

## 产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌对常用消毒剂抵抗性研究

徐和平<sup>1</sup>, 卓 卫<sup>1</sup>, 邹明祥<sup>2</sup>

(1 福建医科大学附属厦门市第一医院思明分院, 福建 厦门 361003; 2 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

**[摘要]** **目的** 探讨产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌(以下简称肺炎克雷伯菌双阳性菌株)对医院常用消毒剂的抵抗性, 为控制其在医院内传播提供实验依据。**方法** 用 75% 乙醇、2% 戊二醛、500 mg/L 有效氯的健之素、安尔碘 4 种消毒剂对肺炎克雷伯菌进行悬液定量杀菌试验和生物被膜片杀灭试验, 分别计算杀灭率。**结果** 在悬液定量杀菌试验中, 作用 1 min 和 3 min 时, 4 种消毒剂对肺炎克雷伯菌双阳性菌株的杀灭率较肺炎克雷伯菌双阴性菌株分别低 5.0%~10.0%、0.5%~3.5%, 但在作用 5 min 和 10 min 时的杀灭率均  $\geq 99\%$ 。在生物被膜片杀菌效果与浮游菌的悬液定量杀菌效果对比中, 肺炎克雷伯菌双阳性菌株在作用 1 min 时, 4 种消毒剂在前者中的杀菌率比后者低 10.0%~15.0%; 作用 5 min 时, 低 5.5%~19.0%; 作用 10 min 时, 低 0.1%~5.5%; 作用 30 min, 杀菌率均  $\geq 99\%$ 。**结论** 作用时间短时, 产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌对消毒剂的耐受性比 ESBLs 和 AmpC 酶阴性肺炎克雷伯菌明显较强; 延长作用时间, 常用消毒剂完全可以杀灭产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌。

**[关键词]** 肺炎克雷伯菌; 超广谱  $\beta$ -内酰胺酶; AmpC 酶; 消毒剂; 抗药性; 微生物

**[中图分类号]** R378.99+6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)06-0397-04

Resistance of ESBLs and AmpC-producing *Klebsiella pneumoniae* to commonly used disinfectants

XU He-ping<sup>1</sup>, ZHUO Wei<sup>1</sup>, ZOU Ming-xiang<sup>2</sup> (1 The First Hospital of Xiamen, Fujian Medical University, Xiamen 361003, China; 2 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore resistance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLs) and AmpC-producing *Klebsiella pneumoniae* (double positive *K. pneumoniae*) to commonly used disinfectants, so as to provide reference for the control of bacterial transmission. **Methods** Four different disinfectants: 75% ethanol, 2% glutaraldehyde, 500 mg/L available chlorine solution and compound iodine solution were used to test their efficacy on *K. pneumoniae* with suspension quantitative germicidal test and biofilm germicidal test, the killing rates of each disinfectant was calculated. **Results** In suspension quantitative germicidal test, the killing rate of 4 kinds of disinfectants to the double positive strains was 5.0% - 10.0%, 0.5% - 3.5% lower than the double negative strains with a 1min and 3 min contact time respectively, the killing rates were all  $\geq 99\%$  with a 5min and 10 min contact time. The killing rate of 4 kinds of disinfectants to double positive strains in biofilm germicidal test was 10.0% - 15.0%, 5.5% - 19.0% and 0.1% - 5.5% lower than that in suspension quantitative germicidal test with a 1 min, 5min and 10 min contact time respectively, the killing rates were all  $\geq 99\%$  with a 30 min contact time. **Conclusion** When contact time is short, the resistance of ESBLs and AmpC-producing *K. pneumoniae* to disinfectants are stronger than non-ESBLs and non-AmpC-producing *K. pneumoniae*; when contact time is prolonged, commonly used disinfectants can kill ESBLs and AmpC-producing *K. pneumoniae*.

**[Key words]** *Klebsiella pneumoniae*; extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; AmpC; disinfectant; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2009, 8(6): 397-399, 402]

[收稿日期] 2009-04-29

[作者简介] 徐和平(1972-), 男(汉族), 湖南省浏阳市人, 主管技师, 主要从事临床微生物检验和医院感染监控检测研究。

[通讯作者] 邹明祥 E-mail: zoumingxiang@126.com

肺炎克雷伯菌是医院感染常见病原菌,除引起典型的原发性肺炎外,还可以引起各种肺外感染,如婴幼儿肠炎、脑膜炎、成人医源性泌尿道感染以及外伤感染和菌血症。由于广谱抗菌药物的广泛使用,由质粒介导的产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)和持续高水平表达 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌已在临床经常出现<sup>[1-3]</sup>。肺炎克雷伯菌常为黏液型菌落,易在生物体表面形成生物被膜(biofilm, BF),更易导致抗感染治疗失败,引起医院内的暴发流行。本研究探讨常用消毒剂对产 ESBLs 和 AmpC 酶双阳性肺炎克雷伯菌的杀灭作用,有助于控制肺炎克雷伯菌在医院内的感染及其流行。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 肺炎克雷伯菌为本院临床分离株,经法国生物梅里埃 VITEK-32 鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603(ESBLs 阳性株)、阴沟肠杆菌 OM29(AmpC 酶阳性株),由厦门大学附属厦门中山医院检验科微生物室惠赠。

