

• 临床检验研究论著 •

60 株铜绿假单胞菌耐药性分析及流行病学调查*

徐令清, 汪峰, 刘彩林, 欧国平, 孙明月, 孙自镛[△]

(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科, 湖北武汉 430030)

摘要:目的 分析一段时期内 60 株铜绿假单胞菌(PA)的耐药性并及其 DNA 多态性。方法 对临床分离的 60 株不重复铜绿假单胞菌采用 Kirby-bauer(KB)法进行药敏试验, 并进行随机引物多态性扩增。结果 耐药率最高的是米诺环素和复方新磺胺甲恶唑, 分别为 100% 和 96.6%, 其次是哌拉西林(55%), 左氧氟沙星(51.6%), 亚胺培南(48.3%)和美洛培南(46.6%), 耐药率较低是头孢他啶(15.0%)和阿米卡星(38.3%)。各菌株基因型差别较大, 在同一科室内有小范围的流行。结论 PA 对多种抗菌药物耐药率均较高, 仅头孢他啶与阿米卡星耐药率较低, 临床可考虑选用。各菌株基因型差别较大, RAPD 可以作为 PA 流行病学调查的手段之一。

关键词:假单胞菌, 铜绿; 抗药性; 随机引物; 流行病学, 分子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)05-0565-03

Drug resistance and epidemiological investigation of 60 *Pseudomonas aeruginosa* strains*

Xu Lingqing, Wang Feng, Liu Cailin, Ou Guoping, Sun Mingyue, Sun Ziyong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To explore the drug resistance and DNA polymorphism of 60 *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Methods** 60 non-repetitive PA clinical isolates were collected from June to August and K-B method was used for the determination of drug resistance pattern. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis was used for gene typing. **Results** The highest resistance rates were minocycline (MH) and cotrimoxazole(SMZ), 100% and 96.6% respectively, followed by piperacillin(PIP) (55%), levofloxacin (LEV), imipenem(IPM) and meropenem(MEM), 55.0%, 51.6%, 48.3% and 46.6% respectively, yet ceftazidime(CAZ) and amikacin(AMK) marked the lowest resistance rates, 15.0% and 38.3% respectively. There were significant differences in genotype in most strains and there was a small epidemics in the same ward during the period. **Conclusion** Most PA strains were resistant to many antibiotics, and only CAZ and AMK possessed the lowest resistant rate and may be recommended for clinical treatment. RAPD analysis is a useful tool in molecular epidemiology.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; drug resistance; random primer; epidemiology, molecular

铜绿假单胞菌(PA)广泛存在于自然界和人体皮肤中, 是临床最常见的条件致病菌, 近年来随着各种抗菌药物的大量使用, 该菌对多种抗菌药物的耐药性逐渐增强, 有些出现多耐药和泛耐药菌株, 给临床上的治疗带来极大的难度。

1 材料与与方法

1.1 菌株 2012 年 6 月至 2012 年 8 月从本院住院部及门诊患者送检标本中共分离出的不重复的铜绿假单胞菌 60 株, 经 VITEK-2 全自动微生物鉴定仪(法国梅里埃公司)或 API 20 NE(法国梅里埃公司)对菌株进行鉴定。铜绿假单胞菌(ATCC27853)为质控菌。

1.2 仪器与试剂 9600PCR 扩增仪和凝胶成像系统均为美国 Bio-Rad 公司产品。抗菌药物药敏纸片为英国 OXOID 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 采用纸片扩散法进行药物敏感试验, 所有实验操作及判读标准参考 CLSI2010 版的标准进行。对药敏试验结果用 WHONET 5.5 软件进行处理。

1.3.2 DNA 的制备 采用煮沸法提取细菌 DNA。

1.3.3 PCR 反应 随机引物多肽性扩增(RAPD)的总反应体系为 25 μ L。其中 10 \times buffer 2.5 μ L; 25 mmol/L MgCl₂ 1.5

μ L; 200 mmol/L dNTP 0.5 μ L; 引物 0.5 μ L; 5U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L; 模板 DNA 2 μ L; 双蒸水补足至 25 μ L。随机引物为一条含 9 bp 的引物, 序列为 5'-ATG GAC GGC-3', 由 Intrivogen 公司合成。扩增条件 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 进行 45 个循环, 每次循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 55 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电压 100 V 电泳 60 min, 凝胶成像系统拍照, 观察结果。

