

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20244776

· 细菌耐药监测研究专题 ·

江苏省 2016—2021 年临床分离铜绿假单胞菌耐药及基因组特征分析

聂俊伟^{1,2}, 周璐³, 瞿志鹏¹, 洪捷³, 鲍倡俊³, 谈忠鸣³

(1. 南京诺唯赞生物科技股份有限公司生命科学事业部, 江苏 南京 210038; 2. 东南大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210096; 3. 国家卫生健康委员会肠道病原微生物重点实验室江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的** 了解江苏地区临床分离的铜绿假单胞菌耐药情况及基因特征。**方法** 收集 2016—2021 年江苏地区各哨点医院临床分离的铜绿假单胞菌, 采用肉汤稀释法对分离株进行 10 类 19 种抗菌药物的敏感性测定, 对分离株行全基因组测序并多位点序列分型, 综合抗菌药物耐药性数据库 (CARD) 扫描分析耐药基因。**结果** 2016—2021 年通过致病菌识别网 12 个市的哨点医院收集患者分离的铜绿假单胞菌 101 株。药敏试验结果显示, 全部菌株对共计 6 类 8 种抗菌药物全部耐药, 包括酰胺醇类抗生素氯霉素、磺胺类的复方磺胺甲噁唑、头孢菌素类的头孢噻肟和头孢唑林、四环素类的四环素、青霉素类的氨苄西林及氨苄西林/舒巴坦以及 β -内酰胺类的阿莫西林/克拉维酸; 45.54% 的分离株为碳青霉烯类耐药菌株, 对亚胺培南、美罗培南两种碳青霉烯类抗生素的耐药率已分别达 45.54%、39.60%; 耐 10 种以上抗生素的菌株达 63.36%; 共发现 35 种耐药表型, 其中 1 株菌对 19 种抗菌药物广泛耐药, 耐药谱为 AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-TE-SXT 的菌株最多 (31.69%, 32 株)。多位点序列分析发现 75 个 ST 型, 聚类发现 ST 262 处于中心点, 并遗传进化出 11 个亚型或分支。全基因组扫描发现 6 类 18 种抗菌药物耐药基因, *crpP* 基因的携带情况与表型完全一致。**结论** 2016—2021 年江苏地区临床分离的铜绿假单胞菌耐药情况严重, 两种碳青霉烯类抗生素的耐药率、耐 10 种以上抗生素的菌株比例高于国内其他省份, 应引起高度重视。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 耐药性; 全基因组测序; 耐药基因; 多位点序列分型

[中图分类号] R181.3⁺2 R378

Antimicrobial resistance and genome characteristics of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*, Jiangsu Province, 2016—2021

NIE Jun-wei^{1,2}, ZHOU Lu³, QU Zhi-peng¹, HONG Jie³, BAO Chang-jun³, TAN Zhong-ming³ (1. Department of Life Sciences, Nanjing Vazyme Biotech Co., Ltd., Nanjing 210038, China; 2. School of Life Science and Technology, Southeast University, Nanjing 210096, China; 3. National Health Commission Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology, Jiangsu Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective** To understand the antimicrobial resistance and genetic characteristics of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* in Jiangsu area. **Methods** *Pseudomonas aeruginosa* isolated from sentinel hospitals in Jiangsu area from 2016 to 2021 were collected, susceptibility of bacterial isolates to 19 kinds of 10 categories of antimicrobial agents were detected with broth dilution method. Bacterial strains were performed whole genome sequencing and multilocus sequence typing, antimicrobial resistance genes were scanned and analyzed through comprehensive antimicrobial resistance database. **Results** From 2016 to 2021, 101 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients at sentinel hospitals in 12 cities were collected through the Pathogenic Bacteria Identification Network. Antimicrobial susceptibility testing results showed that all strains were resistant to 8 kinds antimicrobial agents in 6

[收稿日期] 2023-07-26

[基金项目] 国家重点研发计划项目 (2022YFC2406500); 江苏省卫生健康委科研重点项目 (ZD2021037)

