

· 临床研究 ·

# 临床血液分离大肠埃希菌株耐药性及生物被膜形成分析

熊 杰<sup>1</sup>, 杨继勇<sup>2</sup>, 邹自英<sup>1</sup>, 朱 冰<sup>1</sup>, 汪 璐<sup>1</sup>, 曾 平<sup>1</sup>

(1. 中国人民解放军成都军区总医院检验科, 成都 610083; 2. 中国人民解放军总医院微生物科, 北京 100853)

**摘要:**目的 探讨该院血流感染产超广谱酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌(ECO)检出率及其对常用抗菌药物的耐药性及生物被膜形成能力。方法 采用法国生物梅里埃公司的 Vitek2-Compact 全自动微生物分析仪进行鉴定和药物敏感性分析, 采用结晶紫半定量方法检测菌株的生物被膜形成能力。结果 92 株 ECO 临床血液分离菌株中, 产 ESBLs 菌株 53 株(占 57.61%), ESBLs 阴性菌株 39 株(占 42.39%)。对 3 类以上抗菌药物耐药 ECO 73 株(占 79.35%), 其中, 产 ESBLs 菌株 52 株, 占总菌株数的 56.52%, 占产 ESBLs 菌株数的 98.11%。耐药率最高的为氨苄西林(94.57%), 其次为头孢唑啉(71.74%)和氨苄西林/舒巴坦(67.39%); 环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率均在 60% 以上。对于临床常用的氨苄西林/舒巴坦、头孢菌素类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类的妥布霉素和单酰胺类抗菌药物, 与 ESBLs 阴性菌株相比, 产 ESBLs 菌株的最小抑菌浓度(MIC)值显著升高, 耐药率显著升高( $P < 0.05$ )。而对头霉素类、唑喹类、氨基糖苷类的庆大霉素和阿米卡星、含酶抑制剂的哌拉西林/他唑巴坦和碳青霉烯类抗菌药物的敏感性 ESBLs 阳性组与 ESBLs 阴性组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。96.74% 的 ECO 临床血液分离株具有生物被膜形成能力, 生物被膜形成量以中量为主。结论 该院 ECO 血液分离菌株产 ESBLs 比例高, 生物被膜形成能力强, 呈现多药耐药的特征。

**关键词:**血标本; 肠产毒性大肠杆菌;  $\beta$ 内酰胺酶类; 生物膜; 抗药性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)35-3699-03

## Antibiotics susceptibility and ability of biofilm formation of escherichia coli strains isolated from blood specimens

Xiong Jie<sup>1</sup>, Yang Jiyong<sup>2</sup>, Zou Ziyang<sup>1</sup>, Zhu Bing<sup>1</sup>, Wang Lu<sup>1</sup>, Zeng Ping<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, PLA Chengdu Military Aera Command General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China; 2. Department of Microbiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract:** Objective To approach the drug resistance of Escherichia coli isolated from blood producing extended  $\beta$  lactamases (ESBLs) and its ability of biofilm formation, and provide guidance for clinical medication and nosocomial infection control. **Methods** Escherichia coli identification and drug sensitivity was detected using Vitek2 Compact of biomérieux. The method of microtiter plate culture crystal violet stain was used for quantitative analysis of biofilm formation. **Results** A total of 53(57.61%) Escherichia coli producing ESBLs were isolated from 92 Escherichia coli clinical strains. And which didn't produce ESBLs were 39(42.39%) strains. Escherichia coli that resistant to more than three kinds of antibiotics was 73 strains(79.35%), in which 52 producing ESBLs(56.52%). The most resistant antibiotic was ampicillin(94.57%), the next was cefazolin(71.74%) and ampicillin/sulbactam(67.39%). The resistant rate of ciprofloxacin and levofloxacin was over 60%. The MIC of ESBLs strains of antibiotics often used by clinical including ampicillin/sulbactam, cepheims, fluoroquinolones, tobramycin and monobactams was increased significantly compared with ESBLs negative strains. The resistant rate of ESBLs strains compared with ESBLs negative strains increased( $P < 0.05$ ). Cefotetan, nitrofurans, amikacin and gentamicin, piperacillin/tazobactam and carbapenems were susceptible both to ESBLs strains and ESBLs negative strains( $P > 0.05$ ). 96.74% of the 92 Escherichia coli strains had the ability of biofilm forming, and most isolates formed medium or more quantity of biofilm. **Conclusion** The isolating rate of Escherichia coli from blood producing ESBLs was much higher than most hospital that had reported, and having strong ability to form biofilm and resistant to many different kinds of antibiotics.

