

136 株铜绿假单胞菌产酶状况及单独与联合药敏试验分析

136 pseudomonas aeruginosa enzyme production conditions and individual and combined sensitivity test analysis

谢军花¹ 丁卉² 叶菲¹ 沈杰¹ 蒋雪梦¹

[摘要] **目的:**旨在分析龙泉市人民医院铜绿假单胞菌的产酶情况,单独、联合药敏试验结果对临床用药的指导意义,为临床对抗菌药物的选择提供合理而准确的科学依据。**方法:**收集 136 株铜绿假单胞菌做为研究对象,使用世界卫生组织细菌耐药性监测中心推荐的 WHONET5.5 和 EXCEL 软件进行数据回顾性分析。**结果:**产酶铜绿假单胞菌与非产酶铜绿假单胞菌的药物敏感性差异有统计学意义($P<0.05$),并且在多重耐药铜绿假单胞菌和泛耐药铜绿假单胞菌情况下,头孢哌酮/舒巴坦与左氧氟沙星,多粘菌素 B 与利福平的联合用药在体外抗菌活性以相加和协同作用为主。**结论:**铜绿假单胞菌在临床分离率较高,耐药情况相对严重,耐药机制相对复杂,微生物实验室应及时监测铜绿假单胞菌药物敏感性的变化趋势。在多重耐药与泛耐药情况下,微生物实验室在条件允许情况下,应开展联合药敏试验,为临床在抗菌药物选择性困难的时候提供科学的实验依据。

[关键词] 铜绿假单胞菌;单独药敏试验;联合药敏试验; β 内酰胺酶检测

Key words pseudomonas aeruginosa; separate sensitivity test; combined sensitivity test; β lactamase detection

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2016.04.016

[中图分类号] R965.3 **[文献标志码]** A

铜绿假单胞菌是一种条件致病菌,是医院感染的重要致病菌,感染可发生于人体的任何部位及组织。耐药菌株易导致暴发流行。近年来,铜绿假单胞菌感染率与耐药率呈逐年上升,我院 2015 临床分离率高达 9.01%。微生物实验室有责任提供准确统计数据,为临床医生及院感科提供选择性的指导^[1]。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2014-06-01—2015-12-31 我院各病区的各类标本:痰液 65 株(47.8%),咽拭子 39 株(28.7%),胆汁,尿液,伤口分泌物及其他部位标本 32 株(23.5%),共计 136 株,并且重复分离株没有计数。

1.2 菌株分离

从各感染部位采取合格标本,遵循抗生素使用前采集的原则。接种哥伦比亚血平板,麦康凯平板,35℃培养 24 h,取氧化酶阳性革兰氏染色阴性杆菌的菌落,分纯培养。采用法国梅里埃 ATB 鉴定仪鉴定确认。

1.3 仪器与试剂

法国梅里埃公司生产的 ATB 鉴定仪,药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品,培养液为法国梅里埃产品,MH 培养液为杭州天和微生物有限公司。药敏结果按照临床实验室标准研究所(CLSI)标准进行判读。

1.4 抗菌药物和溶剂

北京生物制品检定公司提供,MIC 测定采用琼脂平板倍比稀释法,利福平溶剂为 pH 7.0 的 PBS,左氧氟沙星的溶剂为 0.1 mol/L 的 NaOH,其他抗菌药物的溶剂为蒸馏水。比浊剂为法国梅里埃产品,96 孔无菌板购自天津京章公司,90 mmol/L 无菌平板为浙江拱东医用塑料厂出品。

1.5 质控菌株

铜绿假单胞菌 ATCC27853,肺炎克雷伯菌 ATCC70063 (ESBLs 阳性),大肠埃希菌 ATCC25922,阴沟肠杆菌为高产 Ampc 酶阳性对照菌株,均购自浙江省临床检验中心。

