

• 经验交流 •

2006~2010 年铜绿假单胞菌的耐药性分析

张贤芝¹, 徐 慧²

(1. 河南省漯河市中医院检验科, 河南漯河 462000; 2. 郑州大学第一附属医院检验科, 河南郑州 450003)

摘 要:**目的** 了解铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药情况和变化趋势。**方法** 收集 2006 年 1 月至 2010 年 12 月临床分离的 715 株铜绿假单胞菌采用纸片扩散法进行药敏试验; 采用双纸片协同法检测金属 β -内酰胺酶。**结果** 铜绿假单胞菌主要标本来源为痰(67.1%)和分泌物(16.6%), 其对阿米卡星的耐药率最低为 10.5%, 亚胺培南、美罗培南的耐药性从 2006 年的 3.41% 和 2.27% 分别上升至 2010 年的 26.4% 和 18.2%; 到 2010 年头孢哌酮、氨曲南、哌拉西林、庆大霉素的耐药率达 50% 以上; 对复方新诺明连续 5 年耐药率均高达 80% 以上, 头孢他啶、头孢吡肟的总耐药率分别为 20.4% 和 17.5%; 对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率低于哌拉西林/他唑巴坦, 分别为 15.9% 和 27.1%, 其余抗菌药物的耐药率约在 30%~50%。金属 β -内酰胺酶检出率为 5%。**结论** 铜绿假单胞菌耐药性总体呈上升趋势, 应加强监测, 指导临床合理使用抗菌药物, 控制医院耐药菌感染的流行。

关键词:假单胞菌, 铜绿; β 内酰胺酶类; 抗药性, 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.047 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2012)17-2140-03

铜绿假单胞菌(PA)是临床上最重要的非发酵菌之一。2007 年度全国细菌耐药性监测网所属 12 家三级甲等医院调查发现, PA 临床分离率, 仅次于大肠埃希菌, 列第 2 位^[1]。该菌对 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类抗菌药物天然及获得性耐药, 因此, 及时了解本地区 PA 的耐药变迁及相关耐药机制, 对临床有效治疗 PA 的感染和控制医院内耐药菌株的传播有着重要指导意义。现将本院 2006 年 1 月至 2010 年 12 月铜绿假单胞菌的标本分布、药敏试验结果和产金属 β -内酰胺酶情况报道如下。

1 材料与 方法

1.1 材料 实验菌株: 2006 年 1 月至 2010 年 12 月本院住院和门诊患者送检的痰、分泌物、尿液、引流液和胸腹水等标本中分离的 PA 共 715 株, 2006~2010 年分别分离 88、104、127、176、220 株。450 株(62.9%)来自住院患者, 265 株(37.1%)来自门诊患者。对同一患者相同标本分离的同种菌株, 选择首次分离株。质控菌株为 PA ATCC27853。

1.2 抗菌药物与试剂 MH 琼脂和 15 种抗菌药物纸片为 OX-oid 产品, EDTA、巯基乙酸钠(SMA)均购自 SIGMA 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株分离与鉴定 对各种标本进行接种、分离, 采用法国生物梅里埃公司的 API 20NE 系统进行菌种鉴定。

1.3.2 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法。按照 CLSI 规定标准判断结果。

1.3.3 产金属 β -内酰胺酶 PA 的检测 双纸片协同试验(DDST): 将 0.5 麦氏单位待测菌液均匀涂布于 MH 琼脂平皿, 平皿上贴 1 张亚胺培南(10 μ g)纸片, 相距 10 mm 处贴 1 张空白纸片, 并向其中加入 0.5 mol/L EDTA 4 μ L 和 300 mg/mL SMA 6 μ L, 35 $^{\circ}$ C 培养过夜, 如加入 EDTA 和 SMA 的纸片与亚胺培南纸片之间的抑菌圈有协同现象者为产酶菌株^[2]。

