

## 耐碳青霉烯酶铜绿假单胞菌的耐药性分析及碳青霉烯酶初筛试验的应用

闫津津, 杨会林, 车华涛, 陈娟, 陈霖 (北京大学深圳医院检验科, 广东深圳, 518000)

**摘要:** **目的** 了解耐碳青霉烯酶铜绿假单胞菌(CRPA)的临床分布、对抗菌药物的耐药性及携带的碳青霉烯酶基因型。**方法** 回顾性分析北京大学深圳医院住院患者临床样本分离的61株CRPA的科室分布、标本来源及耐药情况。随机挑取36株CRPA,采用乙二胺四乙酸(EDTA)双纸片增效法和免疫层析法进行碳青霉烯酶初筛试验。**结果** 61株CRPA主要分布ICU 24株(39.34%)、呼吸内科9株(14.75%),脑外科7株(11.48%)。其标本来源以痰液为主,共49株(80.33%)。药敏试验结果显示,亚胺培南和美罗培南的耐药率分别达100.00%和78.69%,而氨基糖苷类药物阿米卡星耐药率最低,为8.20%。61株CRPA碳青霉烯酶初筛试验检测出金属 $\beta$ -内酰胺酶型阳性菌株3株(1株既产丝氨酸酶又产金属酶),丝氨酸酶型阴性菌株29株;CRPA耐药基因测序结果显示,有3株CRPA携带金属 $\beta$ -内酰胺酶blaIMP-45基因,32株CRPA携带丝氨酸酶OXA-50基因,未检出KPC、GES丝氨酸酶型及NDM、VIM金属酶型基因。**结论** CRPA主要分布于ICU,以痰液标本为主,其菌株多携带丝氨酸酶OXA-50基因;应针对不同科室加强医院防控措施,临床则应根据药敏试验选择抗菌药物预防CRPA传播。

**关键词:** 耐碳青霉烯酶铜绿假单胞菌;金属 $\beta$ -内酰胺酶;丝氨酸酶;细菌耐药性;临床分布

中图分类号: R 917

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2023)02-0212-04

## Analysis on drug resistance of carbapenemase-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and clinical application of primary screening test for carbapenemase

YAN Jin-jin, YANG Hui-lin, CHE Hua-tao, CHEN Juan, CHEN Lin (Laboratory Department, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518000, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the clinical distribution, drug resistance and carbapenemase genotypes of carbapenemase-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA). **Methods** The department distribution, specimen source, and drug resistance of 61 strains of CRPA isolated from clinical samples of inpatients at Peking University Shenzhen Hospital were retrospectively analyzed. Thirty-six CRPA strains were randomly selected for carbapenemase detection with EDTA double disk synergy method and immunochromatography. **Results** Of the 61 CRPA strains, there were 24 strains (39.34%) distributed in the ICU, 9 strains (14.75%) in the respiratory department, and 7 strains (11.48%) in the department of brain surgery. Sputum was the main source of the specimens, covering a total of 49 strains (80.33%). The drug susceptibility test results showed that the resistance rates of imipenem and meropenem were 100.00% and 78.69%, respectively, and that of the aminoglycoside drug amikacin was the lowest (8.20%). The carbapenemase screening test for the 61 CRPA strains identified 3 metallo- $\beta$ -lactamase-positive strains (1 of which produced both serinase and metalloenzyme), and 29 serinase-negative strains; CRPA drug resistance gene sequencing results showed that 3 CRPA strains carried metallo- $\beta$ -lactamase blaIMP-45 gene and 32 CRPA strains carried serine OXA-50 gene, KPC, and no GES serine enzyme type, NDM, VIM metalloenzyme type genes were identified. **Conclusion** CRPA is mainly distributed in ICU, and in sputum specimens, and its strains mostly carry  $\beta$ -lactamase OXA-50 drug resistance genes. Hospital prevention and control measures should be strengthened for different departments, and antimicrobial drugs should be selected according to drug susceptibility test for clinical treatment to prevent the spread of CRPA.

