

DOI:10.13350/j.cjpb.230116

• 临床研究 •

医院铜绿假单胞菌分布及耐药性分析

赵育林¹, 鲍亚玲¹, 于美荣², 欧学兰¹, 张双红¹, 韩博^{1*}

(1. 张家口学院医学院, 河北张家口 075000; 2. 张家口市第一医院)

【摘要】 目的 分析医院铜绿假单胞菌分布及耐药性。方法 收集医院患者送检标本, 采用全自动微生物鉴定和药敏分析仪进行病原菌鉴定以及药敏试验。PCR 扩增检测耐药基因分布情况。结果 从 1 041 份医院患者临床标本中分离铜绿假单胞菌 124 株, 分离率 11.91%。男性标本分离率 13.79%, 女性为 9.62%。婴儿组、少年组、青年组、中年组、老年组患者标本分离率分别为 6.34%、8.62%、10.05%、13.85% 和 16.07%。铜绿假单胞菌在 ICU、呼吸一科、呼吸二科、泌尿科、外科、儿科、血液科及其他科室标本中分离率分别为 14.81%、12.59%、10.37%、9.57%、8.33%、7.02%、6.67% 和 8.33%。痰液、分泌物、尿液、腹腔引流液、血液、脑脊液及其他送检标本分离率分别为 16.40%、14.13%、11.31%、9.70%、8.74%、2.53% 和 5.36%。铜绿假单胞菌临床分离株对阿米卡星、妥布霉素、庆大霉素、亚胺培南、哌拉西林、氨曲南、氧氟沙星、环丙沙星、头孢他啶、头孢吡肟的耐药率分别为 12.10%、16.13%、12.90%、25.00%、26.61%、24.19%、19.35%、16.94%、24.19% 和 26.61%。124 株铜绿假单胞菌中 aac(6')-Ib、aac(6')-II、ant(2')-I、IMP、VIM、TEM、oprM 基因检出阳性率分别为 7.26%、10.48%、8.87%、11.29%、13.71%、16.94% 和 14.52%。结论 铜绿假单胞菌主要分离自老年患者, 男性患者居多, 以痰液标本为主要来源, 主要分布在 ICU 科室。铜绿假单胞菌临床分离株对常用抗菌药物均产生了不同程度耐药性, 菌体中存在耐药基因可能是其产生耐药性的主要原因。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 医院分布; 耐药性; 耐药基因

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)01-0082-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):82-85.]

Distribution and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital

ZHAO Yu-lin¹, BAO Ya-ling¹, YU Mei-rong², OU Xue-lan¹, ZHANG Shuang-hong¹, HAN Bo¹ (1. Medicine College, Zhangjiakou University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China; 2. Zhangjiakou First Hospital) *

【Abstract】 **Objective** Distribution and drug resistance of *P. aeruginosa* isolated from hospital were analyzed to avoid the spread of *P. aeruginosa* in hospital. **Methods** The samples of hospital patients were collected. Automatic microbial identification and drug sensitivity analyzer were used for pathogen identification and drug sensitivity test. PCR amplification was used to detect the distribution of drug-resistant genes. **Results** 124 strains of *P. aeruginosa* were isolated from 1 041 cases of clinical specimens of hospital patients, with the isolation rate of 11.91%. The isolation rate of specimens was 13.79% for male patients and 9.62% for female patients. The isolation rates of specimens were 6.34%, 8.62%, 10.05%, 13.85% and 16.07% respectively in the infant group, juvenile group, youth group, middle-aged group and elderly group. The specimens isolation rates of *P. aeruginosa* were 14.81%, 12.59%, 10.37%, 9.57%, 8.33%, 7.02%, 6.67% and 8.33%, respectively, in patients in ICU, Respiratory department I, Respiratory Department II, Urology department, Surgery department, Pediatrics department, Hematology department and other departments. The separation rates of *P. aeruginosa* in sputum, secretion, urine, peritoneal drainage fluid, blood, cerebrospinal fluid and other specimens were 16.40%, 14.13%, 11.31%, 9.70%, 8.74%, 2.53% and 5.36%, respectively. The drug resistance rates of *P. aeruginosa* isolates against amikacin, tobramycin, gentamicin, imipenem, piperacillin, amronine, ofloxacin, ciprofloxacin, ceftazidime and cefepime were 12.10%, 16.13%, 12.90%, 25.00%, 26.61%, 24.19%, 19.35%, 16.94%, 24.19% and 26.61%, respectively. The positive rates of aac(6')-ib, aac(6')-ii, ant(2')-i, IMP, VIM, TEM and oprM in 124 strains of *P. aeruginosa* were 7.26%, 10.48%, 8.87%, 11.29%, 13.71%, 16.94% and 14.52%, respectively. **Conclusion** *P. aeruginosa* was mainly isolated from elderly patients, mostly male patients, and was mainly distributed in ICU departments with sputum samples as the main source. The clinical isolates of *P. aeruginosa* all developed a certain degree of resistance to the commonly used antimicrobial drugs. The existence of drug resistance genes in bacteria may be the main reason for drug resistance.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; hospital distribution; drug resistance; drug resistant genes

