

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2013.02.004

· 论 著 ·

肺部感染铜绿假单胞菌耐药性与抗菌药物治疗效果研究

毕嘉琦, 周俊立, 陈小凤, 彭 洋, 姚振江

(广东药学院, 广东 广州 510300)

[摘要] **目的** 分析广州地区肺部感染患者分离的铜绿假单胞菌(PA)耐药性及整合子携带情况,探讨其抗菌药物治疗效果及影响因素。**方法** 回顾性调查 2008 年 9 月—2010 年 12 月广州市 3 所三级甲等医院呼吸内科确诊为 PA 肺部感染患者的病历资料。收集上述患者标本分离的 PA 菌株,检测其对常用抗菌药物的敏感性;采用聚合酶链反应(PCR)法扩增菌株整合子片段,分析整合子的类型;分析影响 PA 肺部感染患者预后的可能危险因素。**结果** 共收集 PA 114 株,检出多重耐药菌 47 株(41.23%);71 株(62.28%)PA 检出 I 类整合子。患者预后:21 例(18.42%)治愈,63 例(55.26%)好转,30 例(26.32%)死亡。除庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、哌拉西林及哌拉西林/他唑巴坦外, I 类整合子阳性菌株对常用抗菌药物的耐药率明显高于 I 类整合子阴性菌株(均 $P < 0.05$)。影响 PA 肺部感染患者预后的危险因素包括整合子阳性、多重耐药菌株、不适当的经验性治疗、联合使用 3 类或以上抗菌药物、混合感染、碳青霉烯类抗生素的使用,而联合使用 2 类抗菌药物是患者预后的保护因素。**结论** 肺部感染患者分离的 PA 多重耐药率及 I 类整合子携带率较高,整合子与耐药性关系密切,应加强监测。尽量避免使用碳青霉烯类抗生素进行经验性治疗;可联合使用 2 类抗菌药物进行抗感染治疗。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 肺部感染; 抗药性; 微生物; 整合子; 抗菌药物

[中图分类号] R378.99⁺1 R563.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)02-0092-05

Drug resistance and antimicrobial therapeutic efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* in pulmonary infection

BI Jia-qi, ZHOU Jun-li, CHEN Xiao-feng, PENG Yang, YAO Zhen-jiang (Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510300, China)

[Abstract] **Objective** To analyze drug resistance and distribution of integron in *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) isolated from patients with pulmonary infection, and evaluate antimicrobial therapeutic efficacy and influencing factors. **Methods** Clinical data of 114 patients with *P. aeruginosa* pulmonary infection in a hospital between September 2008 and December 2010 were reviewed retrospectively. *P. aeruginosa* isolated from above patients were performed antimicrobial susceptibility testing; the segments of integron were amplified by polymerase chain reaction; risk factors influencing the prognosis of *P. aeruginosa* pulmonary infection were analyzed. **Results** A total of 114 *P. aeruginosa* isolates were collected, 47(41.23%) were multidrug-resistant strains; 71 (62.28%) were detected class I integron. Patients' prognosis were as follows: 21 (18.42%) were cured, 63(55.26%) were improved, and 30(26.32%) died. Except gentamycin, amikacin, tobramycin, piperacillin and piperacillin/tazobactam, drug resistance rate of class I integron positive strains was obviously higher than class I integron negative strains ($P < 0.05$). Factors influencing the prognosis of *P. aeruginosa* pulmonary infection included positive class I integron, multidrug-resistant strain, inappropriate empirical therapy, combination use of three or more types of antimicrobial agents, mixed infection and use of carbapenems, but combination use of two types of antimicrobial agents

[收稿日期] 2012-07-12

[基金项目] 广东省科技厅计划项目(2008B030301034)

广东药学院科学基金(2006GW002)

广东省教育厅大学生创新实验项目(1057310002)

[作者简介] 毕嘉琦(1986-),女(汉族),广东省广州市人,研究生,主要从事分子流行病学研究。

[通讯作者] 姚振江 E-mail: zhjyao2001@yahoo.com

was the protective factor for prognosis. **Conclusion** Multidrug resistance rate and positive rate of class I integron of *P. aeruginosa* are relatively high in pulmonary infection patients, integron is closely related to drug resistance, it is necessary to strengthen surveillance. Be sure to avoid using carbapenem for empirical treatment; combination of two types of antimicrobial agents for anti-infection treatment is recommended.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; pulmonary infection; drug resistance, microbial; integron; antimicrobial agent

