

• 临床检验研究 •

# 铜绿假单胞菌的临床分布及 β-内酰胺酶耐药表型研究

李文波,温志震<sup>△</sup>,金凤玲,王 辉,钱兴玲,刘丽华  
(甘肃省第二人民医院检验科,兰州 730000)

**摘要:**目的 了解医院分离铜绿假单胞菌院内感染临床分布、产酶情况及其耐药性。方法 采用手工法及法国生物梅里埃鉴定系统对菌种进行鉴定,用琼脂扩散法进行药敏试验,采用双纸片扩散法、三维试验、协同法分别对细菌超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)、β-内酰胺酶(AmpC 酶)、金属酶进行检测。**结果** 铜绿假单胞菌分布于呼吸科、ICU、外科,其中呼吸科和 ICU 检出率最高,分别占总分离菌株的 50.7%和 18.7%;临床标本以痰标本为主,分离率为 80.6%,其次是脓汁和伤口分泌物;产 AmpC 酶 71 株,单产 ESBLs 酶 27 株,产金属酶 16 株,其中同时产 ESBLs 和 AmpC 酶菌株 17 株,产 AmpC 酶菌株检出率最高。**结论** 多重耐药铜绿假单胞菌以产 AmpC 酶为主,临床治疗应合理用药,减少耐药菌株产生和控制医院感染。

**关键词:**假单胞菌,铜绿; β-内酰胺酶类; 抗药性  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.019 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)09-0962-02

## Clinical distribution of pseudomonas aeruginosa and studies on drug resistance phenotype of β-lactamases

Li Wenbo, Wen Zhizhen<sup>△</sup>, Jin Fengling, Wang Hui, Qian Xingling, Liu Lihua

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Gansu, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the distribution, production of beta-lactamases and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) isolated in hospital. **Methods** Manual method and Biomerieux identification system were used to identify bacterial strains and agar diffusion method to detect drug susceptibility. K-B susceptibility method, three-dimensional test and synergetic test were used to detect extended spectrum β-lactamases (ESBLs), AmpC β-lactamases (AmpC) and metal β-lactamases, respectively. **Results** PA strains were mainly isolated from specimens from respiratory department (50.7%) and intensive care unit (18.7%). Specimens, ranged from the first to the third of the isolation rate of PA, were sputum (80.6%), pus and wound secretion. Among the isolated PA strains, 71 strains were detected for producing AmpC, 27 for ESBLs, 16 for metal β-lactamases, 17 for both ESBLs and AmpC. The detection rate of AmpC was the most high. **Conclusion** Multidrug resistant PA mainly produce AmpC. Rational use of drug would be important to reduce the production of drug-resistant strains and the control of hospital infection.

**Key words:** *pseudomonas aeruginosa*; beta-lactamases; drug resistance

铜绿假单胞菌是医院感染的重要病原菌,在临床感染的革兰阴性杆菌中一直处于首位,其感染可发生于人体任何部位和组织<sup>[1]</sup>。近年来,随着新型广谱抗菌剂在临床的广泛应用及滥用,使得铜绿假单胞菌的耐药率呈逐渐上升的趋势,出现了大量多重耐药菌株<sup>[2]</sup>,各种 β-内酰胺酶(AmpC 酶)的产生是耐药的主要机制<sup>[3]</sup>,多重耐药株引起的感染不仅是临床治疗面临诸多困难,也易引起医院感染暴发流行<sup>[4]</sup>。不同地区、医院铜绿假单胞菌的多重耐药性不同,对抗生素的耐药情况也不同。为了解本院铜绿假单胞菌的临床分布、产酶情况及耐药性,对 2007~2008 年间全院临床分离的 134 株铜绿假单胞菌进行超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)、AmpC 酶及金属酶的检测及耐药性分析,现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 分离自本院 2007 年 1 月至 2008 年 12 月全院各病区送检的各类临床标本,包括痰液、咽拭子、尿、伤口分泌物及脓汁、灌洗液等。菌种鉴定按第 3 版《临床微生物学和微生物检验》<sup>[5]</sup>进行分离鉴定,共分离出菌株 134 株。

