

- [5] 闫舒,刘莹,裴丹,等.医护人员高危药品风险因素认知调查[J].药物流行病学杂志,2017,26(2):129-133.
- [6] LU MC, YU S, CHEN IJ, et al. Nurses' knowledge of high-alert medications: a randomized controlled trial[J]. Nurse Educ Today, 2013, 33(1):24-30.
- [7] 刘淑琼,秦正英.护理男生就业现状及其影响因素的调查与分析[J].中国卫生产业,2014,11(4):37-38.
- [8] NEOH CY, TIAN EA, CHOI C, et al. Improving adherence to safe prescription guidelines for Dapsone: harnessing an enhanced electronic medical records system and a team approach[J]. Int J Dermatol, 2012, 51(3):349-354.
- [9] 申良荣,朱晓荣,辛爱利,等.护生高危药品认知现状及培训需求调查[J].齐鲁护理杂志,2017,23(16):22-25.
- [10] 唐红梅,岑金.我国护理教育的研究趋势分析[J].上海交通大学学报(医学版),2013,33(1):89-93.
- [11] 孔令娜,李芬.教练式带教模式对心脏监护室实习护士专科技能的提升效果[J].安徽医药,2017,21(12):2329-2332.
- [12] 严玲微,林丛,林中,等.重症医学科高警讯药物的管理现状及对策[J].护士进修杂志,2013,28(4):308-310.
- [13] 许晶晶,王子超,樊萍.病区抢救车药品管理情况的调查分析与改进建议[J].中国现代医药杂志,2012,14(7):53-56.
- [14] HICKS RW, BECKER SC. An overview of intravenous-related medication administration errors as reported to MEDMARX, a national medication error-reporting program[J]. J Infus Nurs, 2006, 29(1):20-27.
- [15] 王丽萍,焦卫红,孟宪颖.军队医院临床护理人员对高危药品认知现状的调查[J].解放军护理杂志,2011,28(21):32-34.
- [16] 周云,荆珏华.以积极灵活的带教方式搞好骨科临床实习教学[J].安徽医药,2012,16(3):410-411.
- [17] LO TF, YU S, CHEN IJ, et al. Faculties' and nurses' perspectives regarding knowledge of high-alert medications[J]. Nurse Educ Today, 2013, 33(3):214-221.
- [18] 吴文涌,张长乐,李俊.胃肠外科实习教学经验和体会[J].安徽医药,2012,16(4):558-559.

(收稿日期:2018-01-12,修回日期:2019-01-12)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.05.053

◇ 医院药学 ◇

铜绿假单胞菌 280 株基因分型及耐药性分析

陶春梅¹, 龚雅利²作者单位:¹重庆市沙坪坝区陈家桥医院检验科,重庆 401331;²第三军医大学第一附属医院烧伤研究所,重庆 400038

通信作者:龚雅利,女,副主任技师,研究方向为临床烧伤感染,E-mail:gyl0804@163.com

摘要:目的 分析临床感染铜绿假单胞菌的基因型别、耐药特点以及对碳青霉烯类抗生素的耐药机制。方法 收集重庆市沙坪坝区陈家桥医院2011年6月至2017年7月共6年分离的280株铜绿假单胞菌,主要来源于呼吸内科和ICU病房的痰液标本,进行ERIC-PCR(肠杆菌基因间保守重复序列聚合酶链式反应)分型及药敏试验分析,并检测12种主要的碳青霉烯酶基因的携带情况。结果 分型结果表明主要存在A、G、H三种优势型别的流行,细菌对抗生素的耐药率普遍低于全国耐药监测数据,对碳青霉烯类抗生素亚胺培南和美罗培南的平均不敏感率分别为10.4%和7.1%。在35株碳青霉烯类抗生素不敏感菌株中,碳青霉烯酶IMP和VIM的携带率分别为8.57%和5.71%。结论 肺部感染以及A、G、H三种优势型别细菌是铜绿假单胞菌感染防控的重点对象,耐碳青霉烯类抗生素菌株中主要携带IMP和VIM两种常见的碳青霉烯酶基因,但阳性率较低。但碳青霉烯类抗生素耐药率逐年升高,仍应引起重视。

