

重症监护病房铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶检测与耐药特征分析

徐伟红¹, 张正银² (1. 上海市长宁区同仁医院检验科 200050; 2. 上海市长宁区中心医院检验科 200335)

【摘要】 目的 了解上海市长宁区中心医院重症监护病房铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶产生情况, 为临床治疗及控制医院感染提供依据。**方法** 用 K-B 法进行常规药敏试验, 筛选出 78 株多重耐药铜绿假单胞菌, 用改良三维试验检测各种 β -内酰胺酶, 同时用 2-巯基丙酸抑制试验检测金属酶。**结果** 78 株铜绿假单胞菌中产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 5 株 (6.4%)、产碳青霉烯酶 (AmpC) 31 株 (39.7%), 17 株同时产 ESBLs 和 AmpC (21.8%), 金属酶筛选出 12 株 (15.4%) 阳性。**结论** 该院铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶以 AmpC 酶为主, 临床应根据药敏试验结果, 合理选用抗生素, 以减少耐药菌株产生和控制医院感染。

【关键词】 重症监护病房; 铜绿假单胞菌; β -内酰胺酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.14.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)14-1692-02

Detection and analysis of beta-lactamases and antibiotic resistance on pseudomonas aeruginosa in intensive care unit

XU Wei-hong¹, ZHANG Zheng-yin² (1. Department of Clinical Laboratory, Tongren Hospital of Changning District, Shanghai 200050, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Changning District, Shanghai 200335, China)

【Abstract】 Objective To study the production of beta-lactamases on pseudomonas aeruginosa (PA) and provide the guideline for treatment and control of PA infection in intensive care unit (ICU). **Methods** The susceptibility of 78 strains of PA was tested by K-B method. The three dimensional method was taken to test the various beta-lactamases. **Results** Among 78 strains, there were 5 strains producing extended spectrum beta-lactamases (ESBLs), accounted for 6.4%, 31 strains producing Ampc beta-lactamases (AmpC), accounted for 39.7%, 17 trains producing ESBLs and AmpC at the same time, 12 strains of them were producing metallo-beta-lactamases. **Conclusion** The main beta-lactamases was AmpC beta-lactamases in our hospital. In order to reduce the drug-resistance stains and control the infection of PA, antibiotics should be used reasonably according to drug susceptibility test.

【Key words】 intensive care unit; pseudomonas aeruginosa; beta-lactamases

重症监护病房 (ICU) 的患者一般免疫力较低, 病情比较严重, 加上广谱抗生素的普遍使用导致耐药菌株的不断增加以及患者接受侵袭性医疗器械检查机会较多, 致使感染的发生率显著高于普通病房。铜绿假单胞菌 (PA) 是临床上最常见的一种引起严重医院内获得性感染的条件致病菌。随着抗生素的广泛应用, 细菌的耐药性变得越来越严重, 使得治疗铜绿假单胞菌感染十分困难。现将上海市长宁区中心医院 2008 年 1 月至 2009 年 6 月所有重症监护病房中分离的 78 株铜绿假单胞菌的现对其进行产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs)、碳青霉烯 (AmpC) 酶、金属酶的检测及抗菌药物的耐药特征报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 2008 年 1 月至 2009 年 6 月所有 ICU 的细菌学送检标本, 从各种标本中共分离出铜绿假单胞菌 78 株, 来源于痰液、脓汁、尿、血液及其他标本 (同一患者的多次分离株只做第 1 次分离株)。

1.2 培养基、菌种鉴定及药物敏感试验 血琼脂、麦康凯、M-H 等平板购自上海伊华生物科技有限公司。VITEK32 全自动细菌检测及药敏分析仪, GNI⁺ 和 GNS-112 卡片均为法国生物-梅里埃公司产品。多黏菌素 E、头孢哌酮、头孢吡肟、美洛培南、氨基曲南纸片购自 Oxoid 公司。质控菌株: ATCC29213 (大肠埃希氏菌), ATCC27853 (铜绿假单胞菌)。判定标准为美国临床实验标准化委员会 (CLSI) 标准。