### 1.2 方法

**1.2.1 分离及鉴定菌株** 从各科患者感染部位采取标本,接种血平板、麦康凯平板,35℃ 孵育 24 h 分纯菌落,根据革兰染色、生化反应等进行鉴定,必要时用微生物鉴定仪(法国梅里埃全自动微生物鉴定仪)进行鉴定。

**1.2.2 药敏试验** 采用 K-B 法,药敏试验结果按国际临床实

验室标准委员会(CLSI)2006 标准进行判读<sup>[6]</sup>。

**1.2.3 抗菌剂纸片** 氨苄西林(AMP)、哌拉西林(PIP)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢曲松(CRO)、头孢吡肟(FEP)、头孢哌酮(CFP)、头孢哌酮/舒巴坦(SCF)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LEV)、阿米卡星(AK)、亚胺培南(IMP)、妥布霉素(TOB)、复方新诺明(SXT)、头孢唑林(KZ)、头孢西丁(FOX)均由杭州天河微生物试剂有限公司提供,经质控检验合格使用。

**1.2.4 质控菌株** 药敏试验用标准菌株铜绿假单胞菌 ATCC 27853、大肠埃希氏菌 ATCC 25922,均购自省检验中心。肺炎克雷伯菌 ATCC 70063(ESBLs 阳性质控菌)、阴沟肠杆菌为高产 Amp 酶阳性对照菌,均购自省临床检验中心。

**1.2.5 M-H 培养基** 购于杭州天河微生物有限公司。

### 1.3 耐药酶检测

**1.3.1 ESBLs 检测** 采用 CLSI 推荐的双纸片扩散法确证实验<sup>[6]</sup>。

**1.3.1.1 初筛试验** 将细菌菌落稀释成 0.5 麦氏浊度的菌液,均匀涂抹于 M-H 平板上,在其上帖上头孢他啶、头孢噻肟、氨曲南、头孢曲松,37℃ 孵育 24 h,若头孢他啶的抑菌环小于或等于 22 mm。头孢噻肟的抑菌环小于或等于 27 mm。氨曲南的抑菌环小于或等于 27 mm。头孢曲松的抑菌环小于或等于 25 mm,这就意味着有 ESBLs 产生的可能性。

**1.3.1.2 确证试验** 采用双相纸片协同试验挑取在血平板上

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: wzz.doctor@163.com。

生长的细菌菌落,稀释成 0.5 mm 麦氏浊度的菌液,均匀涂抹于 M-H 平板,贴上头孢他啶、头孢他啶/棒酸和头孢噻肟、头孢噻肟/棒酸,37 ℃ 孵育 24 h,判断结果,若对 2 个中任何一个药物,在加棒酸后抑菌环直径与不加棒酸的抑菌环相比,增大值大于或等于 5 mm 时,判断为产 ESBLs。

1.3.2 采用三维法测 AmpC 酶

1.3.2.1 初筛实验 将细菌菌落用生理盐水稀释成 0.5 麦氏浊度,均匀地涂抹于 M-H 平板上,贴一片头孢西丁的药敏纸片,头孢西丁的抑菌环直径小于或等于 19 mm,即可疑产 AmpC 酶。

1.3.2.2 提取液制备<sup>[7]</sup> 待测菌于肉汤中增菌,接种与 M-H 37 ℃ 孵育 24 h,刮取菌落于生理盐水中,−20 ℃ 反复冻融,120 000 r/min 离心 15 min,取上清液−20 ℃ 条件下保存。

1.3.2.3 三维实验<sup>[8]</sup> 将可疑的待测菌挑取于肉汤中,冻融 5 次后,用刀片在涂抹了质控大肠杆菌 ATCC 25922 的 M-H 平板上切个口,将冻融后的菌液滴如刀口中,在其旁边贴头孢西丁的药敏纸片 1 张,37 ℃ 孵育 24 h 后,若在头孢西丁药敏纸片的边缘出现矢状线,既可确定产 AmpC 酶。

1.3.3 金属酶测定<sup>[6]</sup> 筛选试验:亚胺培南抑菌环小于 16 mm。确证试验:将细菌菌落用生理盐水稀释成 0.5 麦氏浊度,均匀地涂抹于 M-H 琼脂平板上,中心贴上含有乙二胺四乙酸(EDTA)的纸片,在 10~15 mm 周围分别贴上头孢他啶(30 μg)、头孢噻肟(30 μg)、亚胺培南(30 μg)的药敏纸片,37 ℃ 孵育 24 h 后,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)与头孢他啶、头孢噻肟、亚胺培南之间任一纸片间出现抑菌环扩大现象表示待测菌产金属酶。

