

106 株铜绿假单胞菌耐药性分析及金属 β -内酰胺酶检测

王 芬, 王朝晖, 邵宏明, 陈 志 (江苏省兴化市人民医院检验科 225700)

【摘要】 目的 分析医院铜绿假单胞菌的分布、耐药性及产金属 β -内酰胺酶的现状, 为临床治疗铜绿假单胞菌感染提供合理用药的实验依据。**方法** 将 VITEK-2 全自动鉴定仪鉴定出的 106 株铜绿假单胞菌, 采用琼脂纸片扩散 (K-B) 法进行体外耐药性监测及统计耐药率, 同时用双纸片协同试验检测金属 β -内酰胺酶的百分率。**结果** 106 株铜绿假单胞菌产金属 β -内酰胺酶的 22 株, 占 20.8%。金属 β -内酰胺酶阳性与阴性的铜绿假单胞菌耐药率相比较, 对头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢曲松、头孢哌酮的耐药率差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而对氨基曲南、阿米卡星、左氧氟沙星、庆大霉素呈现的耐药率二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 产金属 β -内酰胺酶是铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制之一, 临床应根据药敏结果及产酶情况综合考虑合理用药, 以减少耐药菌株的产生。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 金属 β -内酰胺酶; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.01.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)01-0031-02

Drug resistance analysis of 106 strains of Pseudomonas aeruginosa and detection of metallo- β -lactamases WANG Fen, WANG Zhao-hui, TAI Hong-ming, CHEN Zhi, (Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Xinghua, Jiangsu 225700, China)

【Abstract】 Objective To analyze distribution, drug resistance and situation of producing metallo- β -lactamase of hospital Pseudomonas aeruginosa for providing the experimental basis of the rational use of drugs for clinical treatment of Pseudomonas aeruginosa infection. **Methods** 106 stains of P. aeruginosa were identified by VITEK-2 automatic identification system, and, in vitro drug resistance and statistical resistance rates were tested by K-BETA disk diffusion method, while the double disk synergy assay was used to test the percentage of metallo- β -lactamase. **Results**

In 106 stains of Pseudomonas aeruginosa, 22 (20.8%) of them produced metallo- β -lactamase. Metallo- β -lactamase positive strains of Pseudomonas aeruginosa had significantly higher drug resistance rates to ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IPN), cefoperazone/Sulbactam (SCF), piperacillin (PIP), piperacillin/tazobactam (the PIT), ceftriaxone (CRO), cefoperazone (CFP) and than negative strains ($P < 0.05$). There was no significant difference of drug resistance rates of them to Aztreonam (AZT), levofloxacin (LVF), gentamicin (GM) ($P > 0.05$). **Conclusion** Producing metallo- β -lactamase of Pseudomonas aeruginosa is one of the main mechanism of drug resistance to the enzyme β -lactam antimicrobial agents, it should be rationally use medicines in order to reduce resistance strains generating.

【Key words】 Pseudomonas aeruginosa; metallo- β -lactamase; resistance

铜绿假单胞菌 (PA) 是一种广泛分布于周围环境及健康人呼吸道、消化道、皮肤等部位的条件致病菌, 是目前全球医院内感染的重要病原菌, 也是年老体弱、慢性疾病和免疫功能低下患者并发感染的常见病原菌之一^[1]。随着 β -内酰胺类和碳青霉烯类抗菌药物的广泛应用和过度使用, 使得铜绿假单胞菌产生较高的耐药性及多种 β -内酰胺酶, 使 PA 对 β -内酰胺类及碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制变得极其复杂。为探讨 PA 的感染现状, 为临床提供诊断和治疗依据, 作者对临床感染标本中分离出的 106 株 PA 进行了耐药性监测及产金属 β -内酰胺酶情况的分析, 报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2010 年 1 月至 2012 年 4 月住院及门诊患者的痰液、分泌物、脓液、引流液、尿液等标本, 采用法国生物梅里埃 VITEK-2 compact 全自动细菌分析仪对所分离的菌株进行鉴定, 共分离出 PA 106 株。