[Chin Infect Control, 2013, 12(2): 92-96]

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是医院内最常见的病原菌,占临床分离革兰阴性菌的 16.4%,仅次于大肠埃希菌^[1]。PA 感染部位以呼吸道为主,中国 CHINET 细菌耐药性监测中,PA 在呼吸道标本中分离率最高,且其耐药率逐年增加^[2]。同时,出现了不少泛耐药株。患者一旦肺部感染 PA,常致病程延长,甚至死亡。本研究对 2008—2010 年广州地区分离自肺部感染患者的 PA 进行耐药性分析,并检测其整合子携带率,探讨整合子携带与抗菌药物耐药情况,分析患者预后与整合子携带率、多重耐药率、抗菌药物使用的关系,为预防控制及治疗 PA 肺部感染提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 病例来源:回顾性调查 2008 年 9 月—2010 年 12 月广州市 3 所三级甲等医院呼吸内科确诊为 PA 肺部感染的患者 114 例。菌株分离自上述患者呼吸道标本,经法国生物梅里埃公司 ATB 全自动细菌鉴定仪鉴定为 PA,质控菌株为 PA ATCC 27853。

1.2 药敏试验 采用 K-B 纸片法,检测 PA 对 6 类 13 种抗菌药物的药敏结果,质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和 PA ATCC 27853。

1.3 细菌 DNA 提取 采用煮沸法^[3],在过夜培养的细菌培养基上取单个菌落,加 400 μ L TE 缓冲液,涡旋,95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液作 DNA 模板, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 整合子检测 采用简并引物^[4],上游引物为:5'-TGCGGGTYAARGATBTKGATTT-3',下游引物为 5'-CARCACATGCGTRTARAT-3',扩增片段长度为 491 bp。采用 25 μ L 反应体系:PCR mix 12 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,上下游引物各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L,超纯水 9.5 μ L 补足。循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸

8 min。电泳取 PCR 产物 5 μ L 上样,采用 100 bp DNA Marker 作为分子量参照物,100 V 电压电泳 60 min,用含 20 g/L EB 的琼脂糖染色 30 min,于凝胶成像系统观察结果。采用限制性片段多态性方法,对出现 491 bp 条带的 PCR 扩增产物进行分类。采用限制性内切酶 Hinf I 酶切,步骤为:取 10 \times H buffer 2 μ L,10 U/L Hinf I 1 μ L,PCR 产物 8 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h 后,用 10 \times Loading buffer 2 μ L,65 $^{\circ}$ C 20 min 终止反应,琼脂糖凝胶电泳分析结果。结果判断:I 类整合酶,仅出现 491 bp 大小的片段;II 类整合酶,酶切后出现 2 条片段,分别为 300 bp 和 191 bp;III 类整合酶,酶切后出现 2 条片段,分别为 372 bp 和 119 bp。

1.5 诊断标准及相关定义

1.5.1 诊断标准 按照我国卫生部颁布的 2001 版《医院感染诊断标准(试行)》^[5]对医院肺部感染病例进行诊断。

1.5.2 多重耐药菌(multidrug-resistance, MDR)

按照卫生部办公厅发布的《多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南》中多重耐药菌定义:对使用的 3 类或 3 类以上抗菌药物同时呈现耐药的细菌。预后分为好转、治愈和死亡^[6]。延迟性治疗:采集标本确诊为 PA 感染前 24 h 内未使用过任何一种抗菌药物;经验性治疗:标本培养确定为 PA 感染前 24 h 至少使用过 1 种抗菌药物;适当的经验性治疗:在未得到药敏试验结果前,使用过的抗菌药物与药敏试验结果符合;不适当的经验性治疗:在未得到药敏试验结果前,使用过的抗菌药物与药敏试验结果不符合^[7]。各类抗菌药物使用史包括 PA 常用的 6 大类药物: β -内酰胺酶抑制剂、碳青霉烯类、氨基糖苷类、头孢菌素类、大环内酯类、喹诺酮类。

1.6 主要仪器与试剂 药敏试纸均购自英国 Oxoid 公司;PCR Mix(100 mmol/L KCl,20 mmol/L Tris-Cl,3 mmol/L MgCl₂,400 mmol/L dNTP 混合物、溴酚蓝等)购自广州东盛生物科技有限公司;引物由上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成;琼