[作者简介] 聂俊伟 (1980-), 男 (汉族), 河南省驻马店市人, 助理研究员, 主要从事病原生物学研究。周璐为共同第一作者。

[通信作者] 谈忠鸣 E-mail: jstzm@jscdc.cn

categories, including chloramphenicol of amphenicols, compound sulfamethoxazole of sulfonamides, cefotaxime and cefazolin of cephalosporins, tetracycline of tetracyclines, ampicillin and ampicillin/sulbactam of penicillins, as well as amoxicillin/clavulanic acid of β -lactams, 45.54% of the isolates were carbapenem-resistant strains. Resistance rates of two carbapenems imipenem and meropenem were 45.54% and 39.60%, respectively, 63.36% of the strains were resistant to more than 10 kinds of antimicrobial agents. A total of 35 kinds of antimicrobial-resistant phenotypes were found, among which one strain was extensively resistant to 19 antimicrobial agents. The most drug-resistant strain was AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-TE-SXT (31.69%, $n=32$). Multilocus sequence typing analysis revealed 75 ST types, and clustering analysis revealed that ST 262 was at the center point, with 11 subtypes or branches genetically evolved. Whole genome scanning revealed 18 kinds of 6 categories antimicrobial resistance genes, the carrying status and phenotype of the *crpP* gene were completely consistent. **Conclusion** From 2016 to 2021, the clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* in Jiangsu area showed severe antimicrobial resistance, the resistance rates to two carbapenems and the proportion of strains resistant to more than 10 kinds of antimicrobial agents are higher than other provinces in China and should be paid highly attention.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; antimicrobial resistance; whole genome sequencing; antimicrobial resistance gene; multilocus sequence typing

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种常见的机会致病性革兰阴性杆菌^[1],广泛分布在自然界的水、空气和土壤中,对外界环境具有非常强的适应能力,可在人、动物和环境循环传播,不仅影响养殖业的发展,而且可定植在人类的皮肤表面、消化道和呼吸道等部位^[2],是医院常见的感染病原体,尤其是烧伤、免疫受损患者和严重创伤患者感染的重要致病菌。

碳青霉烯类抗生素(carbapenem)、多黏菌素类抗生素(polymyxin)及替加环素(tigecycline)是临床最常用的治疗严重耐药细菌引起感染的三类抗生素^[3],可显著缩短病程,降低疾病负担,减少死亡,是抗感染治疗的“最后一道防线”。然而近年来随着碳青霉烯类药物在临床的使用量增加,其耐药性越来越严重^[4],世界卫生组织(World Health Organization, WHO)已将临床上发现的多重耐药(multi-drug-resistant)铜绿假单胞菌列为“极为关注”的“重点耐药病原体”^[5]。

细菌耐药性受自身以及环境等外界因素影响,极为复杂,传统药物敏感性分析方法费时费力,成本高,需要有经验的工作人员。细菌耐药基因的表达决定着细菌耐药表型,而近几年飞速发展的全基因组测序技术不但能够分析已知耐药机制^[6-8],还可以通过计算机技术预测未知的潜在耐药机制,因此全基因组测序技术将会超越常规技术成为未来研究细菌耐药性的首选方法之一,并为监测和控制医院内菌株感染和传播提供重要的技术手段。为全面了解我省临床分离铜绿假单胞菌的耐药表型及基因分布特征,现对 2016—2021 年江苏省临床患者分离株进

行药物敏感性试验和二代基因测序分析,评估菌株的耐药特征、耐药基因携带情况,阐明耐药与耐药基因和基因型的相关性,为铜绿假单胞菌感染的预防控制、调查溯源和诊断治疗提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 菌株来源 依托国家致病菌识别网监测平台,在全省 13 个区市设立 26 家致病菌哨点医院,2016—2021 年收集分离自医院临床患者病原学标本(包括全血、痰、中段尿、胆汁、脓等)的铜绿假单胞菌菌株,剔除同一患者相同部位的重复菌株。铜绿假单胞菌的标准菌株 ATCC 27853 作为药物敏感性试验的质控菌株,购自中国药品生物制品检定所。

1.2 试剂与仪器 含 5% 脱纤维羊血琼脂平板购自广州市迪景微生物科技有限公司,细菌核酸提取试剂(FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,革兰阴性细菌鉴定卡(VITEC-2 GN Test kit)及全自动细菌生化鉴定仪(VETIC-2 System)为法国生物梅里埃公司生产,德国布鲁克公司生产的全自动细菌鉴定质谱仪(Microflex LT/SH smart MALDI TOF MS System),铜绿假单胞菌致病菌识别网定制药敏板(NMIC/ID-4),全自动微生物鉴定药敏分析系统(Phoenix M50)为美国 BD 公司生产,水套式恒温培养箱(美国热电公司),BSL-II 级生物安全柜(德国 Baker 公司),高速离心机(德国 Eppendorf 公司),-80℃ 冰箱(美国热电公司)。

1.3 铜绿假单胞菌鉴定 按照国家致病菌识别网

技术手册(2022 版)用无菌接种环,四区划线法将菌株接种在含 5%脱纤维羊血琼脂培养基上,37℃ 孵育 20~24 h。挑取可疑菌落纯化放大后经系统生化鉴定和微生物质谱鉴定为铜绿假单胞菌。

