

阴沟肠杆菌的临床分布及其产碳青霉烯酶研究

杨勇文 李从荣

【摘要】目的 探讨阴沟肠杆菌分离菌株的临床分布及其对常用抗菌药物的耐药及产碳青霉烯酶情况。**方法** 收集2014年6月至2016年2月武汉大学人民医院298例患者分类标本培养的菌株,应用BD PhoenixTM 100细菌鉴定及药敏系统鉴定菌种和药物敏感性,并适当补充K-B法药敏试验;对碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降的菌株进行Carba NP实验表型确证,并且进行PCR测序确定基因型;采用阴沟肠杆菌的MLST技术进行分子分型。**结果** 共检出非重复分离的阴沟肠杆菌298株,其中标本主要为痰液(29.87%),其次为尿液(25.50%)。科室分布中,神经外科(17.79%)检出最多,其次为肝胆外科(12.75%)。阴沟肠杆菌对头孢唑林的耐药率最高(98.1%)、其次为氨苄西林(89.7%);对碳青霉烯类抗菌药物耐药的菌株中,9株菌通过Carba NP实验检测,其中8株为阳性,1株为阴性。PCR扩增出4株产NDM-1基因的菌株,其中1株联合产VIM-19基因的菌株,一株单产VIM-19型基因,均经过测序比对验证。将4株产NDM-1碳青霉烯酶的细菌进行MLST分型,得到3个不同的ST型,分别为ST508, ST509和ST145。**结论** 阴沟肠杆菌的耐药较为严峻,感控部门应加强对本地区产碳青霉烯酶菌的监测,以减少耐药菌的产生和播散。

【关键词】 阴沟肠杆菌; 抗菌药物; 碳青霉烯酶

Clinical distribution and carbapenemases research on *Enterobacter cloacae* Yang Yongwen, Li Congrong.

Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Li Congrong, Email: conrongli33@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical distribution of isolated *Escherichia coli* and its resistance to common antimicrobial agents and the production of carbapenemases. **Methods** Various strains of 298 patients from Wuhan University People's Hospital from June 2014 to February 2016 were collected. The strains were identified by BD PhoenixTM 100 bacterial identification and drug susceptibility system. On The strains of alkene antimicrobial with sensitivity decreasing to carbon penicillium were confirmed by Carba NP, genotypes were determined by PCR. The MLST technique of *Enterobacter cloacae* was applied for molecular typing. **Results** Total of 298 strains of *Enterobacter cloacae* were detected, among which the samples were mainly from sputum (29.87%), followed by urine (25.50%). In the departments distribution, neurosurgery (17.79%) was the most, followed by hepatobiliary surgery (12.75%). The resistance rate of *Enterobacter cloacae* to cefazolin was 98.1%, followed by ampicillin (89.7%). Among the strains resistant to carbapenem antibiotics, 9 strains were detected by Carba NP test, 8 of which were positive, one strain was negative. Four strains of NDM-1 gene were amplified by PCR. One strain carrying the VIM-19 gene and one carrying the VIM-19 gene alone were detected by sequencing. Four strains of NDM-1 carbapenem were classified by MLST, and 3 different ST types were obtained, which were ST508, ST509 and ST145, respectively. **Conclusions** Antibiotic resistance of *Enterobacter cloacae* was grim, infection control departments should strengthen the monitoring of carbapenem to reduce the emergence and spread of drug-resistant bacteria.