1.2 药敏试验 药敏试验采用琼脂纸片扩散 (K-B) 法, 参照临床和实验室标准化协会 (CLSI) 2011 年的标准进行药敏试验结果判读。

1.3 检测金属 β -内酰胺酶 采用纸片协同法。依据金属离子

可与乙二胺四乙酸 (EDTA) 络合从而使金属酶失去活性的特征, 将待测菌制成 0.5 麦氏单位的菌液, 均匀涂布于 M-H 琼脂平板, 将 2 张亚胺培南 (IPN) 纸片贴在平皿上, 纸片间距为 2 cm, 在其中一张亚胺培南纸片上加入 5 μ L EDTA, 含 EDTA 的亚胺培南纸片的抑菌圈直径较亚胺培南纸片增加 6 cm 为阳性, 即表示此菌株产金属酶。同时以铜绿假单胞菌 ATCC27853 和产 VIM-2 金属酶标准菌株的铜绿假单胞菌作阴性及阳性对照。

1.4 试剂及药敏纸片 IPN 30 μ g、头孢吡肟 (FEP 30 μ g)、头孢他啶 (CAZ 30 μ g)、氨基曲南 (AZT 30 μ g)、左氧氟沙星 (LVF 5 μ g)、阿米卡星 (AK 30 μ g)、哌拉西林 (PIP 100 μ g)、头孢曲松 (CRO 30 μ g)、头孢哌酮 (CFP 75 μ g)、头孢哌酮/舒巴坦 (SCF 75/30 μ g)、哌拉西林/他唑巴坦 (PIT 100/10 μ g)、庆大霉素 (GM 10 μ g) 均为英国 Oxoid 公司产品, M-H 琼脂购于济南百博生物有限公司, EDTA- Na_2 分析纯购于重庆化学试剂厂。

1.5 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、VIM-2 型金属 β -内酰胺酶阳性的 PA, 购自江苏省临床检验中心。

1.6 统计学方法 采用 WHONET5.3 软件进行资料统计, 并

经 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 106 株 PA 科室的来源分布 见表 1。其中重症监护病房(ICU)36 株(34.0%),呼吸科 33 株(31.1%),ICU 和呼吸科分离率远远高于其他病区。

2.2 药敏试验结果 106 株 PA 的 12 种抗菌药物药敏试验结果见表 2。PA 对 AZT、GM、CFP 的耐药率大于 40.0%,对 CRO 耐药率大于 70.0%,对 IPN、PIT、AK、SCF 的耐药率小于 30.0%。

2.3 产金属酶与非产金属酶 PA 的药敏试验结果 见表 3。产金属酶的有 22 株,占 20.8%,其中金属酶阳性的菌株对 CAZ、FEP、IPN、PIP、SCF、CRO、CFP 耐药率较高,与阴性菌相比差异有统计学意义($P<0.05$)。金属酶阳性和阴性菌株对 AZT、LVF、GM、AK 呈现的耐药率差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 106 株 PA 科室来源与分布

科室	菌株(<i>n</i>)	构成(%)
ICU	36	34.0
呼吸科	33	31.1
脑外科	14	13.2
神经内科	8	7.5
胸外科	5	4.8
其他科室	10	9.4

表 2 106 株 PA 对 12 种抗菌药物药敏试验结果[*n*(%)]

抗菌药物	<i>n</i>	敏感	耐药
PIP	105	68(64.8)	37(35.2)
PIT	105	80(76.2)	25(23.8)
CAZ	106	71(67.0)	35(33.0)
FEP	106	67(63.2)	39(36.8)
AZT	99	56(56.6)	43(43.4)
IPN	106	82(79.2)	22(20.8)
AK	103	82(79.6)	21(20.4)
LVF	106	69(65.1)	37(34.9)
SCF	105	89(84.8)	16(15.2)
GM	102	59(57.8)	43(42.2)
CRO	102	29(28.4)	73(71.6)
CFP	102	56(54.9)	46(45.1)