1.4 药敏试验 采用微量肉汤稀释法对本研究收集的铜绿假单胞菌进行抗菌药物最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)分析,10 类 19 种抗菌药物包括阿米卡星(AN)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、氨苄西林(AM)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、氨基糖苷类(ATM)、头孢唑林(CZ)、头孢吡肟(FEP)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、氯霉素(C)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(GM)、亚胺培南(IPM)、左氧氟沙星(LVX)、美罗培南(MEM)、哌拉西林(PIP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、四环素(TE)、复方磺胺甲噁唑(SXT)。根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) M100-S31 文件标准和中国疾病预防控制中心传染病预防控制所的《疾控系统药敏判读标准》判读结果,抗菌药物敏感性结果分为耐药(R)、中介(I)和敏感(S)三种。药敏试验质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.5 全基因组测序 核酸提取:1.5 mL 无菌 EP 管中加入 200 μ L 无菌水,接种环挑取适量新鲜菌苔加入。使用试剂盒提取纯化细菌全基因组 DNA,按说明书操作步骤进行。分光光度仪检测细菌 dsDNA 浓度,琼脂糖凝胶电泳(1%浓度的琼脂糖凝胶;150 V 电压电泳 40 min)检查核酸完整性,合格样品送北京诺禾致源科技股份有限公司进行建库(≤ 800 bp 常规文库)和细菌全基因组重测序,测序平台为 illu-

mina novaseq x plus。

1.6 质控与组装 利用 CLC genomics workbench 软件(Qiagen)对测序数据进行质控,并用 Microbial Genomics Module 模块对 Clean data 数据进行多个 K-mer 参数拼接,得到最优的 contigs 组装结果,随后进行局部组装和优化,形成 scaffolds。

1.7 耐药基因预测 所有菌株组装文件导入 CLC 软件 Microbial Genomics Module 模块在 ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)和 CARD (<https://card.mcmaster.ca/>)数据库进行耐药基因扫描比对。

1.8 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)分析 MLST 的 7 个等位基因通过 NCBI 在线数据库进行 BLAST 比对,确定每株菌的基因型(sequence type, ST),并将 7 个基因数字作为字符型数据,运用 BioNumerics 8.0(applied maths, belgium)软件,非加权配伍组平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)进行相关 ST 型的聚类分析。

2 结果

2.1 菌株情况 本实验室通过致病菌识别网各哨点医院在 2016—2021 年收集医院患者分离的疑似铜绿假单胞菌菌株,纯化后经生化和 MALDI TOF MS 鉴定,共 101 株铜绿假单胞菌。其中 2019 年南通收集的菌株最多,2021 年较少。全省 13 个地级市,101 株菌来源于其中 12 个地级市。见图 1。

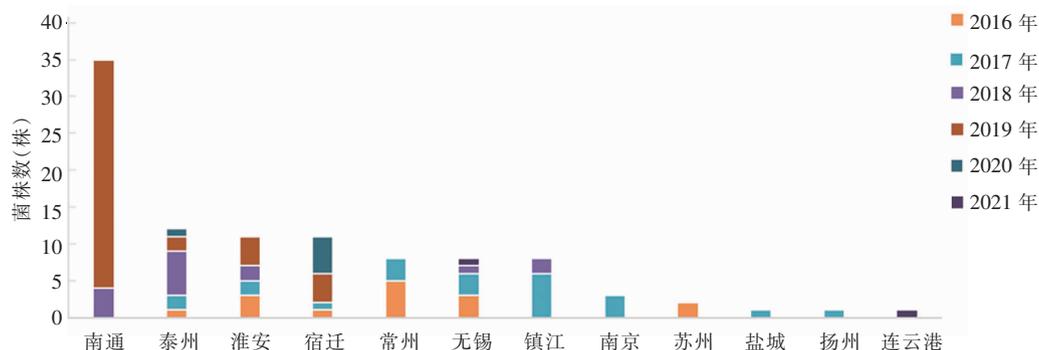


图 1 江苏省 2016—2021 年不同地区临床分离铜绿假单胞菌分布

Figure 1 Distribution of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* from different area, Jiangsu Province, 2016–2021

