

大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药的 流行病学特征及影响因素分析^①

汤丽霞¹, 韦莹慧^{1②}, 黄燕¹, 李来稳¹, 何涛¹, 唐玉莲¹, 陈文成², 龙显科²

(1. 右江民族医学院检验学院, 广西 百色 533000 E-mail: 929456139@qq.com;

2. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 观察大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药(CHEC)的流行病学特征,探讨大肠埃希菌异质性耐药感染的影响因素,为临床合理应用抗菌药物提供理论依据。**方法** 收集临床标本分离的大肠埃希菌株,进行超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)检测、典型碳青霉烯异质性耐药大肠埃希菌检测、菌落谱型分析(PAP),同时对耐药谱进行分析,确证大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药的影响因素。**结果** 200株大肠埃希菌主要分离自尿液、血液和痰液标本,检出率分别占16.50%、20.50%和38.00%。该菌对美罗培南、厄他培南和亚胺培南的异质性耐药率分别为6.00%、20.50%和29.00%。细菌产ESBLs、慢性基础病、先前使用抗生素和侵袭性医疗操作是碳青霉烯异质性耐药大肠埃希菌感染的主要影响因素。**结论** 大肠埃希菌中碳青霉烯异质性耐药现象非常严重,特别是细菌产ESBLs、抗生素使用和侵袭性医疗操作与碳青霉烯异质性耐药有关。因此,临床应合理使用抗菌药物,规范侵袭性医疗操作,可避免院内感染的暴发流行。

关键词: 临床标本;大肠杆菌;碳青霉烯耐药;异质性耐药;影响因素分析

中图分类号: R378.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)02-0172-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.02.020

Epidemiological characteristics and influencing factors analysis of Carbapenems heteroresistant *Escherichia coli*

Tang Lixia¹, Wei Yinghui¹, Huang Yan¹, Li Laiwen¹, He Tao¹, Tang Yulian¹,
Chen Wencheng², Long Xianke²

(1. School of Laboratory, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi
E-mail: 929456139@qq.com;

2. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi)

Abstract: Objective To observe the epidemiological characteristics of Carbapenems heteroresistant *Escherichia coli* (CHEC), and to explore the influencing factors of infection by *Escherichia coli* with Carbapenems heteroresistance, so as to provide evidences for the rational use of antimicrobial agents in clinical practice.

Methods The *Escherichia coli* strains isolated from clinical samples were collected. Then the Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) detection, typical Carbapenems heteroresistant *Escherichia coli* detection and Population Analysis Profile (PAP) were performed. Drug resistant profile was analyzed at the same time. We confirmed the influencing factors of Carbapenem heteroresistant *Escherichia coli*. **Results** The 200 *Escherichia coli* strains were mainly isolated from urine, blood and sputum samples. The detection rates from urine, blood and sputum samples were 16.50%, 20.50% and 38.00%, respectively. In these *Escherichia coli* strains, the rates of heteroresistant to meropenem and ertapenem and imipenem were 6.00%, 20.50% and 29.00%, respectively. Bacteria producing ESBLs, chronic basic diseases, pre-use of antibiotics and invasive medical practices were the main influencing factors for CHEC infection. **Conclusion** The phenomenon of Car-

① 基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z20170231)

② 通信作者, E-mail: 929456139@qq.com

bapenems heteroresistance in *Escherichia coli* is very serious, especially the Carbapenems heteroresistance is associated with bacteria producing ESBLs, antibiotic use and invasive medical practices. Therefore, the rational use of clinical antimicrobial agents and standardizing the invasive medical practices can avoid the nosocomial infection outbreak and prevalence.

Key words: clinical specimen; *Escherichia coli*; Carbapenem resistance; heteroresistance; root cause analysis

碳青霉烯类抗生素是非典型 β 内酰胺类药物,由多种链霉菌产生,具有抗菌谱广、抗菌活性强,耐酶或抑酶等特点,对肠杆菌科、非发酵菌等革兰阴性杆菌具有较强的抗菌活性^[1]。由于临床不合理使用抗菌药物,导致大肠埃希菌对碳青霉烯类抗生素的耐药不断上升^[2],人类将面临革兰阴性菌“极端耐药”的挑战^[3-4]。又由于异质性耐药的表达,此类耐药亚群可导致临床抗生素治疗失败和感染复发。本次研究根据大肠埃希菌对碳青霉烯类药物存在异质性耐药,对其流行病学特征进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株来源 检验对象来自2015年1月—2017年7月右江民族医学院附属医院住院、门诊就诊病人850份标本,共检出200株大肠埃希菌。菌株鉴定和药敏实验使用VivtK2全自动细菌鉴定仪。大肠埃希菌的质控菌株为ATCC 25922。