1.4 统计学处理 采用 WHONET5.4 完成数据的统计分析。

2 结 果

2.1 标本类型分布情况 临床分离的 715 株 PA 中, 痰标本 480 份, 占全部标本数的 67.1%; 分泌物 119 份, 占全部标本数的 16.6%。其他标本所占比率相对较低, 尿液标本 57 份(8.0%), 脓液标本 16 份(2.2%), 引流液标本 14 份(2.0%), 胸腹水标本 11 份(1.5%), 血液标本 7 份(1.0%), 静脉置管标本 4 份(0.6%), 胆汁标本 3 份(0.4%), 其他标本 4 份(0.6%)。

2.2 耐亚胺培南 PA 的分离率 从临床标本中分离的 715 株 PA 中有 140 株耐亚胺培南, 分离率为 19.6%。

2.3 金属 β -内酰胺酶检测 140 株耐亚胺培南 PA 中 7 株菌 DDST 阳性, 其余阴性, 检出率为 5%。

2.4 PA 药敏结果 铜绿假单胞菌对 15 种抗菌药物的耐药率, 详见表 1。

表 1 2006~2010 年 PA 对 15 种抗菌药物的耐药率[n(%)]

抗菌药物	2006 年	2007 年	2008 年	2009 年	2010 年	合计
头孢他啶	12(13.6)	19(18.3)	28(22.0)	38(21.6)	49(22.3)	146(20.4)
头孢吡肟	8(9.1)	15(14.4)	22(17.3)	33(18.7)	47(21.4)	125(17.5)
头孢哌酮	30(34.0)	38(36.5)	54(42.5)	75(43.0)	110(50.0)	307(42.9)
头孢哌酮/舒巴坦	7(8.0)	10(9.6)	16(12.6)	34(19.3)	47(21.4)	114(15.9)
氨曲南	27(30.6)	33(31.7)	41(32.3)	47(26.8)	110(50.0)	258(36.1)
亚胺培南	3(3.4)	10(9.6)	27(21.3)	42(24.1)	58(26.4)	140(19.6)
美罗培南	2(2.3)	5(4.81)	16(12.6)	30(17.0)	40(18.2)	93(13.0)
哌拉西林	28(31.8)	38(36.5)	53(41.7)	81(46.0)	111(50.5)	310(43.4)
哌拉西林/他唑巴坦	16(18.1)	21(20.2)	31(24.4)	37(21.0)	89(40.5)	194(27.1)

续表 1 2006~2010 年 PA 对 15 种抗菌药物的耐药率[n(%)]

抗菌药物	2006 年	2007 年	2008 年	2009 年	2010 年	合计
环丙沙星	27(30.7)	32(30.8)	43(33.9)	54(30.7)	78(35.5)	234(32.7)
左氧氟沙星	21(23.9)	34(32.7)	48(37.8)	47(26.7)	73(33.2)	223(31.1)
阿米卡星	7(8.0)	10(9.6)	12(9.4)	18(10.2)	28(12.7)	75(10.5)
庆大霉素	34(38.6)	47(45.1)	65(51.1)	95(54.0)	136(62.0)	377(52.7)
复方新诺明	71(80.7)	86(82.7)	107(84.3)	156(88.6)	202(91.8)	622(86.9)
替卡西林/克拉维酸	10(11.4)	21(20.2)	37(29.1)	63(35.8)	87(39.5)	218(30.5)

3 讨 论

PA 广泛分布于自然环境中, 容易通过呼吸道感染和接触传播, 是引起医院感染的重要病原菌之一^[3], 常引起下呼吸道、伤口、血液和泌尿系感染等。从本院临床标本分布来看, 以呼吸道标本为主, 仅痰标本就占 67.1%, 与李晓玲等^[4]报道的结果一致, 低于雷鸣和朱志斌^[5]报道的结果。有研究表明 PA 引起的呼吸道感染具有难治性、高耐药性和高病死率^[6], 对临床感染控制构成严重威胁。因此, 医护人员必须严格执行各种消毒隔离制度和有创导管的无菌操作, 以减少医院感染的发生。

