

# 舟山地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及感染危险因素分析

孙春雷\*, 干朝晖, 姚宝锋(舟山市普陀区人民医院重症医学科, 浙江 舟山 316100)

中图分类号 R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)08-1061-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.08.16

**摘要** 目的:为临床控制耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染提供参考依据。方法:选择2013年2月—2014年2月舟山地区3家三级医院感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌的患者114例,从其临床标本中分离出铜绿假单胞菌共计114株,分析菌株耐药特征及产碳青霉烯酶基因多样性;感染危险因素分析以同期住院的对亚胺培南敏感的铜绿假单胞菌感染的101例患者作为对照组,通过单因素及Logistic多因素回归分析,探讨耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染的危险因素。结果:114株铜绿假单胞菌均对多黏菌素B敏感,对其他9种抗菌药物均有不同程度耐药;其产碳青霉烯酶基因携带情况以IMP、VIM基因为主。长时间住院、机械通气、之前使用过亚胺培南及早期联合应用抗菌药物是耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染危险因素。结论:舟山地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药现象较为严重,避免长时间住院、早期联合应用抗菌药物等可降低耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染率。

**关键词** 亚胺培南;铜绿假单胞菌;耐药性;碳青霉烯酶;基因多态性;危险因素

## Analysis of Drug Resistance Characteristics of Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Infection Risk Factors in Zhoushan Area

SUN Chunlei, GAN Chaohui, YAO Baofeng (ICU, Zhoushan Putuo District People's Hospital, Zhejiang Zhoushan 316100, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide reference for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection control. METHODS: 114 patients infected with imipenem-resistant *P. aeruginosa* were selected from 3 tertiary hospitals in Zhoushan during Feb. 2013 to Feb. 2014. 114 strains of *P. aeruginosa* were isolated from clinical specimens, and drug resistance characteristics and carbapenemase-producing gene diversity were analyzed. 101 inpatients with imipenem-resistant *P. aeruginosa* infection were included in control group; univariate and multivariate Logistic regression analysis were adopted to explore the risk factors of imipenem-resistant *P. aeruginosa* infection. RESULTS: 114 strains were sensitive to polymyxin B, and had different levels of resistance to other 9 kinds of antibiotics. Carbapenemase-producing gene were mainly IMP and VIM type gene. Long-term hospitalization, mechanical ventilation, used imipenem and early combined use of antibiotics were risk factors of imipenem-resistant *P. aeruginosa* infection. CONCLUSIONS: In Zhoushan area, imipenem-resistant *P. aeruginosa* shows serious drug resistance. To avoid long-term hospitalization and early combined use of antibiotics can reduce imipenem-resistant *P. aeruginosa* infection.

**KEYWORDS** Imipenem; *Pseudomonas aeruginosa*; Drug resistance; Carbapenemases; Gene diversity; Risk factor

- [3] 杨中良,夏娟,杨秀云,等.慢性阻塞性肺疾病急性加重患者并发真菌性肺炎危险因素的研究[J].中国医药导报,2014,11(27):94.
- [4] 徐丙发,张翠,秦侃,等.慢性阻塞性肺疾病患者临床营养支持的研究进展[J].中国药房,2013,24(6):556.
- [5] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and Pseudomonas aeruginosa[J]. Clin Infect Dis, 2006,43(Suppl 2):49.
- [6] 滕鸿,李岱,钱小毛,等.慢性阻塞性肺疾病患者痰培养革兰阴性菌的分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(23):5758.
- [7] 王辉,刘亚丽,陈民钧,等.2009—2010年中国六城市成人社区获得性呼吸道感染病原菌耐药性监测[J].中华结核和呼吸杂志,2012,35(2):113.
- [8] 江艳,李珂,何萍.黏质沙雷菌医院感染现状及耐药性分析[J].热带医学杂志,2014,14(12):1610.
- [9] 王扬,夏丽萍,康健,等. $\beta$ -内酰胺类抗菌药物对阴沟肠杆菌 AmpC 酶的诱导性研究[J].中华医院感染学杂志,2007,17(2):125.
- [10] Chen HB, Liu YD, Jiang XH, et al. Rapid change of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in a Chinese tertiary care hospital over a 15-year period[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010,54(5):1842.