【Key words】 *Enterobacter cloacae*; Antibacterials; Carbapenemases

阴沟肠杆菌是是肠杆菌科细菌中常见的机会性病原菌之一^[1], 可导致院内泌尿道及呼吸道感染、继发性脑膜炎和败血症等疾病^[2]。患者本身的基础性疾病及常用广谱抗菌药物的不合理使用等因素导致阴沟肠杆菌的院内感染率和耐药率不断上升^[3], 多重耐药阴沟肠杆菌检出率日趋增加, 已成为临床诊治非常棘手的难题^[4]。为明确本院阴沟肠杆菌的临床分布、耐药率及碳青霉烯酶产生情况, 本研究通过对阴沟肠杆菌感染及药敏试验结果进行分析, 对相关菌株产碳青霉烯酶进行了初步研究, 现报道如下。

资料与方法

一、菌株来源

阴沟肠杆菌菌株均分离(剔除同一患者同一部位重复分离菌株)自2014年6月至2016年2月武汉大学人民医院住院患者的各类临床标本中。

二、主要仪器及试剂

阴沟肠杆菌生化鉴定和药敏试剂条及BD PhoenixTM 100全自动细菌鉴定仪均为美国BD公司产品; M-H培养基为广州迪景公司产品, 药敏纸片为英国Oxid公司产品, PCR mix试剂为Takara公司产品, 引物合成和测序委托上海生工公司。Carba NP实验中的亚胺培南为大连美轮公司产品, 其余均为Sigma-Aldrich公司产品。

三、细菌生化鉴定及药敏

严格按照《临床微生物检验标准化操作》第三版^[5]处理各类临床标本。革兰染色明确菌株属性, 获取足够数量的单个可疑菌株配置0.5个麦氏单位的菌悬液, 采用BD PhoenixTM 100系统进行鉴定及药敏。参照2012年版美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准判定结果^[6]。

四、Carba NP试验

1. 碳青霉烯酶的制备: 提前将菌株转种至血平板上, 于35℃孵育箱中培养18~24 h。按照试剂说明书配制工作液, 用移液枪分别取100 μl加入A、B两个1.5 ml灭菌无酶的EP管中; 接种环挑取满环菌株, 加入A、B管并置于冰上裂解约15 min, 期间适当震荡。经10 000 r/min离心10 min(离心半径r = 10 cm)后取上清液备用。

2. 碳青霉烯酶活性测定: 参考CLSI 2015^[7]配置Carba NP试剂和判读结果, A、B管分别加入

Carba NP实验A液和B液。于35℃温育内, 2 h内判读结果, 否则无效。肺炎克雷伯菌ATCC1706为阳性对照, 肺炎克雷伯菌ATCC1705为阴性对照。

五、质控菌株

铜绿假单胞菌(ATCC27853)和大肠埃希菌ATCC 25922均购自购自国家卫生和计划生育委员会临床检验中心。

六、PCR法基因扩增及测序

1. 模板提取: 用烧灼后的接种环挑取3~6个菌落混入装有500 μl ddH₂O中的EP管中, 振荡混匀, 放置于100℃干浴锅中干浴10 min, 12 000 r/min离心8 min, 小心吸取上清作为DNA模板移入新的EP管中, 置于-20℃保存备用。

2. 目的基因检测: 参考文献设计引物(详见表1), 进行PCR扩增。25 μl PCR反应扩增体系包括正、反向引物(10 μmol/L)各1 μl, 2× Ex PCR Mix 12.5 μl, ddH₂O 8.5 μl, 模板2 μl。PCR反应条件: 95℃预变性5 min, 然后95℃变性20 s, 各自退火温度退火45 s, 72℃延伸25 s, 经过25个循环后, 最终72℃延伸8 min。于1.5%琼脂糖凝胶中, 将扩增的PCR产物电泳40 min左右, 在电泳凝胶扫描成像仪Gel-box中扫描并拍照, 出现预期大小的目的条带为阳性扩增。

七、数据处理

采用WHONET 5.6软件总结和分析阴沟肠杆菌的耐药性数据, 由世界卫生组织细菌耐药性监测网提供。

结 果

一、标本的构成及科室分布

本研究检出298株阴沟肠杆菌主要由痰液标本构成(29.87%), 其次为尿液(25.50%), 详见表2。科室分布以神经外科(17.79%)检出最多, 其次为肝胆外科(12.75%), 详见表3。

