

安徽地区铜绿假单胞菌耐药性分析及泛耐药菌体外联合药敏试验的研究

卞婷婷¹, 刘艳艳², 叶英^{1,2}, 李家斌^{1,2}

摘要 目的 收集安徽省细菌耐药中心临床分离铜绿假单胞菌(PAE)菌株,对其感染分布及耐药性情况进行分析,了解其耐药变迁情况,并筛选出泛耐药铜绿假单胞菌(PDR-PA),评价联合用药组的体外抑菌作用,寻求有效的联合抗菌药物。方法 采用琼脂稀释法测定所收集PAE菌株的最低抑菌浓度(MIC)值。按照2015年美国临床实验委员会指导原则的标准计算抗菌药物的耐药率、中介率和敏感率,进一步采用棋盘法设计,琼脂平板稀释法测定所筛选出的54株PDRPA菌株的MIC,并计算部分抑菌浓度。结果 PAE对阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟以及头孢他啶最为敏感且三年内耐药率较为稳定,对头孢唑肟等三代头孢耐药率显著升高($P < 0.05$),对环丙沙星耐药率有所下降($P < 0.05$),对于亚胺培南及美罗培南的耐药率基本持平。多粘菌素E+利福平、多粘菌素E+亚胺培南、多粘菌素E+头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦+阿米卡星、头孢他啶+环丙沙星5组抗菌药物对于PDRPA主要起到协同相加作用。结论 PAE感染仍占临床感染一定比例,应继续加强对PAE耐药性的监测,多粘菌素等多种抗感染药物联合使用可作为对PDRPA感染的治疗方案。

关键词 铜绿假单胞菌; 耐药性; 药物敏感试验; 联合用药
中图分类号 R 378; R 978

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1536-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.027

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas Aeruginosa*, PAE)属于假单胞菌属,是最常见的非发酵革兰阴性菌之一,广泛分布于自然界的各种水、空气以及正常人体皮肤、肠道和呼吸道等,为常见的院内感染致病菌。长期应用激素、免疫抑制剂、肿瘤放化疗等免疫功能低下,以及手术、气管切开或导管留置等侵袭性诊疗操作的患者普遍易感。根据中国CHINET细菌耐药性监测资料显示,2005~2012年PAE的分离率在所有革兰阴性菌中居第2~5位^[1]。PAE的耐药机制

复杂,主要有产生多种灭活酶、改变药物作用靶位、生物被膜的形成、膜通透性下降等。加强对PAE的耐药监测在控制耐药菌株传播以及临床治疗上有着重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 收集安徽省细菌耐药监测中心所属40家医院2013~2015年临床分离的PAE,去除来自同一患者相同部位的重复菌株,共829株。质控菌为PAE ATCC27853,为安徽省细菌耐药监测中心保存菌株。

1.1.2 抗菌药物 哌拉西林/他唑巴坦(美国惠氏制药有限公司);头孢哌酮/舒巴坦(美国辉瑞制药有限公司);亚胺培南西司他丁(美国Merck制药有限公司);美罗培南(日本住友制药有限公司);庆大霉素(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂);头孢吡肟(深圳立健药业有限公司);阿米卡星(上海旭东海普药业有限公司);环丙沙星(广州南新制药有限公司);左氧氟沙星(北京双鹤药业有限公司);头孢他啶(英国葛兰素史克制药有限公司);头孢唑肟(哈尔滨哈药集团制药总厂);多粘菌素E(美国Sigma-Aldrich公司);利福平(重庆华邦制药有限公司)。

1.1.3 仪器与试剂 多点接种仪(英国AQS Manufacturing公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);电热恒温培养箱(上海精宏公司);电动移液器(芬兰Finnpipette公司);超净工作台(苏州苏净公司安泰集团);Walkaway96微生物自动鉴定仪(德国SIEMENS公司);麦氏比浊仪(法国Biomerieux公司);-80℃超低温冰箱(日本Sanyo公司);-20℃冰箱(青岛海尔集团);电子天平(上海名桥精密科学仪器公司);纯水机(美国Labconco公司);Mueller-Hinton琼脂干粉(英国OXOID公司)。

1.2 菌株分离与鉴定 按照《全国临床检验操作规程》进行菌株分离,经微生物分析仪对菌株再次确认。

2017-06-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81172737)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院感染病科,合肥 230022

²安徽省细菌耐药监测中心,合肥 230022

作者简介: 卞婷婷,女,硕士研究生;

李家斌,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lijiaabin948@vip.sohu.com

1.3 药敏试验 以 PAE ATCC27853 为质控菌株,按照 2015 年美国国家临床实验标准委员会(CLSI)推荐的琼脂对倍稀释法测定细菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

