
肺炎克雷伯菌	30	28.30
大肠埃希菌	28	26.42
不动杆菌	15	14.15
铜绿假单胞菌	10	9.43
肠杆菌	8	7.55
其他	15	14.15
合计 Total	106	100.00

表 2 血流感染主要革兰阴性菌的耐药性

Table 2 Drug resistance of main gram negative bacteria in patients with bloodstream infection

抗菌药物 Antibacterial drugs	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i> (n=30)		大肠埃希菌 <i>E. coli</i> (n=28)		不动杆菌 <i>Acinetobacter</i> (n=15)		铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i> (n=10)		肠杆菌 <i>Enterobacteriaceae</i> (n=8)	
	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)
	No. of strain	Drug resistance rate	No. of strain	Drug resistance rate	No. of strain	Drug resistance rate	No. of strain	Drug resistance rate	No. of strain	Drug resistance rate
阿米卡星	10	33.33	5	17.86	8	53.33	1	10.00	0	0.00
庆大霉素	15	50.00	15	53.57	10	66.67	1	10.00	0	0.00
哌拉西林	22	73.33	25	89.29	12	80.00	1	10.00	2	25.00
头孢噻肟	16	53.33	22	78.57	12	80.00	/	/	2	25.00
头孢他啶	15	50.00	16	57.14	9	60.00	1	10.00	2	25.00
头孢吡肟	15	50.00	17	60.71	10	66.67	1	10.00	1	12.50
头孢哌酮-舒巴坦钠	12	40.00	12	42.86	8	53.33	2	20.00	2	25.00
哌拉西林-他唑巴坦	13	43.33	7	25.00	11	73.33	1	10.00	3	37.50
环丙沙星	16	53.33	20	71.43	9	60.00	2	20.00	1	12.50
甲氧苄啶-磺胺甲恶唑	11	36.67	15	53.57	10	66.67	/	/	1	12.50
厄他培南	12	40.00	1	3.57	/	/	/	/	2	25.00
亚胺培南	12	40.00	0	0.00	9	60.00	1	10.00	1	12.50
美罗培南	12	40.00	0	0.00	9	60.00	1	10.00	0	0.00

注: "/"表示未测定。

讨 论

目前国内已上市的碳青霉烯类抗菌药物主要包括亚胺培南,美罗培南,厄他培南等,为临床上抗菌谱广、

2 主要革兰阴性菌的耐药性

药敏试验测定肺炎克雷伯菌对阿米卡星、头孢哌酮-舒巴坦钠、哌拉西林-他唑巴坦、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑以及厄他培南、亚胺培南、美罗培南的耐药率均低于 50.0%,碳青霉烯类抗菌药物(厄他培南、亚胺培南、美罗培南)耐药率为 40.0%;大肠埃希菌对阿米卡星、头孢哌酮-舒巴坦钠、哌拉西林-他唑巴坦以及厄他培南的耐药率均低于 50.0%,碳青霉烯类抗菌药物耐药率为 0~3.57%;不动杆菌对多种抗菌药物的耐药率均高于 50.0%,碳青霉烯类抗菌药物耐药率为 60.0%;铜绿假单胞菌对多种抗菌药物的耐药率均低于 50.0%,碳青霉烯类抗菌药物耐药率在 10.0%左右;肠杆菌对多种抗菌药物的耐药率均低于 50.0%,碳青霉烯类抗菌药物耐药率为 0~25.00%(表 2)。

3 耐碳青霉烯类菌碳青霉烯酶基因携带情况

碳青霉烯类抗菌药物耐药菌共 25 株,其中 12 株为肺炎克雷伯菌,9 株为不动杆菌,2 株肠杆菌,大肠埃希菌、铜绿假单胞菌各 1 株。PCR 检测碳青霉烯酶基因,有 19 株阳性,其中 KPC 基因检出率为 48.0%(12/25),OXA23 基因检出率为 32.0%(8/25),OXA51 基因检出率为 28.0%(7/25),NDM 基因检出率为 4.0%(1/25)。12 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌全部携带 KPC 碳青霉烯酶基因,9 株不动杆菌主要携带 OXA23、OXA51 以及 NDM 碳青霉烯酶基因(表 3)。

抗菌活性强的的非典型 β -内酰胺抗生素,曾经是治疗鲍曼不动杆菌感染的首选药物,也是治疗其他细菌严重感染的主要抗菌药物之一^[6-7]。但随着近年来抗

菌药物的广泛使用,耐药菌株的增加,碳青霉烯类耐药率逐年升高,临床血流感染的治疗难度显著增加。国

内研究发现,临床分离的大肠埃希菌携带超广谱β-内酰胺酶比例较高,抗感染治疗的难度较大^[8]。

表3 耐碳青霉烯类菌株碳青霉烯酶基因携带情况
Table 3 Gene carrying of carbapenemase in carbapenem resistant strains

组别 Group	KPC 阳性菌株数 No. of KPC positive bacteria	OXA23 阳性菌株数 No. of OXA23 positive bacteria	OXA51 阳性菌株数 No. of OXA51 positive bacteria	NDM 阳性菌株数 No. of NDM positive bacteria
肺炎克雷伯菌(n=12)	12	0	0	0
不动杆菌(n=9)	0	8	7	1
合计 Total	12	8	7	1

