

## · 论 著 ·

## 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的产酶及联合药敏试验

叶 明, 杨喜民, 王 刚, 雷光文

**[摘要]** 目的 研究耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(CR-PA)的产酶现状和抗菌药物的体外联合抗菌活性, 为治疗 CR-PA 感染提供合理用药的实验依据。方法 常规培养分离细菌, 应用 VITEK-II 全自动细菌分析仪鉴定细菌。常规药敏试验采用 K-B 纸片法, MIC 测定采用琼脂平板倍比稀释法, 按 CLSI 规定标准进行。结果 从感染的标本中分离出 190 株铜绿假单胞菌, CR-PA 占 9.5%, 均来自呼吸道标本。其中有 10 株同时产金属  $\beta$ -内酰胺酶(MBLs)、AmpC 酶, 4 株仅产 MBLs。头孢吡肟、头孢派酮/舒巴坦、亚胺培南与阿米卡星的协同率分别为 33.3%、61.1%、27.8%。结论 CR-PA 主要来源于呼吸道标本, 其产酶率高, 耐药性严重。建议临床对 CR-PA 引起的感染应使用含酶抑制剂复合药物(如哌拉西林/他唑巴坦、头孢派酮/舒巴坦)联合阿米卡星来治疗。

**[关键词]** 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌; 抗生素; 金属  $\beta$ -内酰胺酶; AmpC 酶; 最低抑菌浓度; 联合用药

**[中图分类号]** R978.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)02-0135-03

### The analysis of zymogenic state against Carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using a susceptibility test

YE Ming, YANG Xi-min, WANG Gang, LEI Guang-wen. The Third Hospital of People's Liberation Army, Baoji, Shanxi 721004, China

**[Abstract]** **Objective** To analyze the zymogenic state and antimicrobial agent combination activity in vitro test of Carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CR-PA), in order to provide laboratory data for clinical treatment. **Methods** All strains were isolated and identified by routine procedure and VITEK-Compact 2 automatic bacterial identification system. Routine antimicrobial susceptibility tests were performed with K-B method and MICs were detected with agar dilution method according to CLSI. **Results** There were 190 strains *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical infectious specimen. CR-PA was 9.47% in all of that came from respiratory tract specimen. There were 10 strains produced Metallo- $\beta$ -lactamases and AmpC, 4 strains produced Metallo- $\beta$ -lactamases. The synergy rate of Cefpirome, Cefoperazone/Sulbactam, Imipenem plus Amikacin were 33.3%, 61.1%, and 27.8% respectively. **Conclusion** CR-PA mostly came from respiratory tract specimen. The zymogenic rates and drug resistance of CR-PA were high, mostly due to multiplex drug-resistance mechanism. Clinical treatment should first select enzyme-inhibitory drugs (Piperacillin/Tazobactam or Cefoperazone/sulbactam) combined with Amikacin against CR-PA.

**[Key words]** CR-PA; antimicrobial agent; metallo- $\beta$ -lactamases; AmpC; minimum inhibiting concentration(MIC); combining-using drug

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PA)是临床上最常见的条件致病菌及主要的医源性病原菌之一。碳青霉烯类抗菌药物是治疗该菌感染的重要武器, 对其耐药严重影响了临床抗感染的治疗。为了协助临床对感染该菌的患者进行有效治疗, 我们从感染标本中分离铜绿假单胞菌, 再筛选出耐碳青霉烯类的菌株, 进行了产酶检测和抗菌药物体外联

合抗菌活性分析, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 2009 年 6 月至 2010 年 5 月从临床感染标本中分离出的 190 株铜绿假单胞菌, 避免重复收集同一患者的菌株。

**1.2 抗菌药物** 亚胺培南(IMP, 杭州默沙东制药有限公司, 批号: W1102); 美罗培南(MEM, 日本住友制药株式会社, 批号: 1011c); 头孢吡肟(FEP, 上海施贵宝制药公司, 批号: 0512793); 左氧氟沙星(LVX, 山西威奇达制药公司, 批号: 20040501); 阿米卡星

作者简介: 叶 明(1978-), 女, 河北衡水人, 本科, 主管技师, 主要从事临床微生物学研究

作者单位: 721004 陕西宝鸡, 解放军第三医院检验科

(AMK, 苏州第六制药厂, 批号: 051110); 头孢他啶 (CAZ, 葛兰素威康公司, 批号: C088178); 头孢哌酮/舒巴坦 (SUP, 大连辉瑞制药公司, 批号: 4583911); 药敏纸片均购自温州康泰公司。

**1.3 试剂和设备** M-H 琼脂购于温州康泰公司, VITEK-Compact 2 全自动微生物鉴定仪购于法国生物梅里埃公司。

**1.4 质控菌株** 大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和产 AmpC 酶阴沟肠杆菌, 均购自卫生部临床检验中心。

**1.5 菌株鉴定和药敏试验** 细菌鉴定使用法国生物梅里埃公司 VITEK- Compact 2 全自动微生物鉴定仪和 GN 卡。采用 K-B 纸片法筛选出耐亚胺培南和(或)美罗培南的铜绿假单胞菌 (CR-PA)<sup>[1]</sup>, 抗菌药物 MIC 测定用平板倍比稀释法, 按 2009 年 CLSI 规定标准进行<sup>[2]</sup>。