**Key words:** carbapenemase-resistant pseudomonas aeruginosa; metallo- $\beta$ -lactamase; serinase; bacterial resistance; clinical distribution

收稿日期: 2022-11-14

作者简介: 闫津津(1980-),女,硕士研究生,副主任技师, E-mail: yj202207@163.com

铜绿假单胞菌(PA)又称绿脓杆菌,为革兰性阴性菌,广泛分布于自然界,适宜在潮湿环境、空调、医院、水池等环境繁殖,易发生医院感染流行<sup>[1]</sup>。在人体免疫力低下或菌群失调时更易感染PA<sup>[2]</sup>。近年来,抗菌药物耐药问题愈发严重,PA的临床耐药菌株检出率直线上升,甚至出现多药耐药PA。而碳青霉烯类抗菌药物作为临床治疗多重耐药菌感染也不例外,其耐药性药物包括亚胺培南和美罗培南等<sup>[3-5]</sup>。PA的耐药机制主要包括碳青霉烯酶的产生、外膜孔蛋白的丢失等<sup>[6]</sup>。耐碳青霉烯酶铜绿假单胞菌(CRPA)的日益增多使临床感染防控工作更加棘手<sup>[7]</sup>。研究CRPA的耐药机制对防控耐药菌株的传播具有重要意义。本研究分析了CRPA的临床分布、对抗菌药物的耐药性、携带的碳青霉烯酶基因型,以为临床用药提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本来源

收集2020年1月至2021年3月北京大学深圳医院住院患者临床样本分离的61株CRPA,菌株于-80℃保存。

### 1.2 仪器与试剂

Vitek2-Compact全自动细菌鉴定和药敏系统(法国梅里埃),Vitek MS质谱仪(法国梅里埃),CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国Thermo-311),药敏纸片(英国OXIOD),哥伦比亚血平板、MH平板(广州迪景),碳青霉烯酶缓冲液(珠海迪尔生物),碳青霉烯酶检测试剂盒(长沙中生众捷生物)。

### 1.3 质控菌株

铜绿假单胞菌ATCC27853与大肠埃希菌ATCC25922为AST药敏试验质控菌株,来自广东省临床检验中心。产KPC肺炎克雷伯菌和产NDM肺炎克雷伯菌为碳青霉烯酶试验质控菌,来自卫生部临床中心提供。

### 1.4 方法

1.4.1 CRPA菌株鉴定和药敏试验 采用Vitek-MS质谱仪和Vitek2-Compact全自动细菌鉴定和药敏系统,严格按照《全国临床检验操作规程》操作进行细菌分离培养鉴定和药敏试验。药敏试验结果根据美国临床和实验室标准协会2020版CLSIM10030th标准判断。

1.4.2 碳青霉烯酶初筛试验 (1) EDTA双纸片增效法:用无菌生理盐水调制麦氏浊度0.5的待测菌液,在MH琼脂平板上均匀涂布。用灭菌镊子放置4张已平衡至室温的亚胺培南药敏纸片,纸片间距>24 mm,

纸片距平板边缘>15 mm,在平板背面对应位置分别标记A、B、C、D。将试剂盒中缓冲液R1(乙二胺四乙酸二钠+氢氧化钠)、R2(3-氨基苯硼酸)平衡至室温,A纸片作为空白对照,B纸片上滴加10 μL缓冲液R1,C纸片上滴加10 μL缓冲液R2,D纸片上分别滴加10 μL缓冲液R1和R2。孵育18~24 h后取出平板,测量B、C纸片抑菌圈直径,分别与A纸片对比,直径比A纸片扩大≥5 mm,则分别表示该菌株产金属酶、产丝氨酸酶。(2)免疫层析法:样本和提取缓冲液在EP管中充分混匀后加到检测卡样本孔,样本中碳青霉烯酶与胶体金偶联的碳青霉烯酶单克隆抗体反应,在层析作用下沿着硝酸纤维素膜移动,与固定在检测卡检测线上的KPC、OXA-48、VIM、IMP和NDM型碳青霉烯酶单克隆抗体捕获,形成“抗体抗原-金标抗体复合物”,并在测试区相应检测线上出现1条或多条红线。

