

• 论 著 •

2013—2015 年临床分离铜绿假单胞菌耐药性及 I 类整合子变化分析

杨 明, 钱扬会, 赵强元

(中国人民解放军海军总医院检验科, 北京 100048)

摘 要:目的 检测该院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月临床分离铜绿假单胞菌耐药性及 I 类整合子变化。方法 对 2013—2015 年临床分离的铜绿假单胞菌分为 2013 年、2014 年和 2015 年 3 个时间阶段, 采用法国生物梅里埃公司的 VITEK-2 Compact 研究其对 22 种常用抗菌药物的耐药性; 在 3 个时间段分离的菌株中分别随机选取 100 株, 采用 PCR 扩增检测 I 类整合子。结果 3 个时间段分别检出铜绿假单胞菌为 366、437 和 520 株。铜绿假单胞菌对 22 种常用抗菌药物耐药性增长明显($P < 0.05$), 以重症监护病房(ICU)最为显著。I 类整合子阳性菌检出率逐年增加, 且 I 类整合子阳性菌耐药性明显高于阴性菌($P < 0.01$)。结论 该院铜绿假单胞菌耐药性较高, I 类整合子和多重耐药检测比例增加明显。需要加强医院感染的检测和耐药菌监控, 进一步规范抗菌药物使用。

关键词:铜绿假单胞菌; I 类整合子; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)07-0886-04

Analysis on changes of drug resistance and class I integron in clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* during 2013—2015

YANG Ming, QIAN Yanghui, ZHAO Qiangyuan

(Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China)

Abstract:Objective To investigate the changes of drug resistance and class I integron in clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in our hospital from January 2013 to December 2015. **Methods** Clinically isolated PA strains were divided into the 3 time periods of 2013, 2014 and 2015. Their resistance to 22 commonly used antibacterial drugs was investigated by adopting the VITEK-2; 200 strains were randomly selected from the isolated strains during these 3 time periods. Class I integron was detected by PCR. **Results** The detected PA in these 3 time periods had 366, 437 and 520 strains respectively. The drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to 22 commonly used antibacterial drugs was remarkably increased ($P < 0.05$), especially in ICU. The detection rate of class I integron positive bacteria was gradually increased year by year, moreover the drug resistance rate of class I integron positive bacteria was significantly higher than that of class I integron negative bacteria ($P < 0.01$). **Conclusion** The drug resistance rate of PA in this hospital is higher. The proportions of multi-drug resistance and class I integron are significantly increased. The hospital infection detection and drug-resistant bacterial monitoring should be strengthened to further standardize the use of antibacterial drugs.

Key words: *pseudomonas aeruginosa*; class I integron; drug resistance

铜绿假单胞菌是重要的院内感染条件致病菌, 占世界范围内院内感染细菌的 10%~15%^[1]。目前, 该菌感染的治疗方法主要采用抗菌药物, 但存在耐药性不断提高的问题, 因此, 人们一直在寻找有效的防治对策^[2]。据近 3 年来本院数据统计显示, 铜绿假单胞菌的临床分离率在革兰阴性菌中居第一位且不断呈上升趋势, 以高压氧科、呼吸科和重症监护病房(ICU)分离率居首位。由于该菌特殊的生物学特点, 常引起各种难治性、持续性感染, 其中生物膜的形成是重要因素, 生物膜将细菌包被在基质网中, 并从生物膜中不断脱落, 经体液循环引起急性或慢性感染^[3-4], 所以临床上分离的铜绿假单胞菌往往呈现多重耐药性, 对多种抗菌药物的耐药率超过 60%, 尤其是对常用消毒剂及亚胺培南等碳青霉烯类药物耐药率呈逐年增高趋势, 给临床治疗带来困难。

研究表明铜绿假单胞菌的耐药机制较为复杂, 牵涉到如碳青霉烯酶、外排泵、群体感应系统等, 近年研究发现由整合子-基因盒系统在介导的铜绿假单胞菌从单一耐药向多重耐药性发展中具有重要作用, 其中我国 I 类整合子最为常见^[5-6]。本文分析总结了该本 2013—2015 年临床分离 PA 耐药性变化, 并对其 I 类整合子分布及与耐药性变化的关系及原因进行了

