

• 临床检验研究论著 •

多重及泛耐药铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌医院感染 调查及产碳青霉烯酶表型研究*

区云枝, 刘春林, 韩福郎, 黄德兵, 关幼华

(南方医科大学附属南海医院检验科, 广东佛山 528200)

摘要:目的 了解铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌院内感染分布、耐药特点以及产碳青霉烯酶表型情况。方法 回顾性收集 2012 年 7 月到 2013 年 7 月该院分离非重复铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌医院感染菌株及病例。采用纸片扩散法(K-B法)进行药敏试验,改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶初筛,初筛阳性菌株应用 2-巯基丙酸协同法进一步检测金属酶。结果 在研究期间,共纳入非重复铜绿假单胞菌 250 株,鲍曼不动杆菌 132 株。菌株标本类型以痰液(55.5%)为主,科室分布以重症监护病房(20.9%)为主。药敏试验显示:铜绿假单胞菌对测试药物敏感性较好,均大于 70%以上,对 IPM 和 MEM 耐药率较低分别为 8.5%、9.5%,然而鲍曼不动杆菌对测试药物耐药率较高达 35.2%~77.4%,对 IPM 和 MEM 耐药率分别为 35.2%、39.1%。多重耐药及泛耐药鲍曼不动杆菌医院感染发生率要高于铜绿假单胞菌分别为 44.7%和 24.0%;9.1%和 2.8%。40 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌,碳青霉烯酶初筛阳性 11 株占 27.5%,金属酶表型阳性 2 株占 18.2%;49 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,碳青霉烯酶初筛阳性 37 株占 75.5%,金属酶表型阳性 1 株占 2.7%。结论 该院铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物呈现不同耐药性,应加强监测。产碳青霉烯酶是鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类药物主要机制之一。产金属酶铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌检出率较低。

关键词:多重耐药; 泛耐药; 铜绿假单胞菌; 鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)16-2144-03

Investigation of nosocomial infections due to multidrug-resistant, pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* and study on carbapenemases-producing phenotype*

Ou Yunzhi, Liu Chunlin, Han Fulang, Huang Debing, Guan Youhua

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Nanhai Hospital of Southern Medical University, Foshan, Guangdong 528200, China)

Abstract: **Objective** To understand the nosocomial infection distribution, drug resistance characteristics and carbapenemases-producing phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) and *Acinetobacter baumannii* (ABA). **Methods** The nosocomial infection strains of non-repeated PAE and ABA isolated in this hospital and the infected cases from July 2012 to July 2013 were retrospectively collected. The antimicrobial susceptibility test was conducted by the disk diffusion method(K-B method). The modified Hodge test was adopted to preliminarily screen carbapenemase and the positive strains of preliminary screening were further detected metallo-beta-lactamase(MBL) by 2-mercaptopyruvic acid synergy test. **Results** During the study period, 250 strains of non-repeated PAE and 132 strains of ABA were included. All of them were primarily isolated from sputum specimens, accounting for 55.5%. The department distribution was dominated by the intensive care units (ICU), accounting for 20.9%. The antimicrobial susceptibility test showed that the sensitivity of PAE to the testing anti-microbial drugs was more than 70%, its resistance rates to IPM and MEM were 8.5% and 9.5% respectively. However, the resistance rates of ABA to the testing anti-microbial drugs were up to 35.2%—77.4%, its resistance rates to IPM and MEM were 35.2%, 39.1% respectively. The occurrence rates of multidrug-resistant and pandrug-resistant ABA nosocomial infection was higher than that of PAE, which were 44.7% and 24.0% and 9.1% and 2.8%, respectively. Among 40 strains of carbapenem-resistant PAE, 11 strains(27.5%) were positive in the preliminary screening and 2 strains(18.2%) were positive of MBL phenotype. Among 49 strains of carbapenem-resistant ABA, 37 strains(75.5%) were positive in the preliminary screening and only 1 strain(2.7%) was positive of MBL phenotype. **Conclusion** PAE and ABA in our hospital exhibit different resistance to common antibacterial drugs. The monitoring should be strengthened. The production of carbapenemase is one the main mechanisms for PAE resistance to carbapenems. The detection rate of MBL-producing PAE and ABA is lower in our hospital.