2 结果

2.1 PA 的抗菌药物耐药性 耐药率最高的是米诺环素和复方磺胺甲恶唑, 分别为 100% 和 96.6%, 其次是哌拉西林(55%), 左氧氟沙星(51.6%), 亚胺培南(48.3%)和美洛培南(46.6%), 耐药率较低是头孢他啶(15.0%)和阿米卡星(38.3%)。见表 1。

表 1 60 株 PA 的耐药率情况

抗生素	耐药株(n)	耐药率(%)
SXT	58	96.6
CIP	27	45.0

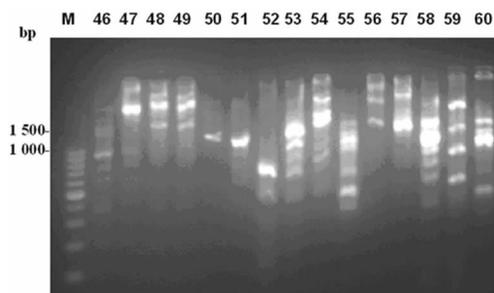
* 基金项目: 国家科技重大专项“十二五”资助课题(2012ZX1000 4207-004)。 作者简介: 徐令清, 在读博士研究生, 主要从事微生物耐药性研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zysun@tjh.tjmu.edu.cn。

续表 1 60 株 PA 的耐药率情况

抗生素	耐药株(n)	耐药率(%)
CN10	29	48.3
AK	23	38.3
IPM	29	48.3
CAZ	9	15.0
ATM	26	43.3
PIP	33	55.0
SCF	28	46.6
LEV	31	51.6
FEP	26	43.3
TZP	27	45.0
MEM	28	46.6
MH	60	100.0
CFP	29	48.3

SXT:复方磺胺甲恶唑;CIP:环丙沙星;CN10:庆大霉素;AK:阿米卡星;IPM:亚胺培南;CAZ:头孢他啶;ATM:氨曲南;PIP:哌拉西林;SCF:头孢哌酮/舒巴坦;LEV:左氧氟沙星;FEP:头孢吡肟;TZP:哌拉西林/他唑巴坦;MEM:美洛培南;MH:米诺环素;CFP:头孢哌酮。

23,40,48。多耐药组(耐 IMP/MEM 及 3 种以上抗菌药物)2, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 34, 40, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 54, 55, 56, 59。敏感组(对大多数抗生素均敏感):1, 3, 6, 7, 9, 15, 16, 18, 19, 20, 25, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 38, 39, 42, 50, 51, 53, 57, 58。12 和 13 号, 22 和 23 号, 24 和 25 号, 26 和 28 号, 48 和 49 分别呈现为同一基因型。其他菌株的型别皆具有其独特性(图 1~4)。耐药谱相同的基因型有很大差异, 基因型相同的菌株其耐药谱也不一样。耐药谱与基因型之间未见明显的相关性。