1.1.2 试剂 消毒剂:75%乙醇(福建莆田市医药乙醇有限公司),2%戊二醛(上海利康消毒高科技有限公司),500 mg/L 有效氯的健之素(北京健之素医药科技有限公司),含有效碘 0.2%、醋酸氯己定 0.45%、乙醇 65%的安尔碘(上海利康消毒高科技有限公司)。中和剂:按有关文献配制不同的中和剂<sup>[4]</sup>,75%乙醇的中和剂为 1%卵磷脂 + 1%吐温 - 80 PBS,2%戊二醛的中和剂为 0.5%甘氨酸 + 1%卵磷脂 + 1%吐温 - 80 PBS,健之素和安尔碘的中和剂为 0.5%硫代硫酸钠 + 1%卵磷脂 + 1%吐温 - 80 PBS,中和剂为自备。

1.1.3 其他材料 药敏纸片和培养基为英国 OX-ROID 公司产品,医用硅胶片为北京医用硅胶膜研究所产品。

### 1.2 方法

1.2.1 ESBLs 和 AmpC 酶的检测 采用美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准,按文献改良方法<sup>[5]</sup>进行。选择 ESBLs 和 AmpC 酶双阳性的菌株(以下简称双阳性菌株)以及 ESBLs 和 AmpC 酶双阴性的菌株(以下简称双阴性菌株)进行实验。

1.2.2 菌悬液的制备 将上述双阳性菌株和双阴性菌株的新鲜培养物用 pH 7.2 的 0.03 mol/L PBS 制成含菌量  $10^8$  CFU/mL 的菌悬液备用。

1.2.3 生物被膜制备 按文献改良方法<sup>[6-7]</sup>进行。将双阳性菌株在血平板上传代 2 次,取典型菌落接种至胰蛋白胨大豆肉汤中培养 24 h,用 0.03 mol/L PBS 调制成含菌量约  $10^8$  CFU/mL 的菌悬液。将医用硅胶膜制成直径为 8 mm 的圆片,高压灭菌后平铺在营养琼脂平板上,然后在膜上加入 20  $\mu$ L 上述菌悬液,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,制成生物被膜片,再将膜片转移至胰蛋白胨大豆肉汤培养基中,培养 5 d,备用。

1.2.4 悬液定量杀菌试验 分别取上述双阳性和双阴性菌株各 1.0 mL 菌悬液,加入 9.0 mL 不同的消毒剂中,空白对照为 0.03 mol/L PBS,混匀作用至预定的时间(分别作用 1、3、5 和 10 min)。取出 1.0 mL 加入 9.0 mL 含相应中和剂的试管内,中和 10 min,敲打均匀后取 1 mL 接种于直径 15 cm 平板,倾注营养琼脂,于 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后计算菌落数,与空白对照组比较,计算杀灭率。为便于菌落计数,在倾注营养琼脂前,分别再作原倍、10 倍、100 倍稀释。每组重复 3 次,取平均值。

1.2.5 生物被膜杀灭试验 取培养 5 d 的生物被膜片,用无菌生理盐水冲洗表面游离菌,每一张膜分别用 5 mL 消毒剂作用预定的时间(分别作用 1、5、10、30、60 和 90 min),0.03 mol/L PBS 作对照。取出膜片,移入装有 5 mL 相应中和剂的试管内,中和 10 min,将膜片研磨以完全释放其中的细菌,取该洗脱液 1 mL 倾注营养琼脂,于 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后计算菌落数,与空白对照组比较,计算杀灭率。为便于菌落计数,在倾注营养琼脂前,分别再作原倍、10 倍、100 倍稀释。每组重复 3 次,取平均值。

## 2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌的杀灭率 悬液定量杀菌试验中双阳性菌株和双阴性菌株的空白对照菌落数分别为  $1.50 \times 10^7$  CFU/mL、 $1.85 \times 10^7$  CFU/mL;使用消毒剂后的平均杀灭率见表 1。双阳性菌株生物被膜每膜片含菌量为  $2.55 \times 10^8$  CFU/片,其杀灭试验结果见表 2。

表 1 悬液定量杀菌试验中肺炎克雷伯菌的杀灭效果(杀灭率,%)

Table 1 Efficacy of disinfectants on killing *K. pneumonia* in suspension quantitative germicidal test (germicidal rate,%)