(收稿日期:2015-05-29 修回日期:2015-09-30)

(编辑:晏妮)

\* 主治医师。研究方向:重症医学。电话:0580-3030265。E-mail:386086098@qq.com

铜绿假单胞菌又称绿脓杆菌,是一种能够引起人和动物感染的条件致病菌,属于革兰阴性杆菌,其分布较为广泛,自然界及健康人群的呼吸道、肠道及皮肤均有分布<sup>[1]</sup>。以亚胺培南为代表的碳青霉烯类被认为是目前临床治疗革兰阴性杆菌最有效的抗菌药物。近年来,随着抗菌药物的广泛及不合理使用,铜绿假单胞菌的耐药现象越来越严重,目前已分离到多重耐药菌株,例如亚胺培南耐药的三重耐药菌株,这给临床治疗带来了巨大挑战<sup>[2-3]</sup>。对亚胺培南产生耐药性,不仅会延长患者的住院时间,增加住院治疗费用,而且还会提高患者的病死率,给患者生命安全造成威胁。因此,及时了解耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药特征及感染危险因素,对临床预防及治疗耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染具有重要的意义。本研究通过对舟山地区3家医院分离的耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药特征及感染危险因素进行分析,旨在了解本地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌的多药耐药现状、产碳青霉烯酶基因多样性及感染危险因素。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

选择2013年2月—2014年2月舟山地区3家三级医院感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌的患者114例,从其临床标本中分离出耐亚胺培南铜绿假单胞菌共计114株(排除同一患者同一部位重复分离的菌株);铜绿假单胞菌ATCC 27853作为质控菌株;感染危险因素分析以同期对亚胺培南敏感的铜绿假单胞菌感染者101例作为对照组。

### 1.2 方法

1.2.1 药敏试验 采用K-B法<sup>[4]</sup>对临床常用的10种抗菌药物进行药敏试验,包括头孢哌酮、头孢他啶、头孢吡肟、左氧氟沙星、环丙沙星、阿米卡星、多黏菌素B、美罗培南、哌拉西林、米诺环素等。

1.2.2 耐药基因检测 (1)制备细菌DNA模板:将114株耐亚胺培南铜绿假单胞菌菌株分别接种在M-H平板上,并置于37℃恒温孵箱中孵育过夜,然后挑选单克隆菌落置于盛有10 ml 营养肉汤(成分:蛋白胨、牛肉膏、氯化钠)培养液的EP管中,将EP管置于37℃恒温摇床过夜,增菌后取3 ml 培养菌液离心处理,弃上清液,加入200 μl 无菌水、0.2 ml 的2 mg/ml 蛋白酶K,振荡,重悬细菌后将其置于60℃水浴箱中预热5 min,再转入95℃水浴箱中水浴10 min后离心处理,取上清液(DNA提取液)密封后置于-20℃保存,备用。(2)PCR扩增体系、反应条件及检测:总反应体系为20 μl,包括2 μl DNA模板及上下游引物各1 μl,10 μl 2×10 Taq PCR Master Mix,使用灭菌双蒸水补足至20 μl。其反应条件为:93℃预变性2 min,94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸70 s,35个循环后,72℃延伸5 min终止反应,PCR产物置于4℃冰箱保存。扩增产物以1.5%琼脂凝胶,120 V电压电泳25 min后(ATCC 27853为阴性对照),使用凝胶成像仪观察结果。(3)基因测序与对比:使用试剂盒进行纯化胶回收并送BIOMED生物科技有限公司进行测序,将核苷酸序列与GenBank上的基因序列进行对比。

1.2.3 感染危险因素研究 收集两组患者病历资料,调查耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染可能相关因素,包括患者年龄、性