**Key words:** blood samples; enterotoxigenic; escherichia coli;  $\beta$ -lactamases; biofilms; drug resistance

大肠埃希菌(ECO)是引起医院感染的重要病原菌之一,是革兰阴性杆菌中产超广谱内酰胺酶(ESBLs)的代表菌种,分子流行病学研究结果表明,ESBLs 基因型包括 SHV、TEM、CTX-M 型等,而 CTX-M 型是包括中国在内的全球流行 ESBLs 基因型<sup>[1]</sup>。随着头孢菌素在临床的广泛应用及产 ESBLs 菌株的增加,加速了耐药质粒的传播,使 ECO 对多种广谱和超广谱抗菌药物的耐药性增加。同时,ECO 是典型的生物被膜菌,细菌生物被膜是细菌感染难以治愈和反复发作的重要原因<sup>[2]</sup>。本研究收集本院临床送检的所有血液标本分离的 ECO 菌株,分析 ESBLs 的检出情况及菌株的耐药性,并检测各菌株的生物被膜形成能力,为医院 ECO 感染控制和临床抗菌药物使用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 分离自 2010 年 10 月至 2011 年 12 月临床送检的血液标本,同一患者的重复分离菌株不予统计。

**1.2 菌株鉴定和药敏试验** 采用法国梅里埃公司的 Vitek2-Compact 全自动微生物分析仪及 GN 鉴定卡对细菌进行鉴定,AST-GN13 药敏卡检测菌株的药物敏感性。结果评价按 2012 年美国临床实验室标准化协会(CLSI) M100-S22 判断。AST-GN13 检测的抗菌药物:氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、头孢唑啉、头孢曲松、头孢他啶、头孢替坦、氨基曲南、厄他培南、亚胺培南、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因。头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸药敏纸片为英国

Oxoid 公司产品。

**1.3 ESBLs 确证试验** AST-GN13 药敏卡通过 Vitek2-Compact 全自动微生物分析仪检测提示 ESBLs 阳性菌株均按 CLSI 推荐的方法,将 0.5 麦氏单位菌液均匀涂布 M-H 平板,将头孢噻肟(30 μg)和头孢噻肟/克拉维酸(30 μg/10 μg)、头孢他啶(30 μg)和头孢他啶/克拉维酸(30 μg/10 μg)黏贴在涂布菌液的 M-H 平板上,35 °C 培养 18 h,测量抑菌圈直径,两对纸片或其中任何一对纸片的直径相差大于或等于 5 mm,即为产 ESBLs 菌株。