1.1.2 试纸和平板 所用的药敏纸片[亚胺培南(IPM, 10 μ g)、厄他培南(ETP, 10 μ g)、美罗培南(MEM, 10 μ g)]、E-test试纸条(IPM、ETP、MEM纸带)、碳青霉烯粉剂(IPM、ETP、MEM粉剂)均购自英国Oxoid公司;K-B琼脂粉、血平板、无抑制巧克力平板和MH平板购自杭州生物制品有限责任公司。

1.1.3 仪器耗材 全自动血培养仪及其配套血培养瓶;美国BD公司。VivtK2全自动细菌鉴定仪和麦氏比浊仪;法国生物梅里埃公司。

1.2 方法

1.2.1 标本的分离培养 按照《全国临床检验操作规程:第4版》^[5]进行。对疑似大肠埃希菌分离株进行菌种鉴定的同时,需进行药敏实验以及ESBLs检测。

1.2.2 K-B纸片扩散法 操作均按照《全国临床检验操作规程:第4版》进行。按美国临床实验室标准化委员会(CLSI)制定的《抗菌药物敏感性试验操作标准(2013版)》^[6]进行结果判读。同时对大肠埃希菌异质性耐药进行判断:异质性耐药(HR)抑菌圈内有细菌生长;非异质性耐药(non-HR)抑菌圈内无细菌生长;完全耐药(FR)没有抑菌圈。

1.2.3 E-test试验 当疑是HR、FR时,进一步用E-test法验证,操作方法按照《临床检验操作规程》第四

版进行,根据CLSI推荐折点进行药敏结果判读。

1.2.4 菌落谱型分析(PAP)实验 从临床分离菌株挑取碳青霉烯异质性耐药大肠埃希菌(CHEC)来确证碳青霉烯异质性耐药表型,non-HR阴性对照株为ATCC 2599,选取碳青霉烯完全耐药株为FP对照,观察菌株的曲线特点。

1.2.5 异质性耐药的PAP确证 取M-H培养基,将抗生素浓度稀释成2倍MIC梯度,37 $^{\circ}$ C 24 h培养,进行单菌落计数(CFU)。耐药判断标准:异质性耐药:比原细菌群体的最低抑菌浓度 >8 倍;中等异质性耐药:比原细菌群体的最低抑菌浓度 $=8$ 倍;同质性耐药:比原细菌群体的最低抑菌浓度 ≤ 4 倍。

1.3 统计学方法 用SPSS 13.0统计软件对数据进行分析,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 200株大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药构成比 在200株大肠埃希菌中,共检出83株碳青霉烯异质性耐药的大肠埃希菌,某些菌株存在联合异质性耐药现象,其中对IPM、MEM和ETP均表现为异质性耐药的大肠埃希菌有6例。见表1。

表1 200株大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药检出结果

编号	组合	检出株数	构成比(%)	异质性耐药率(%)
1	IPM	38	45.78	19.00
2	ETP	20	24.10	10.00
3	IPM+ETP	11	13.25	5.50
4	IPM+ETP+MEM	6	7.23	3.00
5	ETP+MEM	4	4.82	2.00
6	IPM+MEM	3	3.61	1.50
7	MEM	1	1.20	0.50
合计		83	100.0	41.50

2.2 200株大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药型别分布 在200株大肠埃希菌中,引起异质性耐药111例次,其中12例次MEM-HR、41例次ETP-HR和58例次IPM-HR,IPM-HR检出率最高,异质性耐药率为29.00%;MEM-HR检出率最低,异质性耐药率为6.00%。见表2。

表 2 200 株大肠埃希菌碳青霉烯类异质性耐药型别分布 (n, %)

碳青霉烯类药物	异质性耐药型别		
	Non-HR	HR	FR
IPM	142(71.00)	58(29.00)	0
ETP	155(77.50)	41(20.50)	4(2.00)
MEM	187(93.50)	12(6.00)	1(0.50)