二、阴沟肠杆菌的体外药物敏感试验结果

阴沟肠杆菌对头孢唑林的耐药率最高(98.1%), 其次为氨苄西林(89.7%), 共检出15株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的菌株, 详见表4。

三、Carba NP实验结果

本研究总共收集了9株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的菌株进行Carba NP实验, 其中8株为阳性, 1株为阴性。

表 1 5 种主要碳青霉烯酶 PCR 引物信息

引物名称	引物序列 (3'→5')	退火温度 (℃)	产物长度 (bp)	引物来源
KPC-F	TCGCTAAACTCGAACAGG	63	785	参考文献 ^[8]
KPC-R	TTACTGCCGTTGACGCCAATCC			
NDM-F	TTGGCCTTGCTGTCCTTG	60	89	参考文献 ^[8]
NDM-R	ACACCAGTGACAATATCACCG			
VIM-F	AAGTCCGTTAGCCCATTCCG	59	114	NCBI数据库在线设计
VIM-R	GCGATATGCGACCAACACC			
IMP-F	GGGCGTTGTTCTAAACATGG	61	185	NCBI在线设计
IMP-R	TAAGCCACTTATCCGCC			
OXA-F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	60	743	参考文献 ^[9]
OXA-R	GAGCACTTCTTTGTGATGGC			

注: KPC: 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenem), IMP: 水解亚胺培南金属酶 (imipenemase), OXA-48: 苯唑西林酶 48 型 (oxacillinase-48)

表 2 阴沟肠杆菌标本类型的分布

标本类型	株数	构成比 (%)
痰	89	29.87
尿	76	25.50
血液	37	12.42
引流液	33	11.07
胆汁	24	8.05
脓液	22	7.38
口内分泌物	10	3.36
腹水	9	3.02
导管尖端	4	1.34
其他	3	1.02
合计	298	100.00

表 3 所检出阴沟肠杆菌的科室分布

科室	株数	构成比 (%)
神经外科	53	17.79
肝胆外科	38	12.75
泌尿外科	30	10.07
肿瘤科	26	8.72
神经内科	24	8.05
骨科	23	7.72
肾病内科	18	6.04
重症医学科	16	5.37
儿科	14	4.70
老年医学科	12	4.03
耳鼻喉科	8	2.68
胃肠外科	7	2.35
整形外科	7	2.35
呼吸内科	5	1.68
消化内科	4	1.34
心血管内科	3	1.01
心血管外科	3	1.01
胸外科	3	1.01
其他	4	1.36
合计	298	100.00

四、PCR扩增结果

PCR扩增出4株产新德里金属β-内酰胺酶1型 (New Delhi metallo-β-lactamase-1, NDM-1) 基因的菌株, 其中一株联合产维罗纳整合子型金属β-内酰胺酶19型 (verona-integron metallo-β-lactamase, VIM-19) 基因的菌株, 一株单产VIM-1型基因, 详见图1~2。

五、MLST结果

将4株PCR阳性扩增的菌株测序验证后, 进行MLST溯源, 分别得到3个不同的ST型, 分别为ST508、ST509和ST145。

讨 论

阴沟肠杆菌广布于医院环境和人体肠道正常菌群中, 为临床较常见的机会性致病菌^[10]。本研究结果显示, 阴沟肠杆菌检出以痰和尿标本为主, 占

29.87%和25.50%, 证实阴沟肠杆菌在肺部及泌尿道感染的患者中常见, 可能与阴沟肠杆菌菌体表面结构 (如鞭毛、菌毛及多糖荚膜) 的黏附力等侵袭因素较强^[11], 易定植于尿道口周围及呼吸道等部位有关^[12]。神经外科、肝胆外科和泌尿外科是检出阴沟肠杆菌的主要科室来源, 与卢兆莲等^[13]报道不同, 表明接受侵入性操作 (如引流和导尿) 和长期住院是阴沟肠杆菌感染的主要危险因素^[14]。

