[9] Ronchese F, Bovenzi M. Occupational risks and health disorders in transport drivers[J]. G Ital Med Lav Ergon, 2012, 34(3): 352 – 359.
[10] 贺丽,苏丹,张恩,等. 出租车司机功能性胃肠病患病情况调查[J]. 中国公共卫生,2010,26(11):1466 – 1467.
[11] 王静,夏颖,庄楠. 急诊科护士功能性消化不良和功能性肠病患病现况调查[J]. 中华现代护理杂志,2008,14(7):862 – 865.
[12] Lu W Z, Gwee K A, Ho K Y. Functional bowel disorders in rotating shift nurses may be related to sleep disturbances[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(6): 623 – 627.
[13] 赵佳钧,申杰,李宏宇,等. 三级甲等医院外科医护群体功能性肠病及功能性消化不良患病现况调查[J]. 西部医学,2011,23(3):577 – 578.

收稿日期:2012 – 01 – 15　　(刘铁编辑　韩仰欢校对)

· 调查报告与分析 ·

泛耐药铜绿假单胞菌外排泵表型分析*

蔡兴俊[1],吴华[2],黄奕江[1],莫濡冰[1]

关键词:铜绿假单胞菌;泛耐药;次抑菌浓度;外排泵
中图分类号:R 378.99^{+1}　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2013)08-1234-02　DOI:10.11847/zgggws2013-29-08-45

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PAE)是一种常见的医院内获得性感染的重要条件致病菌[1]。泛耐药铜绿假单胞菌(pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, PDPAE),是指对头孢菌素类、碳青霉烯类、青霉素类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类等 5 类以上抗菌药物全部耐药,但不包括多粘菌素及替加环素[2]。随着广谱抗生素的广泛应用,住院时间的延长,免疫缺陷宿主的增加,抗生素的不合理使用,多重耐药甚至泛耐药铜绿假单胞菌明显增多,给临床抗感染治疗带来极大困难。为了解体外构建的泛耐药菌株与临床分离株在外排泵机制方面的差异,本研究通过次抑菌浓度诱导法[3]建立泛耐药模型,并进一步检测及分析外排泵表型。现将结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*材料*　海南省人民医院细菌室在 2010 年 1 月—2011 年 6 月间住院患者的各类标本中分离的泛耐药铜绿假单胞菌 38 株及临床分离的敏感铜绿假单胞菌 12 株。所有菌株均为不重复菌株。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853,由海南省人民医院微生物室提供。

1.2　*主要仪器与试剂*　VITEK – 2 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司),药敏纸片(英国 Oxoid 公司产品)。对泛耐药铜绿假单胞菌再采用 K – B 法进行确证,参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)判断标准[4]。头孢他啶(葛兰素史克制药苏州有限公司),哌拉西林/他唑巴坦(辉瑞制药苏州有限公司),氨曲南(重庆莱美药业股份有限公司),环丙沙星(德国拜耳医药保健有限公司),亚胺培南/西司他丁(杭州默沙东制药有限公司),丁胺卡那(河南辅仁怀庆堂制药有限公司),外排泵抑制剂苯丙氨酸 – 精氨酸 – β – 萘酰胺(phenyl-arginine-β-naphthylamide, PAβN,美国 sigma 公司)。

1.3　*方法*

1.3.1　泛耐药模型构建　将 12 株临床分离的敏感铜绿假单胞菌在含 1/2 MIC 药物的营养肉汤中培养传代,每隔 3 d 转种 1 次,共 3 次,9 d 后转 MH 琼脂固体培养基培养,采用 K – B 法验证药敏情况,根据 NCCLS 判断标准确认对当前药物耐药后,转入下一个药物,如未达当前药物耐药标准时,继续在含 1/2 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)药物的营养肉汤中培养传代 3 d,直至对当前药物耐药后转入下一个药物。诱导药物顺序依次为头孢他啶→哌拉西林/他唑巴坦→氨曲南→环丙沙星→亚胺培南/西司他丁→丁胺卡那。

1.3.2　4 种外排泵(MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM)表型检测　制备 PAβN 浓度为 20 μg/mL 的琼脂平皿和不含药物的琼脂平皿,将体外诱导株及临床分离株分别制备成 10^8 CFU/mL 浓度菌液,用无菌棉签均匀涂布在平皿上,E – test 法检测铜绿假单胞菌在不同培养基上对羧苄青霉素、红霉素、诺氟沙星和庆大霉素的 MIC 值。4 种药物分别为 MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN、MexXY-OprM 的特异底物,根据加与不加外排泵抑制剂 MIC 值降低 3 个稀释度及以上判断为相应的外排泵表型阳性[5-6]。

* **基金项目**:海南省自然科学基金(808203)
作者单位:1. 海南省人民医院呼吸内科,海口 570311; 2. 海南省人民医院检验科
作者简介:蔡兴俊(1974 –),男,海南文昌人,副主任医师,硕士,主要从事感染性疾病及细菌耐药机制研究工作。

中国公共卫生 Chin

1.4　统计分析　单因素分析采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行 χ^2 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　泛耐药模型的构建结果　12 株临床分离的敏感铜绿假单胞菌经次抑菌浓度抗菌素逐步诱导，其中 10 株在 3 次诱导，9 d 后转为泛耐药菌株，2 株在亚胺培南/西司他丁组诱导 3 次，9 d 后抑菌环直径较诱导前减小，但未达到耐药 1 次诱导后，成功转为耐药菌株。