1.6 统计学方法

WHONET5.5 统计软件进行统计。

2 结果

2.1 标本来源分布

剔除重复菌株后,共收集到 136 株铜绿假单胞菌,其中痰液标本来源 65 株(47.8%),咽拭子标本来源 39 株(28.7%),烫伤皮肤标本渗液来源 11 株(8.1%),伤口分泌物 7 株(5.1%),血液 5 株(3.7%),尿液 4 株(2.9%),胆汁 3 株(2.2%),其他 2 株(1.5%)。分析来看菌株主要分离自呼吸道标本,显示出要加强呼吸科的感染控制力。Logistic 回归分析确定了主要的独立危险因素为:入住 ICU 病房,行气管切开术 5 d 以上,分离出铜绿假单胞菌前有使用碳青霉烯类抗菌药物^[2]。

2.2 单独药物敏感试验结果

根据产酶情况将细菌分为不产酶菌株(93 株)和产酶菌株(43 株),对所有铜绿假单胞菌进行常见

¹浙江省龙泉市人民医院检验科(浙江龙泉,323700)

²丽水市中心医院检验科

抗菌药物的药物敏感实验。结果显示不产酶菌株对大部分抗菌药物的敏感性都较好,敏感性几乎都在 70%以上,产酶菌株耐药性较高,对碳青霉烯类耐药率高达 50%以上,对头孢菌素类也存在不同程度的耐药,见表 1。

2.3 耐药酶检测

筛选出多重耐药铜绿假单胞菌,对疑产金属酶,AMPC 酶,超广谱β内酰胺酶的菌株采用 ED-TA 纸片协同法,头孢西丁三维试验和双纸片协同试验进行酶的确证。

金属β内酰胺酶(MBL)检测:参考文献[3]操作,见图 1。Ampc 酶表型筛选与确证试验:按三维试验方法^[4]操作,见图 2。ESBLs 表型筛选与确证试验:根据 CLSI 规则,采用 ESBLs 检测的初筛与确证试验,见图 3。图 4 为阴性对照图。

136 株铜绿假单胞菌中 MDR 铜绿假单胞菌有 43 株,产β内酰胺酶菌株共 43 株(31.6%),其中产金属酶 29 株,产 Ampc 酶 17 株,产 ESBLs6 株,见表 2。

表 1 产酶菌与不产酶菌的单独药物敏感试验结果株(%)

抗生素	不产酶菌株			产酶菌株		
	敏感	中敏	耐药	敏感	中敏	耐药
亚胺培南	87(93.5)	6(6.5)	0	16(37.2)	2(4.7)	25(58.1)
头孢哌酮/舒巴坦	89(95.7)	4(4.3)	0	32(74.4)	7(16.3)	4(9.3)
替卡西林/克拉维酸	73(78.5)	7(7.5)	13(14.0)	17(39.5)	4(9.3)	22(51.2)
头孢他啶	66(71.0)	10(10.8)	17(18.3)	20(46.5)	9(20.9)	14(32.6)
左氧氟沙星	76(81.7)	7(7.5)	10(10.8)	30(69.8)	4(9.3)	9(20.9)
阿米卡星	85(91.4)	4(4.3)	4(4.3)	28(65.1)	5(11.6)	10(23.3)
多粘菌素 B	93(100.0)	0	0	43(100.0)	0	0
美罗培南	88(94.6)	5(5.4)	0	16(37.2)	2(4.7)	25(58.1)
哌拉西林/他巴唑坦	70(75.3)	9(9.7)	14(15.1)	14(32.6)	9(20.9)	20(46.5)
头孢吡肟	88(94.6)	3(3.2)	2(2.2)	30(69.8)	5(11.6)	8(18.6)
氨曲南	67(72.0)	6(6.5)	20(21.5)	16(37.2)	10(23.3)	17(39.5)
哌拉西林	65(69.9)	10(10.8)	18(19.4)	0	0	43(100.0)
妥布霉素	87(93.5)	4(4.3)	2(2.2)	23(53.4)	8(18.6)	12(27.9)
环丙沙星	72(77.4)	7(7.5)	14(15.1)	16(37.2)	7(16.2)	20(46.5)