消毒剂	双阳性菌株(作用时间,min)				双阴性菌株(作用时间,min)			
	1	3	5	10	1	3	5	10
75%乙醇	80.00	95.00	99.00	100.00	90.00	98.50	99.00	100.00
2%戊二醛	90.00	99.00	100.00	100.00	97.00	99.90	100.00	100.00
500 mg/L 健之素	84.00	97.00	99.50	100.00	91.00	98.50	99.50	100.00
安尔碘	86.00	98.50	100.00	100.00	91.00	99.00	100.00	100.00

表 2 生物被膜片杀菌法对产 ESBLs 和 AmpC 酶的肺炎克雷伯菌的杀灭效果(杀灭率,%)

Table 2 Effects of biofilm germicidal test on killing ESBLs and AmpC-producing *K. pneumoniae* (germicidal rate,%)

作用时间(min)	75%乙醇	2%戊二醛	500 mg/L 健之素	安尔碘
1	65.00	80.00	70.00	75.00
5	80.00	94.50	90.00	91.00
10	95.00	99.90	94.50	95.50
30	99.50	100.00	99.94	99.99
60	99.99	100.00	100.00	100.00
90	100.00	100.00	100.00	100.00

在悬液定量杀菌试验中,肺炎克雷伯菌双阳性菌株与双阴性菌株对比分析,在作用 1 min 时,4 种消毒剂对前者的杀灭率较后者低 5.0%~10.0%;作用 3 min 时,4 种消毒剂对前者的杀灭率较后者低 0.5%~3.5%;但在作用 5 min 和 10 min 时杀灭率均达到了 99% 以上。在生物被膜片杀菌效果与浮游菌的悬液定量杀菌效果对比中,肺炎克雷伯菌双阳性菌株在作用 1 min 时,4 种消毒剂在生物膜片试验中的杀菌率比悬液定量试验中的杀菌率低 10.0%~15.0%;作用 5 min 时,低 5.5%~19.0%;作用 10 min 时,低 0.1%~5.5%;当作用到 30 min 后,均达到了 99% 以上。

2.2 4 种消毒剂对肺炎克雷伯菌双阳性菌株在 2 种杀灭方式中的效果对比 在作用时间短时(<5 min),戊二醛对肺炎克雷伯菌双阳性菌株的杀灭率比乙醇高 4.0%~15.0%,比健之素高 2.0%~10.0%,比安尔碘高 0.5%~5.0%;当延长作用时间时(>10 min),戊二醛组与乙醇、健之素和安尔碘组比较,杀灭率差异<5%。

### 3 讨论

ESBLs 和 AmpC 酶是肺炎克雷伯菌常见的 β-内酰胺酶,并且这 2 种酶均可由质粒介导,通过接合、转化和转导等方式在细菌种属之间进行传递,导

致耐药现象扩散,引起严重的医院感染。阻断这种产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌在医院内扩散,除根据药敏结果积极治疗感染(传染源)外,切断传播途径尤为重要。在切断传播途径的措施中,必须采用正确的消毒剂来处理可能被其污染的医护人员手、桌面和医疗器械等媒介。因此,选用正确的消毒剂和作用时间十分重要。根据文献报道<sup>[8]</sup>,ESBLs 和 AmpC 酶阳性菌株中的质粒往往携带有耐消毒剂基因 *qacE Δ1-sull*,导致细菌在一定的时间内(10 min)对消毒剂的抗性明显增强。本研究结果证明,在悬液定量杀菌试验中,产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌与不产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌相比,对消毒剂的耐受性明显增强,与有关文献报道<sup>[9]</sup>相似。

黏液型的肺炎克雷伯菌由于产生荚膜,可依靠荚膜多糖和细菌分泌的黏附分子在物体表面形成生物被膜结构,导致患者迁延不愈。生物被膜中细菌抵抗力增强,一方面是由于生物膜本身具有物理屏障作用,黏附液体基质包围在生物被膜表面阻止杀菌物质进入;另一方面是生物被膜内部细菌代谢缓慢,对抗菌物质敏感性降低,而且代谢产物的积聚对许多药物有拮抗作用。此外,细菌可通过信号转导系统彼此协同,调整菌体数量,共同应对外界环境的异常变化。本研究显示,肺炎克雷伯菌生物膜片对消毒剂的抵抗力与浮游菌悬液定量杀菌试验对比,其耐受时间明显增加,其结果与相关报道<sup>[10-12]</sup>一致。

4 种消毒剂对产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌在短时间的的作用效果对比中,以戊二醛效果最好。但延长作用时间,这 4 种消毒剂对产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌作用效果相同,都完全可以将其杀灭。所以,目前常用的消毒剂完全可以控制产 ESBLs 和 AmpC 酶肺炎克雷伯菌的传播。