1.3 实验方法

1.3.1 ESBLs 确证试验 按 NCCLS 要求进行, 判定标准按 2008 年版 CLSI 标准: 头孢噻肟/头孢噻肟加克拉维酸、头孢他啶/头孢他啶加克拉维酸, 对照不加克拉维酸组抑菌圈直径大于或等于 5 mm 为产酶株。

1.3.2 头孢西丁三维试验 酶粗提物的制备, 取血平板上过夜培养的待检菌制成 0.5 麦氏单位菌液, 取 50 μ L 菌液加入 12 mL 胰陈肉汤, 35 $^{\circ}$ C 培养 4~6 h, 将 12 mL 培养液以 4 000 r/min 离心 25 min, 弃去上清液, 将沉淀 -80 $^{\circ}$ C 反复冻融 5 次以上。加入 0.01 mol/L PBS 1.5 mL 旋涡混匀, 再以 14 000 r/min 离心 2 h, 弃去沉淀, 取上清液。

1.3.3 AmpC 酶鉴定实验 将大肠埃希菌 (ATCC25922) 调制菌液浓度 0.5 麦氏单位, 常规涂布 M-H 平皿, 取头孢西丁纸片 (每片 30 μ g) 置于平皿中心, 使用自制刀片在离纸片边缘 5 mm 处放射状有里向外切割一道狭缝, 用微量加样器或无菌毛细管取 25~30 μ L 酶粗提物有里向外加入狭缝内, 酶液切勿溢出狭缝, M-H 平皿 35 $^{\circ}$ C 培养过夜。狭缝与抑菌圈交界处出现扩大的长菌区域, 视为三维实验阳性, 即该菌产 AmpC 酶。

1.3.4 金属酶筛选试验 以 0.5 麦氏单位待测菌液均匀涂布 MH 琼脂平板, 中间贴头孢他啶药敏纸片, 距纸片 2.5 cm 处贴一空白纸片, 加 2 μ L 2-巯基丙酸溶液, 35 $^{\circ}$ C 培养过夜, 若靠近 2-巯基丙酸侧头孢他啶抑菌环有扩大者为产金属酶株。

2 结 果

2.1 标本菌株分布 从所有 ICU 中分离标本中分离阳性菌

265 株,铜绿假单胞菌为 78 株,占 29.4%。分离菌株:痰液 61 例,占 78.2%;咽拭子 9 例,占 11.5%;尿液 3 例,占 3.8%;血液 1 例,占 1.3%;分泌物 2 例,占 2.6%;胸腔积液、腹水 1 例,占 1.3%;脓液 1 例,占 1.3%。

2.2 耐药率 78 株铜绿假单胞菌其药物敏感度依次为多黏菌素 99.5%,阿米卡星 83.3%,哌拉西林/他唑巴坦 45.8%,环丙沙星 49.65%,头孢哌酮/舒巴坦 33.3%,庆大霉素 33.3%,头孢哌酮 29%。见表 1。

表 1 铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的药敏率(n=78,%)			
抗菌药物	耐药率	中敏率	敏感率
氨苄西林	100	0	0
哌拉西林	38.7	0	61.3
头孢哌酮/舒巴坦	37.5	29.2	33.3
哌拉西林/他唑巴坦	54.2	0	45.8
头孢唑啉	100	0	0
头孢哌酮	45.2	25.8	29.0
头孢呋辛钠	100	0	0
头孢他啶	66.7	16.7	16.7
头孢噻肟	95.8	4.2	0
头孢吡肟	70.8	8.3	20.8
头孢西丁	100	0	0
头孢呋辛酯	100	0	0
氨曲南	41.9	35.5	22.6
亚胺培南	70.8	4.2	25.0
美洛培南	75.0	0	25.0
阿米卡星	4.2	12.5	83.3
庆大霉素	50.0	16.7	33.3
环丙沙星	51.6	9.7	38.7
左旋氧氟沙星	70.8	4.2	25.0
多黏菌素 E	0.5	0	99.5

2.3 78 株铜绿假单胞菌中产 ESBLs 5 株(6.4%)、产 AmpC 酶 31 株(39.7%),17 株同时产 ESBLs 和 AmpC(21.8%),金属酶筛选出 12 株(15.4%)阳性。

3 讨 论

ICU 对于挽救生命垂危的患者具有重要意义。但在 ICU 这个特殊环境中,由于重症患者密集,病原体来源广,种类多,患者病情重、病程长,体质弱,医院内获得性感染概率大。铜绿假单胞菌是本院 ICU 检出率最高的病原菌,其为非发酵菌中的假单胞菌属,故很容易造成机会性感染,是临床上最常见的条件致病菌之一。据本文统计由铜绿假单胞菌引起的医院内感染发生率为 29.4%。铜绿假单胞菌感染可有单一性,也有混合性,其机制复杂,其感染可发生在人体任何部位和组织^[1],常见于烧伤或创伤部位,中耳、角膜、尿道和呼吸道,也可引起心内膜炎、胃炎、脓胸甚至败血症。