脂糖购自西班牙 Genetech 公司;营养琼脂及 M-H 琼脂购自广东环凯微生物科技技术有限公司;限制性内切酶 Hinf I 为 TaKaRa 公司产品;PCR 仪、凝胶成像仪和电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司;恒温水箱购自上海精宏实验设备有限公司;VITEK32 全自动微生物鉴定及药敏系统购自法国 Biomerieux 公司;低温高速离心机和生物二级安全柜购自赛默飞世尔科技有限公司;生化培养箱购自海精宏实验设备有限公司;-20℃冰箱购自青岛海尔股份有限公司。

1.7 调查内容 回顾性查阅病历,调查患者年龄、

性别、混合感染、抗菌药物使用情况、经验性和延迟性治疗及预后情况。同一患者呼吸道分泌物标本多次分离出 PA 者,只对第 1 次感染的情况进行登记分析。

1.8 统计分析 应用 Epidata 3.1 软件录入数据,SPSS 17.0 软件进行统计学分析。耐药率与整合子关系分析采用 χ^2 检验,PA 肺部感染患者预后的危险因素使用有序 Logistic 回归分析,赋值变量见表 1。所有检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 影响 PA 肺部感染患者预后可能的危险因素与赋值

Table 1 Risk factors and assignment of *P. aeruginosa* pulmonary infection

Risk factor	Independent variable	Assignment
Age(year)	X ₁	Numeric variables
Gender	X ₂	Male = 1, Female = 0
Integron	X ₃	Positive = 1, negative = 0
Multidrug resistance	X ₄	MDR strain = 1, Non - MDR strain = 0
Prior antimicrobial therapy	X ₅	Yes = 1, No = 0
Types of used antimicrobial agent	X ₆	One type = 1, two type = 2, three and above type = 3
Duration of antimicrobial use(d)	X ₇	1~7 = 1, 8~14 = 2, 15~21 = 3, 22~28 = 4, >28 = 5
Length of hospital stay(d)	X ₈	Numeric variables
Mixed infections	X ₉	Yes = 1, No = 0
Inappropriate empirical therapy	X ₁₀	Yes = 1, No = 0
Delayed treatment	X ₁₁	Yes = 1, No = 0
Multidrug resistance strain	X ₁₂	Resistance = 1, sensitive = 0
Prior carbapenem therapy	X ₁₃	Resistance = 1, sensitive = 0
Prognosis	Y	Death = 0, improve = 1, cure = 2

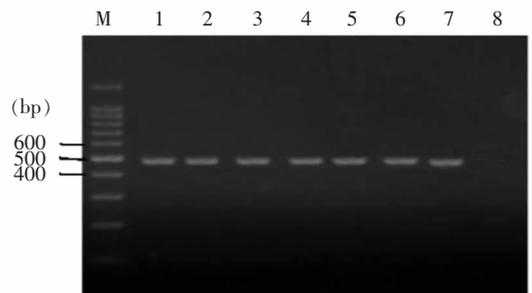
2 结果

2.1 患者基本情况 114 例 PA 肺部感染患者,男性 77 例(67.54%),女性 37 例(32.45%);年龄 16~95 岁,中位数 74.5 岁(P25~P75:64~80 岁)。分离出 PA 菌株 114 株,检出 47 株多重耐药菌,多重耐药菌检出率为 41.23%。多重耐药菌感染者中,男性 27 例,女性 20 例;年龄 32~95 岁,中位数 76 岁。抗菌药物使用天数为 2~90 d,平均使用时间为 14.85 d。住院天数 4~126 d,平均住院天数 31 d。

2.2 预后 21 例(18.42%)患者治愈,63 例(55.26%)好转,30 例(26.32%)死亡。114 例患者,延迟性治疗 15 例,其中死亡 6 例;不适当经验性治疗 40 例,其中死亡 16 例。不适当经验性治疗患者,使用居前 3 位的抗菌药物分别是喹诺酮类(20/40)、氨基糖苷类(17/40)、碳青霉烯类(15/40)。混合感染患者 58 例,死亡 23 例。

2.3 整合子检出情况 检出 I 类整合子 71 株

(62.28%),未检出 II、III 类整合子。I 类整合子电泳图见图 1。



M:DNA marker ladder;1—6: integron I positive strains;7: positive control;8: negative control

图 1 I 类整合子电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of class I integron