阴沟肠杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制

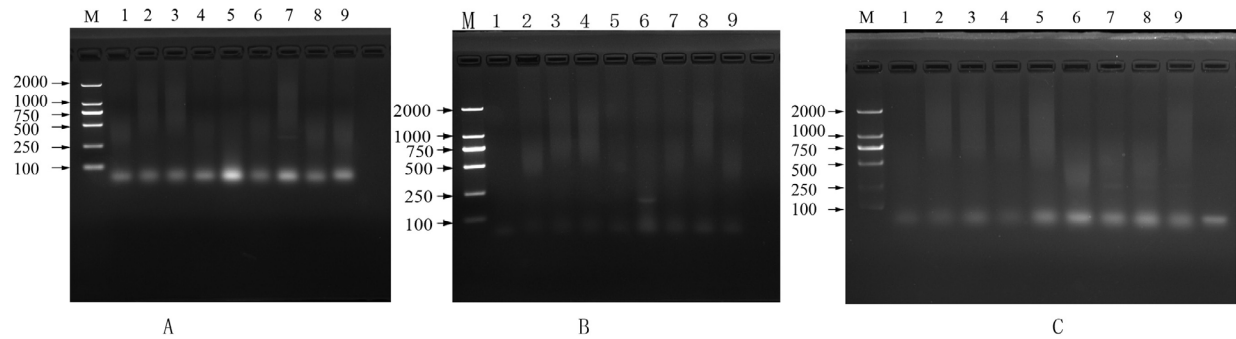
表 4 阴沟肠杆菌对常用抗菌药物的耐药情况

抗菌药物	R		I		S	
	株数	耐药率 (%)	株数	中介率 (%)	株数	敏感率 (%)
AMP	267	89.7	16	5.4	15	4.9
PIP	144	48.4	18	5.9	136	45.7
AMC	274	91.9	3	0.9	21	7.2
TZP	74	24.9	29	9.8	195	65.3
SAM	172	57.8	46	15.6	79	26.6
CZO	292	98.1	0	0.0	0	0.0
CAZ	129	43.4	7	2.2	162	54.4
CTX	149	50.0	8	2.7	141	47.3
FEP	53	17.7	30	10.2	215	72.1
ATM	135	45.3	5	1.8	158	52.9
IPM	13	4.4	5	1.8	280	93.8
MEM	15	4.9	3	0.9	281	94.2
AMK	20	6.6	0	0.0	278	93.4
GEN	68	22.7	1	0.4	229	76.9
CIP	63	21.2	8	2.7	227	76.1
LEV	56	18.8	13	4.4	229	76.9
SXT	85	28.6	0	0.0	213	71.4
CHL	79	26.6	14	4.6	205	68.8

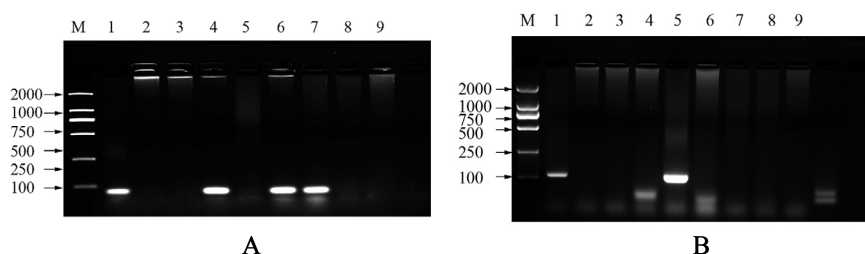
注：氨苄西林（AMP）、氨苄西林/舒巴坦（SAM）、哌拉西林（PIP）、哌拉西林/他唑巴坦（TZP）、阿莫西林/克拉维酸（AMC）、头孢唑林（CZO）、头孢他啶（CAZ）、头孢噻肟（CTX）、头孢吡肟（FEP）、氨曲南（ATM）、亚胺培南（IPM）、美罗培南（MEM）、阿米卡星（AMK）、庆大霉素（GEN）、环丙沙星（CIP）、左旋氧氟沙星（LEV）、复方新诺明（SXT）、氯霉素（CHL）

