维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0269－03

下呼吸道感染的阴沟肠杆菌耐药性及基因型研究

叶跃红，吴　倩，陈维贤，李兴禄

(重庆医科大学第二临床学院检验科，重庆　400010)

【摘　要】目的：掌握我院下呼吸道医院感染阴沟肠杆菌(EC)耐药谱及分子流行病学特征，指导临床合理用药。方法：对 28 株阴沟肠杆菌进行药敏试验，并采用优化反应体系的随机多态 DNA 分型(RAPD)技术进行流行病学研究。结果：28 株阴沟肠杆菌被基因分型为 10 型，抗生素分型分为 18 型。结论：基因分型法显示 ICU 病房有多重耐药菌株 EC 株爆发流行现象；应加强微生物室的监测工作，为控制预防下呼吸道医院感染、追踪传染源、切断传播途径提供遗传学信息对临床医生选用敏感有效抗生素起指导作用。

【关键词】阴沟肠杆菌；医院感染；基因分型

【中国图书分类法分类号】R917　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－11－01

Drug resistance and genotyping of Enterobacter cloacae in lower respiratory tract infection

YE Yuehong, et al

(*Department of Clinical Laboratory, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the type of drug resistance spectrum and molecular biological characteristics of Enterobacter cloacae which infects lower respiratory tract in hospital. *Methods*: Drug resistance in 28 strains EC and optimal reaction system of RAPD were used to study their molecular epidemiology. *Results*: 28 strains EC were divided into 10 types by genotype, 18 types by resistance. *Conclusion*: Genotyping demonstrates the outbreak of multidrug resistant strains EC in ICU. This method is accurate, reliable and highly specific. It can not only provide genetic information for controlling, preventing hospital infection and tracing the infection source and the way of dissemination but also direct the clinical doctors to select sensitive antibiotics.

【Key words】Enterobacter cloacae; Hosptal infection; Genotype

阴沟肠杆菌(Enterobacter cloacae, EC)是一种重要的条件致病菌，随着抗生素的广泛应用和抗菌药物的不断开发，已成为院内感染越来越重要的病原体，并且因高度耐药性、多重耐药性及感染人群高死亡率而引起临床的重视[1]。为了让临床医生了解我院 EC 的感染流行病学特征及耐药性，监测其流行趋势，合理选择抗生素，本文以 2003 年 4 月至 2004 年 4 月从肺炎患者痰标本中分离出的 28 株 EC 为对象，测定其对临床常用 18 种抗生素的敏感性，并采用优化反应体系的随机多态 DNA 分型(RAPD)法对其进行分型研究。

1　材料与方法

作者介绍：叶跃红(1967－　)，女，主管技师，主要研究方向：细菌流行病学研究。

1.1　材料

1.1.1　菌株　试验菌株为我院 2003 年 4 月至 2004 年 4 月从肺炎患者痰标本中分离出来的 28 株 EC，分别编号为 1、2、3 到 28 号。质控参考菌株：ATCC13047。

1.1.2　药敏纸片　选择 18 种临床常用抗生素，分别为氨苄西林(AMP)、头孢唑啉(CFZ)、庆在霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、阿莫西林/克拉维酸(AUG)、哌拉西林/他唑巴坦(PTA)、头孢呋新(FRX)、头孢吡肟(FEP)、头孢西丁(CFX)、头孢噻肟(CTX)、头孢曲松(CRO)、亚胺培南(IMP)、哌拉西林(PIP)、复方新诺明(SXT)、环丙沙星(CIP)、氨曲南(ATM)、头孢他啶(CAZ)、呋喃妥因(NIT)，均购自北京天坛生物制药公司。

1.1.3　试剂和仪器　根据文献[2]合成引物 5'－AACTCGCCCC－3'，引物、dNTP、Taq DNA 聚合酶、PCR 反应配套试剂盒及 DNA Marker 均由 Sangon 公司提供。PCR 扩增仪：PE2400，凝胶成象系统：BioRad 公司。

1.2　方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 RAPD 分型 从哥伦比亚血琼脂平板上取适量菌落溶于 100μl 双蒸水中，100℃ 水浴 15min，置冰浴 5min，再离心 10000r/min20s，取上清备用。总体积 50μl，加入成分最终浓度：引物 2μmol/L，Mg^{2+} 4mmol/L，TaqDNA 聚合酶 3U，10×PCR 缓冲液 5μl，DNA 模板 10μl，dNTP2.5μl。94℃ 预变性 8min，然后 94℃ 变性 1min，38℃ 退火 1min，72℃ 延伸 1.5min，以此进行 40 个循环，72℃ 延伸 10min 后结束反应。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶（含溴化乙锭）中，电压 5V/cm，电泳 100min 后用凝胶成象仪观察结果。以每一分离物的所有可见带具有相同的移动距离定为同一型，带的形状移动的距离不同或所有可见带的移动距离相同但缺少两条带以上定为另一型[3,4]。