表 3 PA 金属酶阳性株与阴性株的药敏试验结果[*n*(%)]

抗菌 药物	金属酶阳性(<i>n</i> =22)		金属酶阴性(<i>n</i> =84)		χ^2	<i>P</i>
	敏感	耐药	敏感	耐药		
CAE	5(22.7)	17(77.3)	66(78.5)	18(21.5)	24.58	<0.05
FEP	4(18.2)	18(81.8)	63(75.0)	21(25.0)	24.20	<0.05
IPN	0(0.0)	22(100.0)	82(97.6)	2(2.4)	85.4	<0.05
PIP	0(0.0)	22(100.0)	68(80.9)	16(19.1)	49.68	<0.05
AZT	13(59.1)	9(40.9)	43(51.2)	41(48.8)	0.43	>0.05

续表 3 PA 金属酶阳性株与阴性株的药敏试验结果[*n*(%)]

抗菌 药物	金属酶阳性(<i>n</i> =22)		金属酶阴性(<i>n</i> =84)		χ^2	<i>P</i>
	敏感	耐药	敏感	耐药		
AK	16(72.7)	6(27.3)	66(78.5)	18(21.5)	0.34	>0.05
LVF	13(59.1)	9(40.9)	56(66.7)	28(33.3)	0.44	>0.05
PIT	6(27.3)	16(72.7)	74(88.1)	10(11.9)	34.84	<0.05
SCF	7(31.8)	15(68.2)	81(96.4)	3(3.6)	51.6	<0.05
GM	12(54.5)	10(45.5)	50(60.0)	34(40.0)	0.18	>0.05
CRO	0(0.0)	22(100.0)	29(34.5)	55(65.5)	10.45	<0.05
CFP	0(0.0)	22(100.0)	56(66.7)	28(33.3)	31.09	<0.05

3 讨 论

PA 是人体最重要的条件致病之一,可引起机体多系统、多脏器、多部位感染^[2]。呼吸科患者大多年老体弱、有慢性病基础、抵抗力低下,长期应用抗菌药物,住院时间较长,使机体的微生态失衡,菌群失调,为 PA 的感染提供了有利条件。ICU 患者病情危重、免疫力低下、各种插管等侵入性操作增加了 PA 感染的机会,因此 ICU 是 PA 的高发区^[3]。本文结果显示,PA 感染主要集中在 ICU 和呼吸科,分别占 34.0% 和 31.1%。

由表 2 可见,PA 对 FEP、CAZ、和 CRO 的耐药率分别为 36.8%、33.0%、71.6%,其中 CRO 耐药率较 CAZ、FEP 高,同为第 3 代头孢菌素 CRO 与 CAZ 的耐药率相比较,CRO 明显高于 CAZ,这可能与临床用药习惯和 CAZ 的慢渗有关,PA 对 AK 的耐药率为 20.4%,其与 CAZ 联合用药对多重耐药的 PA 起到明显的协同作用,但 PA 对肾脏有损害作用,因此临床要酌情使用。PA 对 IPN、PIT、SCF 等高效的抗菌药物也已产生了 15.2%~23.8%的耐药率,高于某些三级医院的报道,其原因可能是对抗菌药物使用规范化的监测力度不够,基于目前抗菌药物泛用的现状,卫生部于 2011 年颁发了抗菌药物专项整治方案,要求加强抗菌药物临床应用管理,规范抗菌药物的临床应用,有望使临床抗菌药物滥用状况得到改善,减少耐药菌株的产生。

