

· 论著 ·

基层医院门诊尿路感染优势菌株及其耐药特征

李雨晗¹ 余江峰¹ 金秀萍² 蒋锦琴³¹绍兴市中心医院医共体钱清分院,浙江绍兴 312030;²绍兴市柯桥区中医医院检验科,浙江绍兴 312030;³杭州医学院基础医学与法医学院 310053

通信作者:蒋锦琴,Email: 529061465@qq.com

【摘要】 目的 了解门诊疑似尿路感染患者中段尿病原菌的分布,分离的优势菌株大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)基因型及携带率。方法 收集 2017—2019 年绍兴市中心医院医共体钱清分院疑似尿路感染患者中段尿样本,并对其进行培养、分离,采用 VITEK 2 全自动微生物鉴定仪鉴定病原菌。纸片扩散法进行药敏试验,双纸片协同试验测定大肠埃希菌产 ESBL 情况,PCR 检测 ESBL 基因型及其携率。结果 1 529 例患者送检中段尿病原菌阳性 392 例,阳性率为 25.6%。分离到病原菌 424 株,革兰阴性菌、阳性菌和真菌分别占 70.3%、22.4%和 7.3%。大肠埃希菌最常见有 226 株,其中 44.7%(101 株)产 ELBL,产 ESBL 菌株 CTX-M 型和 TEM 型基因携带率分别为 87.1%和 70.3%。除亚胺培南和美罗培南,产 ESBL 大肠埃希菌对其余 18 种抗生素的耐药率明显高于非产 ESBL 菌株。结论 大肠埃希菌是本地区门诊尿路感染常见病原菌,其产 ESBL 率高、CTX-M 和 TEM 为主要携带基因型,亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星对大肠埃希菌敏感。

【关键词】 大肠杆菌;尿路感染;超广谱 β -内酰胺酶;耐药性

基金项目:浙江省医学创新学科建设计划(2015-13)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20200111-00010

Dominant strains of urinary tract infection and the drug resistance among outpatients in primary hospitals

Li Yuhang¹, Yu Jiangfeng¹, Jin Xiuping², Jiang Jinqin³¹Shaoxing Central Hospital Medical Community Qianqing Branch, Shaoxing 312030, Zhejiang, China; ²Clinical Laboratory, Keqiao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shaoxing 312030, Zhejiang, China; ³School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China

Corresponding author: Jiang Jinqin, Email: 529061465@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of pathogens in midstream urine samples collected from patients with suspected urinary tract infection (UTI) in outpatient department, the genotype and carrying rate of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) gene in dominant strains of *E. coli*, and the difference of resistance to antibiotics between producing and non-producing ESBL *E. coli*. **Methods** Midstream urine samples were collected from patients with suspected UTI in Shaoxing Central Hospital Medical Community Qianqing Branch during 2017 and 2019. Pathogens were cultured and isolated, and then were identified by VITEK2 Compact automatic bacteria analyzer. The drug sensitivity to antibiotics and ESBL production of *E. coli* isolates were detected by disk diffusion method and double disk synergy test, respectively. PCR was used to detect ESBL related genes and carrying rate. **Results** In 1 529 UTI patients, 392 cases were positive for pathogens in midstream urine with the positive rate of 25.6%. A total of 424 strains were isolated, among which gram-negative bacteria, gram-positive bacteria and fungi accounted for 70.3%, 22.4% and 7.3%, respectively. *E. coli* was the predominant bacteria (226 isolates), of which 101 (44.7%) isolates produced ESBL. The genotypes of ESBL-producing *E. coli* isolates were mainly CTX-M (87.1%) and TEM (70.3%). The resistance rates of ESBL-producing *E. coli* isolates to 18 antibiotics except imipenem and meropenem were significantly higher than those of non-ESBL-producing isolates. **Conclusions** *E. coli* is the major pathogen of UTI in this region. The detection rate of ESBL-producing *E. coli* isolates is high. CTX-M and TEM are the main encoding genotypes of ESBL. Imipenem, meropenem, cefoperazone/sulbactam, piperacillin/tazobactam and amikacin are sensitive for *E. coli*.