2.4 药敏试验结果 114 株 PA 对常用抗菌药物的耐药情况见表 2。除庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、哌拉西林及哌拉西林/他唑巴坦外,I 类整合子

阳性的菌株对常用抗菌药物的耐药率明显高于 I 类整合子阴性的菌株(均 $P < 0.05$)。

2.5 影响预后的危险因素 影响 PA 肺部感染患者预后的因素分析见表 3。

表 2 114 株 PA 对常用抗菌药物的耐药情况(耐药株数,%)

Table 2 Drug resistance of 114 *P. aeruginosa* strains (No. of drug-resistance isolates,%)

Antimicrobial agents	Integron I ⁻ positive strain(n = 71)	Integron I ⁻ negative strain(n = 43)	χ^2	P
Gentamycin	20(28, 17)	7(16, 28)	2.09	0.17
Amikacin	15(21, 13)	6(13, 95)	0.91	0.45
Tobramycin	20(28, 17)	5(11, 63)	4.28	0.06
Piperacillin	25(35, 21)	8(18, 60)	3.59	0.08
Ticarcillin	38(53, 52)	8(18, 60)	13.56	0.00
Imipenem	24(33, 80)	5(11, 63)	6.94	0.00
Meropenem	19(26, 76)	4(9, 30)	6.01	0.01
Levofloxacin	30(42, 25)	6(13, 95)	9.93	0.00
Ciprofloxacin	31(43, 66)	8(18, 60)	7.47	0.00
Aztreonam	31(43, 66)	7(16, 28)	25.40	0.00
Ceftazidime	32(45, 07)	6(13, 95)	11.67	0.00
Cefepime	26(36, 62)	7(16, 28)	5.38	0.03
Piperacillin/Tazobactam	18(25, 35)	6(13, 95)	2.09	0.16

表 3 影响 PA 肺部感染患者预后的因素分析

Table 3 Factors influencing the prognosis of *P. aeruginosa* pulmonary infection

Risk factor(reference group)	Prognosis*	b	S _b	wald χ^2	P	OR	OR 95% CI
Integron (positive)	Y = 0	1.99	0.48	16.67	0.00	7.36	2.82 - 19.19
	Y = 1	0.84	0.42	3.91	0.04	2.32	1.00 - 5.36
Multidrug resistance(multidrug resistance strain)	Y = 0	1.42	0.48	8.77	0.00	4.14	1.61 - 10.61
	Y = 1	0.89	0.44	4.02	0.04	2.45	1.02 - 5.90
Inappropriate empirical therapy(yes)	Y = 0	1.41	0.61	5.36	0.02	4.12	1.10 - 4.73
	Y = 1	1.13	0.61	5.36	0.04	3.11	1.75 - 8.50
Use 2 types of antimicrobial agents (use 1 type of antimicrobial agent)	Y = 0	-2.23	1.04	4.53	0.03	0.10	0.01 - 0.83
	Y = 1	-0.21	0.75	0.08	0.77	0.80	0.18 - 3.55
Use 3 and above types of antimicrobial agents (use 2 types of antimicrobial agents)	Y = 0	3.12	1.00	9.57	0.00	4.66	3.14 - 6.62
	Y = 1	0.74	0.73	1.04	0.31	2.09	0.49 - 8.84
Mixed infections(yes)	Y = 0	1.59	0.68	5.48	0.01	4.92	1.29 - 8.73
	Y = 1	0.08	0.58	0.02	0.04	1.87	1.34 - 3.39
Prior use of carbapenem(yes)	Y = 0	1.49	0.53	9.55	0.00	4.44	1.61 - 12.24
	Y = 1	0.47	0.51	3.77	0.32	1.61	0.62 - 4.16
Threshold	Y = 0	-1.89	0.43	19.21	0.00		
	Y = 1	1.32	0.41	10.45	0.00		

* Reference group was cured group

3 讨论

本组 114 例 PA 肺部感染患者均来自呼吸内科,其中 21 例治愈,63 例好转,30 例死亡,病死率达 26.32%,较吴雷等^[8]报道的广州地区 2006—2009 年 PA 所致肺炎病死率(15.4%)高;多重耐药率达 41.23%,较李鸿雁等^[9]报道的呼吸道分离的多重耐药 PA 耐药率(23.5%)高。本组药敏结果显示,耐药率最高的是头孢类与喹诺酮类,耐药率较低的是阿米卡星,建议临床选用后者,以取得更好的疗效。