1.2.2 抗生素分型 药敏测定按美国实验室标准委员会（NCCL）推荐的纸片扩做法。药敏结果相同视为抗生素分型同一型。

2 结 果

2.1 药敏结果

28 株阴沟肠杆菌对 AMK 耐药率为 64.3%，敏感率为 25.6%，对其它抗生素药敏结果见表 1。所有菌株均对亚胺培南敏感，其抑菌环直径平均约为 25mm，提示亚胺培南对阴沟肠杆菌有很强的抗菌活性。

表 1 28 株阴沟肠杆菌药敏结果

抗生素	R(%)	I(%)	S(%)
氨苄西林	96.4	3.6	0
头孢唑啉	100.0	0	0
庆大霉素	92.3	7.7	0
阿米卡星	64.3	10.1	25.6
阿莫西林/克拉维酸	92.9	7.1	0
哌拉西林/他唑巴坦	21.4	11.4	67.2
头孢呋新	75.0	14.3	10.7
头孢吡肟	14.3	7.1	78.6
头孢西丁	96.4	3.6	0
头孢噻肟	81.1	7.7	14.2
头孢曲松	82.1	10.7	7.2
亚胺培南	0	0	100.0
哌拉西林	65.7	2.1	32.2
复方新诺明	46.4	3.6	50.0
环内沙星	58.8	6.5	34.7
氨曲南	64.3	14.3	21.4
头孢他啶	64.3	7.1	28.6
呋喃妥因	28.6	14.3	57.1

注：R 为耐药，I 为中介，S 为敏感。

2.2 基因分型结果

全部菌株均能产生指纹图谱，分型率 100%。28 株 EC 被分成 10 个基因型，结果见图 1。A 型有 6 株菌，分别为 6、10、13、20、25、27 号；B 型有 4 株菌，为 16、17、19、23 号；C 型有 3 株菌，为 9、14、15 号；D 型有 3 株菌，为 1、2、18 号；E 型有 3 株菌，为 11、21、26 号；F 型有 2 株菌，为 8、12 号；G 型有 2 株菌，为 3、28 号；H 型有 2 株菌，为 4、22 号；I 型有 2 株菌，为 5、24 号；7 号为 J 型。除头孢唑啉（CFZ）和亚胺培南（IMP）外，16 种抗生素的耐药情况与基因分型的关系见表 2。

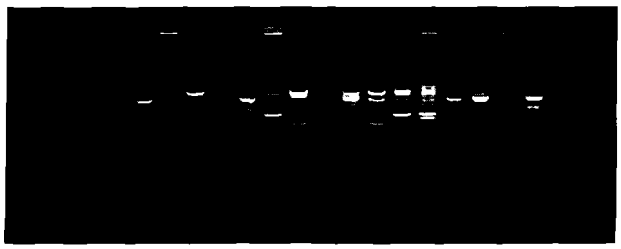


图 1 RAPD 对阴沟肠杆菌分型的结果

M：DNA 标准；A 型：6，10，13；B 型：16，17，19；C 型：9，14，15；D 型：1，2，8；E 型：11；F 型：8，12；G 型：3；H 型：4；I 型：5；J 型：7

注：1、2、3 等为编号。

3 讨 论

阴沟肠杆菌是肠杆菌属的一种。常存在于土壤、污水、蔬菜和牛乳品中，也存在于人和动物肠道中，通常是在机体抵抗力下降时，由位于人体肠道的正常菌群异位定殖或存在于周围环境中的细菌入侵引起菌群失调而感染，是条件致病菌之一。据我国 2002 年的全国医院感染监控网统计，阴沟肠杆菌在革兰氏阴性杆菌所致的感染中居第四位[5]。医院内感染严重威胁住院病人的身心健康和预后，也给卫生资源带来巨大的浪费，也是当前住院病人病死率增高的主要原因之一[6]。阴沟肠杆菌是产生诱导型头孢菌素酶的典型菌，它同时也产生超 β－内酰胺酶及去阻遏高产 AmpC 酶[7]，这可能是对 β－内酰胺类抗生素多重耐药的主要原因。阴沟肠杆菌耐药机制主要有外膜微孔蛋白的丢失或减少，青霉素结合蛋白的改变和 β－内酰胺酶的产生，尤以后者为主。