综上所述,我们可以根据肺炎克雷伯菌对各种消毒剂的抗性,选择适宜的消毒剂品种,并通过适当延长消毒作用时间,以获得高效的消毒效果,延缓细菌对消毒剂抗性的产生。

的住院费用中位数为 25 911.70 元,对照组为 19 899.75 元,病例组每例多支出费用 6 011.95 元,低于崔少罡等<sup>[3]</sup>报道的 8 209.2 元;病例组与对照组的费用之比为 1.30,低于石娜等<sup>[4]</sup>报道的 1.62。病例组住院日中位数为 32.50 d,对照组为 19.50 d,平均每例病例组患者延长住院日 13 d。每例深部切口及器官腔隙感染者比表浅切口感染者增加费用支出 11 059.80 元。由于 SSI 的患者多数需要增加换药、送检标本次数及采取相应消毒隔离措施等,因此感染程度越重,所产生的额外医疗费用越多。从费用项目可以看出,此部分损失主要是西药费用的增加(占 52.63%)所致。抗菌药物的不恰当使用,特别是选择的品种、给药时机、剂量和疗程等不合乎规范时,不仅增加医疗支出,更有导致细菌耐药性增加的危险<sup>[5]</sup>。因此,对术后感染的患者要加强抗菌药物管理,提高病原学送检率,合理使用抗菌药物。

社会各界对医院感染的关注程度不断提高,已经有部分医院感染患者拒绝支付由于医院感染而增加的医疗费用,但目前用于感染控制的经费仅占医院感染经济学损失总费用的 1%~6%<sup>[6]</sup>。因此,医院管理者应转变观念,逐步营造医院感染“零宽容”

的理念和环境,提倡采用预防 SSI 的一揽子预防方法<sup>[7]</sup>,降低医院感染发生率及医院感染所致的额外费用支出,使医院有限的资源获得最大的医院感染预防控制效益。

#### [参 考 文 献]

- [1] 徐俊芳,吴菊芳. 外科手术部位感染的病原学及预防[J]. 中国抗感染化疗杂志,2005,5(1):59-62.
- [2] De Lissvooy G, Fraeman K, Hutchins V, et al. Surgical site infection: incidence and impact on hospital utilization and treatment costs[J]. Am J Infect Control, 2009, 37(5):387-397.
- [3] 崔少罡,白玲,常诚. 剖胸术后切口感染经济损失病例对照分析[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(2):87-88.
- [4] 石娜,徐卫,舒雪芹. 手术部位感染直接经济损失的病例对照研究[J]. 中华医院感染学杂志,2004,14(6):601-602.
- [5] 马小军. 围手术期抗菌药物的应用[J]. 合理用药,2002,5(6):15-17.
- [6] 吴安华. 医院感染损失的经济学评价[J]. 中国感染控制杂志,2006,5(3):193-197.
- [7] 胡必杰. 转变观念改革系统共创医院感染“零宽容”[J]. 中华内科杂志,2007,46(9):708-709.

(上接第 399 页)

#### [参 考 文 献]

- [1] 张振,鲍连生,杨芳荣,等. 肺炎克雷伯菌产 ESBLs 和 AmpC 酶的检测及其质粒分析[J]. 中国感染控制杂志,2007,6(5):329-332.
- [2] Liu W, Chen L, Li H, et al. Novel CTX-M beta-lactamase genotype distribution and spread into multiple species of Enterobacteriaceae in Changsha, Southern China[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(5):895-900.
- [3] Pai H, Kang C I, Byeon J H, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10):3720-3728.
- [4] 林凤. 不同中和剂对几种消毒剂的试验效果观察[J]. 预防医学情报杂志,2006,22(2):241-243.
- [5] 张秀珍,朱德妹. 临床微生物检验问与答[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:360-363.
- [6] Anderl J N, Zahller J, Roe F, et al. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin[J]. Antimi-

crobiol Agents Chemother, 2003, 47(4):1251-1256.

- [7] Kang C I, Kim S H, Park W B, et al. Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(12):4574-4581.
- [8] 路秀文,吕锦,郭晓琳,等. 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌中整合子和耐消毒剂基因的研究[J]. 天津医药,2008,36(11):866-869.
- [9] 刘晓白,顾剑,骆明波,等. 三种消毒剂对 ESBLs 阳性大肠杆菌杀灭效果的观察[J]. 中国消毒学杂志,2003,20(3):193-194.
- [10] Houari A, Di Martino P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation[J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(6):652-656.
- [11] Gawande P V, LoVetri K, Yakandawala N, et al. Antibiofilm activity of sodium bicarbonate, sodium metaperiodate and SDS combination against dental unit waterline-associated bacteria and yeast[J]. J Appl Microbiol, 2008, 105(4):986-992.
- [12] 葛新,王丹敏,詹曦菁. 葡萄球菌生物膜对消毒剂抗力的研究[J]. 中国消毒学杂志,2007,24(2):122-125.