2 结 果

2.1 标本类型及病区感染分布 134 株铜绿假单胞菌中,分离自痰液 108 株(80.6%);脓液、分泌物标本 19 株(14.2%);尿液 7 株(5.22%);血液、脑脊液及胸、腹腔积液均未分离出。病区分布:呼吸科 68 株(50.7%)、脑外科 4 株(2.98%)、ICU 25 株(18.7%)、血液 1 株(0.07%)、干部病房 9 株(6.72%)、外三科 5 株(3.73%)、心内科 5 株(3.73%)、内二科 6 株(4.48%)、感染科 6 株(4.48%)、门诊 3 株(2.24%)、五官科 2 株(1.49%)。

| 表 1 产酶菌株与不产酶菌株的耐药率[n(%)] |                     |                  |               |                 |
|--------------------------|---------------------|------------------|---------------|-----------------|
| 抗菌剂                      | 产 ESBLs 酶<br>(n=27) | AmpC 酶<br>(n=71) | 金属酶<br>(n=16) | 不产酶菌株<br>(n=20) |
| 氨苄西林                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 20(100.0)       |
| 头孢唑林                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 20(100.0)       |
| 头孢他啶                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 7(35.0)         |
| 头孢噻肟                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 11(55.0)        |
| 头孢哌酮                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 11(55.0)        |
| 头孢吡肟                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 6(30.0)         |
| 头孢曲松                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 11(53.0)        |
| 哌拉西林                     | 27(100.0)           | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 10(50.0)        |
| 复方新诺明                    | 19(70.0)            | 42(59.0)         | 16(100.0)     | 8(40.0)         |
| 环丙沙星                     | 12(44.0)            | 18(25.0)         | 12(75.0)      | 3(15.0)         |
| 左氧氟沙星                    | 11(40.7)            | 18(25.0)         | 12(75.0)      | 2(10.0)         |
| 头孢西丁                     | 7(26.0)             | 71(100.0)        | 16(100.0)     | 8(42.0)         |
| 丁胺卡那                     | 0(0.0)              | 6(8.5)           | 4(25.0)       | 2(10.0)         |
| 亚胺培南                     | 0(0.0)              | 0(0.0)           | 16(100.0)     | 0(0.0)          |
| 头孢哌酮/舒巴坦                 | 0(0.0)              | 71(100.0)        | 8(50.0)       | 0(0.0)          |
| 妥布霉素                     | 13(48.1)            | 45(63.3)         | 16(100.0)     | 7(35.0)         |

2.2 耐药表型检测结果 134 株铜绿假单胞菌中检出产酶菌

株 114 株,占总菌株数的 85.1%。134 株铜绿假单胞菌对头孢西丁产生耐药有 102 株,经确证实验证实产 AmpC 酶 71 株,占产酶菌株的 62.2%;单产 ESBLs 菌株 27 株,占产酶菌株的 23.6%;产金属酶的菌株 16 株,占产酶菌株的 14.0%;其中同时产 ESBLs 和 AmpC 菌株 17 株,占产酶菌株的 14.9%;产 AmpC 酶菌株检出率最高。耐药酶检测结果见表 1。

2.3 药敏结果分析 产酶菌株对大多数抗生素耐药,尤其是 β-内酰胺类抗生素显示高度耐药,只有亚胺培南、丁胺卡那、环丙沙星、左氧氟沙星有较高抗菌活性,见表 1。

3 讨 论

铜绿假单胞菌广泛存在于自然界、人体皮肤、肠道、呼吸道、病房及医疗器械,为临床常见的条件致病菌,当机体抵抗力或有其他易感因素如侵入操作、过度使用抗生素导致正常菌群失调时就会引起感染。本结果显示,本院铜绿假单胞菌感染主要集中在呼吸科和 ICU,分别占 50.7%和 18.7%。呼吸科比例最高,另外 ICU 比例不高,主要是因为本院 ICU 2008 年 4 月成立,标本量虽不多但检出率仍较高,占 ICU 病房病原菌分离率的 89.8%。这说明 ICU 收住的患者病情较重,大量使用过抗生素。经调查大部分患者由其他科室(脑外科及呼吸科)治疗 1 个月有余转入 ICU,之前均未做细菌培养,经验用药使用过大量抗生素,这是导致耐药性严重的主要因素。铜绿假单胞菌的检出以痰标本的检出率最高,占总分离率的 80.6%,提示铜绿假单胞菌通过呼吸道污染医疗器械及患者物品导致院内感染。近年来,随着广谱抗生素的临床大量使用,耐药菌株迅速出现。铜绿假单胞菌对 β-内酰胺类抗生素产生耐药主要机制是产生 β-内酰胺酶通过水解方式破坏 β-内酰胺环,使抗生素失活<sup>[9-10]</sup>。本次监测结果表明,耐药菌株多产生一种或几种 β-内酰胺酶,本研究菌株产耐药酶情况非常严重,尤其是产生 AmpC 酶,有 52.9%的菌株产染色体介导的 AmpC 酶,有 20%的菌株产 ESBLs,11.9%的菌株产金属酶,可见本院铜绿假单胞菌产 AmpC 酶情况相当严重,应引起临床高度重视。