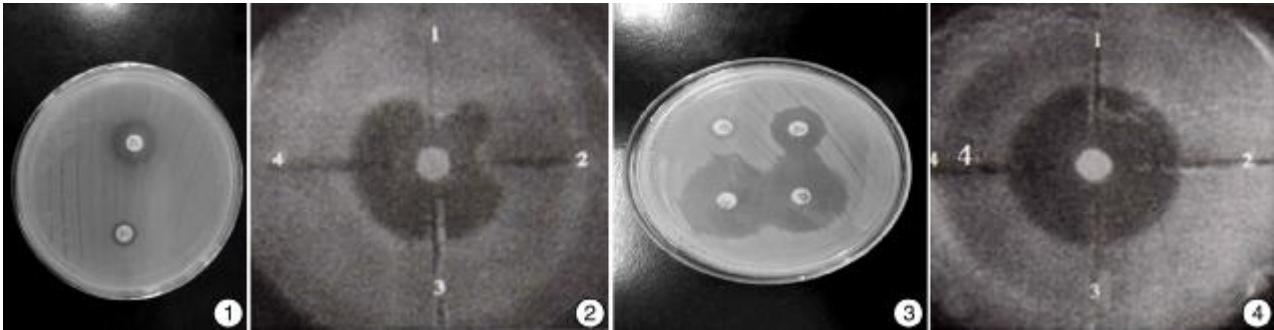


图 1 金属酶阳性;图 2 AMPC 酶阳性;图 3 ESBLs 阳性;图 4 阴性对照

表 2 产酶菌的产酶分布情况株(%)

菌株	金属酶+	Ampc 酶+	ESBLs+	金属酶+ESBLs	金属酶+Ampc
MDR 铜绿假单	25(58.1)	12 (27.9)	6 (14.0)	6 (14.1)	7 (16.3)
NMDR 铜绿假单	0	1 (1.1)	2 (2.2)	0	0
合计	25 (18.4)	13 (9.6)	8 (5.9)	6 (4.4)	7 (5.1)

2.3 联合药敏试验

136 株铜绿假单胞菌中不产色素的有 33 株,粘液型菌株 12 株,粘液型菌株的体外药物敏感性明显高于非粘液型菌株。出现 2 株除了对多粘菌素

B 敏感外耐其他所有抗生素,显示出泛耐药情况单独药敏试验不足为临床医生提供抗菌药物的选择。故笔者也做了二组联合药敏试验。采用琼脂稀释法,测定抗菌药物单独应用和最佳组合时的 MIC

值,计算部分抑菌浓度 FIC 指数来判定联合抑菌效应。单独药物 MIC 测定采用不同浓度范围,联合的浓度范围为 0.13~64.00 mol/L,0.03~32.00 mol/L。组合药物 FIC 指数=MIC 甲药联用/MIC 甲药单用+MIC 乙药联用/MIC 乙药单用。药物选择:头孢哌酮/舒巴坦与左氧氟沙星、多粘菌素 B 与阿米卡星。见表 3,4。

表 3 单用药物与联用药物的 MIC 值对照

	单用		联用	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
CFS	128	256	4	8
LVX	16	32	8	16
PLB	2	4	0.25	0.5
RIF	32	64	0.5	2.0

表 4 2 组药物 FIC 指数构成比

FIC 指数	组 1		组 2	
	株数	构成比/%	株数	构成比/%
≤0.05	30	69.8	40	93.0
0.10~1.00	12	27.9	3	7.0
1.01~2.00	1	2.3	0	0
>2.00	0	0	0	0
合计	43	100	43	100