**1.6 细菌酶学检测方法** 金属 β-内酰胺酶 (MBLs) 检测用抑制剂增效试验和双纸片协同试验<sup>[3]</sup>。两组纸片 CAZ (30 μg/片) 含 2-巯基丙酸 (3 μl/片) 与 CAZ, IMP (10 μg/片) 含 0.5 mol/L 的 EDTA (乙二胺四乙酸) 10 μl 与 IMP, 任意一组抑菌圈直径扩大 (4 mm 以上) 即为阳性。AmpC 酶的检测: 改良三维试验法<sup>[4]</sup>, 首先将标准菌株 ATCC 25922 按常规药敏纸片 K-B 法操作, 均匀涂布于 M-H 平板上, 然后在 M-H 平板中心贴一片头孢西丁 (30 μg/片) 纸片, 在距纸片边缘 1 cm 处, 用无菌手术刀片切 3 cm 长度的小槽, 将待测菌株的 3~5 个菌落接种于槽内 (勿溢出槽外), 35℃ 孵育 18~24 h, 若抑菌圈向内凹陷即 AmpC 酶阳性。三联纸片试验, 按文献<sup>[5]</sup>进行, 首先将标准菌株 ATCC 25922 按常规药敏纸片 K-B 法操作均匀涂布于 M-H 平板上, 然后在 M-H 平板中心贴一片头孢西丁 (30 μg/片) 纸片, 在纸片边缘贴有待测菌的纸片 (纸片预先用 20 μl pH 8.0 1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA 沾湿), 在纸片的另一侧贴产 AmpC 酶菌的纸片 (纸片预先用 20 μl pH 8.0 1 mol/L Tris-0.1 mol/L EDTA 沾

湿)。35℃ 温育 18~24 h, 如待检菌出现扁平或凹陷的抑菌环为阳性。

**1.7 药物相互作用效应** 药物相互作用效应通过计算最小部分抑菌浓度 (fractional inhibitory concentration, FIC) 指数来判断。FIC 为联合用药时各药的 MIC 值分别除以单药时 MIC 值的商的和, 即:  $FIC = (A \text{ 药联合 MIC} / A \text{ 药单用 MIC}) + (B \text{ 药联合 MIC} / B \text{ 药单用 MIC})$ 。相互作用解释为:  $FIC \leq 1$  为协同作用,  $1 < FIC \leq 2$  为无关作用,  $FIC > 2$  为拮抗作用。

**1.8 统计学处理** 采用 WHONET 5.0 和 SPSS 12.0 软件进行数据统计分析。

2 结果

**2.1 纸片筛选结果** 190 株铜绿假单胞菌中筛选出 18 株 CR-PA (9.5%), 常用抗菌药物对 18 株菌的体外抗菌活性见表 1。

表 1 常用抗菌药物对 18 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的体外抗菌活性

抗菌药物	MIC (μg/ml)	MIC <sub>50</sub> (μg/ml)	MIC <sub>90</sub> (μg/ml)	抑菌率 (%)
FEP	8~128	128	128	5.6(1/18)
SUP	2~128	128	128	22.2(4/18)
LVX	1~32	8	16	11.1(2/18)
AMK	16~64	64	64	11.1(2/18)
CAZ	4~128	128	128	5.6(1/18)

**2.2 产酶检测结果** 18 株菌中有 10 株同时产 MBLs、AmpC 酶, 4 株仅产 MBLs。

**2.3 联合抗菌效应** 抗菌药物对 18 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的体外联合抗菌效应结果见表 2。

3 讨论

本研究分离的 18 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌均来源于呼吸道标本, 说明呼吸道是该菌感染的重要场所。因此, 临床应加强对呼吸机使用的监控以及对呼吸道感染患者的护理和预防控制, 防止院内耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌暴发流行。

表 2 抗菌药物对 18 株耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的体外联合抗菌效应

抗生素组合	MIC (μg/ml)	MIC <sub>50</sub> (μg/ml)	MIC <sub>90</sub> (μg/ml)	FIC	FIC ≤ 1 [株(%)]	1 < FIC ≤ 2 [株(%)]	FIC > 2 [株(%)]
FEP + AMK	FEP 4~128	64	128	0.38~2.50	6(33.3)	8(44.4)	4(22.2)
	AMK 2~64	32	64				
SUP + AMK	SUP 1~128	32	128	0.14~1.85	11(61.1)	7(38.9)	0(0.0)
	AMK 0.25~64	1	32				
IMP + AMK	IMP 0.5~128	32	128	0.45~4.02	5(27.8)	5(27.8)	8(44.4)
	AMK 8~64	64	64				

