

DOI:10.13350/j.cjpb.220717

• 临床研究 •

子宫内膜异位症术后感染病原学研究*

邓颖¹, 白殊同^{2**}

(1. 重庆市中医院妇科, 重庆 400021; 2. 重庆市中医院, 中医药防治自身免疫疾病重庆市重点实验室)

【摘要】 **目的** 研究本地区子宫内膜异位症术后感染病原菌分布和流行特点, 为合理使用抗生素进行预防和治疗提供依据。 **方法** 收集本地区子宫内膜异位症术后感染患者临床标本, 采用全自动微生物鉴定仪进行菌种鉴定, 采用 K-B 纸片法进行药敏试验, 并筛选 MRSA 和产 ESBLs 酶的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌。采用 PCR 热扩增对产 ESBLs 酶的大肠埃希菌进行分型研究。 **结果** 共计分离出 38 株革兰阳性菌, 分别为金黄色葡萄球菌 16 株、表皮葡萄球菌 9 株、肠球菌 8 株、肺炎链球菌 5 株; 59 株革兰阴性菌, 分别为大肠埃希菌 23 株、肺炎克雷伯菌 15 株、铜绿假单胞菌 11 株、鲍曼不动杆菌 6 株、其他 G⁻ 4 株; 真菌共计 3 株, 全部为白色假丝酵母菌。其中 MRSA 检出 5 株, 检出率 31.25%; 产 ESBLs 大肠埃希菌检出 11 株, 检出率 47.83%; 产 ESBLs 肺炎克雷伯菌检出 5 株, 检出率 33.33%。革兰阳性菌对红霉素、青霉素 G、四环素、头孢呋辛酯、头孢噻肟、庆大霉素、阿米卡星、哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦和左氧氟沙星耐药率为 68.42%、52.63%、55.26%、44.74%、39.47%、55.26%、10.53%、57.89%、10.53% 和 28.95%, 未产生对替考拉宁和万古霉素产生耐药性; 革兰阴性菌对头孢他啶、头孢吡肟、哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦、左氧氟沙星、美罗培南和亚胺培南耐药率为 38.98%、15.25%、66.10%、8.47%、28.81%、5.08% 和 5.08%。11 株产 ESBLs 大肠埃希菌中检出 7 株携带 CTX-M-1 基因, 4 株携带 TEM 基因, 3 株携带 CTX-M-14 基因, 携带 SHV 基因、CTX-M-8 基因、CTX-M-9 基因、OXA1 基因和 OXA2 基因各 1 株。 **结论** 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是本次研究中的主要致病菌, CTX-M 型是产 ESBLs 大肠埃希菌的主要基因型。

【关键词】 子宫内膜异位症; 术后感染; 病原学

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)07-0823-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Jul.;17(7):823-826.]

Study on etiology of postoperative infection of endometriosis

DENG Ying¹, BAI Shu-tong² (1. Department of Gynecology, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine to Prevent and Treat Auto-immune Diseases, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital) ***

【Abstract】 **Objective** To study the distribution and epidemic characteristics of postoperative infection pathogens of endometriosis in this area, so as to provide basis for the rational use of antibiotics for prevention and treatment. **Methods** The clinical specimens of patients with postoperative endometriosis infection in this region were collected. K-B disk method was used for drug sensitivity test. MRSA and ESBLs producing *E. coli* and *K. pneumoniae* were screened. The typing of ESBLs producing *E. coli* was studied by PCR thermal amplification. **Results** Specimen isolation: a total of 38 strains of Gram-positive bacteria were isolated, including 16 strains of *S. aureus*, 9 strains of *S. epidermidis*, 8 strains of *Enterococcus* and 5 strains of *S. pneumoniae*; 59 strains of Gram-negative bacteria were isolated, including 23 strains of *E. coli*, 15 strains of *K. pneumoniae*, 11 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, 6 strains of *Acinetobacter baumannii* and other G⁻ 4 strains; 3 strains of fungi were isolated, all of which are *Candida albicans*. Among them, 5 strains were detected by MRSA, and the detection rate was 31.25%; 11 strains of ESBLs producing *E. coli* were detected, and the detection rate was 47.83%; 5 strains of *K. pneumoniae* producing ESBLs were detected, and the detection rate was 33.33%. Drug sensitivity: the resistance rates of Gram-positive bacteria to erythromycin, penicillin G, tetracycline, cefuroxime, cefotaxime, gentamicin, amikacin, piperacillin, piperacillin tazobactam and levofloxacin were 68.42%, 52.63%, 55.26%, 44.74%, 39.47%, 55.26%, 10.53%, 57.89%, 10.53% and 28.95%, and there was no resistance to teicoplanin and vancomycin; The resistance rates of Gram-negative bacteria to ceftazidime, cefepime, piperacillin, piperacillin tazobactam, levofloxacin, meropenem and imipenem were 38.98%, 15.25%, 66.10%, 8.47%, 28.81%, 5.08% and 5.08%. Among the