PA 对多种抗菌药物天然耐药, 且易变异, 容易经诱导对临床常用抗菌药物产生获得性耐药。本研究药敏结果显示, PA 对 15 种抗菌药物的耐药性总体呈上升趋势, 但程度不一。2006 年 PA 耐药率最低的是美罗培南, 其次为亚胺培南; 临床常用的头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、阿米卡星和头孢他啶的耐药率相对较低, 该结果与顾俊明等^[7]报道的结果接近。虽然阿米卡星的体外敏感性很高, 但在肺组织中的分布浓度低, 因而限制了其在疾病中的应用, 对 PA 重症感染患者的治疗应考虑 β-内酰胺类抗假单胞菌药与氨基糖苷类的联合应用^[8]。2008 年和 2009 年的药敏结果低于同期艾效曼等^[9-10]的报道, 2009 年和 2008 年相比升高趋势减慢, 部分抗菌药物耐药率下降, 可能与本院这两年加强耐药菌监测, 控制抗菌药物的滥用有关。到 2010 年头孢哌酮、氨曲南、哌拉西林、庆大霉素的耐药率达 50% 以上; 对复方新诺明连续 5 年耐药率均高达 80% 以上, 第三代头孢菌素头孢他啶因对多种 β-内酰胺酶稳定, 总耐药率为 20.4%, 可作为治疗 PA 感染的有效药物; 第四代头孢菌素头孢吡肟, 对 β-内酰胺酶尤其是 AmpC 酶具有较好稳定性, 总耐药率为 17.5%, 低于第三代头孢菌素, 故在治疗 PA 感染时, 可使用第四代头孢替换第三代头孢减少细菌的抗菌药物压力, 以恢复第三代头孢菌素抗菌活性^[11]; 氟喹诺酮类中的环丙沙星、左氧氟沙星耐药率为 30% 左右, 有中度抗菌活性; 值得注意的是亚胺培南、美罗培南的耐药性分别从 2006 年的 3.41% 和 2.27% 分别上升至 2010 年的 26.4% 和 18.2%, 增长幅度较大, 可能与临床近年大量使用碳青霉烯类抗菌药物有密切关系, 用药频度与细菌耐药呈正相关^[12]。碳青霉烯类抗菌药物是治疗 PA 感染的一线药物, 耐亚胺培南 PA 的出现不但增加了临床用药难度和治疗费用, 而且严重威胁患者的生命^[13-14], 加强对该类菌株的监测非常必要。

随着抗菌药物的广泛和不规范应用, 抗菌药物耐药是临床有效治疗 PA 感染所面临的一大难题。PA 产生的金属酶能水解包括碳青霉烯类抗菌药物在内的绝大多数 β-内酰胺类抗菌药物, 是碳青霉烯类抗菌药物耐药的重要机制之一^[15]。本院 2006~2010 年临床分离的 140 株耐亚胺培南 PA 株中筛选出 7 株产金属 β-内酰胺酶, 检出率为 5.0%, 与有关报道一致^[16],

略低于全国水平^[17]。虽然检出率较低, 但绝大多数的金属酶却是由质粒介导的, 极易通过不同菌株之间的转导进行播散, 随时可能引起医院感染的暴发和流行。为有效控制其在院内的广泛传播, 临床在治疗该类临床分离菌株时应针对其耐药机制选择有效的抗菌药物治疗。

综上所述, PA 的耐药性呈上升趋势, 临床中已出现产金属 β-内酰胺酶菌株, 医生要根据药敏结果合理、适量、分阶梯的应用抗菌药物, 以减缓细菌耐药性的快速增长。微生物室要加强对 PA 耐药率的连续监测^[18], 同时加强金属 β-内酰胺酶流行的研究和监测, 对防止医院内耐药菌株传播具有重要意义。

参考文献

[1] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2007 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2008, 8(5): 325-333.