* **【通讯作者】** 韩博, E-mail: 754508693@qq.com

【作者简介】 赵育林(1991-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 医学硕士, 讲师。研究方向: 临床用药的合理性研究。E-mail: 1532517434@qq.com

铜绿假单胞菌是自然界广泛分布的革兰阴性菌,通常作为正常菌株定植于人体皮肤、呼吸道、肠道等部位,也是临床常见的条件致病菌。由于铜绿假单胞菌较低的外膜渗透性,该类病原菌对临床常用抗菌药物具有一定程度的天然耐药性,较容易衍生多重耐药菌株,已被列入“超级细菌”行列^[1]。由于医院治疗中,长期采用抗生素、激素、免疫抑制剂,患者免疫力降低,环境微生态改变,导致临床病原菌的耐药问题日益严峻。近年来,铜绿假单胞菌分离率有增高趋势,已经成为医院感染的重要致病菌类型^[2]。危重患者的临床治疗中多会采用侵入性操作,导致患者更容易发生铜绿假单胞菌感染,甚至造成患者死亡。因此,积极分析医院铜绿假单胞菌分布及耐药性,对于从源头控制医院感染发生及流行传播具有指导意义。

材料与方法

1 临床资料

收集医院患者临床资料及送检标本,其中男性患者 573 例,女性患者 468 例;标本科室来源包括 ICU 科室 351 例、呼吸一科 278 例、呼吸二科 135 例、儿科 94 例等;按照世界卫生组织标准分 5 个年龄组:婴儿组(包括新生儿)(≤ 1 岁)有 142 例、少年组(1~14岁)174 例、青年组(15~44岁)189 例、中年组(45~59岁)231 例、老年组(≥ 60 岁)305 例;共收集 1 041 份临床标本,其中痰液标本数 317 份、分泌物 184 份、尿液 168 份、腹腔引流液 134 份等;所有标本均经患者同意送检。

2 主要试剂与仪器

Microscan WalkAway-40SI 全自动细菌鉴定与药敏分析仪购买自德国 SIEMENS 公司;台式高速离心机购买自上海安亭科学仪器厂;Taq DNA 聚合酶、 $2 \times$ Taq PCR MIX、dNTPs、 $10 \times$ PCR Buffer、DNA Marker、 $10 \times$ Loading Buffer 等均购买自大连宝生物公司;PCR 扩增仪、成像分析仪购买自美国 BIO-RAD 公司;

3 病原菌鉴定与耐药性分析

按照《全国临床检验标本操作规程》,收集医院患者送检的各种临床标本(痰液、分泌物、尿液、血液等),从中分离铜绿假单胞菌,并剔除同一患者同一标本中的重复菌株。采用 Microscan walkaway-40SI 全自动细菌鉴定与药敏分析仪,对铜绿假单胞菌进行鉴定及药敏实验分析,依据 2017 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)的标准,对药敏结果进行判读;质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

4 耐药基因检测

DNA 模板提取:用无菌环挑取单菌落,接种至液

体培养基,37 °C 220 r/min 摇床培养过夜;取菌液离心,10 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 2 min 后,弃去上清;菌体沉淀中加入 200 μ l 无菌双蒸水、200 μ l 蛋白酶 K(2 mg/ml),震荡摇匀后,重悬菌体;经 60 °C 预热 5 min 后采用 95 °C 水浴 10 min;10 000 r/min 离心 2 min 后,所得上清液即为铜绿假单胞菌的基因组 DNA 模板,-20 °C 冰箱保存待用。PCR 扩增引物见表 1。

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 The primers for PCR amplification