18 株菌对常用抗菌药物均高度耐药,其中对 SUP 敏感的只有 4 株,可能是因为其他菌株在产 MBLs 的同时还产 AmpC 酶,还可能与携带多种  $\beta$  内酰胺酶基因有关<sup>[6]</sup>。CR-PA 对 LVX、AMK 呈高耐药性,可能是因为主动泵出机制也参与了细菌耐药的形成<sup>[7]</sup>;对 AMK 耐药严重还可能与氨基糖苷类修饰酶的存在有关<sup>[8]</sup>。只有 1 株对 FEP 和 CAZ 敏感,可能与我院临床长期大量使用头孢类抗生素有关。MBLs 能够水解包括碳青霉烯类抗生素在内的所有  $\beta$ -内酰胺类药物<sup>[9]</sup>。本研究中,18 株菌有 14 株产 MBLs,其中 4 株仅产 MBLs。提示产 MBLs 可能是铜绿假单胞菌对碳青霉烯类耐药的机制之一。因此,临床应综合考虑感染菌的耐药表型和药敏结果,合理选择抗菌药物。对 MBLs 阳性的感染菌,即使亚胺培南体外药敏结果敏感,临床也应慎用。

耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的治疗现已成为临床亟待解决的难题,对碳青霉烯类耐药将意味着同时对多种抗菌药物耐药。本研究显示,头孢哌酮/舒巴坦联合阿米卡星的协同率最高(61.1%),没有发现交叉耐药;而亚胺培南与阿米卡星联合却以拮抗作用为主(44.4%)。由此得出结论,临床对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌引起的感染应使用含酶抑制剂复合药物(如哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦)联合阿米卡星来治疗。

## 【参考文献】

- [1] 赵苏瑛,吴倩,李克涓,等.耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌金属酶的筛选及分型研究[J].中国感染与化疗杂志,2009,9(1):48-51.
- [2] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement [S]. CLSI, 2009 (M100-S19):44-45.
- [3] 沈定霞,罗燕平,崔岩,等.分离产金属  $\beta$ -内酰胺酶的铜绿假单胞菌[J].中华医院感染学杂志,2004,14(4):86-88.
- [4] 褚海青,任胜祥,李惠萍.下呼吸道标本铜绿假单胞菌感染产 AmpC 酶和 ESBLs 酶的研究[J].中国感染与化疗杂志,2006,6(1):22-26.
- [5] 田磊,李莉,张蓓,等.阴沟肠杆菌 AmpC 酶与 ESBLs 酶的研究[J].中华医院感染学杂志,2009,19(15):1941-1943.
- [6] 黄文密,杨丽蓉,糜祖煌,等.亚胺培南耐药铜绿假单胞菌消毒剂及  $\beta$  内酰胺类抗生素耐药相关基因研究[J].东南国防医药,2005,7(3):172-175.
- [7] 刘忆霜,肖春玲.细菌多重耐药外排泵抑制剂研究进展[J].中国抗生素杂志,2007,32(4):211-215.
- [8] 陈建中,黄文密,仵蕾,等.4 种非发酵糖苷阴性杆菌氨基糖苷类修饰酶基因研究[J].东南国防医药,2007,9(3):161-164.
- [9] 徐俊芳,吴菊芳.多重耐药铜绿假单胞菌感染[J].中国感染与化疗杂志,2007,7(20):141-144.

(收稿日期:2010-10-26;修回日期:2011-01-02)

(本文编辑:潘雪飞;英文编辑:王建东)

(上接第 134 页)

发现提取时间是最小影响因素,其次是提取次数,对提取条件影响较大的因素为提取溶媒水的体积分数,考虑到生产效率和成本,最终确定提取工艺为  $A_3B_3C_2$ ,即 10 倍量水煎煮提取 2 次,每次 1 h。

## 【参考文献】

- [1] 杨武亮,陈海芳,余金宝,等.枳壳活性化学成分研究[J].中药材,2008,31(12):1812-1815.
- [2] Zhou DY, Xu Q, Xue XY, et al. characterization of polymethoxylated flavones in Fructus aurantii by off-line two-dimensional liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009,49(2):207-213.
- [3] Si PY, He Q, Song Y, et al. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-dinglycosides from genus Citrus in negative electrospray ionization by iontrap mass spectrometry [J]. Anal

Chim Acta, 2007, 598(1):110-118.

- [4] Zhou DY, Xu Q, Xue XY, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of flavanone aglycones in Fructus aurantii by HPLC ion-trap MS[J]. J Sep Sci, 2007,598(1):858-867.
- [5] Fang TZ, Wang YG, Ma Y, et al. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006,40(2):454-459.
- [6] 马超一,高温远,高颖,等.枳壳化学成分和代谢成分的 UP-LC-PAD-Q-TOF/MA 分析[J].药物评价研究,2010,33(2):110-115.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[S].北京:化学工业出版社,2005:171-172.
- [8] 陈艳,许茜,许景峰,等.正交设计优化姜香脐贴中木香醇提工艺[J].东南国防医药,2010,12(1):39-40.

(收稿日期:2010-09-29;修回日期:2010-12-04)

(本文编辑:潘雪飞;英文编辑:王建东)