从药敏结果看,产 ESBLs 菌株对 2、3、4 代头孢 100%耐药,酶抑制剂类抗生素 100%敏感,产 AmpC 酶菌株对四代头孢敏感,对酶抑制剂类药物 100%耐药,产金属酶类菌株对所有 β-内酰胺类抗生素耐药。不产酶菌株对哌拉西林、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶的耐药率为 35%~55%,对头孢吡肟的耐药率为 30%,对喹诺酮类药物、丁胺卡那耐药率为 10%~15%,对亚胺培南、酶抑制剂类抗生素 100%敏感,产酶菌株耐药率明显高于不产酶菌株。从以上结果看,多重耐药的产生显然是由于菌株产生了 ESBLs、AmpC 酶所致,医院应加强对铜绿假单胞菌耐药酶检测,加强医院感染监测,定期发布细菌耐药监测结果,有效提高经验用药的效果,严格根据抗生素敏感试验结果进行铜绿假单胞菌引起感染的治疗。亚胺培南是目前抗感染治疗革兰阴性杆菌最好的抗生素,这是由于该类药物对青霉素结合蛋白(PBPs)亲和力很强,可使细菌迅速肿胀、溶解<sup>[11]</sup>,对 β-内酰胺酶有较高的抑制性,具有持续、有效的抗菌活性,但是随着亚胺培南的广泛使用,也出现了耐药性,而且耐药性越来越严重。本研究显示 11.9%的菌株对亚胺培南产生耐药,这主要是产生了金属酶的缘故,此酶水解碳青霉烯类药物和所有头孢菌素类抗生素,而且不被酶抑制剂所抑制,应引起临床高度重视,合理、慎重选用碳青霉烯类药物,以保护优秀的抗生素,延长其使用寿命。临床上合理有效使用抗生素,重视微生物试验检验结果,根据药敏结果选用合理抗菌剂治疗,同时加强铜绿假单胞菌的耐药性监测,是控制和减少产酶耐药菌株流行的重要方法。(下转第 983 页)