[2] Lee K, Lim YS, Yong D, et al. Evaluation of the Hodge test and imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4623-4629.

[3] 郭仲辉, 黎毓光, 林晓晖, 等. 2003~2007 年铜绿假单胞菌耐药性变迁分析 [J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2): 153-155.

[4] 李晓玲, 高婷, 王霞, 等. 铜绿假单胞菌临床分离情况及对常用抗生素的耐药性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(8): 864-868.

[5] 雷鸣, 朱志斌. 铜绿假单胞菌医院感染及耐药性研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(7): 592-594.

[6] Worlitzsch D, Tarran R, Uhlrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients [J]. J Clin Invest, 2002, 109(3): 317-325.

[7] 顾俊明, 李家泰, 王镇山, 等. 2004~2005 年住院患者细菌耐药监测研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(6): 615-622.

[8] 孙景勇, 倪语星, 汪复, 等. 2007 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 192-195.

[9] 艾效曼, 陶凤蓉, 宣天芝, 等. 2008 年北京医院细菌耐药监测结果 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(2): 134-138.

[10] 艾效曼, 陶凤蓉, 陈东科, 等. 2009 年北京医院细菌耐药监测结果 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(2): 141-146.

[11] 李庆兴, 金益辉, 王邦松, 等. 我院铜绿假单胞菌对 β-内酰胺类抗生素的耐药性调查与控制策略 [J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(4): 226-228.

[12] 梁陈方, 蒋利君, 韦晓谋. 第三代头孢菌素的用药频度与耐药现状分析 [J]. 中国药物与临床, 2005, 5(3): 192-194.

[13] Lautenbach E, Synnestvedt M, Weniner MG, et al. Imipenem-resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: emergence, epidemiology, and impact on clinical and economic outcomes [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010, 31(1): 47-53.

[14] Furtado GH, Berqamasco MD, Menezes FG, et al. Imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical in-

tensive care unit; risk factors and mortality[J]. J Crit Care, 2009, 24(4):9-14.

[15] 李立艳, 魏殿军, 门昆, 等. 天津地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌 blaIMP-1 及相关整合子分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(3):290-292.

[16] 王贵年, 姜波, 吴金英. 铜绿假单胞菌产金属 β -内酰胺酶的临床调查研究[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(10):899-901.

[17] 周志慧, 张俊丽, 瞿婷婷, 等. 我国 28 家医院中铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药性及同源性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(11):1228-1232.

[18] 将景华, 陈文光, 章泽豹, 等. 244 株铜绿假单胞菌的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(12):1576-1577.

(收稿日期:2012-01-06)

• 经验交流 •

骨髓细胞化学染色对急性白血病分型的诊断意义

朱 竑¹, 崔 雯²

(1. 天津市公安医院检验科, 天津 300042; 2. 中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所血液病医院, 天津 300020)

摘 要:**目的** 利用细胞化学染色方法对各型急性白血病(AL)进行鉴别诊断。**方法** 对 188 例门诊和病房初诊 AL 患者的骨髓标本做细胞化学染色测定, 对其结果进行分析。**结果** MPO 和 SBB 的阳性指数强弱顺序均为 M3>M2b>M2a>M6>M4>M1>M5>ALL, AS-D NCE 的阳性指数强弱顺序为 M3>M2b>M5>M2a>M4>M6>M1>ALL, α -NAE 的阳性指数强弱顺序为 M5>M3>M2b>M2a>M4>M1>M6>ALL, PAS 的阳性率及阳性指数在不同类型的急性白血病中相差不大, 但是形态表现各有特点。**结论** 细胞化学染色是鉴别各型 AL 的重要手段, 可以提高诊断的准确性, 为临床治疗提供指导。

关键词: 白血病, 髓样, 急性; 白血病, 单核细胞, 急性; 过氧化物酶
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.048 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2012)17-2142-02