2.3 大肠埃希菌对碳青霉烯类异质性耐药表型特点在 K-B 纸片或 E-test 试纸条的抑菌圈内有散在菌落生长。见图 1 和图 2。

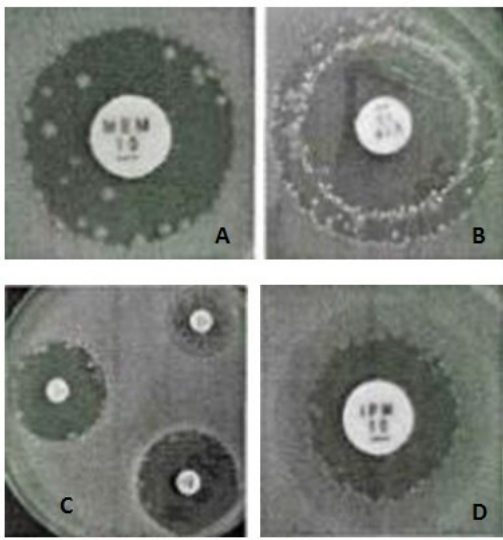


图 1 K-B 法中大肠埃希菌对碳青霉烯类异质性耐药现象
注:A. 大肠埃希菌对 MEM 的异质性耐药现象;B. 大肠埃希菌对 MEM 的双环抑菌圈现象;C. 大肠埃希菌对 ETP 的异质性耐药现象;D. 大肠埃希菌对 ETP 的双环抑菌圈现象

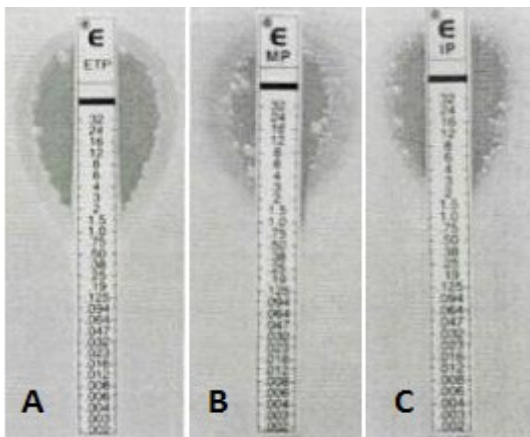


图 2 E-test 法中大肠埃希菌对碳青霉烯类异质性耐药现象
A. 大肠埃希菌对 ETP 的异质性耐药现象(双环抑菌圈现象);
B. 大肠埃希菌对 MEM 的双环抑菌圈现象;C. 大肠埃希菌对 IPM 的异质性耐药现象

2.4 大肠埃希菌碳青霉烯类异质性耐药临床分布情况

病区和标本分布:200 例大肠埃希菌临床主要分布于骨外科、呼吸内科和 ICU 等科室,分别占 18.00%、13.50%和 12.00%,见表 3。标本主要分布于痰液、血液和尿液,分别占 38.00%、20.50%和 16.50%,见表 4。

表 3 200 例耐药性大肠埃希菌在临床科室分布情况

病区	例数	构成比(%)
ICU	24	12.00
骨外科	36	18.00
胃肠外科	13	6.50
肝胆外科	12	6.00
呼吸内科	27	13.50
血液内科	15	7.50
内分泌科	11	5.50
神经内科	16	8.00
肾内科	12	6.00
心血管内科	8	4.00
儿科	4	2.00
妇产科	15	7.50
门诊	7	3.50
合计	200	100.00

表 4 200 例耐药性大肠埃希菌在临床标本分布情况

标本类型	例数	构成比(%)
血液	41	20.50
痰液	76	38.00
尿液	33	16.50
脓液	25	12.50
穿刺液	12	6.00
脑脊液	8	4.00
其它	5	2.50
合计	200	100.00

2.5 大肠埃希菌对 IPM、ETP 和 MEM 耐药因素分析 IPM-HR 大肠埃希菌分离株感染中提示先前使用抗生素和慢性基础病是 IPM-HR 菌株感染的主要影响因素;ETP-HR 分离株感染提示慢性基础病、侵袭性操作、先前使用抗生素和细菌产 ESBLs 是 ETP-HR 菌株感染的主要影响因素。见表 5。

3 讨论

3.1 大肠埃希菌碳青霉烯类异质性耐药机制 细菌异质性耐药,最早报道于耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌^[7-8],随后相继报道革兰阴性杆菌对多粘菌素、哌拉西林他唑巴坦、头孢类和碳青霉烯类^[9-10]及革兰阳性球菌对万古霉素、青霉素和达托霉素^[11-12]的异质性耐药现象。目前碳青霉烯类药物临床用量快速增长,碳青霉烯类耐药的菌株不断产生。对碳青霉烯类耐药

表5 大肠埃希菌对IPM、ETP和MEM异质性耐药的影响因素分析 (n,%)