许多研究表明,铜绿假单胞菌是医院内获得性肺炎。尤其是 ICU 肺部感染的首位病原菌,据本文标本来源:痰液 61 例,占 78.2%,咽拭子 9 例,占 11.5%,尿液 3 例,分泌物 2 例,血液,胸腔积液、腹水、脓液各 1 例。近年来的研究表明,铜绿假单胞菌的细胞膜能产生富有黏附性的由糖蛋白构成的生物被

膜,它可阻止和抑制白细胞、巨噬细胞、抗体及抗菌药物泵入生物被膜中杀灭病原菌,是造成抗菌药物耐药的重要原因,同时病原菌还能从生物被膜中游离出来并繁殖,这可能是临床上常见的病原菌检测阳性经久不愈的原因之一^[2-3],一旦形成肺部感染,治疗上相当棘手。主要表现为肺炎迁延不愈,病程长,但并没有出现明显的败血症等表现,这可能与此类病原菌致病能力不强有关,但一旦病原菌发生变异,后果非常严重。

该菌可通过产生 ESBLs, AmpC,金属酶主动泵出等对各种抗菌药物产生耐药^[4]。本次试验 78 株铜绿假单胞菌中产 ESBLs 5 株(6.4%)、产 AmpC 酶 31 株(39.7%),17 株同时产 ESBLs 和 AmpC(21.8%),金属酶筛选出 12 株(15.4%)阳性。

近年来,铜绿假单胞菌的临床感染逐渐增多,本研究对 78 株铜绿假单胞菌其药物敏感度依次为阿米卡星 83.3%,哌拉西林/他唑巴坦 45.8%,环丙沙星 49.65%,头孢哌酮/舒巴坦 33.3%,庆大霉素 33.3%,头孢哌酮 29%。亚胺培南、美洛培南耐药率达 70.8%、75%,可能与使用碳青霉烯类抗生素较多有关。因为碳青霉烯类抗生素比其他内酰胺类更耐受 β-内酰胺酶,且与所有的青霉素结合蛋白,特别是青霉素结合蛋白(PBP₂)优先结合,具有较强的亲和力,从而显出了强大的抑菌活性,成为治疗院内严重感染的有效抗菌药物而使临床易频繁选用,导致耐药率上升。庆大霉素和阿米卡星耐药率尚可是否与 ICU 很少应用氨基糖苷类抗菌药物治疗有关,尚需进一步研究。从药敏试验的结果分析,对铜绿假单胞菌、氨基糖苷类抗菌药物中比较敏感的为阿米卡星。由于医院很少应用多黏菌素,其对铜绿假单胞菌有高度敏感性;哌拉西林/他唑巴坦在医院广泛应用的时间并不长,因此耐药率较低。

为了提高抗菌药物治疗效果,经常监测本地区及本单位的病原菌对抗菌药物的敏感性及其耐药特性,并根据药敏试验有针对性地合理选用抗菌药物^[5-6]。同时,严格执行消毒隔离制度,无菌操作规范,防止耐药菌的交叉感染,控制医院感染发生率,是一项非常重要的工作。

参考文献

[1] 何林,张立军,李勇,等. 铜绿假单胞菌对 22 种抗生素耐药性的差异[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(11):853-855.

[2] 王豫平,王慕云,廖致红. 多重耐药铜绿假单胞菌感染相关因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(9):1059-1060.

[3] 明德松,吴一波,朱焱,等. 铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗菌药物机制分类检测的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2005,15(2):215-216.

[4] 张凤凯,Malcom G,Page P,等. 铜绿假单胞菌对 B2 内酰胺类抗生素耐药性主决定因素的研究[J]. 中国抗生素杂志 2000,25(5):362-367.

[5] 马均宝,吴智刚,陈启然. 铜绿假单胞菌耐药特性的分析及其临床抗感染用药的方向性初探[J]. 海南医学,2005,16(11):115-117.

[6] 胡锡浩,许小敏,金春光,等. 烧伤病房铜绿假单胞菌的耐药检测及脉冲场凝胶电泳分析[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(4):450-452.