[Key words] *Escherichia coli*; Urinary tract infection; Extended-spectrum β -lactamase; Drug resistance

Fund program: Medical Innovation Discipline Construction Plan of Zhejiang Province (2015-13)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200111-00010

尿路感染是由于各种病原微生物感染所引起的尿路急、慢性炎症^[1]。随着人口老龄化,高龄、伴有糖尿病和心脑血管疾病等基础疾病、长期卧床等增加人群尿路感染机会^[2-3]。目前,基层医院首诊治疗尿路感染时多采用经验性抗菌药物治疗,且门诊患者依从性较差常导致治疗不合理或不彻底,造成细菌耐药性增加,因此了解基层医院门诊患者尿路感染病原菌的分布及耐药性,对防控感染和合理应用抗菌药物有重要意义^[4]。本研究对近几年基层门诊分离的尿路感染病原菌进行分析,以期为基础合理应用抗菌药物提供依据。

材料与方 法

一、菌株来源

收集 2017—2019 年绍兴市中心医院医共体钱清分院门诊就诊的 1 529 例疑似尿路感染患者送检的中段尿样本,严格按照全国临床检验操作规程(第 4 版)留取及接种样本,进行培养、分离、鉴定和药敏分析,剔除同一患者的重复菌株。细菌性尿路感染诊断标准:清洁中段尿细菌定量培养革兰阴性菌 $\geq 10^5$ CFU/mL、革兰阳性菌 $\geq 10^4$ CFU/mL。大肠埃希菌标准菌株 ATCC29522 购自中国食品药品检定研究院。肺炎克雷伯菌超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)阳性(产 SHV-12)ATCC700603 由浙江大学病原生物系提供。

二、菌株的分离鉴定及药敏试验

VITEK 2 Compact 微生物鉴定仪、GN、GP、YST、ANC 细菌鉴定卡及培养基均为法国生物梅里埃公司生产。大肠埃希菌药敏试验采用 K-B 纸片法,在 MH 琼脂平板上进行。K-B 纸片、MH 琼脂平板购于杭州天和微生物试剂有限公司。采用 2015 年 CLSI 的标准判断药敏试验结果。

三、ESBL 表型确认

采用 2015 年 CLSI 推荐的 ESBL 纸片筛选法和

酶抑制剂增强试验,即使用每片含 30 μ g 头孢他啶、头孢噻肟纸片和头孢他啶-克拉维酸、头孢噻肟-克拉维酸复合剂纸片(英国 OXOID 公司)进行试验,当任何一种复合剂纸片抑菌圈直径大于等于其单独药敏纸片抑菌圈直径 5 mm,可确证该菌株产 ESBL。以肺炎克雷伯菌 ATCC700603 为 ESBL 阳性质控菌株。

四、ESBL 基因型检测

细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa 公司)提取产 ESBL 大肠埃希菌基因组 DNA,紫外分光光度法测定其浓度和纯度。根据参考文献[5]扩增大肠埃希菌 ESBL 基因(KPC、TEM、CTX-M 和 SHV)的引物序列^[6],委托 Invitrogen 公司合成各引物。采用高保真 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)扩增上述目的基因片段。PCR 反应总体积 100 μ L,内含 2.5 mol/L dNTP、200 nmol/L 各引物、20 mol/L MgCl₂、2.5 U EX-Taq DNA 聚合酶、100 ng DNA 模板和 1 \times PCR 缓冲液(pH8.3)。PCR 参数:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、52 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 120 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。采用溴乙锭预染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

五、统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件对相关数据进行统计学分析处理,耐药率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、尿路感染病原菌分布

1 529 例疑似尿路感染患者送检中段尿,其中病原阳性 392 例,阳性率为 25.6%。多为单一病原体感染,16 例为 2 种病原体混合感染,共分离到病原菌 424 株,病原菌分布见表 1。革兰阴性菌 298 株(70.3%),以大肠埃希菌最为常见(226 株,占 53.3%);革兰阳性菌 95 株(22.4%),以粪肠球菌最

表 1 2017—2019 年绍兴市中心医院门诊患者尿路感染病原菌分布 (n=424)