急性白血病(AL)是一组恶性克隆性造血干细胞疾病, 恶性克隆的细胞生物学行为异常主要体现在干细胞分化受阻、增殖过度和凋亡受阻^[1]。临床常见的急性白血病有急性髓系白血病(AML)和急性淋巴细胞白血病(ALL)两个主要类型。我国 20 世纪 70 年代白血病年发病率以浙江、江苏、福建和上海为最高^[2], 且近 5 年患者数明显多于前 5 年, 确诊例数呈稳步上升趋势^[3]。世界卫生组织(WHO)白血病诊断标准要求白血病的诊断方法是细胞形态学、免疫学和细胞遗传学的实验室诊断、临床症状、体征的联合诊断法^[4], 其中细胞化学染色是临床常用的诊断方法, 它对鉴别急性白血病的类型、鉴别诊断、疗效观察和预后评估起着十分重要的作用。本文对 188 例 AL 的骨髓细胞化学染色结果加以分析, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 10 月至 2012 年 2 月中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所血液病医院门诊和住院的初诊各类型 AL 患者 188 例, 其中男 104 例, 女 84 例。患者年龄 2~84 岁, 平均 33 岁, 其中 12 岁以下儿童 44 例。这 188 例均经染色体核型、分子生物学、流式细胞学、电镜和骨髓病理等检查确诊。

1.2 仪器 光学显微镜(日本 Olympus)、隔水式电热恒温培养箱(上海医疗器械七厂)。

1.3 方法 将新鲜的骨髓涂片置 4℃冰箱干燥保存, 7 d 之内染色。染色前将标本平衡到室温再从标本盒内取出, 不同染色方法选取不同的固定方法固定涂片后方可进行染色。髓过氧化物酶(MPO)染色采用二氨基联苯胺法, 苏丹黑 B(SBB)染色采用苏丹黑 B 染色法, 氯乙酸 AS-D 萘酚酯酶(AS-D NCE)染色、 α -醋酸萘酚酯酶(α -NAE)染色、氟化钠(NaF)抑制试验采用六偶氮副品红法(Yam 法), 糖原染色(PAS)采用过碘酸-雪夫反应。

1.4 结果判定 在油镜下观察骨髓片的体尾交界处, 按照组

化的常规方法计数片中 100 个原始及幼稚细胞的阳性率, 将阳性率分为+、++、+++、++++ 4 个级别, 计算阳性指数并对白血病的类型加以分析。

2 结 果

188 例 AL 患者中 M1(急性粒细胞白血病未分化型)2 例, M2(急性粒细胞白血病部分分化型)48 例(包括 M2a 30 例和 M2b 18 例), M3(急性早幼粒细胞白血病)10 例, M4(急性粒单核细胞白血病)6 例, M5(急性单核细胞白血病)46 例, M6(急性红白血病)6 例, ALL 70 例。各类型白血病的阳性指数见表 1。

表 1 不同染色方法在各类型白血病中的阳性指数							
分型	<i>n</i>	MPO	SBB	AS-D NCE	α -NAE	NaF	PAS
M1	2	66	105	2	25	22	104
M2a	30	173	225	81	60	56	111
M2b	18	195	236	169	77	72	103
M3	10	302	371	224	92	88	160
M4	6	141	191	77	46	23	107
M5	46	57	92	145	115	11	109
M6	6	161	211	40	19	12	125
ALL	70	0	0	0	14	12	87

3 讨 论

细胞化学染色是以细胞形态学为基础, 综合运用化学反应的原理对血细胞内的各种化学物质(包括酶类、脂类、糖类、铁、蛋白质、核酸等)作定性、定位、半定量分析的方法^[5]。MPO 是粒细胞进入循环之前在骨髓内合成并贮存于嗜天青颗粒中的一种血红素蛋白酶, 主要存在于中性粒细胞、单核细胞和某些巨噬细胞中, 其主要功能是破坏生物氧化过程中有剧毒的过氧