2.2 耐药性分析 铜绿假单胞菌存在固有耐药,本研究收集到的全部菌株对其中 6 类 8 种抗菌药物全

部耐药,包括酰胺醇类抗生素氯霉素、磺胺类的复方磺胺甲噁唑、头孢菌素类的头孢噻肟和头孢唑林、四

环素类的四环素、青霉素类的氨苄西林及氨苄西林/舒巴坦,以及β-内酰胺类的阿莫西林/克拉维酸。对另外 11 种抗菌药物均有不同程度的耐药,对铜绿假

单胞菌最敏感的 3 种抗菌药物分别为氨基糖苷类的阿米卡星(97.03%)、庆大霉素(88.12%),以及头孢菌素类的头孢他啶(74.26%)。见表 1。

表 1 江苏省临床分离的 101 株铜绿假单胞菌对 11 种抗菌药物的药敏结果

Table 1 Antimicrobial susceptibility testing results of 101 strains of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa* to 11 kinds of antimicrobial agents, Jiangsu Province

抗菌药物	耐药		中介		敏感		抗菌药物	耐药		中介		敏感	
	菌株数	率(%)	菌株数	率(%)	菌株数	率(%)		菌株数	率(%)	菌株数	率(%)	菌株数	率(%)
哌拉西林	18	17.82	9	8.91	74	73.27	亚胺培南	46	45.54	3	2.97	52	51.49
哌拉西林/他唑巴坦	18	17.82	11	10.89	72	71.29	美罗培南	40	39.60	7	6.93	54	53.47
头孢他啶	20	19.80	6	5.94	75	74.26	阿米卡星	3	2.97	0	0	98	97.03
头孢吡肟	26	25.74	24	23.76	51	50.50	庆大霉素	7	6.93	5	4.95	89	88.12
氨基南	38	37.62	11	10.89	52	51.49	左氧氟沙星	45	44.55	7	6.93	49	48.52
							环丙沙星	31	30.69	13	12.87	57	56.44

2.3 耐药谱分析 铜绿假单胞菌耐药模式多样,见表 2,共有 35 种耐药表型,其中 1 菌株对检测的 19 种抗菌药物均耐药,耐药谱为 8 种固有耐药抗菌药物的 AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-TE-SXT 菌株最多,占 31.69%(32 株)。耐药情况最严重的耐药药物谱分别为 19 种抗菌药物(AN-AMC-AM-SAM-ATM-

CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT)和 18 种抗菌药物(AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT、AN-AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT,各 1 株)。

表 2 江苏省 101 株临床分离铜绿假单胞菌耐药谱

Table 2 Antimicrobial resistance spectrum of 101 strains of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*, Jiangsu Province

非敏感药物数	非敏感药物谱	菌株数	占比(%)
19	AN-AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99
18	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99
	AN-AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99
17	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT	5	4.95
16	AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-IPM-LVX-MEM-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99
	AN-AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-IPM-LVX-MEM-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-GM-LVX-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99
15	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-IPM-MEM-PIP-TZP-TE-SXT	4	3.96
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-CIP-LVX-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99
14	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-C-CIP-IPM-LVX-MEM-TE-SXT	2	1.98
13	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-CTX-C-CIP-IPM-LVX-MEM-TE-SXT	2	1.98
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-CTX-CAZ-C-IPM-MEM-TZP-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-C-CIP-IPM-LVX-MEM-TE-SXT	1	0.99
12	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-CTX-C-IPM-LVX-MEM-TE-SXT	4	3.96
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-CIP-IPM-LVX-MEM-TE-SXT	4	3.96
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-C-IPM-MEM-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-C-CIP-IPM-LVX-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-CAZ-C-PIP-TZP-TE-SXT	1	0.99

续表 2 (Table 2, Continued)

非敏感药物数	非敏感药物谱	菌株数	占比(%)
11	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-CTX-C-IPM-MEM-TE-SXT	3	2.97
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-CTX-C-CIP-LVX-TE-SXT	2	1.98
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-CIP-IPM-LVX-TE-SXT	2	1.98
	AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-C-CIP-LVX-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-CTX-CAZ-C-PIP-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-IPM-LVX-MEM-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-GM-IPM-MEM-TE-SXT	1	0.99
10	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-CTX-C-LVX-TE-SXT	7	6.93
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-IPM-MEM-TE-SXT	6	5.94
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-CIP-LVX-TE-SXT	4	3.96
	AMC-AM-SAM-CZ-FEP-CTX-C-LVX-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-ATM-CZ-FEP-CTX-C-TE-SXT	1	0.99
9	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-IPM-TE-SXT	3	2.97
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-GM-TE-SXT	1	0.99
	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-LVX-TE-SXT	1	0.99
8	AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-TE-SXT	32	31.69