3 讨论

铜绿假单胞菌耐药机制很复杂,有天然耐药的也有获得性耐药的,主要耐药机制有:①细菌产生抗菌活性酶,如 β 内酰胺酶;②细菌改变抗菌药物作用的靶位;③外膜通透性降低,大多阴性菌的膜孔蛋白通道数约为 105,铜绿假单胞菌的膜孔蛋白的通道仅是其他阴性菌通道的 1/4,更容易对亲水性抗生素耐药,从而逃避抗菌药物的作用;④生物膜形,可以先用磷霉素,阿奇霉素破膜,30 min 后再用别的抗生素;⑤主动泵出系统,铜绿假单胞菌对 β 内酰胺类抗生素耐药的主要机制是产生 β 内酰胺酶,其中最为常见的是金属 β 内酰胺酶,Ampc 酶和 ESBLs。细菌产生金属酶后会对绝大部分 β-内酰胺类抗生素(包括含酶抑制剂的复合抗生素),Ampc 酶是一种诱导酶,引起对多种 β-内酰胺类抗生素及其含酶抑制剂的抗生素交叉耐药,有效水解第 3 代头孢菌素,头霉素,但对酶抑制稳定,对碳青霉烯类及 4 代头孢菌素敏感,ESBLs 可有效水解 3 代头孢菌素,部份可水解 4 代头孢菌素,但对碳青霉烯类,头霉素类和内酰胺酶抑制剂敏感。同时产 Ampc 酶,ESBLs 的菌株则首选碳青霉烯类^[5]。

本试验中铜绿假单胞菌中 β-内酰胺酶的产酶率为较高水平,达 31.6%。以金属酶最为突出

(18.4%),其次为 Ampc 酶(9.6%),再次为 ESBLs (5.9%)。甚至出现双重产酶菌株,并可在同种和异种呈水平与垂直传播。以上资料显示出,不产酶菌的耐药率从高到低依次为哌拉西林/他巴唑坦,氨曲南,头孢吡肟,头孢他啶,阿米卡星,环丙沙星,左氧氟沙星,替卡西林/克拉维酸,哌拉西林,妥布霉素,亚胺培南,头孢哌酮/舒巴坦,美罗培南,多粘菌素 B。而产酶菌的耐药率从高到低依次为哌拉西林,亚胺培南,环丙沙星,美罗培南,氨曲南,替卡西林/克拉维酸,头孢他啶,帕拉西林/他巴唑,妥布霉素,阿米卡星,头孢哌酮/舒巴坦,左氧氟沙星,头孢吡肟,多粘菌素 B。

由此可见,产酶菌的耐药性与非产酶菌的药物敏感性差异有统计学意义。控制好产酶耐药菌的传播和耐药基因的转移,即初次敏感的菌株在开始治疗 3~4 d 后就有可能变成耐药株,所以在治疗过程中要反复测试分离株的耐药性,要严格按照体外药敏试验的结果用药,重症感染者联合用药也是降低铜绿假单胞菌耐药的有效手段^[6]。实验室应加强对耐药酶的检测能力,特别是产 2 种以上 β 内酰胺酶菌株的耐药性检测,加强医院感染监测,定期发布耐药监测,有效提高经验用药的效果,合理慎重的选用碳青霉烯类抗生素,其在治疗过程中易出现诱导耐药,不越级使用高效抗生素,以保护优秀抗生素使用期限。

细菌产生耐药性的速度远快于新一代抗菌药物的问世,每一位医务工作者都有责任保证优秀抗生素使用期限和范围。

参考文献

[1] 许时菲,贾翠兰,冶辉,等. 铜绿假单胞菌分离率及耐药性分析[J]. 中外医学研究,2014,12(13):68—69.

[2] 刘树华. 2010~2013 年烧伤病房铜绿假单胞菌分离率及耐药性分析[J]. 中国临床研究,2014,27(21):81—84.

[3] 叶晓涛,张旭. ICU 与普通病房铜绿假单胞菌感染分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(10):2196—2198.

[4] 赵祝香,陈惠玲,魏树全. 多耐药铜绿假单胞菌耐药性及耐药基因分析[J]. 中国实验诊断学,2011,15(7):1159—1162.

[5] 陈玉玉,吴移谋,刘双全,等. 铜绿假单胞菌体外联合药物敏感性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(24):5618—5620.

[6] 张传飞. 多重耐药铜绿假单胞菌产 ESBLs 酶与高产 AmpC 酶情况及药物敏感性研究[J]. 中国微生态学杂志,2015,27(1):76—79.

(收稿日期:2016-01-29)