初步研究。

1 材料与方法

1.1 菌株 PA 菌株来源于本院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月临床分离的患者标本(包括痰液、尿液、血液及分泌物等), 来源于 ICU、呼吸科、高压氧科、神经内科、血液科、神经外科、骨科、普外科等 25 个临床科室, 来源同一患者的菌株不重复选择(表 1)。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922; 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 和铜绿假单胞菌 ATCC27853, 均由卫生部临床检验中心提供。所有菌株均用法国生物梅里埃公司的 VITEK-2 Compact 分析鉴定。

1.2 仪器和试剂 细菌鉴定采用 VITEK-2 Compact 型全自动微生物分析系统(法国梅里埃); CFX96 C1000 Real-time PCR 仪; PAC300 电泳仪; Doc2000 凝胶成像系统为美国 BIO-RAD 生产; GN 和 AST-GN09 鉴定和药敏卡均购于法国生物梅里埃公司。

1.3 方法 按照全国临床检验操作规程和本院检验标本采集手册留取、接种及培养, 严格按照 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定分析仪操作说明进行细菌的鉴定和药敏分析, 药敏根据美国临床实验室标准化研究所(CLSI)最新版的标准判读。

作者简介: 杨明, 女, 主管技师, 主要从事临床检验研究。

1.4 I 类整合子检测分析

1.4.1 DNA 提取 参考文献[7],分别随机选取 2013 年、2014 年、2015 年铜绿假单胞菌各 100 株,采用煮沸法提取 DNA。取培养细菌各 3 mL,3 000 r/min,离心 5 min。弃上清液,沉淀加 PBS 100 mL 混悬后,煮沸 10 min,5 000 r/min,离心 10 min,取上清液备用。

1.4.2 整合子基因扩增及测序 采用 PCR 对菌株整合子酶基因扩增,引物设计参考文献[8](表 2),引物合成由上海英骏生物生物技术有限公司完成,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后拍照存档。

表 1 铜绿假单胞菌不同标本分布构成比						
标本	2013 年		2014 年		2015 年	
	株数	构成比(%)	株数	构成比(%)	株数	构成比(%)
痰液	226	61.7	200	45.8	233	44.8
尿液	51	13.9	94	21.5	122	23.5
静脉血	47	12.8	71	16.2	94	18.1
分泌物	15	4.1	25	5.7	34	6.5
脓液	3	0.8	19	4.3	11	2.1
穿刺液	3	0.8	17	3.8	9	1.7
咽拭子	8	2.2	5	1.2	7	1.3
导管	3	0.8	4	1.0	4	0.8
其他	10	2.9	2	0.5	6	1.2
合计	191	100.0	279	100.0	527	100.0

表 2 整合子基因检测所需引物序列		
引物名称	引物序列(5'~3')	产物大小/bp
Int-1F	GGC ATC CAA GCA GCA AG	480
Int-1R	AAG CAG ACT TGA CCT GA	

1.5 统计学处理 药敏结果采用 WHONET 5.6 软件进行分析,其他数据分析采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 铜绿假单胞菌在临床常见病原菌中的构成比变化 2013 年 1 月至 2015 年 12 月住院患者送检的各类临临床标本中,铜绿假单胞菌的构成比逐年上升,2013 年占分离总数的 13.4%,2014 年占 14.1%,到 2015 年更达 15.3%。高压氧科铜绿假单胞菌检出率明显高于其他科室,其次为呼吸科和 ICU,但 ICU 增长率尤为突出,见表 3。

表 3 2013—2015 年铜绿假单胞菌在临床分离菌株中构成比(%)			
科室	2013 年	2014 年	2015 年
高压氧科	17.6	16.0	15.5
呼吸科	13.9	10.7	10.1
ICU	8.5	12.6	17.2
神经内科	10.3	6.2	6.7
神经外科	9.7	12.6	6.1
肾内科	9.3	5.8	5.6

续表 3 2013—2015 年铜绿假单胞菌在临床分离菌株中构成比(%)			
科室	2013 年	2014 年	2015 年
急诊病区	7.7	4.2	5.1
干部综合内科	—	11.5	13.6
儿科	4.5	5.7	3.5
其他	18.5	14.7	16.6

注:—表示此项无数据。

2.2 药敏实验结果 2013~2015 年铜绿假单胞菌耐药情况变化见表 4。除耐药性较高的氨苄西林、头孢唑啉、呋喃妥因、头孢呋辛、氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、头孢曲松、头孢替坦外,大多数药物耐药性呈上升趋势。其中亚胺培南、美洛培南、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、多黏菌素 B 等耐药性上升尤为明显($P<0.01$)。