* **【基金项目】** 重庆市科学技术局科研院所项目 (No. cstc2017jxj130041); 重庆市卫生健康委员会中医药科研项目青年项目 (No. 2021ZY4108)。

** **【通讯作者】** 白殊同, E-mail: baishutong521@163.com

【作者简介】 邓颖 (1991-), 女, 重庆垫江人, 硕士, 重庆市中医院主治医师, 妇科疾病诊治及预防。E-mail: dengying111929@163.com

11 ESBLs producing *E. coli* strains, 7 strains carried CTX-M-1 gene, 4 strains carried TEM gene, 3 strains carried CTX-M-14 gene, and 1 strain each carried SHV gene, CTX-M-8 gene, CTX-M-9 gene, OXA1 gene and OXA2 gene. **Conclusion** *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* are the main pathogens in this study. CTX-M type is the main genotype of ESBLs producing *E. coli*.

【Key words】 endometriosis; postoperative infection; etiology

子宫内膜异位症是一种常见的、慢性的和炎性的妇科疾病。它是指子宫内膜组织(腺体和间隙)出现在子宫及宫腔被覆内膜以外的部位并生长为特征,从而引发疼痛、不孕等临床症状,影响着女性的身心健康。内膜异位主要出现在宫骶韧带、子宫直肠陷凹和卵巢等部位。子宫内膜异位症在育龄女性中的发病率为2%~15%,在不孕女性中发病率约为50%^[1-2]。子宫内膜异位症所引起的病灶因部位不同具有多样性,因而治疗方案也可分为药物治疗和手术治疗^[3]。药物治疗主要是通过药物抑制异常内膜增生,但是其存在副作用,且用药期间无法怀孕。手术治疗则是通过手术的方式切除病灶,其存在问题是术后感染和复发的风险^[4]。术后感染是常见并发症,而随着抗生素的广泛使用,病原菌的分布和耐药性不断发生变化。因而对术后感染进行病原学研究,探讨病原菌耐药机制能够为感染后有效用药提供有力依据。本研究中对子宫内膜异位症术后感染病原菌分布和耐药特点进行研究,并进一步研究主要病原菌的耐药机制和流行特点。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 研究对象 收集本地区子宫内膜异位症术后感染患者临床标本。术后感染诊断标准《医院感染诊断标准》。标本采集依据《临床微生物学检验标本的采集和转运(WS/T640-2018)》中的相关要求。

1.2 仪器与试剂 VITEK[®] 2COMPACT 30/60 全自动微生物鉴定仪,法国生物梅里埃公司生产;ABI-7500 型荧光定量 PCR 分析仪,美国应用生物系统公司生产;凝胶电泳仪,美国 BIO-RAD 公司生产;微量高速离心机及离心管,德国 Eppendorf 公司产品。培养基,杭州天和微生物试剂有限公司产品;Taq DNA 聚合酶、10×PCR buffer、dNTP Mixture、DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司产品;药敏纸片,北京天坛药物生物技术开发公司产品。

2 方法

2.1 样本鉴定 标本培养及鉴定参照《全国临床检验操作规程》,标本鉴定采用 VITEK[®] 2COMPACT 30/60 全自动微生物鉴定仪和对应鉴定卡。

2.2 药敏试验 采用 K-B 纸片法对临床常用抗生素进行药敏试验。室温复苏菌株,并将菌株接种于对应

的培养基,(35±2)℃培养 18-24 h。在培养基上挑选饱满菌落 3~5 个接种于 MH 肉汤中,再次培养 6 h。采用生理盐水将校正为 0.5 麦氏浊度。同步准备纸片,将纸片在 35℃的温箱中放置 30 min,以除去水分。用无菌棉签蘸取菌液后并挤去多余菌液,均涂布接种 3 次,每次旋转平板 60 度。涂布完毕并于室温放置 15 min,然后采用无菌镊子放置药敏纸片,药敏纸片平贴于平板,纸片间距离不少于 24 mm,纸片中心距平板边缘不少于 15 mm。纸片贴好后不能移动,室温放置 15 min 后,倒置于 35℃的温箱中,培养 18-20 h 后观察结果。判读标准:CLSI 2021。