关键词:铜绿假单胞菌; 重复序列,核酸; 肠杆菌属; 聚合酶链反应; β 内酰胺抗药性; 基因,MDR

Genotyping and drug resistance of 280 strains of clinically isolated pseudomonas aeruginosa

TAO Chunmei¹, GONG Yali²Author Affiliations:¹Department of Clinical Laboratory, Chen Jiaqiao Hospital, Shapingba District,Chongqing 401331, China; ²Institute of Burn Research, Southwest Hospital,

Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To investigate the genotype, drug resistance characteristics and mechanism of carbapenems resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** A total of 280 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chen Jiaqiao Hospital during

June 2011 to July 2017 were analyzed by ERIC-PCR and antimicrobial susceptibility testing. The gene encoding carbapenemases was detected by PCR. **Results** A majority of the *P. aeruginosa* strains were isolated from sputum of the patients in medical and ICU wards. Type A, G, and H were the dominant types. Drug resistance rates in our hospital were significantly lower than that reported by China Antimicrobial Resistance Surveillance System. The average insensitivity rates to Imipenem and Meropenem were 10.4% and 7.1%, respectively. Only 8.57% and 5.71% of the carbapenem-non-susceptible isolates were positive for Carbapenemases IMP and VIM, respectively. **Conclusion** Pulmonary infection and type A, G, and H *P. aeruginosa* are the key points to control *P. aeruginosa* infection in our hospital. IMP and VIM were the main Carbapenemases harbored in the Carbapenem-non-susceptible isolates but with relatively low detection rate. It is still worthy of attention that resistance to Carbapenems is rising year by year.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; Repetitive sequences, nucleic acid; Enterobacter; Polymerase chain reaction; Beta-lactam resistance; Genes, MDR

铜绿假单胞菌是一种重要的条件致病菌,也是引起医院感染的重要病原菌之一。在免疫力低下或缺失、肺囊性纤维化以及烧伤病人中的感染尤为常见^[1-2]。近年来,随着抗生素的广泛应用,铜绿假单胞菌对抗菌药物的耐药率日益攀升,多重耐药(multidrug-resistant, MDR)及广泛耐药(extensively drug resistant, XDR)菌株的分离率不断升高,为临床感染的控制和治疗带来了严峻的挑战^[3]。根据2016年全国耐药监测数据,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率达到了25%以上。不仅在中国,多耐药铜绿假单胞菌在全球亦呈现出广泛流行和传播的特点,成为重要的全球性的公共卫生问题^[3]。因此有必要对临床感染的铜绿假单胞菌进行定期的流行病学监测及耐药性分析,从而帮助我们了解细菌的亲缘关系、传播途径以及耐药特点,确认是否存在暴发或交叉感染,以便制定有效的防控措施。

在本研究中,我们对280株铜绿假单胞菌进行了ERIC-PCR分型及耐药性分析,并检测了35株碳青霉烯不敏感菌株中12种主要的碳青霉烯酶基因(*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SPM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{BIC}*, *bla_{KPC}*, *bla_{AIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{DIM}*)的携带情况,探讨细菌的型别分布及耐药变迁。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 280株铜绿假单胞菌分离自2011年6月至2017年7月重庆市沙坪坝区陈家桥医院住院病人,所有菌株经API 20NE系统(非肠道革兰阴性杆菌鉴定系统)鉴定为铜绿假单胞菌。

1.1.2 主要仪器和试剂 生化鉴定系统(API 20NE, 法国BioMerieux);PCR扩增仪(美国Bio-Rad);电泳仪(美国Bio-Rad);凝胶成像系统(美国Bio-Rad);药敏检测纸片(英国Oxoid);LB培养基(英国Oxoid)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离鉴定 按常规方法分离采集菌