1.4.3 CRPA耐药基因测序 将收集的菌株送至深圳市第一人民医院进行碳青霉烯酶耐药基因(KPC、OXA-50、VIM、IMP和NDM)检测。

### 1.5 统计学处理

采用WHONET 5.6、Microsoft Excel 2020及统计学软件SPSS 26.0对实验数据进行统计分析,计数资料以菌株数及百分数表示。

## 2 结果

### 2.1 CRPA的科室分布

61株CRPA主要分布ICU科室24株、普通病房37株,其中检出率排行前3的是ICU 24株(39.34%)、呼吸内科9株(14.75%)、脑外科7株(11.48%),其余包括神经内科3株,肾内科、胸外科、运动医学科各2株,耳鼻喉病区、肝胆胰外科、急诊科、脊柱外科、泌尿外科、血液内科各1株,以及其他科室6株。

### 2.2 CRPA的标本来源

61株CRPA的标本来源以痰液为主,共49株(80.33%),尿液7株(11.48%),腹水2株(3.28%),伤口分泌物、血液、引流物各1株(1.64%)

### 2.3 CRPA耐药性分析

亚胺培南和美罗培南的耐药率较高,分别达100.00%和78.69%,其次为左氧氟沙星和替卡西林/克拉维酸,均为60.66%,而氨基糖苷类药物阿米卡星耐药率最低,为8.20%。其余抗菌药物耐药率见表1。

### 2.4 CRPA碳青霉烯酶初筛试验结果

61株CRPA碳青霉烯酶初筛试验检测出金属β-

内酰胺酶型阳性菌株 3 株(1 株既产丝氨酸酶又产金属酶),丝氨酸酶型阴性菌株 29 株;CPPA 耐药基因测序结果显示,有 3 株 CRPA 携带金属 $\beta$ -内酰胺酶 IMP-45 基因,32 株 CRPA 携带丝氨酸酶 OXA-50 基因,未检出 KPC、GES 丝氨酸酶型及 NDM、VIM 金属 $\beta$ -内酰胺酶型基因。见表 2、图 1。

表 1 61 株 CRPA 耐药性分析 例(%)

抗菌药物	耐药	中度敏感	敏感
头孢他啶	29 (47.54)	9 (14.75)	23 (37.70)
头孢吡肟	16 (26.23)	28 (45.90)	17 (27.87)
亚胺培南	61 (100.00)	0	0
美罗培南	48 (78.69)	13 (21.31)	0
阿米卡星	5 (8.20)	2 (3.28)	54 (88.52)
环丙沙星	31 (50.82)	13 (21.31)	27 (44.26)
左氧氟沙星	37 (60.66)	11 (18.03)	12 (19.67)
替卡西林/克拉维酸	37 (60.66)	13 (21.31)	2 (3.28)
哌拉西林/他唑巴坦	13 (21.31)	18 (29.51)	13 (21.31)
头孢哌酮/舒巴坦	32 (52.46)	15 (24.59)	14 (22.95)

表 2 61 株 CRPA 碳青霉烯酶初筛试验结果

内酰胺酶分类	基因型	阳性	阴性	EDTA 增效法	免疫层析法
丝氨酸酶	KPC	N	36		N
	GES	N	36	29	N
	OXA-50	32	4		N
金属 $\beta$ -内酰胺酶	NDM	N	36		N
	IMP-45	3	33	3	3
	VIM	N	36		N
多重机制	OXA-50/IMP-45	1	35	1	N