菌株类型	菌株数(株)	构成比(%)
革兰阴性菌	298	70.3
大肠埃希菌	226	53.3
铜绿假单胞菌	19	4.5
鲍曼不动杆菌	11	2.6
阴沟肠杆菌	10	2.3
弗氏柠檬酸杆菌	9	2.1
肺炎克雷伯菌	7	1.7
奇异变形杆菌	7	1.7
沙雷菌属	4	0.9
其他	5	1.2
革兰阳性菌	95	22.4
粪肠球菌	38	9.0
屎肠球菌	16	3.8
表皮葡萄球菌	15	3.5
溶血葡萄球菌	11	2.6
金黄色葡萄球菌	7	1.7
其他葡萄球菌	4	0.9
其他	4	0.9
真菌	31	7.3
白假丝酵母菌	14	3.3
光滑假丝酵母菌	8	1.9
克柔假丝酵母菌	4	0.9
热带假丝酵母菌	2	0.5
其他	3	0.7

为常见;真菌 31 株(7.3%),以白假丝酵母菌为主。

二、产 ESBL 大肠埃希菌检出率及耐药基因分布

226 株大肠埃希菌中 101 株(44.7%)产 ESBL,其中 2017 年、2018 年和 2019 年分离的大肠埃希菌产 ESBL 率分别为 42.5%(31/73)、45.6%(36/79)和 45.9%(34/74)。

101 株产 ESBL 大肠埃希菌分别有 71 株(70.3%)携带 TEM、88 株(87.1%)携带 CTX-M、10 株(9.9%)携带 SHV 和 1 株(1.0%)携带 KPC 基因。其中 65 株(64.4%)同时携带 ≥2 种 ESBL 基因,包括 59 株(58.4%)同时携带 TEM 和 CTX-M,2 株(2.0%)同时携带 CTX-M 和 SHV,4 株(4.0%)同时携带 TEM、CTX-M 和 SHV。

三、大肠埃希菌药敏结果

表 2 可见,大肠埃希菌临床菌株对氨苄西林和哌拉西林的耐药率均超过 80%,头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、美罗培南和阿米卡星的耐药率均低于 5%。除亚胺培南和美罗培南,其余 18 种抗生素对产 ESBL 大肠埃希菌耐药率均明显高于非产 ESBL 菌株(P<0.05)。产 ESBL 株对氨

表 2 2017—2019 年绍兴市中心医院门诊患者尿路感染大肠埃希菌对常用抗菌药物的耐药情况[株(%)]

抗菌药物	产 ESBL 大肠埃希菌(n=101)	非产 ESBL 大肠埃希菌(n=125)	合计(n=226)
氨苄西林	99(98.0) ^a	93(74.4)	192(85.0)
哌拉西林	96(95.0) ^a	88(70.4)	184(81.4)
阿莫西林/克拉维酸	24(23.8) ^a	16(12.8)	40(17.7)
头孢哌酮/舒巴坦	8(7.9) ^a	3(2.4)	11(4.9)
氨苄西林/舒巴坦	66(65.3) ^a	29(23.2)	95(42.0)
哌拉西林/他唑巴坦	9(8.9) ^a	2(1.6)	11(4.9)
头孢哌酮	91(90.1) ^a	7(5.6)	98(43.4)
头孢他啶	45(44.6) ^a	8(6.4)	53(23.5)
头孢曲松	97(96.0) ^a	38(30.4)	135(59.7)
头孢噻肟	99(98.0) ^a	12(9.6)	111(49.1)
头孢西丁	19(18.8) ^a	12(9.6)	31(13.7)
氨基南	63(62.4) ^a	7(5.6)	70(31.0)
亚胺培南	1(1.0)	2(1.6)	3(1.3)
美罗培南	1(1.0)	2(1.6)	3(1.3)
阿米卡星	8(7.9) ^a	3(2.4)	11(4.9)
庆大霉素	59(58.4) ^a	45(36.0)	104(46.0)
妥布霉素	30(29.7) ^a	12(9.6)	42(18.6)
环丙沙星	73(72.3) ^a	52(41.6)	125(55.3)
左氧氟沙星	74(73.3) ^a	49(39.2)	123(54.4)
复方磺胺甲噁唑	72(71.3) ^a	63(50.4)	135(59.7)