本研究结果显示,186例血流感染患者经血培养分离出革兰阴性菌106株,其中肺炎克雷伯菌占28.30%,大肠埃希菌占26.42%,不动杆菌、铜绿假单胞菌以及肠杆菌分别占14.15%、9.43%和7.55%,其他细菌占14.15%,主要病原菌革兰阴性菌与文献[9-10]报道的血流感染常见菌一致。对上述革兰阴性菌进行药敏试验,肺炎克雷伯菌对阿米卡星、头孢哌酮-舒巴坦钠、哌拉西林-他唑巴坦、甲氧苄啶-磺胺甲恶唑以及厄他培南、亚胺培南、美罗培南的耐药率低于50.0%,大肠埃希菌对阿米卡星、头孢哌酮-舒巴坦钠、哌拉西林-他唑巴坦以及厄他培南的耐药率低于50.0%,不动杆菌对多种抗菌药物的耐药率高于50.0%,铜绿假单胞菌对多种抗菌药物的耐药率低于50.0%,肠杆菌对多种抗菌药物均的耐药率低于50.0%。表明大肠埃希菌引起的血流感染可在药敏结果报告之前经验性选择碳青霉烯类抗菌药物进行治疗,而因肺炎克雷伯菌、不动杆菌引起的血流感染,则需慎重使用碳青霉烯类抗菌药物,有选择性地使用阿米卡星等抗菌药物,以免造成细菌产生耐药性。

细菌耐药性检测数据提示耐碳青霉烯类抗菌药物的革兰阴性菌的比例逐年升高^[11],导致对碳青霉烯类耐药的重要原因之一是耐药菌株产生了一种能水解碳青霉烯类药物-β内酰胺酶,而耐药菌株产生β内酰胺酶的增多引起抗菌药物治疗失效。本研究中肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率为40.0%,大肠埃希菌耐药率为0~3.57%,不动杆菌耐药率为60.0%,铜绿假单胞菌耐药率在10.0%左右,肠杆菌耐药率为0~25.00%。可见,血培养分离的对碳青霉烯类抗菌药物耐药性增强的革兰阴性菌有集中分布的趋势,主要为肺炎克雷伯菌、不动杆菌。进一步对耐碳青霉烯类菌株碳青霉烯酶基因携带情况进行检测,25株耐碳青霉烯类菌株中12株为肺炎克雷伯菌,9株为不动杆菌,2株肠杆菌,大肠埃希菌和铜绿假单胞菌各1株。有19株检出碳青霉烯酶基因,其中KPC基因检出率为44.0%,OXA23基因的检出率为32.0%,OXA51基因检出率为28.0%,NDM基因检出率为

4.0%。表明携带KPC、OXA23型碳青霉烯酶基因可能是肺炎克雷伯菌和不动杆菌耐碳青霉烯类药物的主要机制。

综上所述,革兰阴性菌为住院患者血流感染的主要致病菌,其菌种分布与既往研究相似,需结合病原菌耐药性检测结果以及耐药基因筛查结果制定治疗方案,为患者提供更适宜的抗菌药物进行治疗,避免抗菌药物滥用,延缓细菌耐药性的产生。

【参考文献】

[1] 杨辉,罗倩,陈君灏,等.血清PCT、CRP及内毒素在细菌性血流感染所致脓毒症患者中的早期诊断价值[J].现代生物医学进展,2017,17(2):338-41.
[2] Patel PK, Greene MT, Rogers MAM, et al. The epidemiology of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection in veterans[J]. Am J Infect Control, 2018, 46(7):747-50.
[3] 姜丽,贾萌,高飞,等.血流感染泛耐药鲍曼不动杆菌耐药和基因型分析[J].中国病原生物学杂志,2018,13(4):424-7.
[4] 童明庆.临床微生物学血培养操作规范[J].中华检验医学杂志,2004,27(2):124-6.
[5] 周庭银,倪语星,王明贵,等.血流感染实验诊断与临床诊治[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2014:198-200.
[6] O'Donnell JN, Rhodes NJ, Lopez J, et al. Carbapenems versus alternative β-lactams for the treatment of nosocomial pneumonia: A systematic review and meta-analysis[J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52(4):451-8.
[7] 魏星,丁银环,向成玉,等.我国耐碳青霉烯鲍氏不动杆菌感染医院获得性肺炎影响因素的Meta分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(6):805-9,814.
[8] 李晶.血流感染超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌耐药性及危险因素分析[D].苏州:苏州大学,2018.
[9] 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.
[10] 吴春婷,赵佳晖,叶晓芳,等.革兰阴性杆菌血流感染60例患者的临床资料分析[J].中国呼吸与危重监护杂志,2018,17(3):243-6.
[11] 周宏,时黎明,李桂霞,等.碳青霉烯类抗生素超级耐药细菌检测及抗菌策略研究进展[J].中国病原生物学杂志,2018,13(4):432-5,439.

【收稿日期】 2020-05-31 【修回日期】 2020-08-26