别、是否入住重症监护病房(ICU)及住院时间等一般资料,治疗期间患者是否接受留置导管、内窥镜及机械通气等侵袭性操作,之前2周抗菌药物使用情况,通过对调查结果统计、分析,探讨耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染的危险因素。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析处理,计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间比较采用 $t$ 检验;计数资料采用%表示,采用 $\chi^2$ 检验进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。将单因素分析中有显著性差异的因素进行Logistic多因素回归分析。

## 2 结果

### 2.1 对抗菌药物的耐药情况

114株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对抗菌药物的耐药情况见表1。由表1可见,114株耐亚胺培南铜绿假单胞菌菌株均对多黏菌素B敏感,对其他9种抗菌药物均有不同程度耐药。

表1 114株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对抗菌药物的耐药情况

抗菌药物	耐药菌株数	耐药率, %
头孢哌酮	87	76.32
头孢他啶	61	53.51
头孢吡肟	76	66.67
左氧氟沙星	37	32.46
环丙沙星	41	35.96
阿米卡星	52	45.61
多黏菌素B	0	0
美罗培南	55	48.25
哌拉西林	43	37.72
米诺环素	65	57.02

### 2.2 产碳青霉烯酶基因多样性检测结果

114株耐亚胺培南铜绿假单胞菌菌株携带产碳青霉烯酶基因以IMP、VIM基因为主,其携带基因多样性检测结果见表2。

表2 114株耐亚胺培南铜绿假单胞菌产碳青霉烯酶基因多样性检测结果

Tab 2 Gene diversity of drug resistance gene of 114 strains of imipenem-resistant *P. aeruginosa*

基因名称	菌株数	检出率, %
IMP	23	20.18
VIM	71	62.28
SPM	5	4.39
SIM	3	2.63
NDM-1	0	0
GIM	0	0
OXA	0	0

### 2.3 单因素分析结果

经单因素分析,结果显示:高龄、入住ICU、住院时间 $\geq 4$ 周、机械通气、之前使用过亚胺培南以及联用抗菌药物是感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌的相关因素,具体见表3。

### 2.4 Logistic多因素回归分析结果

选择单因素分析结果中6个差异具有统计学意义的变量,采用Logistic多因素回归分析,结果显示:住院时间 $\geq 4$ 周、机械通气、之前使用过亚胺培南及早期联用抗菌药物是感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌的危险因素,具体见表4。

表3 耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染危险因素单因素分析 (例,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Univariate analysis of risk factor of imipenem-resistant *P. aeruginosa* infection (case,  $\bar{x} \pm s$ )

危险因素	病例组(n=114)	对照组(n=101)	P
性别(男/女)	69/45	63/38	>0.05
年龄,岁	68.24 ± 6.47	53.45 ± 6.21	<0.05
入住ICU	57	30	<0.05
住院时间≥4周	64	29	<0.05
留置导管	51	47	>0.05
机械通气	30	15	<0.05
之前使用过亚胺培南	103	51	<0.05
之前使用过头孢吡肟	15	19	>0.05
之前使用过氟喹诺酮类	11	15	>0.05
联用抗菌药物(>3 d)	77	49	<0.05
使用免疫抑制剂	16	14	>0.05

表4 耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染危险因素Logistic多因素回归分析

Tab 4 Multivariate Logistic regression analysis of risk factor of imipenem-resistant *P. aeruginosa* infection

危险因素	b	S.E	Wald	P	OR	OR的95%CI
年龄≥60岁	0.709	0.927	1.257	>0.05	0.176	0.004~5.298
入住ICU	0.759	0.926	1.163	>0.05	4.352	0.542~76.769
住院时间≥4周	2.068	0.888	4.902	<0.05	18.753	1.436~139.638
机械通气	3.768	0.834	5.725	<0.05	27.358	2.957~267.737
之前使用过亚胺培南	4.013	0.769	6.557	<0.05	31.393	2.654~154.329
联用抗菌药物	0.718	1.327	1.204	<0.05	2.658	0.275~86.338