表 4 2013—2015 年铜绿假单胞菌对抗菌药物的耐药率(%)			
药物	耐药率/%		
	2013($n=366$)	2014($n=437$)	2015($n=520$)
氨苄西林	99.1	100	100
头孢唑啉	100	99.7	99.3
呋喃妥因	99.1	98.9	99.3
头孢呋辛	99.1	99.5	99.8
氨苄西林/舒巴坦	98.5	100	100
复方磺胺甲噁唑	98.5	99.3	100
头孢曲松	98.2	99.3	99.3
头孢替坦	97.6	98.0	99.1
米诺环素	88.1	92.9 ^a	93.6 ^a
亚胺培南	39.6	47.0 ^a	45.4 ^a
美洛培南	32.7	43.3 ^b	43.5 ^b
头孢哌酮/舒巴坦	32.4	35.5	37.6 ^a
哌拉西林	27.0	30.9	37.5 ^{bc}
庆大霉素	26.7	26.2	35.9 ^{bd}
妥布霉素	25.5	25.0	35.3 ^{bd}
环丙沙星	22.5	27.1 ^a	33.7 ^{bc}
左氧氟沙星	21.3	28.0 ^a	33.6 ^{bc}
头孢他啶	19.8	37.8 ^b	28.6 ^{ac}
头孢吡肟	17.7	20.1 ^a	26.1 ^{ac}
哌拉西林/他唑巴坦	16.6	17.3	23.5 ^{ac}
阿米卡星	12.3	12.9	24.5 ^{bd}
多黏菌素 B	8.5	4.7 ^b	10.5 ^{ad}

注:与 2013 组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 2014 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

2.3 I 类整合酶基因检测耐药性分析 分别从 2013 年、2014 年、2015 年 3 年中随机抽取的 100 个菌株中检测 I 类整合子,整合子数逐年增加,分别为 52%(52/100),59%(59/100)和 66%(66/100)。除氨苄西林、头孢唑啉、呋喃妥因、头孢呋辛、氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、头孢曲松、头孢替坦外,I

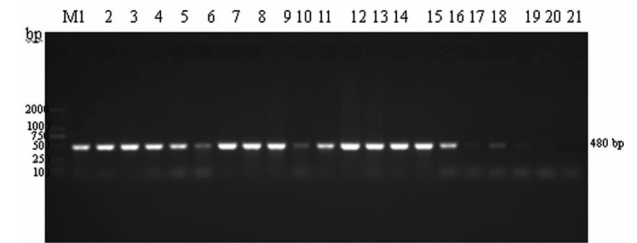
类整合子阳性菌株耐药性均显著高于 I 类整合子阴性菌($P<0.01$),见表 5。

表 5 I 类整合酶基因阳性和阴性菌耐药率 (%)

药物	2013($n=100$)		2014($n=100$)		2015($n=100$)	
	+(52/100)	-(48/100)	+(59/100)	-(41/100)	+(66/100)	-(34/100)
氨苄西林	98.1	95.8	98.3	95.1	98.5	91.2 ^a
头孢唑啉	98.1	95.8	98.3	92.7 ^a	98.5	94.1
呋喃妥因	98.1	95.8	96.6	95.1	96.9	94.1
头孢呋辛	98.1	95.8	98.3	95.1	98.5	91.2 ^a
氨苄西林/舒巴坦	98.1	95.8	100.0	92.7 ^a	100	94.1
复方磺胺甲噁唑	96.2	95.8	96.6	95.1	98.5	91.2 ^a
头孢曲松	98.1	95.8	100.0	95.1	100.0	91.2 ^a
头孢替坦	98.1	95.8	98.3	95.1	100.0	88.2 ^a
米诺环素	94.2	62.1 ^b	92.6	69.3 ^b	98.5	71.8 ^b
亚胺培南	31.7	5.2 ^b	46.2	12.4 ^b	56.8	22.6 ^b
美洛培南	25.4	4.2 ^b	17.5	9.7 ^b	32.2	20.9 ^b
头孢哌酮/舒巴坦	55.8	30.2 ^b	79.9	41.8 ^b	79.9	43.7 ^b
哌拉西林	28.4	4.9 ^b	19.5	12.4 ^b	34.2	21.9 ^b
庆大霉素	68.0	38.1 ^b	78.9	39.3 ^b	74.5	42.5 ^b
妥布霉素	65.5	43.5 ^b	72.5	27.0 ^b	76.0	32.8 ^b
环丙沙星	57.8	30.2 ^b	79.9	45.8 ^b	79.9	54.7 ^b
左氧氟沙星	58.8	26.4 ^b	62.9	39.2 ^b	68.5	42.5 ^b
头孢他啶	38.5	6.2 ^b	45.2	22.4 ^b	50.8	24.6 ^b
头孢吡肟	29.4	4.9 ^b	27.5	9.9 ^b	35.2	23.9 ^b
哌拉西林/他唑巴坦	23.3	8.1 ^b	32.7	15.1 ^b	45.9	18.6 ^b
阿米卡星	28.0	10.1 ^b	34.9	16.3 ^b	35.5	12.5 ^b
多黏菌素 B	8.0	3.1 ^b	9.9	4.3 ^b	13.5	4.4 ^b