株,均采用API 20NE生化鉴定系统分析鉴定。

1.2.2 ERIC-PCR分型 取各菌株菌液煮沸10 min后5 000 g离心,吸取上清作为PCR扩增模板。以ERIC1:5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'和ERIC2:5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'为引物(上海生工合成)^[4],用2×Fast Taq酶(Novoprotein)进行PCR扩增。扩增条件如下:95℃预变性7 min,95℃变性1 min,52℃退火1 min,62℃延伸1 min,共30个循环,最后62℃终延伸10 min。PCR扩增产物行2%琼脂糖凝胶电泳检测。应用Quantity one软件对获得的指纹图谱进行识别提取,最后采用非加权组平均法进行聚类分析。以相似度≥0.8作为同一基因型,<0.8为不同基因型。

1.2.3 药敏试验 应用K-B扩散法鉴定哌拉西林(PIP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、替卡西林/棒酸(TIM)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、氨基糖苷类(ATM)、亚胺培南(IMP)、美罗培南(MEM)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、妥布霉素(TOB)、左氧氟沙星(LVX)、环丙沙星(CIP)等抗生素的敏感性,判定方法参考细菌分离当年的CLSI(美国临床和实验室标准协会)标准。

1.2.4 碳青霉烯酶基因检测 按上述PCR模板制备方法,取碳青霉烯不敏感菌株35株中12对主要的碳青霉烯酶基因(*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SPM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{BIC}*, *bla_{KPC}*, *bla_{AIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{DIM}*)的引物,以2×Fast Taq酶进行多重PCR扩增,引物及方法参见相关文献^[5]。扩增体系及条件如下:模板1 μL,上下游引物各0.5 μL,2×Fast Taq酶5 μL,去离子水3 μL。94℃预变性3 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环;72℃终延伸5 min。PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 菌株标本来源及病房分布 本研究一共统计了分离的280株铜绿假单胞菌,同一病人选取首次分离菌。标本来源以痰液标本最多,为262株

(93.6%)。其他标本来源依次为伤口分泌物9株(3.2%)、脓液3株(1.0%)、组织液2株(0.7%)、血液2株(0.7%)、穿刺液1株(0.4%)、尿液1株(0.4%)。280株细菌的病房分布以内一科(呼吸内科、消化内科)居多,共179株(63.9%),其次是ICU共36株(12.9%),其余病房依次为儿科21株(7.5%)、内二科(心血管内科、神经内科)18株(6.4%)、外一科(骨科)13株(4.6%)、外二科(普外科)8株(2.9%)、门诊4株(1.4%)、妇产科1株(0.4%)。

2.2 ERIC-PCR分型 280株铜绿假单胞菌通过ERIC-PCR分型及聚类分析后,以相似度 ≥ 0.8 作为同一基因型分型,所有细菌可以分为17种型别,分别命名为A(42株)、B(1株)、C(4株)、D(16株)、E(18株)、F(16株)、G(47株)、H(43株)、I(22株)、J(20株)、K(8株)、L(24株)、M(1株)、N(8株)、O(7株)、P(2株)、Q(1株)型,见图1。

其中A、G、H三种为主要型别,分别有42株、47株和43株。A、G、H三种型别在几个主要的科室如内一科(呼吸内科、消化内科)、ICU、儿科、内二科(心血管内科、神经内科)、外一科(骨科)、外二科(普外科)均有分布。其余型别散在分布于各个科室。

图2为典型的ERIC-PCR产物电泳图,箭头所示依次为A、G、H三种主要型别的指纹图谱。

2.3 药敏试验结果 药敏试验共测试了13种抗菌药物的敏感性,结果按照美国临床和实验室标准协会(CLSI)标准分为敏感、中介和耐药。细菌对各种抗生素的敏感性分别为哌拉西林(PIP, 82.9%)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP, 90.4%)、替卡西林/棒酸(TIM, 80.4%)、头孢他啶(CAZ, 81.1%)、头孢吡肟(FEP, 86.8%)、氨曲南(ATM, 88.6%)、亚胺培南(IMP, 89.6%)、美罗培南(MEM, 92.9%)、阿米卡星(AMK, 94.6%)、庆大霉素(GEN, 90.7%)、妥布霉素(TOB, 95.4%)、左氧氟沙星(LVX, 86.4%)、环丙沙星(CIP, 87.5%)。