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequence	长度(bp) Length
TEM	CTGAATGAAGCCATACCAAA TG TAGATAACTACGATACGGGAG	330
IMP	CGGCCTCAGGAGAGGCTTT AACCAGTTTTGCCTTACTAT	587
VIM	TCCGACAGTCAGCGAAT GCAGCACCAGGATAGAAGA	700
aac(6')-Ib	ATGACTGAGCATGACCTTGC TTAGGCATCACTGCGTGTTT	519
aac(6')-II	TTCATGTCCGCGAGCACCCC GACTCTTCCGCATCGCTCT	178
ant(2')-I	GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG CTGTTACAACGGACTGGCCGC	325
oprM	F:CTGAACGTCGAGGCCTTCC R:CTGGATCTTCGCGTAGTCC	849

PCR 扩增反应体系:DNA 模板 2 μ l、上下游引物各 1 μ l、 $2 \times$ Taq Master Mix 12.5 μ l、dNTPs 混合液 2 μ l、PCR buffer 2 μ l,加 ddH₂O 至 25 μ l,在冰上配制 PCR 反应液并混匀;反应条件:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 1 min、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min,30 个循环后,72 °C 终延伸 8 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,紫外成像系统拍照记录结果。阳性结果重复三次,结果真实可靠。

结 果

1 不同性别患者的标本中铜绿假单胞菌分布情况

从 1 041 份临床标本中分离铜绿假单胞菌 124 株,分离率 11.91%。其中,男性患者标本 573 份,分离铜绿假单胞菌 79 株,分离率 13.79%,女性患者标本 468 份,分离铜绿假单胞菌 45 株,分离率为 9.62%。

2 不同年龄患者的标本中铜绿假单胞菌分布情况

婴儿组、少年组、青年组、中年组、老年组患者的标本中铜绿假单胞菌分离率依次为 6.34%、8.62%、10.05%、13.85%和 16.07%。婴儿组标本分离率最低,老年组分离率最高。随着患者年龄增长,铜绿假单胞菌分离率增高(表 2)。

表 2 不同年龄患者的标本中铜绿假单胞菌分布
Table 2 The distribution of *P. aeruginosa* in samples from patients of different ages

组别 Group	标本 Samples		铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>		分离率(%) Isolated rate
	数量 No.	占比(%) Rate	数量 No.	占比(%) Rate	
婴儿组	142	13.64	9	7.26	6.34
少年组	174	16.71	15	12.10	8.62
青年组	189	18.16	19	15.32	10.05
中年组	231	22.19	32	25.81	13.85
老年组	305	29.30	49	39.51	16.07
合计 Total	1041	100.00	124	100.00	11.91

3 不同科室患者的标本中铜绿假单胞菌分布情况

铜绿假单胞菌在 ICU、呼吸一科、呼吸二科、泌尿科、外科、儿科、血液科及其他科室患者标本中分离率分别为 14.81%、12.59%、10.37%、9.57%、8.33%、7.02%、6.67% 和 8.33%。铜绿假单胞菌分离率 ICU 科室最高(表 3)。

表 3 不同科室患者的标本中铜绿假单胞菌分布
Table 3 The distribution of *P. aeruginosa* in samples from patients in different departments

科室 Departments	标本 Samples		铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>		分离率(%) Isolated rate
	数量 No.	占比(%) Rate	数量 No.	占比(%) Rate	
ICU	351	33.72	52	41.94	14.81
呼吸一科	278	26.71	35	28.23	12.59
呼吸二科	135	12.97	14	11.29	10.37
泌尿科	94	9.03	9	7.26	9.57
外科	72	6.92	6	4.84	8.33
儿科	57	5.48	4	3.23	7.02
血液科	30	2.88	2	1.61	6.67
其他	24	2.31	2	1.61	8.33
合计 Total	1041	100.00	124	100.00	11.91

4 不同标本中铜绿假单胞菌分布情况

痰液、分泌物、尿液、腹腔引流液、血液、脑脊液及其他送检标本中铜绿假单胞菌分离率分别为 16.40%、14.13%、11.31%、9.70%、8.74%、2.53% 和 5.36%。铜绿假单胞菌分离率痰液标本最高(表 4)。

表 4 不同标本中铜绿假单胞菌分布
Table 4 The distribution of *P. aeruginosa* in different samples