注:与阳性株比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

2.4 I 类整合酶基因检测结果 I 类整合酶基因检测部分电泳结果见图 1,产物大小为 480 bp。



注:M 表示标记物;1~14 表示临床扩增阳性菌;20~21 表示临床扩增阴性菌。

图 1 I 类整合酶基因电泳图

3 讨 论

3.1 铜绿假单胞菌分布广泛,是院内感染的重要条件致病菌^[9]。近年监测资料显示,铜绿假单胞菌在本院感染病原菌中已位居第 1 位,与孟小斌等^[10]报道的略有差别。本院 2013 年、2014 年、2015 年铜绿假单胞菌分离分别占该院分离菌株总数 13.4%、14.1%和 15.3%,其中高压氧科和 ICU 送检标本铜绿假单胞菌检出率和增长率均略高于报道水平,可能与这两科室患者住院时间长,抵抗力低下有关。

3.2 该院铜绿假单胞菌对 22 种常用抗菌药物的药敏实验结果发现,除对碳青霉烯类、氨基糖苷类和第 3 代、第 4 代头孢敏感性较好外,其余均呈耐药表现,呈多重耐药性,且耐药能力增长迅速。值得注意的是抗铜绿假单胞菌首选药物亚胺培南、美洛培南耐药性发展迅速,2013 年分别达 39.6%和 32.7%,而 2014 年则达到 47.0%和 43.3%,与上年度同比均呈显著增长状态($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。这可能与近几年来碳青霉烯类药物的临床使用愈加广泛,铜绿假单胞菌针对碳青霉烯类药物的耐药能力增加有关。临床需对碳青霉烯类药物的使用进行合理控制,规范使用。而目前有研究发现,对已发生多重耐药的铜绿假单胞菌感染,建议碳青霉烯类联合氨基糖苷类药物或舒巴坦治疗^[11],既可增强抗菌效能,又可延缓铜绿假单胞菌的耐药性发展。

3.3 铜绿假单胞菌的耐药性发展日益受到重视。近年来研究发现整合子系统对耐药基因的传递作用与铜绿假单胞菌耐药性的发展关系密切^[12]。在抗菌药物的选择压力下,整合子系统不断进化,菌群传递耐药基因生成新的耐药,可能是铜绿假单胞菌的耐药性向多重性发展的重要机制。

3.4 本研究对本院 2013 年、2014 年和 2015 年,3 个年度随机选取的各 100 株临床分离铜绿假单胞菌进行 I 类整合子检测,结果发现 2013 年、2014 年和 2015 年年度的铜绿假单胞菌 I

类整合子的检出率分别为 52%、59% 和 66%，与文献报道基本一致或略低^[11-12]。同时，本研究也对铜绿假单胞菌的Ⅱ类和Ⅲ类整合子进行了检测，均未发现Ⅱ类和Ⅲ类整合子。

3.5 本研究对铜绿假单胞菌Ⅰ类整合子阴性和阳性菌株的耐药性分别进行统计分析，结果在 2013 年、2014 年和 2015 年 3 个年度，研究用 22 种抗菌药物，除氨苄西林、头孢唑啉、呋喃妥因、头孢呋辛、氨苄西林/舒巴坦、复方磺胺甲噁唑、头孢曲松、头孢替坦外，铜绿假单胞菌Ⅰ类整合子阳性菌株对其余 14 中抗菌药物的耐药率均显著高于Ⅰ类整合子阴性菌株($P < 0.05$)。Ⅰ类整合子阳性菌株在 2013 年、2014 年和 2015 年 3 个年度对耐药性较高的氨苄西林等 8 种药物耐药率没有显著差异，这可能与这两年度这些药物在临床使用逐渐减少，铜绿假单胞菌敏感回升有关。