表 5 MLST 结果

样本号	dnaA	fusA	gyrB	leuS	pyrG	rplB	rpoB	ST
1	63	11	58	36	77	16	19	508
4	155	109	137	107	157	8	28	509
6	59	40	82	9	67	6	6	145
7	155	109	137	107	157	8	28	509



注：A、B、C分别为KPC、IMP和OXA-48型酶
图1 KPC、IMP和OXA-48型酶的阴性结果



注: A和B分别为NDM和VIM型酶

图2 NDM和VIM型酶的阳性结果

复杂,主要包括产生A、B和D的碳青霉烯酶^[15],外膜上外排泵高表达及通透性降低和药物作用靶位的改变等耐药机制^[16]。本研究耐药数据表明,阴沟肠杆菌对各类临床常用的抗菌药物均呈现出不同程度的耐药,头孢唑啉和氨苄西林耐药率分别为98.1%和89.7%,因此临床应避免使用头孢唑啉和氨苄西林经验性治疗阴沟肠杆菌引起的感染^[17]。头孢噻肟和头孢他啶的耐药率分别为50%和43.4%,以往研究表明,阴沟肠杆菌表达的AmpC酶将破除 β -内酰胺类抗菌药物的酰胺键,且不能被 β -内酰胺抑制剂(克拉维酸)^[18],临床可依据MIC值正确选择三代头孢类抗菌药物。头孢吡肟(四代头孢类抗菌药物)的耐药率相对缓和(17.7%),可能与AmpC酶对其氨基噻唑侧链亲和力较低,同时可快速穿透细胞外膜蛋白有关^[19]。碳青霉烯类抗菌药物亚胺培南、美罗培南的耐药率分别为4.4%和4.9%(均<10%),可推荐作为经验性用药治疗多重耐药阴沟肠杆菌引起的感染。

CLSI^[20]于2016年明确将Carba NP实验作为确证肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的表型实验,其主要是通过将酶释放到体外,水解亚胺培南使特定pH范围内的酚红由红变黄而鉴定碳青霉烯酶的活性^[21]。本研究中Carba NP实验阳性株为8株,经PCR和测序验证4株产NDM-1型碳青霉烯酶,其中1株协同产VIM-19型碳青霉烯酶;另一株单产VIM-19型碳青霉烯酶。Miyoshi-Akiyama等^[22]通过建立阴沟肠杆菌的MLST方案使多重耐药菌的溯源成为可能,而后Izdebski等^[23]采用大量的咽部标本分离出的定植产酶菌株进行验证,并认为阴沟肠杆菌的国际高危克隆ST型分别为ST66、ST78、ST108和ST114,这些ST型可能会在全球广泛播散。本研究通过MLST分型定出3个独特的ST型,即ST508、ST509和ST145。说明本地区的产酶阴沟肠杆菌与大肠埃希菌ST 131和肺炎克雷伯杆菌ST 258外源性的输入不

同,呈散在克隆播散,暂未发现国际高危克隆ST型。

综上所述,阴沟肠杆菌对抗菌药物耐药情况日益严重,产碳青霉烯酶阴沟肠杆菌的出现进一步加剧耐药问题^[24]。为减少该菌造成的院内感染以及在湖北地区的播散,应加强产碳青霉烯酶阴沟肠杆菌的耐药性监测,严格隔离和消毒等感控措施^[25]。及时掌握准确的阴沟肠杆菌的临床分布及耐药情况,对减少该菌的耐药性变迁具有重要价值。