Key words: multidrug-resistant; extensively drug-resistant; *Pseudomonas aeruginosa*; acinetobacter; carbapenemase

铜绿假单胞菌(PAE)和鲍曼不动杆菌(ABA)是引起医院感染常见且重要的条件致病菌,随着广谱抗菌药物的广泛使用,耐药问题严重,特别是多重耐药(MDR)及泛耐药(XDR)菌

株的出现,使细菌耐药性成为全球关注的问题^[1]。碳青霉烯类药物是治疗多重耐药菌株的首选药物,然而碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的出现,一方面给临床抗感染治疗

* 基金项目:2013 年佛山市卫生局课题资助项目(243)。 作者简介:区云枝,女,主管检验师,主要从事微生物检验研究。

带来新的挑战,另一方面由于存在克隆菌株在不同地区、医院暴发流行,给院感防控工作难度加大^[2]。因此,本研究拟评价本院铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物耐药情况、多重及泛耐药菌株院内感染发生率及主要碳青霉烯酶耐药表型,指导临床合理用药,防止或延缓耐药菌株的产生和传播提供依据。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 回顾性收集 2012 年 7 月到 2013 年 7 月本院分离非重复铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌,选择符合引起医院感染病例,所有菌株根据临床资料确定是感染,而非定植,排除 48 h 内分离的菌株、重复株、非研究对象包含菌株以及非致病株均未统计在内。医院感染诊断标准依据卫生部 2001 年 1 月颁布的《医院感染诊断标准(试行)》。

1.2 菌株鉴定及药敏试验 应用 ATB 细菌鉴定药敏仪及传统手工方法进行菌株鉴定;采用纸片扩散法测定试验菌株对 12 种抗菌药物敏感性,结果判读参照 CLSI M100-S22。

1.3 药敏纸片 哌拉西林(PIP)、头孢哌酮/舒巴坦(SCF)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、庆大霉素(GM)、阿米卡星(AK)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、多黏菌素 B(PB)、空白纸片,以上纸片购自 OXoid 公司;2-巯基丙酸(MPA, Sigma 公司)。

1.4 多重及泛耐药菌株判定标准 判定标准参照文献^[3]。抗假单胞菌头孢菌素、抗假单胞菌碳青霉烯类、β 内酰胺酶抑制剂的复合制剂、氟喹诺酮类、氨基糖苷类,具有上述 3 类以上耐药者为多重耐药株;泛耐药株是指对目前推荐用于铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌感染经验治疗药物全部耐药者,但多黏菌素或替加环素除外。

1.5 碳青霉烯酶表型试验 改良 Hodge 试验^[4]。用 0.5 麦氏单位大肠埃希菌 ATCC25922 涂布 M-H 平板,接种待检菌的无菌接种环自平板中间向边缘划线,置于室温 15 min 后,中间贴亚胺培南纸片,35 °C 培养 18~24 h 后观察结果,亚胺培南抑菌圈内出现待检菌 矢状生长者为碳青霉烯酶菌株。

1.6 金属 β 内酰胺酶表型检测 双纸片协同试验^[5]:用 0.5 麦氏单位待测菌均匀涂布在 M-H 平板上,平板中央贴 1 个空白纸片,在其两侧对称贴 1 个 IPM 纸片和 1 个 CAZ 纸片,各纸片间的距离约为 2.0 cm,向空白纸片上加入 5 μL MPA(1.4 mmol/L),经 35 °C 培养 16~18 h 后观察结果,抑菌环出现任何协同现象者均为阳性。

1.7 质控菌株 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、产金属酶 IMP-1 型铜绿假单胞菌,由卫生部临检中心提供。

1.8 统计学处理 采用 WHONET5.4 软件,进行数据处理。

2 结果

2.1 标本类型与科室分布 在研究期间,共纳入符合研究条件非重复铜绿假单胞菌 250 株,鲍曼不动杆菌 132 株;标本类型以痰液 55.5%(212/382)、创面伤口拭子 16.8%(64/382)、尿液 6.3%(24/382)为主;科室分布以重症监护病房 20.9%(80/382)、神经外科 9.2%(35/382)、普外科 7.9%(30/382)为主。

2.2 耐药性分析 在 250 株铜绿假单胞菌中,多重耐药株有 60 例,发生率 24.0%;泛耐药有 7 株,发生率为 2.8%;然而多重耐药及泛耐药鲍曼不动杆菌发生率更高(44.7%、9.1%)。