### 3 讨论

铜绿假单胞菌是住院患者感染检出率最高的革兰阴性菌之一,一旦发生感染则患者住院时间将大大延长,此外还会增加患者的经济负担。临床上用于治疗铜绿假单胞菌感染的抗菌药物有 $\beta$ -内酰胺类及氨基糖苷类等,其中 $\beta$ -内酰胺类中的碳青霉烯类是抗菌活性最强、抗菌谱最广的抗菌药物,亚胺培南是碳青霉烯类抗菌药物的代表药物,与第三代头孢菌素无交叉耐药性,且对 $\beta$ -内酰胺酶稳定,被认为是临床上治疗耐药铜绿假单胞菌感染的重要抗菌药物之一<sup>[5-6]</sup>。但由于近年来对亚胺培南的广泛使用,造成越来越多的铜绿假单胞菌对亚胺培南产生耐药。文献表明,造成铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要原因为膜孔蛋白oprD2缺失或表达减低、抗菌药物灭活酶水解<sup>[7-8]</sup>。本研究结果显示,所有铜绿假单胞菌菌株均对多黏菌素B敏感,对大多数抗菌药物存在不同程度的耐药。

碳青霉烯酶是一类能够水解碳青霉烯类抗菌药物的 $\beta$ -内酰胺酶,其种类繁多,包括A、B、C三类,具有重要临床意义的产碳青霉烯酶基因型包括:IMP、VIM、OXA、KCP、NDM-1<sup>[9]</sup>,其中铜绿假单胞菌以IMP、VIM基因型居多。本研究中IMP的阳性检出率为20.18%,VIM的阳性检出率为62.28%,与文

献报道相似<sup>[10]</sup>;另有文献报道OXA基因型在铜绿假单胞菌曾被检出<sup>[11]</sup>,但本研究中未发现OXA基因型。

经本研究调查分析发现,长时间住院、机械通气、在分离出耐亚胺培南铜绿假单胞菌前使用过亚胺培南及早期联用抗菌药物是耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染的危险因素,因此在治疗存在上述危险因素的患者时,应注意预防院内感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌。

综上所述,舟山地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药现象较为严重,产碳青霉烯酶基因以IMP、VIM为主,避免长时间住院和早期联合使用抗菌药物等可降低耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染率。

### 参考文献

- [1] 王丽娟,李武平,史皆然,等.76例耐亚胺培南铜绿假单胞菌B类碳青霉烯酶与耐药现状研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(5):559.
- [2] 杨海红.某院2010年下呼吸道感染病原菌分布及其耐药性[J].中国感染控制杂志,2011,10(6):464.
- [3] 董国伟,郭洁.耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的初步研究[J].中国感染控制杂志,2014,13(7):385.
- [4] 吕春兰,郝爱军.耐亚胺培南铜绿假单胞菌的感染现状及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(3):606.
- [5] 徐洪伟,多丽波,张联博,等.院内感染亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌的分布及耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2010,20(5):1137.
- [6] 费静娴,吴莲凤,彭定辉,等.铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药性[J].中国公共卫生,2010,26(10):1258.
- [7] 朱晓艳,谭银玲.铜绿假单胞菌耐药机制及其耐药现状[J].重庆医学,2010,39(8):986.
- [8] 廖景光,李小燕,李敏研,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌相关耐药基因的检测[J].中国微生态学杂志,2011,23(5):412.
- [9] 张鞠玲,鲍春梅,陈素明,等.对亚胺培南不敏感菌株的产碳青霉烯酶的情况分析[J].中国卫生检验杂志,2011,21(6):1328.
- [10] 王丽娟,李武平,徐修礼.西安地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药现状及碳青霉烯酶基因研究[J].国际检验医学杂志,2014,35(14):1882.
- [11] 时东彦,魏宏莲.5年间耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性监测及耐药机制探讨[J].中华医院感染学杂志,2010,20(12):1654.

(收稿日期:2015-07-14 修回日期:2015-11-23)

(编辑:晏妮)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