**1.4 质控菌株** 阴沟肠杆菌 ATCC700323、ECO ATCC25922、ESBLs 阳性肺炎克雷伯菌 ATCC700603 购自卫生部临检中心。

**1.5 细菌生物膜半定量检测** 采用半定量结晶紫染色法,操作方法参照文献[2],略作改动。将菌液培养至对数期,用新鲜 M-H 培养液调节菌液浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/mL,接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,每株菌设 3 个复孔,37 °C 静止培养 48 h,24 h 换液 1 次。轻轻弃去上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS)(每孔 200 μL)轻柔的清洗 4 次,弃去上清液。每孔加入 Bouin'S 固定液 50 μL,固定 1 h,轻轻倒去液体,PBS 清洗 4 次。每孔加入 50 μL 结晶紫,染色 2 min,轻轻倒去液体。用自来水轻轻冲洗 96 孔板,直至阴性对照没有颜色,室温晾干,95%乙醇脱色。酶标仪测定  $A_{570}$ ,阴性对照组为 M-H 培养液。生物膜形成量判断标准:以阴性对照的平均  $A_{570}$  加标准差定义为  $A_c$ ,待测菌株 A 与  $A_c$  比较,将菌株生物膜形成能力分为 4 类:阴性(-): $A < A_c$ ;少量(1+): $A_c < A \leq 2 A_c$ ;中量(2+): $2 A_c < A \leq 4 A_c$ ;大量: $A > 4 A_c$ 。

**1.6 统计学处理** 采用 WHONET4.5 软件录入数据分析。采用 SPSS17.0 软件进行组间数据分析,计数资料以百分率表示,组间分析采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ECO 临床血液分离株的耐药性分析** 92 株 ECO 临床血液分离菌株中,产 ESBLs 菌株 53 株,占 57.61%,ESBLs 阴性菌株 39 株,占 42.39%。对 3 类以上抗菌药物耐药 ECO 73 株,占 79.35%,其中,产 ESBLs 菌株 52 株,占总菌株数的 56.52%,占产 ESBLs 菌株数的 98.11%。ECO 临床血液分离株对常用抗菌药物的耐药性,见表 1。

**2.2 ECO 临床血液分离株的生物被膜半定量检测结果** 96.74%的 ECO 临床血液分离株具有产生生物被膜能力,以产生中量生物被膜菌株比例最高(75.00%)。ECO 临床血液分离株产生生物被膜能力,见表 2。

表 1 临床血液分离 ECO 对常用抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	ECO (n=92)	ESBLs 阴性 ECO(n=39)	ESBLs 阳性 ECO(n=53)	P*
氨苄西林	94.57	87.18	100.00	0.478
头孢唑啉	71.74	35.90	98.11	0.000
氨苄西林/舒巴坦	67.39	46.15	83.02	0.000
环丙沙星	64.13	28.21	90.57	0.000
左氧氟沙星	61.96	25.64	88.68	0.000
头孢曲松	60.87	12.82	96.23	0.000
庆大霉素	55.43	43.59	64.15	0.130
氨基糖	34.78	2.56	58.49	0.000
头孢他啶	23.91	7.69	35.85	0.000
妥布霉素	16.30	7.69	22.64	0.000
头孢吡肟	15.22	0.00	26.42	0.000

续表 1 临床血液分离 ECO 对常用抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	ECO (n=92)	ESBLs 阴性 ECO(n=39)	ESBLs 阳性 ECO(n=53)	P*
呋喃妥因	4.35	2.56	5.66	0.533
头孢替坦	3.26	2.56	3.77	1.000
阿米卡星	2.17	0.00	3.77	0.804
厄他培南	2.17	0.00	3.77	1.000
哌拉西林/他唑巴坦	0.00	0.00	0.00	—
亚胺培南	0.00	0.00	0.00	—
多药耐药	79.35	53.85	98.11	0.000

\*:ESBLs 阳性菌株与 ESBLs 阴性菌株耐药率比较;—,表示无数据。

表 2 临床血液分离 ECO 生物被膜形成能力

产生物被膜	菌株数(n)	百分比(%)
阴性(-)	3	3.26
少量(1+)	11	11.96
中量(2+)	69	75.00
大量(3+)	9	9.78
阳性合计(+)	89	96.74