整合子是细菌获得外源性耐药基因,造成细菌

间传播的重要机制^[6]。整合子的检出与多种抗菌药物耐药存在联系,以碳青霉烯类、青霉素、头孢类最明显。应加强医院病原菌整合子携带率的检测,分析其与抗菌药物耐药的联系,以指导临床用药。

有序 Logistic 回归分析表明,菌株携带整合子、菌株的多重耐药性会增加患者死亡风险,联合 2 类抗菌药物是保护因素(OR = 0.10, 95% CI: 0.01 ~ 0.83)。联合治疗能减少耐药菌株的产生,提高治疗成功机会。使用 3 类或 3 类以上抗菌药物组患者死亡的危险度是使用 2 类抗菌药物组的 4.66 倍,提示盲目地增加使用抗菌药物的种类,会导致不良反应

发生率和多重耐药率的增高。因此,一般联合 2 类抗菌药物使用即可,不建议使用 3 类或 3 类以上抗菌药物联合治疗。

使用碳青霉烯类抗生素是死亡组的危险因素($OR = 4.44, 95\% CI: 1.61 \sim 12.24$),说明患者使用碳青霉烯类抗生素治疗,会影响预后。这可能与使用碳青霉烯类抗生素会诱导 PA 发展为耐药菌,甚至是泛耐药菌有关。PA 对碳青霉烯类抗生素耐药的机制有多种^[10],碳青霉烯类抗生素会诱导 PA 产生一个或多个耐药机制。研究^[11]表明,在碳青霉烯类抗生素的选择性压力下,菌株外排泵的表达水平被上调。而在 PA 耐药机制中,外排作用的底物甚广,从而导致 PA 产生多重耐药^[12]。因此,医院在使用碳青霉烯类抗生素时应谨慎;在经验性治疗中,尽量避免使用。

综上所述,医院应加强监测 PA 的耐药性及整合子携带情况,以便医生及时修改用药方案。对于 PA 肺部感染患者,医生在经验性治疗时,应尽量避免使用碳青霉烯类抗生素;及时进行药敏试验,必要时使用 2 类抗菌药物联合治疗。此外,医院需加强医院感染管理,以便有效地降低 PA 肺部感染的发生率。

[参考文献]

[1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(5):321-329.

- [2] 张伟博,倪语星,孙景勇,等. 2009 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(6):436-440.
- [3] Yousefi S, Nahaei M, Farajnia S, *et al.* Class I integron and imipenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence and antibiotic susceptibility[J]. Iran J Microbiol, 2010,2(3):115-121.
- [4] Japoni A, Gudarzi M, Farshad M, *et al.* Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* strains by PCR-RFLP in Southern Iran[J]. Jpn J Infect, 2008, 61(1):85-88.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志, 2001,81(5):314-320.
- [6] 杨平. 美罗培南治疗小儿铜绿假单胞菌肺炎临床观察[J]. 医药论坛杂志, 2005,26(17):25-28.
- [7] Hirsch E B, Tam V H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes[J]. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res, 2010, 10(4):441-451.
- [8] 吴雷,蔡绍曦,耿穗娜,等. 南方医院于 2006—2009 年医院感染铜绿假单胞菌肺炎预后因素分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2010,26(3):163-166.
- [9] 李鸿雁,夏前明,李福祥,等. 下呼吸道铜绿假单胞菌的多耐药现状及临床策略[J]. 临床医药实践, 2010,19(1):7-8.
- [10] 王秋婷. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物的耐药机制研究[D]. 山西医科大学, 2010.
- [11] 王贺. 主动外排系统在不动杆菌对碳青霉烯类耐药中的作用研究[D]. 中国协和医科大学, 2007.
- [12] Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, *et al.* Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Exp Med, 2002, 196(1):109-118.

《中国当代儿科杂志》征订征稿启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊。同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与动态。辟有国外儿科研究、论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊,每月 15 日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价 12 元,全年 144 元。邮发代号:国内 42-188;国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免收审稿费。审稿周期 4~6 周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。

为更好地与读者、作者进行沟通互动,我刊于 2012 年 2 月入驻国内著名医学媒体丁香园博客,网址:<http://i.dxy.cn/cjcp>。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-84327402 传真:0731-84327922 Email:ddek7402@163.com 网址:<http://www.cjcp.org>