- national study in the EC4 framework of the Calibration 2000 project[J]. Clin Chim Acta, 2006, 368(1/2): 160-167.
- [2] Van Nevel L, Örnemark U, Smeyers P, et al. IMEP-17 Trace and minor constituents in human serum[S]. GEEL, Belgium; European commission-Joint Rseaseard center, 2007.
  - [3] European Union. Directive 98/79/EC of the European parliament and of the council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices[J]. Official Journal of the European Communities, 1998, L331: 1-37.
  - [4] International Organization for Standards. ISO 17511 In vitro diagnostic medical devices—measurement of quantities in biological samples—metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials [S]. 1st. Geneva, Switzerland; ISO, 2003.
  - [5] International Organization for Standards. ISO 18153 In vitro diagnostic medical devices—measurement of quantities in biological samples—metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned to calibrators and control materials [S]. 1st. Geneva, Switzerland; ISO, 2003.
  - [6] Thienpont LM, Van Uytfanghe K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry[J]. Clin Chim Acta, 2002, 323(1/2): 73-87.
  - [7] Panteghini M. Traceability, reference systems and result comparability[J]. Clin Biochem Rev, 2007, 28(3): 97-104.
  - [8] 熊亮, 李丽, 马清峰. 定值质控血清及血清酶校准品在室内质控中的溯源性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(9): 847-848.
  - [9] 刘远程, 郭永灿, 张帮林, 等. 非配套检测系统溯源性的建立及其确认[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 531-532.
  - [10] Infusino I, Schumann G, Ceriotti F, et al. Standardization in clinical enzymology: a challenge for the theory of metrological traceability[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(3): 301-307.
  - [11] Hosogaya S. Standardization of clinical laboratory data in Japan by the JAMT and JCCLS[J]. Rinsho Byori, 2009, 57(6): 579-583.
  - [12] Infusino I, Bonora R, Panteghini M. Traceability in clinical enzymology[J]. Clin Biochem Rev, 2007, 28(4): 155-161.
  - [13] Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine[J]. Clin Biochem, 2009, 42(4/5): 236-240.
  - [14] Panteghini M, Pagani F. AACC creatine kinase MB (CKMB) standardization material used as manufacturer's working calibrator is unable to harmonize CK-MB results between two commercial immunoassays[J]. Clin Chem, 2004, 50(9): 1711-1712.
  - [15] 翁文浩, 李智. 酶标准品的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(1): 54-56.
  - [16] Cattozzo G, Guerra E, Ceriotti F, et al. Enzyme working group of the italian society of clinical biochemistry and clinical molecular biology (SIBioC). Commutable calibrator with value assigned by the IFCC reference procedure to harmonize serum lactate dehydrogenase activity results measured by 2 different methods[J]. Clin Chem, 2008, 54(8): 1349-1355.
  - [17] Canalias F, Camprubí S, Sánchez M, et al. Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned to a calibration material[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(3): 333-339.
  - [18] Xia C, Tong Q, Wang Q, et al. Application of five frozen human-pooled serum samples assigned by the International federation of clinical chemistry and laboratory medicine reference procedure in a traceability investigation of gamma-glutamyltransferase catalytic concentration measurements in China[J]. Ann Clin Biochem, 2010, 47(Pt 3): 189-194.
  - [19] Canalias F, Garcia E, Sánchez M. Metrological traceability of values for alpha-amylase catalytic concentration assigned to a commutable calibrator materials[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(1/2): 7-12.
  - [20] Wang J, Zhang CB, Ju Y, et al. Performance of IFCC enzyme reference method laboratory network in China[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2008, 31(3): 258-263.
  - [21] International Organization for Standards. ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories[S]. 1st. Geneva, Switzerland; ISO, 2005.
  - [22] International Organization for Standards. ISO 15195 Laboratory medicine—requirements for reference measurement laboratories [S]. 1st. Geneva, Switzerland; ISO, 2005.
  - [23] Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward[J]. Ann Clin Biochem, 2009, 46(Pt 1): 8-17.
  - [24] Ricós C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1999, 59(7): 491-500.
  - [25] Wang T, Qi LL, Liu HY, et al. Application of reference methods suggested by IFCC and analysis of the 2006 ring trial results[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2008, 31(3): 264-269.

(收稿日期: 2010-12-19)

(上接第 963 页)

## 参考文献

- [1] 何林, 张立军, 李勇, 等. 铜绿假单胞菌对 22 种抗生素耐药性的差异[J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(11): 853-855.
- [2] 吴安华, 任南, 文细毛, 等. 医院内感染非发酵革兰阴性杆菌的病原学与耐药性监测研究[J]. 中华临床医学杂志, 2004, 27(11): 764-766.
- [3] 蔡炎, 范昕建, 吕晓菊. AmpC 酶、 $\beta$ -内酰胺酶的分子生物学研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2006, 23(4): 165-167.
- [4] 吴安华, 罗晓燕. 铜绿假单胞菌多重药物主动排泵与抗生素耐药[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(1): 93-95.
- [5] 张卓然. 临床微生物学和微生物检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1-10.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. M2-A7 performance sandards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2004.
- [7] Marchese A, Arler G, Schito GC, et al. Characterization of FOX-3, an AmpC-type plasmid-mediated-lactamase from an Italian isolate of klebsiella oxytoca[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(2): 464-467.
- [8] 陈东科, 张志敏, 张秀珍. 三维法检测  $\beta$ -内酰胺酶的影响因素探讨及方法的改进[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(10): 600-604.
- [9] 陈曼丹, 辜红妮, 林漫燕, 等. 开放性伤口感染的病原菌及其耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(5): 404-406.
- [10] Bou G, Olive A, Martinez-Beltrá J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an acinetobacter baumannii clinical strain[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1556-1561.
- [11] 戴自英. 实用抗菌药理学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 1-10.

(收稿日期: 2011-02-03)