2.3 MRSA 菌株检测 采用 K-B 纸片法进行初筛,试验过程参照 2.2,孵育温度 33~35℃,孵育时间 16-18 h。药敏纸片选用 30 μg FOX(头孢西丁)。判读标准依据 CLSI 2021,FOX 抑菌环≤21 mm,为阳性。质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC 43300。

2.4 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产 ESBLs 菌株检测

2.4.1 产 ESBLs 菌株初筛 采用 K-B 纸片法进行初筛,试验过程参照 2.2,孵育温度(35±2)℃,孵育时间 18-20 h。药敏纸片选用 30 μg CAZ(头孢他啶)。判读标准依据 CLSI 2021,CAZ 抑菌环≤22 mm。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922,肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

2.4.2 产 ESBLs 菌株表型确证 采用 K-B 纸片法进行初筛,试验过程参照 2.2,孵育温度(35±2)℃,孵育时间 16-18 h。药敏纸片选用 30 μg CAZ,30 μg/10 μg CAZ/CA(头孢他啶/克拉维酸);30 μg CTX(头孢噻肟),30 μg/10 μg CTX/CA(头孢噻肟/克拉维酸)两组药敏纸片。判读标准依据 CLSI 2021,任何一组加 CA(克拉维酸)后与不加 CA 比较,抑菌环增加值≥5 mm。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922,肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

2.5 大肠埃希菌产 ESBLs 基因检测

2.5.1 DNA 模板制备 从 MH 模板上挑取 3~5 个饱满菌落,置入盛有 0.6 ml 无菌水中,100℃煮沸 15 min,5 000 g 离心 3 min,取上清,-20℃保存备用。

2.5.2 PCR 扩增 引物设计参考文献[5]和 GenBank 对 TEM、SHV、CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8、CTX-M-9、CTX-M-14、OXA-1、OXA-2 和 OXA-10 进行设计。反应体系:EX Taq 酶 1.25 μl,dNTP Mix-

ture 4 μ l, 10 \times PCR buffer 5 μ l, DNA 模板液 4 μ l, 上下游引物各 2 μ l, ddH₂O 8.75 μ l。循环参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 解链 40 s,58 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,35 cycles;72 $^{\circ}$ C 终延伸 8 min,4 $^{\circ}$ C 保存。产物经 1%琼脂糖凝胶(0.5 μ g/ml EB)120 V 电泳 30 min,采用凝胶成像系统进行拍照。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922。

结 果

1 菌株分布

本次研究中共分离出 100 株病原菌。其中革兰阳性菌 38 株,革兰阴性菌 59 株,真菌 3 株。革兰阳性菌中金黄色葡萄球菌 16 株、表皮葡萄球菌 9 株、肠球菌 8 株、肺炎链球菌 5 株。革兰阴性菌中大肠埃希菌 23 株、肺炎克雷伯菌 15 株、铜绿假单胞菌 11 株、鲍曼不动杆菌 6 株、其他革兰阴性菌 4 株。真菌全部为白色假丝酵母菌。金黄色葡萄球菌是革兰阳性菌中主要致病菌,其中 MRSA 检出 5 株,检出率 31.25%。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是革兰阴性菌中主要致病菌。其中产 ESBLs 大肠埃希菌检出 11 株,检出率 47.83%;产 ESBLs 肺炎克雷伯菌检出 5 株,检出率 33.33%。

2 革兰阳性菌耐药情况

革兰阳性菌对红霉素、青霉素 G、四环素、头孢唑辛酯、头孢噻肟、庆大霉素、阿米卡星、哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦和左氧氟沙星耐药株数为:26、20、21、17、15、21、4、22、4 和 11 株,耐药率为 68.42%、52.63%、55.26%、44.74%、39.47%、55.26%、10.53%、57.89%、10.53% 和 28.95%。革兰阳性菌未产生对替考拉宁和万古霉素耐药性。金黄色葡萄球菌对上述药物耐药株数为:13、12、10、6、5、8、2、8、1 和 6 株,耐药率为 81.25%、75.00%、62.50%、37.50%、31.25%、50.00%、12.50%、50.00%、6.25% 和 37.50%。