本研究所分离的阴沟肠杆菌主要分布于 ICU、呼吸内科、血液科等科室，这与这些科室普遍存在阴沟肠杆菌感染的危险因素有关。ICU 患者多有危重

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 不同基因型的阴沟肠杆菌药敏结果

分型	AMP	GEN	AMK	AUG	PTA	FRX	FEP	CFX	CT	CRO	PIP	SXT	CIP	ATM	CAZ	NTT
A	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S
B	R	R	R	R	S	I	S	R	S	R	R	R	I	S	S	I
C	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S
D	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E	R	R	I	R	R	R	S	R	R	I	R	S	S	R	R	S
F	R	I	R	R	S	R	S	R	I	R	S	S	R	S	R	R
G	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	S
H	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S
I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	S	I	I	R
J	I	R	S	R	S	R	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R

基础疾病，多行气管切开或机械通气等侵袭性诊疗操作，使阴沟肠杆菌感染易发生于 ICU，并可导致爆发流行。由表 1 可知，阴沟肠杆菌对 12 种抗菌药物的耐药率超过 50%，其中对头孢唑啉的耐药率最高(100%)，其次为氨苄西林和头孢西丁(96.4%)，阿莫西林/克拉维酸(92.9%)、庆大霉素(92.3%)、头孢曲松(82.1%)、头孢噻肟(81.1%)、头孢呋新(75.0%)，而亚胺培南、头孢吡肟、哌拉西林/他唑巴坦、呋喃妥因、环内沙星的敏感率分别为 100%、78.6%、67.2%、66.8%、57.1%。数据说明阴沟肠杆菌具高耐药率、高耐药水平及多重耐药的现象，这给临床抗感染治疗带来严峻的挑战。抗菌药物的使用是导致细菌耐药性产生的最基本诱因。因此，应加强抗菌药的管理，减少抗菌药的使用率及处方量，不宜盲目进行经验性治疗，应严密监测细菌学和耐药情况的变异。

临床上可选择：碳青霉烯类如亚胺培南杀菌效果最好，四代头孢菌素如头孢吡肟对 AmpC 酶的亲和力低，且能快速穿透细菌的外膜屏障，与 PBP 亲和力强，所以抗 AmpC 酶突变体的活性强于三代头孢菌素，可作为临床经验用药[8]。复合抗生素如哌拉西林/他唑巴坦也可作为经验用药加以选择。

本课题着重研究分析了 28 株阴沟肠杆菌的 RAPD 基因型及抗生素型。基因分型表明，医院感染株在同一科室内基因表型有集中现象。抗生素分型发现 ICU 病房有多重耐药株聚集，并与基因表型密切相关。我院 ICU 室 19 株多重耐药菌，其中 6 株为 A 型，4 株为 B 型，提示有多重耐药菌株在 ICU 病房爆发流行。同一克隆株在空间分布的集中趋势，表明存在通过某一尚未识别的共同传播源传播，追溯病例调查发现，5 名患者均表现为脑昏迷，且有使用过呼吸机或吸痰仪的病史。同一病房多重耐药菌株的流行，给患者的生命、经济造成巨大损失。

总之，阴沟肠杆菌对临床常用抗生素的耐药问题相当严重，在治疗该类细菌感染时，需根据药敏结果选药，避免滥用抗生素，以减少耐药菌株的产生。同时，在获得菌株时应及时进行 DNA 分析，对细菌的基因进行诊断，是最直接的诊断方法[9]，从遗传角度分析其同源性，必将在控制和预防医院感染、追踪传染源、切断传播途径等流行病学研究中发挥更大作用。

参 考 文 献

[1] 徐秀华. 临床医院感染学[M]. 长沙：湖南科学技术出版社，1998；48－58.

[2] 吴海寰，吕 波. 细菌随机扩增多态性 DNA 分析中随机引物的筛选与反应体系的优化[J]. 中华临床新医学，2002；2(4)：289－291.

[3] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990; 18(22): 6531.

[4] Welsh J, Mc Cleland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990; 18(24): 7213.

[5] 文细毛，任 南. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志，2002；12(4)：241－244.

[6] Pras nanth K. Badrinaths simplified phenotypic tests for indentification of acinetobacter SPP and their antimicrodial susceptibility status[J]. Med Microdiol, 2000; 49(6): 773－778.

[7] 汪 复. 抗菌药物临床应用新编[M]. 上海：上海医科大学出版社，1994；55－69.

[8] Xu Yingchun, Chen Minjun. Evaluation of the in anti－microbial activity of cefepime compared to other troad－spectrum β－lactams testd against recent clinical isolates from 10 Chinese hopital[J]. Diagn Microbial Infect Dis, 1999; 35: 135.

[9] 陈晓玲，吕晓菊. 101 株阴沟肠杆菌的耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志，2003；28(3)：147－149.