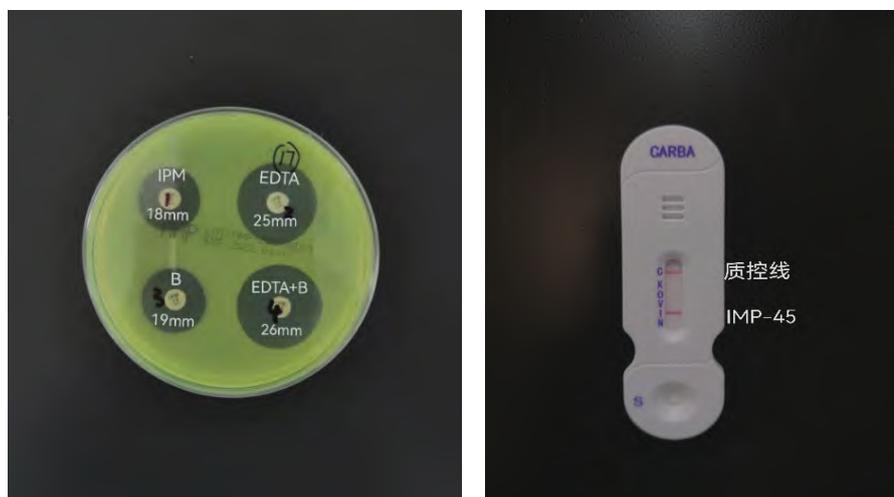
N 为未检出

### 3 讨论

PA 可导致机体各个部位的感染,肺泡灌洗液、痰

液、尿液等其他分泌物均可分离出该菌株<sup>[8-9]</sup>。本组资料显示,61 株 CRPA 主要分布 ICU 24 株(39.34%)、呼吸内科 9 株(14.75%)、脑外科 7 株(11.48%)。主要原因可能有:以上科室患者往往病情严重、病程较长,需频繁接受静脉置管、气管插管等有创伤性的侵袭性操作;同时部分患者长期使用广谱抗菌药物,导致自身菌群失调、PA 机会性感染<sup>[10-12]</sup>。ICU 科室危重患者多,CRPA 在该科室分布较多,临床应重视对 CRPA 的防控工作,预防临床感染的发生,有助于加快患者的治疗进度。有研究显示,机体呼吸系统易感染 PA,其易定植于人体呼吸道,因此该类菌株为患者呼吸道感染的主要病原菌<sup>[13]</sup>。本研究结果与之描述一致,CRPA 的标本来源以痰液为主,提示 CRPA 易感染的部位为呼吸系统。

2015 年一项 Meta 分析报道,PA 碳青霉烯耐药率为 8.7%~50.4%<sup>[14]</sup>。研究显示<sup>[15]</sup>,2018 年临床分离菌中 PA 排名第 3,分离率达 10%,PA 对亚胺培南的耐药率达 30.7%。CRPA 中,最常引起碳青霉烯类耐药的原因是 MexXY-OprM 外排泵表达增加或过表达,其次是菌株 OprD 基因减少或缺失,以及 MexAB-oprM 有没有表达增加或过表达<sup>[16]</sup>。本研究药敏试验显示,亚胺培南和美罗培南的耐药率较高,分别达 100.00% 和 78.69%;其次为左氧氟沙星和替卡西林/克拉维酸,均为 60.66%;而氨基糖苷类药物阿米卡星耐药率最低,为 8.20%。CRPA 对氨基糖苷类药物耐药率最低,可能是其在临床应用较少或与抗菌药物联合应用,延缓其耐药率的升高<sup>[17-18]</sup>。Abdallah 等<sup>[19]</sup>的研究也表明,在短期内控制碳青霉烯类药物的应用,PA 对碳青霉烯类药物耐药率有所下降。鉴于此,在 CRPA 感染治



IPM: 亚胺培南药敏纸片(对照); B: R2 (3-氨基苯硼酸)缓冲液; EDTA: R1 (乙二胺四乙酸二钠)缓冲液

图 1 CRPA 碳青霉烯酶初筛试验结果

疗中,应合理使用碳青霉烯类药物或进行联合用药,如 $\beta$ -内酰胺酶联合氨基糖苷类,或 $\beta$ -内酰胺酶联合喹诺酮类<sup>[20]</sup>。根据氨基酸序列的不同,碳青霉烯酶按内酰胺酶分类可分为A类丝氨酸酶、D类丝氨酸酶和B类金属 $\beta$ -内酰胺酶型。本研究检测出金属 $\beta$ -内酰胺酶型阳性菌株3株,未检出其他类别金属酶型基因,说明CPPA中金属酶的型别主要为IMP-45;且CPPA耐药基因主要携带丝氨酸酶OXA-50基因,但其是否属于固有耐药,还需更多的数据验证。