相关因素	IPM-HR (58例次)	non-IPM-HR (142例次)	P	ETP-HR (41例次)	non-ETP-HR (155例次)	P	MEM-HR (12例次)	non-MEM-HR (187例次)	P
内科病区	27(46.55)	62(43.66)	0.709	16(39.02)	70(45.16)	0.481	7(58.33)	85(45.46)	0.386
外科病区	16(27.59)	45(31.69)	0.567	14(34.15)	46(29.68)	0.581	2(16.67)	56(29.95)	0.513
ICU病区	10(17.24)	14(9.86)	0.145	7(17.07)	17(10.97)	0.289	2(16.67)	21(11.23)	0.916
妇科病区	5(8.62)	10(7.04)	0.929	4(9.76)	11(7.10)	0.811	1(8.33)	14(7.49)	0.648
儿科	0(0.00)	4(2.82)	0.463	0(0.00)	4(2.58)	0.676	0(0.00)	4(2.14)	0.583
门诊	0(0.00)	7(4.93)	0.195	0(0.00)	7(4.52)	0.362	0(0.00)	7(3.74)	0.900
先前使用抗生素	50(86.21)	102(71.83)	0.031	41(100.00)	37(23.87)	<0.001	8(66.67)	150(80.21)	0.450
联合使用抗生素	22(37.93)	35(24.65)	0.059	18(43.90)	67(43.22)	0.938	3(25.00)	41(21.93)	0.912
慢性基础病	46(79.31)	79(55.63)	0.002	30(73.17)	80(51.61)	<0.001	9(75.00)	112(59.89)	0.463
侵袭性操作	28(48.28)	60(42.25)	0.436	28(68.29)	72(46.45)	0.013	6(50.00)	44(23.53)	0.088
产ESBLs	39(67.24)	87(61.27)	0.427	40(97.56)	96(61.94)	<0.001	7(58.33)	107(57.22)	0.940

的主要机制包括产生碳青霉烯酶、突变引起细菌外膜通透性下降及主动外排受累或孔道蛋白改变、碳青霉烯类抗菌药物作用的靶位改变等。本组研究结果表明,大肠埃希菌对亚胺培南异质性耐药(IPM-HR)率最高,检出率为29.00%,ETP-HR检出率为20.50%,MEM-HR检出率为6.00%,MEM异质性耐药率最低。PAP实验是通过抗生素浓度变化观察细菌的生长情况来检测异质性耐药亚群,是异质性耐药的确证试验。E-test法和K-B法中表现为碳青霉烯异质性耐药的菌株进行了PAP试验,证实临床标本中存在大肠埃希菌对碳青霉烯的异质性耐药现象。因此,临床在对感染进行治疗时导致碳青霉烯类药物失效。

3.2 流行病学调查 在研究中发现,CEHC菌株在医院的多个科室中有散在流行,特别是IPM-HR,检出率高达29.00%。异质性耐药在体外环境中容易发生耐药表型的改变,干扰了临床抗菌药物敏感性试验,因此,实验室不能给临床正确的药敏信息,导致治疗失败或延误病情。ESBLs大肠埃希菌感染用碳青霉烯类药物治疗是最后一道防线,所以,异质性耐药株的出现将给临床治疗带来重大挑战。

本次研究结果表明,大肠埃希菌碳青霉烯异质性耐药的主要影响因素有细菌产ESBLs、慢性基础病、侵袭性操作(尤其是静脉留置管)和先前使用抗生素等,这与国外文献报道大致相近^[13],又由于大肠埃希菌异质性耐药的影响因素不同,产ESBLs细菌是其中之一。因此,推测细菌产ESBLs酶是异质性耐药的进化,碳青霉烯敏感的大肠埃希菌株借助产ESBLs酶经过异质性耐药进化为碳青霉烯完全耐药。本研究对象仅200例,对统计学结果有一定影响,需扩大样本量进一步论证。MEM-HR病例组仅有12例,病例数太少,统计学误差在MEM异质性耐药中较明显,后续研究将改进。

总之,碳青霉烯异质性耐药的大肠埃希菌给临床抗感染治疗带来严重挑战^[14]。细菌的药敏特征、传播

机制及流行趋势的研究将减少或阻断异质性耐药菌的产生,同时也为临床合理使用抗生素及控制CHEC菌株感染提供有效的科学依据。

参考文献:

- [1] 龙安,张冰松,朱胜波. 尿液中奇异变形杆菌耐药性分析[J]. 右江民族医学院学报,2017,39(2):119-120.
- [2] 杨君,凌宙贵,刘卫,等. 2012~2014年我院铜绿假单胞菌的耐药性监测[J]. 右江民族医学院学报,2016,38(1):81-83.
- [3] Xiaorong Wang, Yu Kang, Chunxiong Luo, et al. Heteroresistance at the Single-Cell Level: Adapting to Antibiotic Stress through a Population-Based Strategy and Growth-Controlled Interphenotypic Coordination [J]. mBio,2014,5(1):e00942-13.
- [4] Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, et al. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? [J]. Clin Microbiol Infect,2008,14(2):101-104.
- [5] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规定:第4版[M]. 北京:人民卫生出版社,2015.
- [6] 美国临床和实验室标准协会. M100-S23:抗菌药物敏感性试验执行标准;第二十三版资料增刊[J]. 孙长贵,杨启文,杨继勇,译. 中华检验医学杂志(CLSI文件:M100-S23),2013,33(1):1-195.
- [7] Deresinski S. The Multiple Paths to Heteroresistance and Intermediate Resistance to Vancomycin in Staphylococcus aureus[J]. J Infect Dis,2013,208(1):7-9.
- [8] 叶满. 糖尿病足病原菌的耐药分析[J]. 右江民族医学院学报,2015,37(5):700-702.
- [9] Hung KH, Wang MC, Huang AH, et al. Heteroresistance to cephalosporins and penicillins in Acinetobacter baumannii[J]. J Clin Microbiol,2012,50(3):721-726.
- [10] Armand-Lefèvre L, Angebault C, Barbier F, et al. Emergence of imipenem-resistant gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients[J]. Antimicrob Agents Chemother,2013,57(3):1488-1495.
- [11] 乔立松. 异质性万古霉素耐药金黄色葡萄球菌感染研究

进展[J]. 中国实用医学, 2010, 5(30): 251-253.

- [12] Lenka Krizova, Laurent Poiriel, Patrice Nordmann, et al. TEM-1 β -lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(12): 2786-2791.
- [13] Fernandez-Cuenca F, Gómez-Sánchez M, Rodríguez-Bano J, et al. Epidemiological and clinical features associated with colonisation/infection by *Acinetobacter baumannii* with phenotypic heterogeneous resistance to car-

bapenems[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(3): 235-238.

- [14] Tängden T, Adler M, Cars O, et al. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model[J]. *Antimicrob Chemother*, 2013, 68(6): 1319-1326.

收稿日期: 2018-01-02; 修回日期: 2018-04-15

(上接第 163 页)

- [5] 吴文通, 王芳, 钱尤. 中西医结合治疗中重度癌痛的临床疗效观察[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(2): 492-494.
- [6] 刘丹, 东方, 季宇彬. 中医药在恶性肿瘤治疗中治法研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2013, 35(4): 539-540.
- [7] Zhang Y, Dennis JA, Leach MJ, et al. Complementary and Alternative Medicine Use Among US Adults With Headache or Migraine: Results from the 2012 National Health Interview Survey[J]. *Headache*, 2017, 57(18): 1228-1242.
- [8] 李小青, 李洁, 许峰, 等. 陆广莘的学术思想与中医气功[J]. *中医药文化*, 2017, 12(5): 40-45.
- [9] Buric I, Farias M, Jong J, et al. What Is the Molecular Signature of Mind-Body Interventions? A Systematic Review of Gene Expression Changes Induced by Meditation and Related Practices [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 670.
- [10] Wang XQ, Pi YL, Chen PJ, et al. Traditional Chinese Exercise for Cardiovascular Diseases: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2016, 5(3): e002562.
- [11] Yun H, Sun L, Mao JJ. Growth of Integrative Medicine

at Leading Cancer Centers Between 2009 and 2016: A Systematic Analysis of NCI-Designated Comprehensive Cancer Center Websites [J]. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 2017, 2017(52).

- [12] Crew KD, Capodice JL, Greenlee H, et al. Randomized, blinded, sham-controlled trial of acupuncture for the management of aromatase inhibitor-associated joint symptoms in women with early-stage breast cancer [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28(7): 1154-1160.
- [13] Schosserer M, Grillari J, Breitenbach M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy [J]. *Frontiers in Oncology*, 2017, 7: 278.
- [14] Wang D, Calabrese EJ, Lian B, et al. Hormesis as a mechanistic approach to understanding herbal treatments in traditional Chinese medicine[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 184: 42-50.
- [15] Cyranoski D. China to roll back regulations for traditional medicine despite safety concerns [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 552-553.
- [16] 赵娣, 周亚东, 李卓. 新形势下中医药文化的国际传播途径[J]. *中医药临床杂志*, 2017, 29(8): 1157-1159.

收稿日期: 2018-03-23; 修回日期: 2018-04-13