参考文献

- [1] Wu W, Feng Y, Carattoli A, et al. Characterization of an *Enterobacter cloacae* strain producing both KPC and NDM carbapenemases by whole-genome sequencing[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 6625-6628.
- [2] Davin-Regli A, Pages JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 392.
- [3] Eumkeb G, Chukrathok S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*[J]. Phytomedicine, 2013, 20(3-4): 262-269.
- [4] Wang Y, Lo WU, Lai EL, et al. Complete sequence of the multidrug-resistant IncL/M plasmid pIMP-HB623 Cocarrying bla IMP-34 and fosC2 in an *Enterobacter cloacae* strain associated with medical travel to China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9): 5854-5856.
- [5] 周庭银, 倪语星, 胡继红, 等. 临床微生物检验标准化操作(第三版)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 310-457.
- [6] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement[S]. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [7] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement[S]. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [8] Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(27): 1-5.
- [9] Poirel L, Heritier C, Tolun V, et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(1): 15-22.
- [10] Fehlberg LC, Da Silva Nogueira K, Cayo da Silva R, et al. Detection of

- PER-2-producing *Enterobacter cloacae* in a Brazilian liver transplantation unit[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2014,58(3):1831-1832.
- [11] Majtan J, Bohova J, Horniackova M, et al. Anti-biofilm effects of honey against wound pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*[J]. *Phytother Res*,2014,28(1):69-75.
- [12] Zhu B, Lou MM, Xie GL, et al. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*,2011,61(Pt 11):2769-2774.
- [13] 卢兆莲, 公衍文, 薛炼, 等. 阴沟肠杆菌的临床分布及耐药性变迁[J]. *中国感染与化疗杂志*,2015,15(5):459-461.
- [14] Ling ML, Tee YM, Tan SG, et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in an acute tertiary care hospital in Singapore[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*,2015,4(26):1-7.
- [15] Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, et al. Molecular and epidemiological characterization of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a Large tertiary care hospital in Japan[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2014,58(6):3441-3450.
- [16] Flamm RK, Rhomberg PR, Simpson KM, et al. In vitro spectrum of pexiganan activity when tested against pathogens from diabetic foot infections and with selected resistance mechanisms[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2015,59(3):1751-1754.
- [17] Mohd Khari FI, Karunakaran R, Rosli R, et al. Genotypic and phenotypic detection of AmpC β -lactamases in *Enterobacter* spp. isolated from a teaching hospital in Malaysia[J]. *PLoS One*,2016,11(3):e0150643.
- [18] Guerin F, Isnard C, Cattoir V, et al. Complex regulation pathways of AmpC-mediated β -Lactam resistance in *Enterobacter cloacae* complex[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2015,59(12):7753-7761.
- [19] Lee NY, Lee CC, Li CW, et al. Cefepime Therapy for monomicrobial *Enterobacter cloacae* bacteremia: unfavorable outcomes in patients infected by cefepime-susceptible dose-dependent isolates[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2015,59(12):7558-7563.
- [20] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-sixth informational supplement[S]. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute,2016.
- [21] 杨勇文, 李从荣. Carba NP实验用于筛查肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶基因的临床评价[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*,2016,30(2):134-136.
- [22] Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, et al. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*[J]. *PLoS One*,2013,8(6):e66358.
- [23] Izdebski R, Baraniak A, Herda M, et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*[J]. *J Antimicrob Chemother*,2015,70(1):48-56.
- [24] Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, et al. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing[J]. *J Antimicrob Chemother*,2015,70(4):1008-1015.
- [25] Hargreaves ML, Shaw KM, Dobbins G, et al. Clonal dissemination of *Enterobacter cloacae* harboring blaKPC-3 in the Upper Midwestern United States[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2015,59(12):7723-7734.

(收稿日期: 2016-04-29)

(本文编辑: 孙荣华)

杨勇文, 李从荣. 阴沟肠杆菌的临床分布及其产碳青霉烯酶研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2017,11(3):239-244.