2.2　4 种外排泵表型检测　38 株临床分离耐药株中外排泵表型阳性株依次为：MexAB-OprM 阳性率为 60.53%（23/38），MexEF-OprN 阳性率为 28.95%（11/38），MexCD-OprJ 阳性率为 23.68%（9/38），MexXY-OprM 阳性率为 21.05%（8/38），总外排泵阳性率为 94.74%（36/38）。12 株体外诱导耐药株中，MexAB-OprM 表型阳性率为 66.67%（8/12），MexXY-OprM 表型阳性率为 58.33%（7/12），MexCD-OprJ 表型阳性率为 41.67%（5/12），MexEF-OprN 表型阳性率为 8.33%（1/12），总外排泵阳性率为 91.67%（11/12）。2 组菌株总外排泵阳性率均较高，差异无统计学意义（$\chi^2=0.152$，$P=0.696$）。12 株临床敏感株外排泵阳性率 25.0%（3/12），均为 MexAB-OprM，而诱导后耐药株总外排泵阳性率增加（91.67%，11/12），差异有统计学意义（$\chi^2=10.971$，$P=0.001$）；主要表型 MexAB-OprM 阳性率（66.67%，8/12）对比差异亦有统计学意义（$\chi^2=4.196$，$P=0.041$）。

3　讨　论

铜绿假单胞菌外排泵抑制剂主要分为广谱抑制剂和特异性抑制剂。广谱抑制剂有 PAβN、氰氯苯腙（CCCP）和利福平等，特异性抑制剂有吗啉类似物泵抑制剂等[7]。PAβN 本身缺乏抗菌活性，但是能够抑制细菌外排泵的表达，提高抗菌药物的疗效并且能够降低铜绿假单胞菌的侵袭性[8]，研究表明，PAβN 浓度为 20 μg/mL 时能显著提高 PAβN 对抗菌药物的敏感性[9]，其作用机制主要是与抗菌药物竞争泵内转运蛋白上的药物结合位点，使药物不受外排泵的影响，顺利到达作用位点发挥抗菌作用。本研究选用 PAβN 作为外排泵抑制剂，通过检测铜绿假单胞菌对 4 种外排泵作用底物的敏感性变化来筛选主动外排泵表型阳性菌。本研究通过次抑菌浓度诱导造成细菌对抗生素的长期暴露从而产生耐药，可成功构建泛耐药铜绿假单胞菌的体外耐药模型，提示临床用药时抗感染药物应足量使用，避免抗菌药物低浓度与细菌长期接触产生耐药而造成耐药菌产生，治疗失败。进一步的研究发现，临床分离泛耐药株与体外诱导耐药株中外排泵阳性率均较高，提示主动外排系统激活是铜绿假单胞菌耐药的主要常见机制，4 种常见的外排泵表型均在 2 组菌株中检测出来，以 MexAB-OprM 最多见，与国内其他地区相比，结果基本类似但检出率有差异[10]。另外，本研究尚发现临床敏感菌株经次抑菌浓度诱导耐药后外排泵表型阳性率明显增加，提示诱导耐药的机制主要为外排系统激活所致。这些结果也显示 MexAB-OprM 是铜绿假单胞菌最常见的外排泵表型，不同地区外排泵检出的构成及检出率的差异说明同一种细菌在不同地域由于菌株的异质性可能其耐药发生的分子机制稍有不同，导致临床上表现为耐药表型的不同。

参考文献

[1]　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)：1258－1260.

[2]　郑金鼎，徐艳，牟霞，等. 泛耐药铜绿假单胞菌的目标性监测与分析[J]. 中华医院感染学杂志，2012，22(7)：1475－1476.

[3]　魏树全，钟维农，郑业勤，等. 泛耐药铜绿假单胞菌体外耐药模型构建及耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志，2012，22(13)：2731－2735.

[4]　CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement[J]. CLSI M100－S19，2009，29(3)：39－40.

[5]　曹敬荣，沈殿霞，罗燕萍，等. 铜绿假单胞菌 MexAB－OprM 主动外排表型筛选和外排基因检测[J]. 中国抗生素杂志，2007，32(6)：371－375.

[6]　Linares JF，Lopez JA，Camafeita E，et al. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type Ⅲ secretion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol，2005，187(4)：1384－1391.

[7]　Yoshida K，Nakayama K，Yokomizo Y，et al. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 6：exploration of aromatic substituents[J]. Bioorg Med Chem Lett，2006，14(24)：8506－8518.

[8]　Hirakata Y，Kondo A，Hoshino K，et al. Efflux pump inhibitors reduce the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Int J Antimicrob Agents，2009，34(4)：343－346.

[9]　Hsu DI，Okamote MP，Murthy R，et al. Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*：risk factors for acquisition and impact on outcomes[J]. J Antimicrob Chemether，2005，55(4)：535－541.

[10]　蔡兴东，胡成平，李玮，等. 湖南省铜绿假单胞菌四种外排泵在多重耐药菌株中表达的分布及作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2010，30(2)：130－134.

收稿日期：2013－02－28　（韩仰欢编校）