注:ESBL:超广谱 β-内酰胺酶;与非产 ESBL 菌株耐药率比较,^aP<0.05

苄西林、哌拉西林、头孢哌酮、头孢曲松和头孢噻肟的耐药率均超过 90%，氨苄西林/舒巴坦、氨曲南、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星和复方磺胺甲噁唑耐药率也较高，为 58.4%~73.3%；产 ESBL 株对头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星较敏感，耐药率均小于 10%；非产 ESBL 大肠埃希菌除了对氨苄西林和哌拉西林的耐药率较高分别为 74.4% 和 70.4% 外，对头孢曲松、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星和复方磺胺甲噁唑也有 30.4%~50.3% 的耐药率，对其余抗生素则较敏感。

讨 论

本研究分析了绍兴市人民医院医共体钱清分院近三年门诊收治的疑似尿路感染患者中段尿病原菌分布，发现感染率为 25.6%，革兰阴性菌占 70.3%，此结果低于蔡辉等^[6]报道的感染率(29.9%) 和革兰阴性菌(76.5%)，可能与本研究样本来源于社区门诊而蔡辉等报道样本来源于住院患者有关。本文发现尿路感染最常见的病原菌是大肠埃希菌，与多数报道一致^[7-8]。ESBL 是一种通过细菌质粒介导从而水解青霉素、第三代头孢菌素、头霉素和硫霉素等抗菌药物的酶，全球已有超过 700 多种 ESBL 基因型，本地区主要包含 CTX-M、TEM 和 SHV 等^[9-10]。本研究分离的 226 株大肠埃希菌临床菌株，44.7% 为产 ESBL 株，与省内卢滔等^[4]报道的县级医院社区发作血流感染大肠埃希菌 ESBL 的检出率 41.3% 接近，但低于高家林等^[11]报道的皖南地区中老年糖尿病合并尿路感染患者分离大肠埃希菌 ESBL 的检出率 55.89%，可能质粒传导的 ESBL 耐药机制存在地区性差异，也可能本研究部分患者不伴基础疾病。另外，本文显示产 ESBL 大肠埃希菌 CTX-M 和 TEM 检出率分别为 87.1% 和 70.3%，64.4% 菌株同时携带 2 种或以上 ESBL 基因。

药敏试验结果显示，产 ESBL 株对大多数抗菌药物的耐药率均高于非产 ESBL 株。产 ESBL 大肠埃希菌对头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、美罗培南和阿米卡星的耐药率均 < 10%，此

结果与省内其他县区级医院的报道一致^[4,12]。本研究中 4 种三代头孢菌素(头孢哌酮、头孢他啶、头孢曲松和头孢噻肟)耐药率较高，特别是产 ESBL 株对头孢哌酮、头孢曲松和头孢噻肟几乎全部耐药，属于酶对药物产生的钝化作用。头孢西丁作为一种头孢霉素衍生物，与头孢菌素不同之处在于其 β -内酰胺环 7 号位上含有一个甲氧基。这种结构上的差异使头孢西丁在耐受革兰阴性菌所产 ESBL 的降解作用方面与现有的头孢菌素衍生物不同，也就是酶对头孢西丁几乎不起钝化作用，本文中头孢西丁总耐药率仅为 13.7%，但产 ESBL 株的耐药率还是明显高于非产 ESBL 株，可能存在其他耐药机制。

综上所述，基层医院尿路感染最常见病原体是大肠埃希菌，本地区大肠埃希菌产 ESBL 率高，编码基因主要是 CTX-M 和 TEM，且常见 2 种基因同时携带，亚胺培南、美罗培南等碳青霉烯类、头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦等复合制剂、阿米卡星等对产 ESBL 大肠埃希菌有较好的抗菌活性，除头孢西丁外产酶菌株对三代头孢菌素几乎全部耐药，建议临床根据药敏结果用药。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 宋凌云, 童宗武. 单纯性尿路感染的诊治进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18 (5): 457-458, 464. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2017.05.030.
Song LY, Tong ZW. Progress in diagnosis and treatment of simple urinary tract infection [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2017, 18 (5): 457-458, 464. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2017.05.030.
- [2] 王丹丽, 简桂花, 汪年松. 糖尿病合并尿路感染的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17 (10): 927-929. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2016.10.032.
Wang DL, Jian GH, Wang NS. Progress in diabetic urinary tract infection [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2016, 17 (10): 927-929. DOI: 10.3969/j.issn.1009-587X.2016.10.032.
- [3] 董雪, 李婷, 赵琪珩. 社区居家长期卧床老年患者主要照顾者对尿路感染认知的调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28 (10): 1577-1580. DOI: 10.11816/en.ni.2018-180001.
Dong X, Li T, Zhao QH. Main caregivers' cognition about urinary tract infections in long-bedridden geriatric patients in communities [J]. Chin J Nosocomiol, 2018, 28 (10): 1577-1580. DOI:

- 10.11816/cn.ni.2018-180001.
- [4] 卢滔, 全晶晶, 王燕飞, 等. 浙江省县市级医院社区发作大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌血流感染患者产超广谱 β -内酰胺酶情况分析[J]. 中华传染病杂志, 2017, 35(4): 198-202. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2017.04.003.
- Lu T, Quan JJ, Wang YF, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-onset bloodstream infections from county hospitals of Zhejiang Province[J]. Chin J Infect Dis, 2017, 35(4): 198-202. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2017.04.003.
- [5] 王银环, 葛玉梅, 孙爱华, 等. β -内酰胺抗生素诱导大肠埃希菌 ESBLs 基因表达及其抑制机制[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34(2): 83-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2014.02.001.
- Wang YH, Ge YM, Sun AH, et al. The expression of ESBLs genes in *Escherichia coli* isolates induced by β -lactam antibiotics and inhibited by histidine kinase inhibitors[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2014, 34(2): 83-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2014.02.001.
- [6] 蔡辉, 张肖, 陆峰泉, 等. 1 151 例中段尿培养病原菌构成与耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(1): 38-42. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7708.2015.01.010.
- Cai H, Zhang X, Lu FQ, et al. Pathogens from 1 151 cases of urine culture and their antibiotic resistance profile[J]. Chin J Infect Chemother, 2015, 15(1): 38-42. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7708.2015.01.010.
- [7] 贺文芳, 周磊, 张鹏亮, 等. 10 年间尿路感染病原谱及其耐药率变迁分析[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(9): 1327-1330, 1335. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2019.09.015.
- He WF, Zhou L, Zhang PL, et al. Analysis of pathogens and drug resistance change in urinary tract infection in 10 years [J]. J Mod Med Health, 2019, 35(9): 1327-1330, 1335. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2019.09.015.
- [8] 张文婧, 王佳贺. 老年患者尿路感染产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J]. 中国医药导报, 2019, 16(21): 172-176.
- Zhang WJ, Wang JH. Antibiotic resistance analysis of ESBLs-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in urinary tract infections in elderly patients [J]. China Medical Herald, 2019, 16(21): 172-176.
- [9] 刘保光, 汪保英, 栗俞程, 等. 肺炎克雷伯菌产 CTX-M-14 型超广谱 β -内酰胺酶的基因环境研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(10): 950-956. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.121.
- Liu BG, Wang BY, Li YC, et al. Gene environmental structure of CTX-M-14 type ESBL gene produced by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(10): 950-956. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.121.
- [10] 陈祚江, 吴庆, 徐春泉, 等. 大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶的基因分布和流行特性[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(2): 106-110. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2015.02.013.
- Chen LJ, Wu Q, Xu CQ, et al. Gene distribution and epidemic characteristics of β -lactamase in *Escherichia coli* [J]. Chin J Infect Dis, 2015, 33(2): 106-110. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2015.02.013.
- [11] 高家林, 张魏, 刘春生, 等. 皖南地区 1831 例中老年糖尿病合并尿路感染病原菌分布、耐药情况及治疗对策[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(6): 678-683.
- Gao JL, Zhang W, Liu CS, et al. Epidemiology and antimicrobial resistance profiles of pathogens causing urinary tract infections (1831 cases) and treatment analysis in middle and aged people with diabetes mellitus in southern Anhui province [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2016, 21(6): 678-683.
- [12] 方敏, 卢滔, 彭春仙, 等. 衢州地区社区获得性大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌血流感染患者产超广谱 β -内酰胺酶流行情况及危险因素分析[J]. 中华传染病杂志, 2019, 37(3): 167-170. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2019.03.008.
- Fang M, Lu T, Peng CX, et al. Prevalence and risk factor analysis of ultra broad spectrum β -lactamase production in patients with community-acquired *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in Quzhou area [J]. Chin J Infect Dis, 2019, 37(3): 167-170. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2019.03.008.

(收稿日期: 2020-01-11)