药敏试验显示:铜绿假单胞菌对测试药物敏感性较好均大于 70%以上,对 IPM 和 MEM 耐药率较低分别为 8.5%、9.5%,对 PB 敏感性达 100.0%;然而鲍曼不动杆菌对测试药物耐药率较高达 35.2%~77.4%,对 IPM 和 MEM 耐药率分别为 35.2%、39.1%,对 SCF 和 PB 较高抗菌活性(80.0%~90.9%),见表 1。

表 1 铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物敏感性(%)

| 抗菌药物 | 铜绿假单胞菌(n=250) | | | 鲍曼不动杆菌(n=132) | | |
|------|---------------|------|-------|---------------|-----|------|
| | R | I | S | R | I | S |
| PIP | 18.1 | 4.7 | 77.2 | 77.4 | 0.0 | 22.6 |
| LEV | 16.2 | 8.1 | 75.7 | 48.6 | 0.0 | 51.4 |
| GN | 14.1 | 2.8 | 83.1 | 46.4 | 1.6 | 52.0 |
| CIP | 9.8 | 3.8 | 86.3 | 45.3 | 0.8 | 53.9 |
| FEP | 13.6 | 4.4 | 82.0 | 42.4 | 2.4 | 55.2 |
| AK | 3.4 | 1.3 | 95.3 | 42.4 | 0.8 | 56.8 |
| TZP | 10.1 | 2.8 | 87.2 | 41.3 | 0.0 | 58.7 |
| CAZ | 13.5 | 4.6 | 81.9 | 40.2 | 5.5 | 54.3 |
| MEM | 9.5 | 1.5 | 89.1 | 39.1 | 1.1 | 59.8 |
| IPM | 8.5 | 2.1 | 89.4 | 35.2 | 1.6 | 63.3 |
| PB | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 9.1 | 0.0 | 90.9 |
| SCF | 13.3 | 13.3 | 73.3 | 15.2 | 4.8 | 80.0 |

2.3 碳青霉烯酶表型检测 在 250 株铜绿假单胞菌中,其中有 40 株对亚胺培南和(或)美罗培南耐药,改良 Hodge 试验显示:碳青霉烯酶表型初筛阳性 11 株,可疑阳性 4 株,阴性 25 株;在 132 株鲍曼不动杆菌中,有 49 株对亚胺培南和(或)美洛培南耐药,碳青霉烯酶表型初筛阳性 37 株,可疑阳性 3 株,阴性 9 株,见表 2。

2.4 金属酶表型检测 对 11 株铜绿假单胞菌碳青霉烯酶初筛阳性应用双纸片协同试验检测金属酶表型,结果显示:金属酶表型阳性 2 株,可疑阳性 1 株,阴性 8 株;37 株鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶初筛阳性菌株中,金属酶表型阳性 1 株,可疑阳性 0 株,阴性 36 株,见表 2。

表 2 PA 和 AB 碳青霉烯酶和金属酶表型检测(n)

| 表型 | 改良 Hoge 试验 | | 双纸片协同试验 | |
|------|------------|-----|---------|-----|
| | PAE | ABA | PAE | ABA |
| 阳性 | 11 | 37 | 2 | 1 |
| 可疑阳性 | 4 | 3 | 1 | 0 |
| 阴性 | 25 | 9 | 8 | 36 |

3 讨论

本次研究中,多重耐药及泛耐药鲍曼不动杆菌医院感染发生率分别为 44.7%、9.1%,高于铜绿假单胞菌(24.0%、2.8%);铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶检出率分别为 27.5%、75.5%;然而金属酶检出率较低(18.2%、2.7%)。

多重耐药及泛耐药菌株的出现是临床治疗面临的难题。据 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测结果显示:XDR 铜绿假单胞菌发生率约为 1.7%;MDR 和 XDR 鲍曼不动杆菌发

生率分别为 55.0%、21.4%^[6-7]。在本次研究中,菌株标本类型以痰液占 55.5% 为主,科室分布以重症监护病房 20.9% 为主;药敏试验显示,铜绿假单胞菌对测试药物敏感性较好均大于 70% 以上,对 IPM 和 MEM 耐药率较低分别为 8.5%, 9.5%;然而鲍曼不动杆菌对测试药物耐药率较高达 35.2%~77.4%,对 IPM 和 MEM 耐药率分别为 35.2%、39.1%,对 SCF 和 PB 较高抗菌活性(80.0%~90.9%);多重耐药及泛耐药鲍曼不动杆菌医院感染发生率要高于铜绿假单胞菌分别为 44.7% 和 24.0%, 9.1% 和 2.8%, 低于上述的报道^[6-7]。可能的解释是,与医院结构、用药习惯、院感防控等有关。然而值得注意的是,研究者调查医院感染细菌耐药性,并不包括临床所有分离菌,数据可能更有说服力。