3 革兰阴性菌耐药情况

革兰阴性菌对头孢他啶、头孢吡肟、哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦、左氧氟沙星、美罗培南和亚胺培南耐药株数为:23、9、39、5、17、3 和 3 株,耐药率为 38.98%、15.25%、66.10%、8.47%、28.81%、5.08% 和 5.08%。大肠埃希菌对上述药物耐药株数为:12、6、15、3、9、1 和 1 株,耐药率为 52.17%、26.09%、65.22%、13.04%、39.13%、4.35% 和 4.35%。

4 产 ESBLs 大肠埃希菌 PCR 扩增结果

11 株产 ESBLs 大肠埃希菌中所携带基因类型及菌株数为:CTX-M-1 3 株,CTX-M-14 2 株,CTX-M-1 + TEM、CTX-M-1 + TEM + SHV、CTX-M-1 + CTX-

M-8 + TEM、CTX-M-1 + CTX-M-14、CTX-M-9 + TEM + OXA2、CTX-M-14 + OXA1 各 1 株。检出 7 株携带 CTX-M-1 基因,4 株携带 TEM 基因,3 株携带 CTX-M-14 基因,携带 SHV 基因、CTX-M-8 基因、CTX-M-9 基因、OXA1 基因和 OXA2 基因各 1 株。

讨 论

手术治疗子宫内膜异位症能够有效地去除病灶从源头上解决问题,但是术后感染的预防和治疗是研究的重点。本次研究中大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌是本次研究中的主要病原菌,也是院内感染的常见病原菌,其中大肠埃希菌占比最高。大肠埃希菌在临床分离的革兰阴性菌中居首位,是肠道中的寄居菌,也是条件致病菌。大肠埃希菌中部分血清型具有致病性其机理是特定的菌毛抗原、致病性毒素引起感染^[6]。当机体免疫下降或在肠道外时,它可引发多部位感染,如泌尿系感染、血流感染和肺部感染等^[7]。由于抗生素的广泛使用,大肠埃希菌耐药菌的检出率越来越高。超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)是革兰阴性菌的重要耐药机制之一。ESBLs 由革兰阴性菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌产生,由质粒介导,能够水解青霉素酶类、单环氨基糖苷类和第三代头孢菌素等。产 ESBLs 的革兰阴性菌约数百种,其中产 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是主要菌群。麦颖等^[8]对广州医科大学附属第一医院分离菌株进行分析显示产 ESBL 大肠埃希菌检出率由 23.5% 升到 54.9%,产 ESBL 肺炎克雷伯菌从 22.1% 升至 33.9%。刘海红^[9]对 2010-2014 年山东省的三家医院收集标本研究显示产 ESBLs 检出率为 62.28%。黄海林等^[10]对 2017-2020 年昆明市儿童医院研究显示大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌产 ESBLs 率分别为 51.8% 和 39.1%。ESBLs 有 TEM、SHV、OXA 和 CTX-M 基因型,不同地区不同时间 ESBLs 的流行基因型有着较大差异。不同 ESBLs 基因型水解抗生素存在一定差异,其机制是其发生氨基酸位点突变使得水解底物活性发生改变,其中 TEM 和 SHV 型水解头孢噻肟能力强于水解头孢他啶,而 CTX-M 型水解头孢他啶能力更强^[11]。在 20 世纪 80 年代 TEM 和 SHV 型是 ESBLs 的主要基因型,而近年来 CTX-M 型检出率越来越高。Castanheira 等^[12]在 2011-2013 年一份对美国研究中显示分离到的产 ESBLs 酶大肠埃希菌以 SHV 型、CTX-M-14 型和 CTX-M-15 型为主。Ondera 等^[13]对日本医院的研究中显示产 ESBLs 酶大肠埃希菌以 CTX-M-3 型为主。Nogueira 等^[14]对巴西三级医院的研究显示产 ESBLs 酶大肠埃希菌以 CTX-M-15 型和 SHV 型为主。在国内,刘海红^[9]