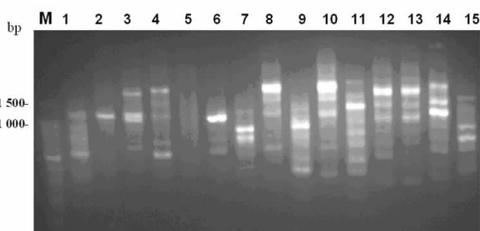
M:DNA 标记物;46~60:PA 菌株。

图 4 46~60 株 PA 的 RAPD 图

3 讨论

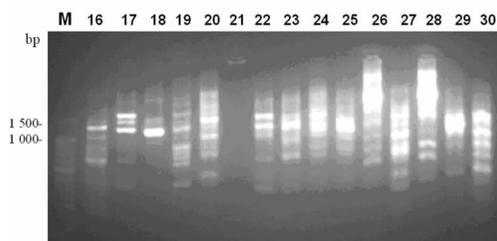
PA 是自然界中广泛存在的一种微生物,也是人体皮肤、呼吸道常见的条件致病菌之一。近年来,PA 的临床感染逐渐增多,并随着抗菌药物的广泛使用,其对碳青霉烯类抗生素耐药菌株亦有逐年上升的趋势。朱德妹等^[1]报道 2002 年上海地区医院 PA 对亚胺培南的耐药率为 26%;王辉等^[2]对 2003~2004 年中国十家教学医院革兰阴性杆菌耐药性分析 PA 对亚胺培南的耐药率为 22%~24%。2006 年 CHINET 细菌耐药监测数据显示,PA 对亚胺培南和美罗培南耐药率较 2005 年有所增高,尤以细菌对亚胺培南的耐药率升高较显著(自 31% 升高至 42.8%),对美罗培南耐药率为 34.1%^[3]。2008 年 CHINET 细菌耐药性监测显示对美罗培南和亚胺培南的耐药率分别是 24.5% 和 30.5%^[4]。2010 年 CHINET 细菌耐药性监测显示对美罗培南和亚胺培南的耐药率分别是 25.8% 和 30.8%^[5]。研究显示本院在一段时期内 PA 对美罗培南及亚胺培南的耐药率分别达到 46.6% 和 48.3%,这与辛续丽等^[6]报道 IMP2009 和 2010 耐药率分别为 53.2 和 58.8% 比较接近,但与吴祥林等^[7]报道的 2010 年 IMP 耐药率 5.1% 相差较远,这种不同地区耐药率的差异可能与本地区抗菌药物的使用有关,同时与纳入菌株的数量有一定关系。在本研究中米诺环素,复方磺胺甲恶唑,哌拉西林,左氧氟沙星,环丙沙星呈现出较高的耐药率,而头孢他啶(15%)和阿米卡星(38.3%)耐药率较低,临床上根据患者情况可以考虑选用,当然还要根据具体的药敏结果及患者实际情况进行合理选择,避免滥用。

在耐碳青霉烯类抗菌药物菌株中,几乎都出现了多重耐药株(MRD);并检出全耐药株(2, 23, 40, 48),绝大多数来自 ICU 病房,这值得更多的关注。PA 对抗生素产生广泛的耐药性主要是由于它的多种耐药机制所决定,其主要耐药机制有产生 β-内酰胺酶,细菌外膜通透性降低,如外膜孔蛋白 D2(OprD2)缺失,菌体蛋白结构和功能改变,形成生物保护膜等^[8-9]。在临床送检的各种标本中以痰液标本最多(占 75%),其次是分泌物,导管,胆汁(各占 3.3%),而标本来源科室中 ICU(13 株),占 21.6%,其次是呼吸内科和胸外科,分别为 13.3% 和 6.6%。提示本院的铜绿假单胞菌主要以呼吸道感染为主,且主要来源



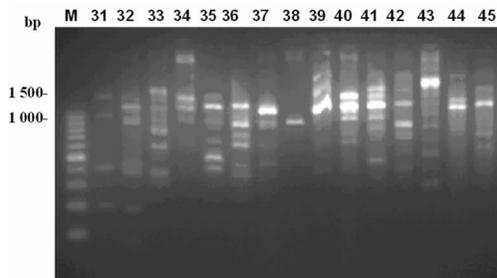
M:DNA 标记物;1~15:PA 菌株。

图 1 1~15 株 PA 的 RAPD 图



M:DNA 标记物;16~30:PA 菌株。

图 2 16~30 株 PA 的 RAPD 图



M:DNA 标记物;31~45:PA 菌株。

图 3 31~45 株 PA 的 RAPD 图

2.2 PA 耐药性及 RAPD 基因分型 60 株 PA 临床菌株 RAPD-PCR 产物分成 55 种基因型。60 株临床分离株的呈现多种型别,不同菌株的 RAPD 谱型中的扩增 DNA 片段数目为 1~7 条。全耐药组(对 15 种抗菌药物全部耐药的菌株)为 2,

于 ICU 及呼吸内科、胸外科及神经内科等。

RAPD 技术是 1990 年由 Williams^[10]、Welsh 和 McClelland^[11] 建立的揭示基因多态性的分型方法,是在 PCR 基础上发展起来的一种分子生物学技术。由于其使用随机的单条引物,基因组 DNA 分子如发生片段插入,缺失或碱基突变,将造成引物特定结合位点的变化,使 PCR 产物的条带发生分子量与数目的改变;它的特异性较好,分析周期相对较短,且简易、稳定、可靠,也不需要特殊的试剂和生物材料,几乎适用于所有生物的分型,尤其是对一些尚未建立标准分型方法和缺乏血清型等方法的菌种的鉴定和分型特别实用。本研究中出现了 4 株全耐药株,对所有抗菌药物都耐药,但其基因型没有相似性。另外泛耐药株与泛耐药株之间,及敏感株与敏感株之间的基因型也是各有特点,并不一样。在本研究中检出了 5 对相同型别的菌株,分别来自于 ICU,呼吸内科,胸外科和神经内科病房,且发现是分离自不同的患者,时间只相隔 1~2 周,有可能说明在短时间内出现了科室内的规模流行。而其他的病区患者检出的 PA 菌株 RAPD 型别各不相同,表明各病区无交叉感染现象出现,为 PA 的医院感染的散发流行。