碳青霉烯酶的产生是铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类药物主要机制之一^[8]。本研究结果显示:铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶表型检出率分别为 27.5%, 75.5%, 与刘星等^[9]报道一致。然而金属 β-内酰胺酶(MBL)是国内外学者研究较多的一种碳青霉烯酶^[8]。在本次研究中,11 株碳青霉烯酶表型阳性铜绿假单胞菌中,金属酶初筛阳性占 18.2%;37 株碳青霉烯酶表型阳性鲍曼不动杆菌中,金属酶初筛阳性占 2.7%。可见,铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌金属酶检出率较低,与国内学者报道基本一致^[10]。因为有文献^[11]报道,耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌耐药机制主要是孔蛋白丢失和主动外排活跃。同样地,Zhou 等^[12]报道,耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药机制主要是和 D 类酶有关如 OXA-23 基因型等。

本研究存在一些不足。(1)表型方法结果判读,主观性较强^[13],需要经验丰富技术人员,比如本试验中出现几株不确定性结果。(2)尽管采用分子生物学手段可以确定菌株是否产碳青霉烯酶和(或)金属酶以及基因分型,但这需要相应的设备、技术、人员,更重要的是需要基于当地耐药模式、菌种类型等^[5,10-12]。

总之,多重耐药及泛耐药铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌医院感染不容忽视,应加强耐药菌株的监测、抗菌药物的合理使用,防止耐药菌株的播散。另一方面,碳青霉烯酶和金属酶表型检测要基于当地耐药模式、耐碳青霉烯类菌株发生率以及菌种类型等。

参考文献

[1] Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(2): 177-

184.
 [2] Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, et al. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: resistance mechanisms and implications for therapy[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010, 8(1): 71-93.
 [3] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3): 268-281.
 [4] Lee K, Lim YS, Yong D, et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolate of pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1): 4623-4629.
 [5] Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 2028-2037.
 [6] 张祎博,倪语星,孙景勇,等. 2010 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, 2012, 12(3): 161-166.
 [7] 习慧明,徐英春,朱德妹,等. 2010 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(2): 98-104.
 [8] 谷秀梅,杨敏,刘文恩. 产碳青霉烯酶菌株实验室检测研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 24(1): 68-70.
 [9] 刘星,张晓兵,罗阳,等. 产碳青霉烯酶鲍氏不动杆菌的表型筛选研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(10): 1941-1944.
 [10] Qu TT, Zhang JL, Wang J, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa strains in China[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 1136-1142.
 [11] He C, Xie Y, Fan H, et al. Spread of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii of European clone II in Western China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(3): 257-260.
 [12] Zhou H, Yang Q, Yu YS, et al. Clonal spread of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii among different cities of China[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 4054-4057.
 [13] Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, et al. Comparison of the double-disk, combined disk, and E-test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 49(1): 5-11.

(收稿日期:2014-02-01)

(上接第 2143 页)

[2] Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, et al. Outbreak of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 5094-5101.
 [3] 方子正,宋秀兰,沈鸿,等. 1 850 株病原菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(1): 95-96.
 [4] 杨虹,王丽,温见翔,等. 近 5 年铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的耐药性变迁研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(8): 936-940.
 [5] 赵津彩,张跃栋. 520 株铜绿假单胞菌临床分布和耐药性分析[J]. 检验医学, 2013, 28(8): 734-735.

[6] 周林涛,刘晓云,朱柏珍,等. 临床分离的铜绿假单胞菌的分布及耐药性变迁[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(13): 1696-1697.
 [7] 李力华,范文. 荆州市多药耐药铜绿假单胞菌的耐药特性探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6): 1227-1228.
 [8] 庞众多,李依萍,鲁彦. 102 株铜绿假单胞菌的分布和耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(8): 1073-1074.
 [9] 张瑞琴,陈灿,王凤芝,等. 医院内科系统铜绿假单胞菌耐药与抗菌药物的使用的相关性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(7): 539-544.

(收稿日期:2014-02-03)