2.4 碳青霉烯类抗生素耐药趋势分析 该院6年间铜绿假单胞菌亚胺培南和美罗培南的总不敏感率(亚胺培南或美罗培南不敏感菌株数/菌株总数)分别为10.4%(29/280)和7.1%(20/280),其中,2011年6月至2017年7月各年份分离菌株对亚胺培南的不敏感率分别为5.5%、5.4%、7.1%、10.6%、13.2%、12.2%、14.7%,而对美罗培南的不敏感率分别为5.5%、2.7%、2.3%、6.3%、9.4%、10.2%、11.7%。表明该院分离的铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率有逐年升高的趋势。见图3。

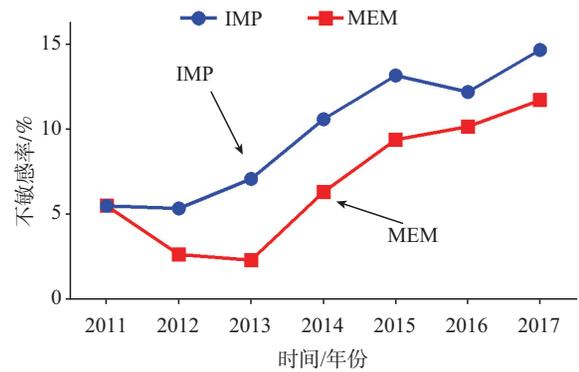


图3 2011年6月至2017年7月分离铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的不敏感率

2.5 碳青霉烯酶的携带检测结果分析 通过PCR检测35株碳青霉烯类抗生素不敏感菌株的碳青霉烯酶的携带情况,结果表明仅IMP和VIM两种酶编码基因有检出,携带率分别为8.57%(3/35)和5.71%(2/35)。其余基因 bla_{NDM} , bla_{GES} , bla_{SPM} , bla_{OXA-48} , bla_{BIC} , bla_{KPC} , bla_{AIM} , bla_{CIM} , bla_{SIM} , bla_{DIM} 均未发现阳性表达。

3 讨论

铜绿假单胞菌是引起医院感染的重要的条件致病菌,由于耐药现象日益严重,对其临床感染的治疗和耐药机制的研究一直备受关注。不同于其他细菌单一的克隆传播,铜绿假单胞菌往往呈现出多样性的遗传背景,而基因型别的多样性使其更容易获得耐药性或者其他遗传优势,导致其毒力增强,感染能力增加^[6]。本研究中,从标本来源和科室分布来看,绝大部分标本来自于痰液,呼吸内科和ICU病房分离率最高,说明在我院铜绿假单胞菌多来源于肺部感染的内科病人,该群体应该成为铜绿假单胞菌防控的重点。ERIC-PCR分型的结果显示我院分离的铜绿假单胞菌呈现出较高的遗传多样性,与国内各地区医院流调报道基本一致^[7-9]。但基因分型以A、G、H三种主要型别为主,且在大多数科室均有分布,表明这三种型别是我院流行的优势型别,应加强对这些主要型别的监测,控制其在病区间的传播,降低医院感染的发生率。此外,各个科室的型别组成也有一定的差异。这种差异可能是由于各个科室抗生素使用习惯不同所致,不同的选择压力导致了不同型别的感染和流行。但ERIC-PCR也存在一定的局限性,与脉冲场凝胶电泳及多位点序列分型相比,ERIC-PCR的分型结果很难进行横向比较,只能反映局部地区流行细菌的亲缘关系。

随着抗生素的广泛使用,铜绿假单胞菌对大多

数临床常用抗生素的敏感性不断下降,多耐药和广泛耐药细菌分离率日益增高。碳青霉烯类抗生素是治疗多耐药铜绿假单胞菌常用且有效的抗菌药物之一,其耐药率也在不断攀升^[10]。但各地铜绿假单胞菌的碳青霉烯耐药率也有所差异,在欧洲各国,碳青霉烯类抗生素不敏感率大多在10%~30%不等,但希腊达到了50.5%^[11]。美国研究机构所提供的数据显示亚胺培南耐药率为21.9%,美罗培南耐药率为15.4%^[12]。中国2016年全国耐药监测数据显示亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为28.7%和25.3%。而本研究中,我院6年来铜绿假单胞菌对亚胺培南和美罗培南的平均不敏感率分别为10.4%和7.1%。与其他检测的大多数抗生素一样,我院所分离的铜绿假单胞菌的耐药率显著低于全国耐药数据。其可能原因是由于全国耐药数据所统计的大多数细菌来自于全国三级甲等以上的医院所致。但从不同年份的耐药情况来看,碳青霉烯类抗生素的耐药率仍在逐年升高。因此,尽管可能在基层医院碳青霉烯的耐药率较低,但其逐年升高的趋势也不容忽视,抗生素合理有效的使用仍应引起临床工作者的足够重视。

铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制较为复杂,目前报道的主要包括携带碳青霉烯酶,孔蛋白OprD的突变或表达抑制,以及外排泵系统高表达^[13]。在本研究中,我们只检测了碳青霉烯酶的携带情况,结果表明检测菌株中主要携带IMP和VIM两种常见的碳青霉烯酶基因,但阳性率较低。既往文献报道也显示,与欧美国家相比,国内流行的铜绿假单胞菌碳青霉烯酶携带率较低^[7,14]。oprD基因突变和外排泵高表达是国内菌株耐碳青霉烯的主要机制^[15]。

综上,本研究调查了我院2011年至2017年六年中铜绿假单胞菌的总流行情况,分析发现该细菌多来源于内科肺部感染病人,存在A、G、H三种主要型别。细菌对碳青霉烯酶类抗生素的耐药率虽逐年升高,但仍低于全国耐药监测网所提供的数据,且细菌碳青霉烯酶基因携带率较低。

(本文图1,2见插图5-6)

参考文献

[1] 彭天元,徐庆连,蔡晨.2010—2014年烧伤科临床分离细菌分布及耐药性分析[J].安徽医药,2016,20(9):1776-1779.
[2] LÓPEZ-CAUSAPÉ C, DE DIOS-CABALLERO J, COBO M, et al. Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis

Pseudomonas aeruginosa isolates from a Spanish multi-centre study[J].Int J Antimicrob Agents, 2017, 50(3):334-341.

- [3] El ZME, Al TAA, WEBSTER TJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies [J]. Future Microbiol, 2015, 10(10):1683-1706.
[4] LAKSHMI PJ, PRAJNA L, MOHANKUMAR V. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from post-cataract endophthalmitis patients [J]. Microb Pathog, 2015, 78:67-73.
[5] POIREL L, WALSH TR, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1):119-123.
[6] MAATALLAH M, CHERIAA J, BACKHROUF A, et al. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235 [J]. PLoS One, 2011, 6(10):e25617. DOI: 10.1371/journal.pone.0025617.
[7] 张勇,刘爱胜,文艳.75株碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌ERIC-PCR菌种分型及其主要耐药机制研究[J].检验医学,2014,29(7):755-759.
[8] 卢雯君,李健,李情操.ICU耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌检出及同源性分析[J].浙江临床医学,2017,19(5):957-958.
[9] 李情操,吴巧萍,屠艳焯,等.耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌第1类整合子可变区启动子检测及同源性分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(12):2641-2644,2648.
[10] BUEHRLE DJ, SHIELDS RK, CLARKE LG, et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(1):pii:e01243-16. DOI: 10.1128/AAC.01243-16.
[11] SOULI M, GALANI I, GIAMARELLOU H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe [J]. Euro Surveill, 2008, 13(47). pii: 19045. PMID: 19021957.
[12] MORROW BJ, PILLAR CM, DEANE J, et al. Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the CAPITAL surveillance program [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(4):412-416.
[13] CASTANHEIRA M, DESHPANDE LM, COSTELLO A, et al. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(7):1804-1814.
[14] 魏宏莲,杨靖,时东彦,等.CIM和Carba NP筛选铜绿假单胞菌产碳青霉烯酶比较[J].临床检验杂志,2016,34(4):241-243.
[15] WANG J, ZHOU JY, QU TT, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals [J]. International journal of antimicrobial agents, 2010, 35(5):486-491.

(收稿日期:2017-10-26,修回日期:2019-01-15)