标本 Specimen	标本 Samples		铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>		分离率(%) Isolated rate
	数量 No.	占比(%) Rate	数量 No.	占比(%) Rate	
痰液	317	30.45	52	41.94	16.40
分泌物	184	17.68	26	20.97	14.13
尿液	168	16.14	19	15.32	11.31
腹腔引流液	134	12.87	13	10.48	9.70
血液	103	9.89	9	7.26	8.74
脑脊液	79	7.59	2	1.61	2.53
其他	56	5.38	3	2.42	5.36
合计 Total	1041	100.00	124	100.00	11.91

5 铜绿假单胞菌临床分离株的耐药性

铜绿假单胞菌临床分离株对阿米卡星、妥布霉素、庆大霉素、亚胺培南、哌拉西林、氨基糖苷类、氧氟沙星、环丙沙星、头孢他啶、头孢吡肟的耐药率分别为 12.10%、16.13%、12.90%、25.00%、26.61%、24.19%、19.35%、16.94%、24.19% 和 26.61%。铜绿假单胞菌分离株对常用抗菌药物均产生了一定程度耐药性。

6 铜绿假单胞菌耐药基因

124 株铜绿假单胞菌中 *aac(6')-Ib*、*aac(6')-II*、*ant(2')-I*、*IMP*、*VIM*、*TEM*、*oprM* 基因检出阳性率分别为 7.26% (9 株)、10.48% (13 株)、8.87% (11 株)、11.29% (14 株)、13.71% (17 株)、16.94% (21 株) 和 14.52% (18 株)。因此,铜绿假单胞菌中存在耐药基因可能是其产生耐药性的主要原因。

讨论

铜绿假单胞菌分布广泛,作为条件致病菌,目前铜绿假单胞菌感染发生率可高达 10%~35%,成为医院感染的主要病原菌类型^[3]。医院感染的铜绿假单胞菌主要分离自老年患者,随着年龄增长铜绿假单胞菌分离率增高,由于老龄患者蛋白质代谢呈负氮平衡,机体中抗体生成量不足,应激反应较年轻人迟钝,患者更容易发生医院感染^[4]。加之,男性患者居多,对于老年男性患者应给予高度重视。医院感染的铜绿假单胞菌主要分离自 ICU 科室,该科室患者多存在基础疾病,机体免疫能力差,患者病情危重,住院时间长,接受侵入性操作次数较多,导致该科室患者发生医院感染几率增加。医院感染的铜绿假单胞菌主要分离自痰液标本,表明铜绿假单胞菌感染部位主要在患者呼吸道,这是由于铜绿假单胞菌是人体呼吸道的正常菌群,作为条件致病菌时,更容易在呼吸道定植,导致痰液标本中铜绿假单胞菌检出率较高^[5]。由于临床抗感染治疗中,大量使用广谱抗菌药物、激素、免疫抑制剂,致使铜绿假单胞菌临床分离株的耐药性逐年加剧,因此本研究分析了铜绿假单胞菌的耐药性。结果表明,医院感染铜绿假单胞菌对常用抗菌药物均产生了一定程度的耐药性。

微生物需要从体外吸收营养物质,并将代谢产物及时排出体外,因而细菌外膜中的微孔蛋白结构允许水溶性小分子物质自由通过^[6]。常用抗生素类药物分子较小,如喹诺酮类、四环素类、内酰胺类、氨基糖苷类,亲水性极强,可以快速穿透菌体的膜孔蛋白通道,导致病原菌对这类小分子药物敏感。但铜绿假单胞菌中微孔蛋白效率较低,药物穿透性差,导致其对常用小分子药物具有一定的天然耐药性^[7]。因此,积极监测

铜绿假单胞菌的耐药性具有重要意义。除了铜绿假单胞菌一定程度的天然耐药性,其耐药机制还包括体内存在抗菌药物修饰酶、改变药物作用靶点、形成生物膜以及外排泵系统等,加剧了铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药性问题^[8]。菌体内产生氨基糖苷类修饰酶,或者改变药物作用靶位,如 16SrRNA,是导致铜绿假单胞菌临床分离株对氨基糖苷类抗生素产生耐药性的主要原因^[9]。在氨基糖苷类修饰酶中,aac(6')和 ant(2')是两种常见的编码基因类型,铜绿假单胞菌中存在氨基糖苷类修饰酶编码基因使病原菌产生耐药性。有研究报道^[10],在革兰阴性菌中 aac(6')-Ib 基因编码的阿米卡星修饰酶较为常见,病原菌体内存在该基因会使阿米卡星、妥布霉素等药物失去活性。而 aac(6')-II 和 ant(2')-I 两种耐药基因的检出会使革兰阴性菌对庆大霉素、妥布霉素等产生耐药性^[11]。因此,本研究分离的铜绿假单胞菌中 aac(6')-Ib 基因、aac(6')-II 基因以及 ant(2')-I 基因检出情况与其对氨基糖苷类抗菌药物的耐药性直接相关,基因编码的氨基糖苷类修饰酶是导致铜绿假单胞菌产生耐药性的直接原因。