1.4 抗菌药物联合药敏试验 分别选择多粘菌素 E + 利福平、多粘菌素 E + 亚胺培南、多粘菌素 E + 头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦 + 阿米卡星、头孢他啶 + 环丙沙星 5 组药物配伍,采用微量棋盘法,根据单药测定的 MIC 值,选取 2 倍 MIC 为最高浓度,依次对倍稀释共 8 个稀释度,分别选取所需两种药物以 1:1 的比例各 1 ml 加入 96 孔平板的横轴和纵轴混匀,再用移液器量取高温消毒冷却至 50 °C 的 MHA 琼脂 8 ml 加入混匀。各取 140 μ l 菌液依次加入多点接种仪的加样孔中并记录名称,将菌液接种到含有不同药物浓度梯度的琼脂培养基中,之后放置于电热恒温箱中 37 °C 培养 16 ~ 18 h,根据 2015 年 CLSI 的判定标准读取 MIC 结果。

1.5 部分抑菌(fractional inhibitory concentration, FIC)指数的计算 FIC 指数 = MIC 甲药联合/MIC 甲药单用 + MIC 乙药联合/MIC 乙药单用。FIC 指数 ≤ 0.5 为协同作用; $0.5 < \text{FIC 指数} \leq 1$ 为相加作用; $1 < \text{FIC 指数} \leq 4$ 为无关作用; FIC 指数 > 4 系拮抗作用。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本分布 剔除同一患者的重复株,安徽省细菌耐药监测中心 2013 ~ 2015 年共收集临床分离 PAE 829 株,分别为 309 株、232 株、288 株,占临床总分离革兰阴性菌比例为 12.0%、14.4%、12.1%。

2.2 感染部位分布 主要来自于痰液、脓液及分泌物、尿液、血液等多种标本,具体分布见表 1。

表 1 2013 ~ 2015 年 829 株 PAE 临床分离标本来源[n(%)]

标本来源	2013 年	2014 年	2015 年
痰	111(35.9)	163(70.3)	114(39.6)
尿液	51(16.5)	13(5.6)	58(20.1)
血液	32(10.4)	4(1.7)	34(11.8)
脓液及分泌物	53(17.2)	26(11.2)	47(16.3)
其他	62(20.1)	26(11.2)	35(12.2)
合计	309(100.0)	232(100.0)	288(100.0)

2.3 科室分布 PAE 主要来自于 ICU、神经外科、呼吸内科、老年科、肿瘤科等临床科室,其在各病区的分布见表 2。

表 2 2013 ~ 2015 年 PAE 在临床各科室的构成比[n(%)]

病区	2013 年	2014 年	2015 年
	株数(n=309)	株数(n=232)	株数(n=288)
ICU	91(29.4)	71(30.6)	80(27.8)
普外科	13(4.2)	4(1.7)	11(3.8)
呼吸内科	19(6.1)	15(6.5)	31(10.8)
神经外科	24(7.8)	18(7.8)	49(17.0)
骨科	8(2.6)	11(4.8)	16(5.6)
老年科	5(1.6)	12(5.2)	26(9.0)
肿瘤科	23(7.4)	15(6.5)	17(5.9)
神经内科	10(3.2)	5(2.2)	16(5.6)
胸外科	5(1.6)	6(2.6)	8(2.8)
儿科	3(1.0)	6(2.6)	5(1.7)
感染科	6(1.9)	2(0.9)	3(1.0)
急诊科	8(2.6)	7(3.0)	6(2.1)
烧伤科	8(2.6)	3(1.3)	6(2.1)
泌尿外科	11(3.6)	4(1.7)	4(1.4)
其他	75(24.2)	53(22.8)	10(3.5)

2.4 对药物耐药性的变化 PAE 对阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟以及头孢他啶最为敏感且三年内耐药率较为稳定,三年平均耐药率分别为 13.5%、15.7%、19.2%、25.4%;对头孢唑肟耐药率显著升高($P < 0.05$),对环丙沙星耐药率有所下降($P < 0.05$),对于亚胺培南及美罗培南的耐药率基本持平,见表 3。

2.5 抗菌药物联合药敏试验 2013 ~ 2015 年安徽地区临床分离共 54 株泛耐药铜绿假单胞菌(pan-drug resistant Pseudomonas Aeruginosa, PDRPA),多粘菌素 E + 利福平、多粘菌素 E + 亚胺培南、多粘菌素 E + 头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦 + 阿米卡星、头孢他啶 + 环丙沙星 5 组抗菌药物对于 PDRPA 的 FIC 指数如下。各组药物联合均主要表现为协同及相加作用,未见提示拮抗作用;其中,多粘菌素 E + 亚胺培南组合的协同作用最佳, FIC 指数为 53.7%。见表 4。