综上,CRPA主要分布于ICU,以痰液标本为主,其菌株多携带丝氨酸酶OXA-50基因;应针对不同科室加强医院防控措施。医院应重视对ICU患者的细菌鉴定,临床应根据药敏试验及患者的病情合理应用抗菌药物,从而完善医院感染防控措施,延缓CRPA耐药率的升高、控制CRPA传播。本研究不足之处:由于检测条件有限,仅检测部分常见抗菌药物的药敏结果和具有代表性的耐药基因,未检测多黏菌素等,药敏数据和耐药基因数据具有一定局限性,其临床价值受限,日后需对CRPA的耐药机制及其携带的基因型进行更深入的研究。

#### 参考文献:

- [1]张亚会,李文茹,廖康,等.铜绿假单胞菌对青霉素类抗生素异质性耐药研究[J].微生物学通报,2022,49(5):1786-1798.
- [2]王明贵, GUAN X, HE L, 等.广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制:中国专家共识[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(1):82-92.
- [3]YIN S P, CHEN P, YOU B, et al.Molecular typing and carbapenem resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese burn center from 2011 to 2016[J].Front Microbiol, 2018, 9: 1135.
- [4]DEL BARRIO-TOFIFO E, LOPEZ-CAUSAPEC, CABOT G, et al.Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain[J].Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(11): e01589-17.
- [5]全国细菌耐药监测网 2014-2019年临床分离非发酵革兰阴性杆菌耐药性变迁[J].中国感染控制杂志,2021,20(1):70-76.
- [6]秦柯君,曹献芹,陈派强,等.铜绿假单胞菌临床分布及耐药机制研究[J].中国病原生物学杂志,2021,16(2):224-227.
- [7]袁莉莉,丁百兴,沈震,等.碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌感染的临床研究[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(2):121-126.
- [8]刘沫然,肖钢,杨秀静,等.136株住院患者感染铜绿假单胞菌的耐药状况及机制研究[J].中国病原生物学杂志,2018,13(5):543-546.
- [9]OLIVER A, MULET X, LOPEZ-CAUSAPEC, et al.The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones[J].Drug Resist Updat, 2015, 21-22: 41-59.
- [10]宋晓超,金美娟,丁蔚.重症监护室与普通病房碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌医院感染分布与耐药性[J].中华医院感染学杂志,2021,31(22):3397-3401.
- [11]迟星云,朱晓莉,王虹,等.重症监护病房多重耐药菌检出及药物敏感性[J].中华医院感染学杂志,2019,29(24):3729-3733.
- [12]ASHKENAZI-HOFFNUNG L, ARI A, BILAVSKY E, et al.*Pseudomonas aeruginosa* identified as a key pathogen in hospitalised children with aspiration pneumonia and a high aspiration risk[J].Acta Paediatr, 2016, 105(12): e588-e592.
- [13]林群,冯洁仪,黄金华,等.应用环介导等温扩增技术对分离自呼吸系统感染铜绿假单胞菌的快速检测[J].实用医学杂志,2016,32(16):2677-2679.
- [14]LIU Q, LI X, LI W, et al.Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: A meta-analysis[J].Sci Rep, 2015, 5: 11715.
- [15]汪复.2018年CHINET中国细菌耐药监测结果[EB/OL].http://www.chinets.com/Data/GermYear,2019-04-01/2019-09-15.
- [16]刘婧娟,俞静,刘瑛.产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药基因及流行病学研究进展[J].中国感染与化疗杂志,2015,15(1):91-96.
- [17]LIN K Y, LAUDERDALE T L, WANG J T, et al.Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections[J].J Microbiol Immunol Infect, 2016, 49(1): 52-59.
- [18]袁瑾懿,林东昉.美国感染病学会对产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肠杆菌目细菌、碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌和难治性耐药铜绿假单胞菌的治疗指导原则[J].中国感染与化疗杂志,2021,21(5):633-638.
- [19]ABDALLAH M, BADAWI M, AMIRAH M F, et al.Impact of carbapenem restriction on the antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in the ICU[J].J Antimicrob Chemother, 2017, 72(11): 3187-3190.
- [20]袁莉莉,丁百兴,沈震,等.耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药性及分子流行病学研究[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(3):289-292.