研究中 360 株产 ESBLs 酶大肠埃希菌中 303 株为 CTX-M 型, 159 株 SHV 型和 254 株 TEM 型。本次研究中产 ESBLs 大肠埃希菌检出率 47.83%, CTX-M 型是主要基因型。金黄色葡萄球菌能够产生多种酶、毒素和抗原蛋白, 具有较强的致病力, 是术后感染的常见病原菌。它能够引起术后切口感染、软组织感染以及血流感染等。在研究金黄色葡萄球菌耐药机制时发现其有一个可移动的基因元件, 葡萄球菌盒式染色体 (SCCmec), 它可以携带 mecA 基因, 还可携带多种质子, 可同时编码多种耐药基因。MRSA 曾被称为“超级细菌”, 它不仅对青霉素、 β -内酰胺类抗生素类药物耐药, 同时对喹诺酮类抗生素、大环内酯类抗生素、氨基糖苷类抗生素敏感性降低。2012 年万艳红^[15]对山西省 3 家医院的研究显示 MRSA 阳性率 33.6%。2016-2020 年四川省耐药监测网显示 MRSA 检出率位于 26.2% 与 28.3% 之间^[16]。在本次研究中 MRSA 检出率为 31.25%, 对红霉素、青霉素 G 耐药率较高, 未对替考拉宁和万古霉素耐药性产生耐药性。因而, 在手术治疗子宫内膜异位症时应慎重选用抗生素预防术后感染, 延缓病原菌耐药进程。在治疗术后感染时, 尽量进行药敏试验, 并根据结果合理选择抗生素。

【参考文献】

- [1] 姚书忠, 梁炎春, 韦雅婧. 子宫内膜异位症的手术治疗[J]. 山东大学学报(医学版), 2019, 57(06): 6-15.
- [2] 丛珊珊, 张广美. 子宫内膜异位症药物治疗新进展[J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(03): 292-295.
- [3] Vercellini P, Frattaruolo MP, Rosati R, et al. Medical treatment or surgery for colorectal endometriosis? Results of a shared decision-making approach[J]. Hum Reprod, 2018, 33(2): 202-211.
- [4] Singh SS, Suen MW. Surgery for endometriosis: beyond medical therapies [J]. Fertil Steril, 2017, 107(3): 549-554.
- [5] Iqbal R. Determination of epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended spectrum beta laclamase producing uropathogens[J]. J Pakistan Med Associat, 2019, 69(5): 690-694.
- [6] Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, et al. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(12): 1077-1090.
- [7] Watts R E, Totsika M, Challinor VL, et al. Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of a-symptomatic bacteriuria *Escherichia coli* [J]. Infect Immun, 2012, 80(1): 333-344.
- [8] 麦颖, 管婧, 苏丹虹, 等. 2005-2014 年广州医科大学附属第一医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(2): 179-188.
- [9] 刘海红. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌流行病学及感染危险因素研究分析[D]. 山东大学, 2016.
- [10] 黄海林, 蒋鸿超, 李小娟. 2017 年至 2020 年昆明市儿童医院血流感染大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药性[J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(8): 95-100.
- [11] D'Angelo RG, Johnson JK, Bork J T, et al. Treatment options for extended- spectrum -beta -lactamase(ESBL) and AmpC-producing bacteria[J]. Expert Opin Pharmacother, 2016, 17(7): 953-967.
- [12] Castanheira M, Mills JC, Costello SE, et al. Ceftazidime-avibactam activity tested against Enterobacteriaceae isolates from U. S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of beta-lactamase-producing strains [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(6): 3509-3517.
- [13] Ondera N, Suzuki K, Takahashi M, et al. Epidemiological survey of the extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in hospitals and nursing homes in morioka secondary medical area zone of iwate prefecture [J]. Kansenshogaku Zasshi, 2016, 90(2): 105-112.
- [14] Nogueira Kda S, Conte D, Maia FV, et al. Distribution of extended-spectrum beta-lactamase types in a Brazilian tertiary hospital [J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2015, 48(2): 162-169.
- [15] 万艳红. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌表型与基因型分析研究[D]. 青岛大学, 2014.
- [16] 张弦, 史梦, 罗俊, 等. 四川省细菌耐药监测网 2016-2020 年耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分布及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(7): 694-698.

【收稿日期】 2022-03-27 【修回日期】 2022-06-15