## 3 讨论

ESBLs 是由质粒介导的一类  $\beta$ -内酰胺酶,能水解含氧氨基的  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物,并可被  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂克拉维酸抑制。本研究结果显示,92 株 ECO 临床分离株检出产 ESBLs 菌株 53 株,占 57.61%,高于多篇文献报道的检出率<sup>[3-8]</sup>,ESBLs 的高检出率,给临床抗感染治疗带来很大压力和挑战,随着抗菌药物的不合理使用,ESBLs 菌株的检出率势必还将持续升高。92 株 ESBLs 菌株对亚胺培南、厄他培南、头孢替坦、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星和呋喃妥因较敏感,耐药率小于 10%,与 ESBLs 阴性菌株比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );对氨苄西林的耐药率达到 100%,而氨苄西林/舒巴坦的耐药率也达到 83.02%,头孢曲松和头孢唑啉的耐药率均大于 95%,氨基糖、头孢他啶和头孢吡肟的耐药率分别为 58.49%、35.85%和 26.42%,与 ESBLs 阴性菌株比较耐药率显著升高( $P < 0.05$ );按照 2008 年 CLSI M100-S18 标准,ESBLs 菌株所有  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物均应判定为耐药,自 2010 年 CLSI 对折点进行修正后,就提出不必常规进行 ESBLs 检验,2012 年 CLSI M100-S22 明确指出,采用更新后的折点,不必将头孢菌素类、青霉素类和氨基糖的耐药结果从敏感修正为耐药,实验室检测 ESBLs 主要用于流行病学调查和医院感染控制<sup>[9]</sup>。因此,新标准增加了这几类抗菌药物用于临床治疗肠杆菌科细菌的机会,虽然在临床治疗中还存在一定的争议。本研究结果提示,ESBLs 仍然是临床抗菌药物选择的一个不容忽视的限制性因素,临床若选择  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物治疗 ESBLs ECO 感染,则需根据 MIC 值慎重选择敏感抗菌药物,且承担治疗失败的风险加大。鉴于本院 ESBLs 的高检出率,仍然常规检测和报告 ESBLs,既不减少临床抗菌药物选择的机会,又提醒临床需慎重选择。氟喹诺酮类环丙沙星和左氧氟沙星对产 ESBLs 的 ECO 菌株耐药率均大于 85%,可能与 ESBLs 基因常与质粒介导喹诺酮耐药基因共存有关,在产 ESBLs 的 ECO 中,同时检测到 *qnr* 基因携带及 *gyrA* 基因和 *parC* 基因变异,而这些基因的存在和变异使得细菌对喹诺酮类药物高度

耐药<sup>[10]</sup>。氨基糖苷类妥布霉素和庆大霉素对 ESBLs 菌株的耐药率达到 22.64% 和 64.15%，而且由于氨基糖苷类的肝肾毒性，限制了该类药物在临床的应用，常常作为联合用药的一部分。本研究结果显示，产 ESBLs 的 ECO 呈现对青霉素类、头孢菌素类、氟喹诺酮类等多种药物的耐药性。ESBLs 阴性 ECO 菌株对大部分抗菌药物均有较高的敏感率，除氨苄西林外，检测的其余抗菌药物的敏感率均大于 50%。ESBLs 为质粒介导的可通过结合、转化、转导等方式在同种病原菌间甚至不同种病原菌间进行耐药性传播，携带 ESBLs 菌株可引起医院感染暴发流行。因此，规范抗菌药物的合理应用和监测 ESBLs 耐药菌的传播和流行应当作为医院感染控制的一个常规性工作。

有报道生物被膜菌与游离态细菌相比耐药性大幅度提高，生物被膜是细菌感染难以治愈和反复发作的重要原因<sup>[11]</sup>。本研究结果提示，96.74% 的 ECO 血液分离菌可以形成生物被膜，而形成被膜的量以中量居多，与文献报道相似<sup>[2]</sup>。ECO 被膜菌耐药性升高与 *rpoS* 基因的表达增加密切相关，而 *rpoS* 基因又调节一系列与生物被膜形成、黏附、增殖、成熟等各个阶段相关基因的表达，使得被膜菌对抗菌药物的耐药性增强<sup>[11]</sup>。传统的药敏试验测得的 MIC 是针对单个游离的细菌，据文献报导，采用被膜菌测得的最小杀菌浓度 (BIC) 与传统的 MIC 存在很大差异，两类药敏试验筛选出的敏感抗菌药物也存在很大差异，因此只以 MIC 指导临床抗菌药物的使用，对生物被膜菌的感染治疗难以达到满意的结果<sup>[12]</sup>。由于绝大多数 ECO 菌株均能形成生物被膜，在临床治疗相关感染若依据传统药敏结果疗效不佳时，选择生物被膜敏感的抗菌药物，以提高抗感染治疗的效果。