3 讨论

随着抗生素的广泛应用,PAE 的耐药情况逐年加重,并出现多重耐药性,为临床治疗制造了障碍^[2]。多药耐药性是导致治疗 PAE 感染效果不理想的重要原因。根据安徽省 3 年来耐药监测数据,PAE 临床分离率较为稳定,分别占有革兰阴性菌比例为 12.0%、14.4%、12.1%。菌株主要来自痰液、脓液及分泌物、尿液、血液等多种标本;ICU、神经外科、呼吸内科、老年科、肿瘤科等临床科室总分离率较高,其原因可能为这类科室患者住院时间长、抵抗力较差,部分患者使用气管插管、呼吸机辅助呼

表3 2013~2015年829株PAE对11种抗菌药物的敏感性和耐药性(%)

抗菌药物	2013年			2014年			2015年			χ^2 值	P 值
	耐药率 (%)	中介率 (%)	敏感率 (%)	耐药率 (%)	中介率 (%)	敏感率 (%)	耐药率 (%)	中介率 (%)	敏感率 (%)		
哌拉西林他唑巴坦	15.2	13.3	71.5	15.9	18.2	65.9	15.9	19.9	64.3	0.239	0.887
头孢他定	24.6	5.5	69.9	26.4	5.9	67.7	25.1	4.9	70.0	0.080	0.961
头孢吡肟	17.2	11.0	71.8	19.8	15.0	65.2	20.7	9.5	69.7	0.614	0.736
头孢唑肟	43.2	37.0	19.8	43.9	1.4	54.8	41.8	36.3	21.9	14.422	0.001
氨曲南	36.0	9.8	52.2	33.9	14.2	51.8	25.9	18.7	55.3	3.011	0.222
亚胺培南	25.9	13.6	60.5	15.8	5.4	78.7	23.1	15.0	62.0	5.317	0.070
美罗培南	17.8	8.7	73.5	13.6	6.8	79.5	15.0	13.3	71.8	0.884	0.643
庆大霉素	23.0	2.2	74.8	30.8	5.0	64.3	15.9	11.5	72.6	5.266	0.072
阿米卡星	11.7	1.9	86.4	16.9	1.8	81.3	11.8	0.9	87.3	1.045	0.593
环丙沙星	22.0	8.1	69.9	36.4	2.3	61.4	21.9	4.3	73.8	8.074	0.018
左氧氟沙星	27.4	8.5	64.1	33.5	4.1	62.4	20.7	13.5	65.7	4.125	0.127

表4 多种抗菌药物联合使用 FIC 指数的构成比[n(%) n=54]

FIC 指数	多粘菌素 + 利福平菌株数	多粘菌素 + 亚胺培南 西司他丁菌株数	多粘菌素 + 头孢他啶菌株数	哌拉西林他唑巴坦 + 阿米卡星菌株数	头孢他啶 + 环丙沙星菌株数
≤0.5	19(35.2)	29(53.7)	21(38.9)	6(11.1)	15(27.8)
0.5~1	35(64.8)	25(46.3)	33(61.1)	47(87.0)	37(68.5)
1~4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(1.9)	2(3.7)
>4	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
合计	54(100.0)	54(100.0)	54(100.0)	54(100.0)	54(100.0)

吸等侵入性操作也加大了病原菌感染机会。全球性细菌耐药监测 SENTR 数据提示 PAE 是引起医院获得性肺炎和呼吸机相关肺炎的主要病原菌。其原因可能系患者呼吸道纤毛运动减弱、分泌功能减弱、分泌物增加、机体免疫力降低所致^[3]。药敏结果提示对 PAE 最敏感的药物为阿米卡星,但其存在耳肾毒性,临床通常不单独使用;哌拉西林他唑巴坦、头孢他啶以及头孢吡肟敏感率高且耐药率相对较稳定;对环丙沙星耐药率有所下降;对于美罗培南及亚胺培南耐药率无明显升高;对头孢唑肟总体耐药率较高,在临床应用时应尽量避免。根据 PAE 下呼吸道感染诊治专家共识观点,对于耐药 PAE 患者应选择使用联合用药^[4]。研究^[5-7]也表明,选择适当的抗菌药物组合体外联合用药对耐药 PAE 可起到良好的杀菌或抑菌效果。多粘菌素是一种多肽类杀菌剂,具有很强的抗内毒素作用,国外有报道^[8]指出,多粘菌素破坏细菌外膜磷脂,并可以同时抑制肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 等炎症因子的释放,导致细胞通透性升高进而死亡。在耐药形势严峻的当今,是很好的抗菌药物选择之一。但由于其具有肝肾及神经毒性,临床上多用其与其他抗菌药物联合使用,一方面提高抗菌疗效,另一方面可以改善药物的毒性。研究^[9]表明,除了对于 PAE 治疗的经典药物,还可以联合多粘菌素与利福平等非传统抗生素治