PA 的耐药机制相当复杂,其耐药可能与以下机制有关^[4-6]:(1)产生抗菌活性酶,如 β -内酰胺酶、金属酶、氨基糖苷钝化酶等;(2)改变抗菌药物靶性,如青霉素结合蛋白、DNA 旋转酶等结构发生改变,从而逃避抗菌药物作用;(3)外膜通透性降低,如外膜微孔蛋白 OprD2 的缺乏或丧失;(4)生物膜的形成;(5)主动外排系统可随时将抗菌药物泵出和排出体外。PA 对 β -内酰胺类抗菌药物的耐药机制主要是产生 β -内酰胺酶,依据 Amble 分类 β 类是金属酶,其酶的活性中心需金属锌离子的参与,故称为金属 β -内酰胺酶^[7]。迄今为止,已有五类金属 β -内酰胺酶被相继报道^[8],它们分别是 IMP 家族、VIM 家族、SPM-1、GIM-1 和 SIM。该类酶以包括碳青霉烯类在内的一大类 β -内酰胺类抗菌药物为底物,水解除单环类抗菌药物以外的大多数其他 β -内酰胺类药物及碳青霉烯类药物。而且对常用的 β -内酰胺酶抑制剂如克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦的敏感性差。有研究报道,IPM 型和 VIM 型金属 β -内酰胺酶的产生是引起 PA 对 IPN 耐药的重要机制,而且能引起 PA 对 β -内酰胺类抗菌药物的广泛耐药^[9]。本实验用双纸片协同实验在 106 株 PA 中检测出 22 株产金属酶 PA,占 20.8%,高于国内的其他报道,这可能与该院应用碳青霉烯类抗菌药(下转第 34 页)

(B) 的人数比 A 型或 B 型人的 IgG 抗体的人数多, 所以 ABO 溶血病以母亲为 O 型的发病率为最高^[2]。临床症状常表现为黄疸、水肿、贫血、肝脾肿大, 甚至死胎、新生儿死亡等溶血病症状和并发症。一般孕妇血清中 IgG 抗体效价的高低与胎儿受害程度呈正相关。准确测定孕妇血清中 IgG 抗-A(B) 效价可作为产前诊断和预防 ABO-HDN 提供依据^[3]。一般传统的方法认为, 当 IgG 抗-A(B) 效价小于 64 时, 即使母婴血型不同, 很少发生新生儿黄疸, 当抗体效价大于或等于 1:64 时, 就有可能使新生儿发生溶血, 如果母亲血清中 IgG 抗-A(B) 效价大于或等于 1:128 时, 提示婴儿很可能受害, 如果 IgG 抗-A(B) 效价大于或等于 1:512 时, 几乎 100% 受害, 必须进行临床预防性治疗^[4]。传统的抗人球蛋白试管法经改良为微柱凝胶法后灵敏度大为提高, 有多家文献报道^[5-7]。本院根据文献报道结合长期的临床实践经验, 采用 1:128 作为临床判断异常临界值。

本文所检测的 521 例 O 型孕妇, 其中 IgG 抗-A 效价大于或等于 1:128 者有 161 例, 占 IgG 抗-A 总人数的 54.03%; IgG 抗-B 效价大于或等于 1:128 者有 127 例, 占 IgG 抗-B 总人数的 45.04%。结果显示 O-A 不合者例数高于 O-B 不合者, 前者为后者的 1.27 倍, 与有关资料报道的前者为后者的 1.22 接近, 这可能与红细胞上 A 抗原较强有关。本研究中抗体效价大于或等于 1:128 的检出率高达 49.66%, 明显高于其他文献的报道^[8], 这可能与实验方法或样本量的大小以及地区分布有关。随着抗体效价的增高, 患者的阳性检出率逐渐降低, 这可能与孕妇的及早检查与积极治疗有关。

总之, 产前孕妇 IgG 抗-A(B) 效价的测定对预防和评估新生儿 ABO-HDN 是很有必要的, 特别是对于效价大于或等于 1:128 者, 应定期复检, 及时给予中西医结合治疗, 可预防和减