ECO 是目前临床血液标本最常见的分离菌株之一，作为机会致病菌，对 ECO 特别是 ESBLs 菌的感染重在预防。高龄、低免疫力和长期住院患者是 ESBLs 菌的易感对象，长期激素、放化疗和介入治疗是 ESBLs 菌感染的高危因素。因此，合理使用抗菌药物，减少激素的使用，加强医务人员无菌观念和严格的消毒隔离措施，及时更换或拔除各类导管和合理使用呼吸机等，均有利于预防和减少产 ESBLs 的 ECO 的感染和传播。

#### 参考文献:

[1] 茆海丰, 营丽娟, 赵勇, 等. 新生儿病房分离产 ESBLs 大

(上接第 3698 页)

- [5] 许兰平, 黄晓军, 刘开彦, 等. 异基因造血干细胞移植治疗骨髓增生异常综合征 30 例分析[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(8): 518.
- [6] 杜玮, 黄文杰. 异基因造血干细胞移植术后并特发性肺炎综合征 1 例并文献复习[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(4): 818.
- [7] O'Donnell MR, Long GD, Parker PM, et al. Busulfan/cyclophosphamide as conditioning regimen for allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplasia [J]. J Clin Oncol, 1995, 13(12): 2973.
- [8] 董陆佳, 叶根耀. 现代造血干细胞移植治疗学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 215-229, 244.

肠埃希菌的 TEM、SHV、CTX-M 基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(7): 1291-1294.

- [2] 刘晓峰, 迟秀文, 黄震, 等. 大肠埃希菌临床菌株生物被膜形成的分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(9): 1732-1734.
- [3] 余锡灿, 朱美英, 张筱蓉. ICU 产超广谱  $\beta$  内酰胺酶细菌医院感染危险因素及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(8): 1177-1179.
- [4] 吕卫东. 260 株大肠埃希菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(3): 568-569.
- [5] 孙衡, 沈继录, 熊自忠, 等. 临床血标本中产 ESBLs 大肠埃希菌耐药性检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(13): 2810-2812.
- [6] 穆海霞, 陈俊清, 吴容. 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶大肠埃希菌的耐药性和产酶因素分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(19): 4148-4150.
- [7] 蒋东香, 陈刚, 王玉春, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的临床分布与耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2): 371-373.
- [8] 陈汝昌, 王利健. 2006~2009 年重症监护病房医院感染大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(5): 1013-1015.
- [9] CLSI. M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement[S]. Wayne, PA: 2012.
- [10] 梁海军, 崔艳慧, 杨道坤. 产 ESBLs 大肠埃希菌耐药性分析及 *qnr*, *gyrA*, *parC* 基因变异的检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6): 1068-1071.
- [11] Ito A, Taniuchi A, May T, et al. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(12): 4093-4100.
- [12] Moskowicz SM, Foster JM, Emerson JC, et al. Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection [J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(9): 879-886.

(收稿日期: 2012-06-13 修回日期: 2012-09-12)

- [9] Choi S, Reddy P. Graft-versus-host disease[J]. Panminerva Med, 2010, 52(2): 111.
- [10] Xu LP, Huang XJ. Current status and development of hematopoietic stem cell transplantation in China; a report from Chinese Hematopoietic Stem Cell Transplantation Register Group[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(16): 2548.
- [11] 薛梅, 王恒湘, 闫洪敏, 等. 异基因造血干细胞移植治疗骨髓增生异常综合征 6 例报告[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(3): 719.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)