总之,RAPD 分型法稳定性较好,分型率、分辨率很高;最大特点是不需已知基因组系列即可进行分型,且该技术具有快速、简单、省时、省力等优点。因此,得到广泛应用。目前尚未对 RAPD 进行统一、标准化,因而难以对不同实验室 RAPD 结果以及流行菌株特征比较,这成为 RAPD 技术的不足之处。由于 PA 在自然界广泛存在,并通过多种途径传播,因此,医院要建立健全的消毒制度,实施严格的消毒措施。医护人员更要勤洗手,认真执行各项无菌操作,防止该菌在院内传播。

参考文献

[1] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2002 年上海地区医院细菌耐药性监测

[J]. 中华传染病杂志,2004,22(3):154-159.
 [2] 王辉,陈民钧,倪语星,等. 2003~2004 年中国十家教学医院革兰阴性杆菌的耐药分析[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(12):1295-1303.
 [3] 汪复. 2006 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国抗感染化疗杂志,2008,8(1):1-9.
 [4] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(5):321-329.
 [5] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.
 [6] 辛续丽,杨朵,王松雪,等. 铜绿假单胞菌院内感染分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(1):99-101.
 [7] 吴祥林,肖丽霞,马东礼,等. 59 株铜绿假单胞菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(15):1782-1783.
 [8] 周立新,张秀平,方滨,等. 重症监护病房感染患者铜绿假单胞菌的分离与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2004,14(7):807-808.
 [9] 王继东,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.
 [10] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990,18(22):6531-6535.
 [11] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (24): 7213-7218.

(收稿日期:2012-11-23)

(上接第 564 页)

creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation[J]. Clin Chem,2000,46(8 Pt 1):1206-1207.
 [5] Filler G, Lepage N. Should the schwartz formula for estimation of GFR be replaced by cystatin C formula [J]. Pediatr Nephrol, 2003,18(10):981-985.
 [6] Larsson A, Malm J, Grubb A, et al. Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L[J]. Scand J Clin Lab Invest,2004,64(1):25-30.
 [7] Rule AD, Bergstralh EJ, Slezak JM, et al. Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations [J]. Kidney Int,2006,69(2):399-405.
 [8] Grubb A, Nyman U, Björk J, et al. Simple cystatin C-based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the Schwartz and the Counahan-Barratt prediction equations for children[J]. Clin Chem,2005,51(8):1420-1431.
 [9] Stevens LA, Coresh J, Schmid CH, et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3,418 individuals with CKD[J]. Am J Kidney Dis,2008,51(3):395-406.
 [10] Grubb A, Blirup-Jensen S, Lindström V, et al. First certified reference material for cystatin C in human serum ERM-DA471/IFCC [J]. Clin Chem Lab Med,2010,48(11):1619-1621.
 [11] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to

estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group[J]. Ann Intern Med,1999,130(6):461-470.
 [12] Traynor J, Mactier R, Geddes CC, et al. How to measure renal function in clinical practice[J]. BMJ,2006,333(7571):733-737.
 [13] Fischbaeh M, Graff V, Terzic J, et al. Impact of age on reference values for serum concentration of cystatin C in children[J]. Pediatr nephrol,2002,17(2):104-106.
 [14] Price CP, Finney H. Developments in the assessment of glomerular filtration rate[J]. Clin Chim Acta,2000,297(1-2):55-66.
 [15] Hsu CY, Chertow GM, Curhan GC. Methodological issues in studying the epidemiology of mild to moderate chronic renal insufficiency[J]. Kidney Int,2002,61(5):1567-1576.
 [16] Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, et al. Cystatin C as a marker of GFR—history, indications, and future research [J]. Clin Biochem,2005,38(1):1-8.
 [17] Tidman M, Sjöström P, Jones I. A comparison of GFR estimating formulae based upon s-cystatin C and s-creatinine and a combination of the two[J]. Nephrol Dial Transplant,2008,23(1):154-160.
 [18] Swaminathan R. Cystatin for estimation of glomerular filtration rate[J]. Lancet,2001,357(9250):143-144.
 [19] Deinum J, Derkx FH. Cystatin for estimation of glomerular filtration rate[J]. Lancet,2000,356(9242):1624-1625.

(收稿日期:2012-08-21)