少新生儿溶血病的发生。这对优生优育、提高新生儿生存质量有重要意义。

参考文献

- [1] 万忠和. 大剂量静脉注射免疫球蛋白治疗新生儿 ABO 溶血病 18 例的疗效观察[J]. 新医学, 2001, 32(8): 480-481.
- [2] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 130-136.
- [3] 宣景秀, 练正秋, 康凯, 等. 凝聚胺法测定孕妇血清 IgG 抗-A(抗-B) 效价的方法学评价[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(1): 50-52.
- [4] 胡丽华, 余忠清, 曹奎杰, 等. 黄疸患儿 ABO、RH 新生儿溶血病发生率的调查[J]. 中国输血杂志, 2000, 13(2): 120.
- [5] 吴定昌. 微柱凝胶法检测孕妇红细胞血型 IgG 抗 A(B) 抗体效价方法的探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(7): 19.
- [6] 张军. 微柱凝胶法技术与抗球蛋白法和凝聚胺法的实验观察[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(12): 948-949.
- [7] 臧荣发, 王雪明, 王健. 微柱凝胶法与抗球蛋白法和凝聚胺法的实验观察[J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(3): 397-398.
- [8] 董予新, 贾昭华, 刘怀慧, 等. ABO 新生儿溶血病与孕妇血型抗体效价的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(6): 397-460.

(收稿日期: 2012-05-28 修回日期: 2012-11-12)

(上接第 32 页)

物较多有关, 产金属酶的 PA 对 CAZ、FEP、IPN、PIT、SCF、CRO、PIP、CFP 耐药与阴性菌株相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。产酶的菌株对 IPN、PIP、CRO、CFP 4 种药物的耐药率达 100%, 其余的药物大多数耐药率在 40.0% 以上, 仅 AK 小于 30.0%, 耐药情况十分严重。

目前临床认为对 PA 治疗较为有效的药物是碳青霉烯类抗菌药物 IPN、MEN 等, 近年来随着 IPN 等药物在临床的广泛应用, 在其选择性压力下, 细菌对 IPN、MEN 的耐药率不断上升^[10]。提示临床应依据患者的病情慎用碳青霉烯类抗菌药物, 尽量避免使用能诱导细菌产生耐药性的抗菌药物。加强对 PA 耐药菌株的监测, 规范化使用抗菌药物, 尽最大可能降低 PA 的感染, 减少产酶的耐药菌株的产生, 对遏制 PA 耐药性的增长有着重要的意义。

参考文献

- [1] 杨敬芳, 王悦, 焦青. 呼吸科重症监护病房患者感染相关危险因素分析及病原菌的耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(11): 1540-1543.
- [2] 闭雄杰. 2003~2007 年铜绿假单胞菌感染分布及耐药性变迁[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(17): 3702-3703.
- [3] 王玉敏. ICU 铜绿假单胞菌感染与耐药性分析[J]. 中国

医学创新, 2011, 8(23): 177-178.

- [4] 文继中, 周丽珍, 宫玲玲, 等. 铜绿假单胞菌的多重耐药基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(3): 241-244.
- [5] 胡琴, 陆学东, 陈群. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(3): 358-360.
- [6] 于高, 王梅, 袁军, 等. 2001~2006 年医院重症监护病房铜绿假单胞菌耐药性的变迁[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 437-439.
- [7] 甘晓玲. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的多重耐药机制[J]. 重庆医学, 2008, 37(16): 1851-1853.
- [8] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.
- [9] 杨青, 魏泽庆, 俞云松, 等. 重症监护病房产 VIM-2 型金属酶绿脓假单胞菌的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(10): 678-680.
- [10] 文细毛, 任南, 吴安华, 等. 864 例次耐亚胺培南铜绿假单胞菌医院感染特征分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(16): 2416-2418.

(收稿日期: 2012-05-31 修回日期: 2012-11-06)