临床病原菌分离株对 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药性的主要机制是由于菌体内存在金属 β -内酰胺酶。IMP 和 VIM 是编码金属 β -内酰胺酶的常见基因,此类编码基因的检出与病原菌的耐药性存在相关性。同时,有研究报道^[12],铜绿假单胞菌中存在 TEM 基因也会导致其对 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药性。因此,本研究分离的铜绿假单胞菌中,IMP、VIM、TEM 耐药基因的检出与病原菌对 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药性有关,如亚胺培南、哌拉西林、氨曲南,菌体中金属 β -内酰胺酶导致铜绿假单胞菌耐药。此外,TEM 耐药基因的检出也与病原菌对头孢菌素的耐药性产生有关。目前,已报道多种病原菌对喹诺酮类药物的耐药性与菌体外排泵系统有关^[13]。例如,大肠埃希菌细胞膜上存在主动外排系统,导致其对四环素类抗生素等药物产生耐药性,因此临床抗感染治疗中越来越重视菌体内外排系统对菌株耐药性的影响。在铜绿假单胞菌中存在多个 Mex-Opr 主要外排系统,包括 MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM 等,其中,MexAB-OprM 系统是铜绿假单胞菌中存在的最主要外排系统类型^[14]。这些主动外排系统可以使绿假单胞菌外排多种抗菌药物,导致病原菌对多种抗生素产生广泛耐药性,如喹诺酮类等常用抗菌药物^[15]。本研究中 oprM 基因的高检出率在一定程度上也决定了铜绿假单胞菌临床分离株对

常用抗菌药物的耐药性,如氧氟沙星、环丙沙星,临床应给予高度重视。随着新型抗生素的不断研发使用,抗生素合理使用变得愈加重要,积极关注临床常见病原菌的耐药性,控制耐药性发展对于高效的临床治疗具有重要意义。

【参考文献】

- [1] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms [J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(4): 582-610.
- [2] Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections; a matched case control study [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(5): 1124-30.
- [3] 蓝锴, 罗强, 张伟铮, 等. 医院内铜绿假单胞菌感染的临床分布及耐药性变迁 [J]. 广东医学, 2011, 32(18): 2398-400.
- [4] 张鸿, 申建维, 孙秀琴, 等. 医院感染铜绿假单胞菌的耐药性变迁分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(2): 449-51.
- [5] 颜令, 王淑玲, 徐兰兰, 等. 铜绿假单胞菌临床分布及耐药性的不均一性 [J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(3): 230.
- [6] Cabot G, Zamorano L, Moya B, et al. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(3): 1767-1778.
- [7] Lyer R, Sylvester MA, Velez-Vega C, et al. Whole-cell based assay to evaluate structure permeation relationships for carbapenem passage through the *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD [J]. ACS Infect Dis, 2017, 3(4): 310-319.
- [8] 王莉, 李明, 江志红, 等. 543 株铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性 [J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(4): 355.
- [9] 李江萍, 廖国林. 铜绿假单胞菌的临床感染分布及耐药性分析 [J]. 河北医药, 2017, 39(9): 1418.
- [10] Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: Risk factors for mortality and microbiologic treatment failure [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2017: 61.
- [11] 储从家, 吴惠玲, 李杰芬. 铜绿假单胞菌 1 245 株的临床分布及耐药性分析 [J]. 实用医技杂志, 2017, 24(6): 652.
- [12] 郝歆, 吕治, 苏建荣. 铜绿假单胞菌感染临床分布及耐药性分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(20): 2060-2062.
- [13] Shen JL, Fang YP. Detection of drug-resistance mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* developing from a sensitive strain to a persister during carbapenem treatment [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 6723-6732.
- [14] Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, et al. Contribution of mexAB-oprM and mexXY (-oprA) efflux operons in antibiotic resistance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Tabriz, Iran [J]. J Meegid, 2016, 45(11): 75-82.
- [15] 余昊, 杨红. 673 例铜绿假单胞菌感染的分布特点及耐药性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(16): 2327-2329.

【收稿日期】 2022-08-13 【修回日期】 2022-10-30