3.6 本文结果表明对Ⅰ类整合子在铜绿假单胞菌的耐药性发展中具有重要作用。由于Ⅰ类整合子区具有多个可变区，下一步研究可结合基因测序计数对Ⅰ类整合子可变区中不同耐药基因变化情况进行研究，以进一步明确铜绿假单胞菌耐药性机制。

参考文献

[1] Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* -a phenomenon of bacterial resistance[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 9):1133-1148.

[2] Krylov VN. Bacteriophages of *pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy[J]. Adv Virus Res, 2014, 88(2):277-278.

[3] Fujioka M, Otomo Y, Ahsan CR. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*[J]. J Microbiol Methods, 2013, 92(3):289-292.

[4] Rund SA, Rohde H, Sonnenborn U, et al. Antagonistic

effects of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104:H4 and O157:H7[J]. Int J Med Microbiol, 2013, 303(1):1-8.

[5] 宋晓萍, 孙明娥, 李程, 等. Ⅰ类整合子与铜绿假单胞菌耐药性相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6):648-649.

[6] Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, et al. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Clin Microbiol 2007, 45(4):453-560.

[7] 夏涵, 府伟灵, 陈鸣, 等. 快速提取细菌 DNA 方法的研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(5):571-573.

[8] Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, et al. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(3):838-842.

[9] 林冬玲, 陈茶, 曾建明. 铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(1):91-95.

[10] 孟小斌, 古汉福, 雷南凤, 等. 下呼吸道感染铜绿假单胞菌产绿脓菌素及生物膜形成能力与耐碳青霉烯类抗菌药物相关性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(19):4336-4338.

[11] 宋晓钰, 胡昭宇, 赵德军, 等. 贵阳某院 2011—2013 年铜绿假单胞菌感染的流行分布及耐药性监测[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(19):2831-2832.

[12] 黄震, 陈文胜, 余治健, 等. Ⅰ类整合子与铜绿假单胞菌多重耐药相关性研究[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(3):165-168.

(收稿日期:2016-10-20 修回日期:2016-11-22)

(上接第 885 页)

HGB、HCT、MCV 和 MCH4 个指标较引用标准也有较大程度的变化,导致了所引用标准不适用于长沙地区的女性,应该进行调整,这可能与该地区女性的身材和营养状况相关^[1]。因此,有必要对长沙市血细胞分析检测来说应该将这些指标分性别设定。

对于研究指标基本上还没有可以直接引用的参考值范围,为此本文通过对长沙市参考人群设定了相应的参考值范围。其中 RDW-CV、RDW-SD、PDW、HFC#、HFC% 和 InR# 等指标男女性别间虽有差异计算出的参考值范围差别并不是很大,鉴于尚为研究参数,暂时可以尝试使用统一的参考值范围。但 IMG# 和 IMG% 各指标性别间差异较大,应当分别设定参考值范围。因为研究参数在现在血细胞分析中其临床意义尚不完全清楚,关于其参考值范围也鲜为认知,因此,这些参考范围的应用还需要加以更全方位的验证。

参考文献

[1] 魏红璐, 王萍. 基于 WS/T 405-2012 行标的血细胞分析参考区间验证[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(5):621-

622.

[2] 江梅, 方积乾. 利用 SPSS 的宏实现任意条件下的随机抽样[J]. 中国卫生统计, 2007, 30(4):430-431.

[3] 卫生部临床检验标准委员会. WS/T 402-2012, 临床实验室检验项目参考区间的制定[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.

[4] 卫生部临床检验标准委员会. WS/T 405-2012, 血细胞分析参考区间[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.

[5] 郑建新, 杨慧, 傅启华. 上海市学龄前儿童末梢血血常规参考值范围调查分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16):2194-2196.

[6] 张永生, 熊彩萍. 昆山市健康成人血常规检测中 10 项指标的参考值范围分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(3):355-356.

[7] 孟艺. 4 063 例 0~18 周岁体检健康人群血细胞参考值范围分析[J]. 浙江实用医学, 2012, 33(5):369-370.

(收稿日期:2016-09-13 修回日期:2016-12-24)