疗。在本研究中,多粘菌素 E 与利福平、亚胺培南及头孢他啶分别联合使用均取得了可观的抗菌效应,考虑可能系多粘菌素作用于细菌外膜磷脂,破坏胞膜结构,从而促进其他抗菌药物穿透细胞膜进入胞质内以发挥抗菌作用^[10]。然而国外目前已有报道对多粘菌素耐药的菌株^[11],在今后仍需在此方面多进行相关研究来进一步了解其机制。另外,体内外存在多种差异,是否在临床上能达到同样的疗效,有无不良反应,仍需进一步动物试验及用药观察。

参考文献

[1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2012年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志 2013, 13(5): 321-30.

[2] Stove C K, Pham X Q, Erwin A L, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 an opportunistic pathogen[J]. Nature 2000, 406(6799): 959-64.

[3] 张祎博,孙景勇,倪语星,等. 2005~2014年 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志 2016, 16(2): 141-5.

[4] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志 2014, 37(1): 9-15.

[5] 丁力,赵智,时东彦,等. 联合用药对临床分离的铜绿假单胞菌的体外抗菌活性影响[J]. 中华医院药学杂志 2011, 31(19): 1638-40.

[6] 杨启文,王辉,徐英春,等. 环丙沙星或阿米卡星联合 β -内酰胺

- 胺类抗生素对多重耐药铜绿假单胞菌的体外联合抑菌效应研究[J]. 中国实用内科杂志 2006 26(9): 685-7.
- [7] 杨德青,倪文涛,王睿等. 体外联合用药对耐碳青霉烯铜绿假单胞菌的抗菌活性研究[J]. 中国临床药理学杂志 2016 32(24): 2269-72.
- [8] Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, et al. Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation[J]. *J Surg Res* 2001 100(1): 127-34.
- [9] Timurkaynak F, Can F, Azap O K, et al. *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multi-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units[J]. *Int J Antimicrob Agents* 2006 27(3): 224-8.
- [10] Yoon J, Urban C, Terzian C, et al. *In vitro* double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 48(3): 753-7.
- [11] Gill M M, Rao J U, Kaleem F, et al. *In vitro* efficacy of colistin against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* by minimum inhibitory concentration [J]. *Pak J Pharm Sci* 2013 26(1): 7-10.

Analysis of antibiotics resistance among *Pseudomonas aeruginosa* in Anhui Province and *in vitro* antimicrobial combinations for pan-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Bian Tingting¹, Liu Yanyan², Ye Ying^{1,2}, et al

(¹Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Antimicrobial Resistance Surveillance Center, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the distribution and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Anhui Province and collect all the pan-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (PDRPA) using the microtiter plate checkerboard assay as a test *in vitro* bacteriostasis experiment, which providing reference for the choice of clinical medicine. **Methods** Minimal inhibitory concentration of *Pseudomonas aeruginosa* strains were tested by using agar dilution method. The resistance rate, the medium rate and the sensitivity rate of the antimicrobial agents were calculated according to the guidelines of the American Clinical Laboratory Committee guidelines. Picking out PDRPA, using the method of board joint drug susceptibility test *in vitro* bacteriostasis experiment, provide reference for the choice of clinical medicine. **Results** The resistances of PAE to amikacin, piperacillin/tazobactam, cefepime and ceftazidime were sensitive and stable; the resistances to ceftizoxime were significantly increased ($P < 0.05$); the resistance to ciprofloxacin was decreased to some point ($P < 0.05$); the resistances to imipenem and meropenem were stable. Polymyxin E + rifampicin, polymyxin E + imipenem, polymyxin E + cephalosporins, piperacillin/tazobactam + amikacin, cephalosporins + ciprofloxacin, 5 groups of antimicrobial agents for PDR *Pseudomonas aeruginosa* major synergy together. **Conclusion** *Pseudomonas aeruginosa* infection is still a certain proportion of clinical infection. Thus it is necessary to strengthen the surveillance of prevalence of PAE drug resistance so as to provide a reference for clinical therapy. The polymyxin E and other anti-infective drug combination can be used as the generic drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* infection treatment.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*; drug resistance; bacterial resistance surveillance; combination