注:AN 为阿米卡星,AMC 为阿莫西林/克拉维酸,AM 为氨苄西林,SAM 为氨苄西林/舒巴坦,ATM 为氨基糖苷类,GM 为庆大霉素,IPM 为亚胺培南,CZ 为头孢唑林,FEP 为头孢吡肟,CTX 为头孢噻肟,CAZ 为头孢他啶,C 为氯霉素,CIP 为环丙沙星,GM 为庆大霉素,IPM 为亚胺培南,LVX 为左氧氟沙星,MEM 为美罗培南,PIP 为哌拉西林,TZP 为哌拉西林/他唑巴坦,TE 为四环素,SXT 为复方磺胺甲噁唑。

2.4 耐药基因携带情况 101 株铜绿假单胞菌介导对 β-内酰胺类等共 9 类 18 种抗菌药物耐药相关基因见表 3 和图 2,分别是 β-内酰胺酶基因的 *bla_{OXA}* 和 *bla_{PAO}*;氨基糖苷类耐药基因 *aac*、*aad* 和 *aph*;喹诺酮类相关耐药基因 *qnr* 和 *crpP*;常见的四环素类耐药基因如 *tet*;酰胺醇类相关耐药基因如 *floR*、*cmlA* 和 *cat*;介导磺胺类的耐药基因如 *dfrA*、*qac* 和 *sul*;针对利福霉素类抗生素的耐药基因 *arr*;抗生素灭活基因 *fosA* 和抗生素外排泵基因 *qacE*。结果显示所有菌株携带 *aph(3')-IIb* 和 *fosA* 基因,同时发现大部分菌株携带有 β-内酰胺酶相关基因 *bla_{OXA}* (99 株,98.02%) 和 *bla_{PAO}* (100 株,99.01%),氨基糖苷类耐药基因 *aac* 和 *aad* 的携带率分别为 11.88% (12 株) 和 4.95% (5 株)。此外,有 43 株菌株 (42.57%) 发现喹诺酮类抗菌药物耐药相关的关键基因 *crpP*,同时这些菌株对萘啶酸及喹诺酮类药物均呈现耐药表型特性,耐药表型和 *crpP* 基因的携带情况完全匹配。

2.5 MLST 分析 NCBI 的在线平台 pub-MLST 数据库中鉴定每株菌的 7 个等位基因号和 ST 型。

表 3 铜绿假单胞菌 9 类 18 种耐药基因分布

Table 3 Distribution of 18 kinds of 9 categories of antimicrobial resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*

耐药类型	耐药基因	耐药类型	耐药基因
β-内酰胺酶类	<i>bla_{OXA}</i>	酰胺醇类	<i>floR</i>
	<i>bla_{PAO}</i>		<i>cmlA</i>
氨基糖苷类	<i>aac</i>	磺胺类	<i>cat</i>
	<i>aad</i>		<i>dfrA</i>
	<i>aph</i>		<i>qac</i>
喹诺酮类	<i>qnr</i>	利福霉素类	<i>sul</i>
	<i>crpP</i>		<i>arr</i>
四环素类	<i>tetA</i>	磷酸类	<i>fosA</i>
	<i>tetG</i>		抗生素外排泵

结果显示 101 株铜绿假单胞菌存在 75 个 ST 型,ST 244 (5 株)、ST 235 (4 株)、ST 319 (3 株)、ST 773 (3 株) 和 ST 1076 (3 株) 等几个 ST 型的菌株最多。聚类图显示所有的 ST 型中,ST 262 处于聚类图的中心点,11 个亚型或分支从 ST 262 扩散,聚类图显示各血清型菌株的 ST 型相对集中。见图 3。

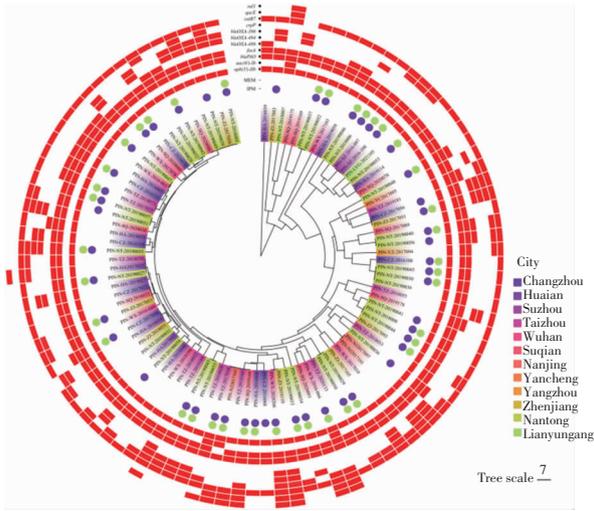


图 2 江苏省 101 株铜绿假单胞临床分离株 MLST 聚类树图
Figure 2 Cluster tree of MIST of 101 strains of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*, Jiangsu Province

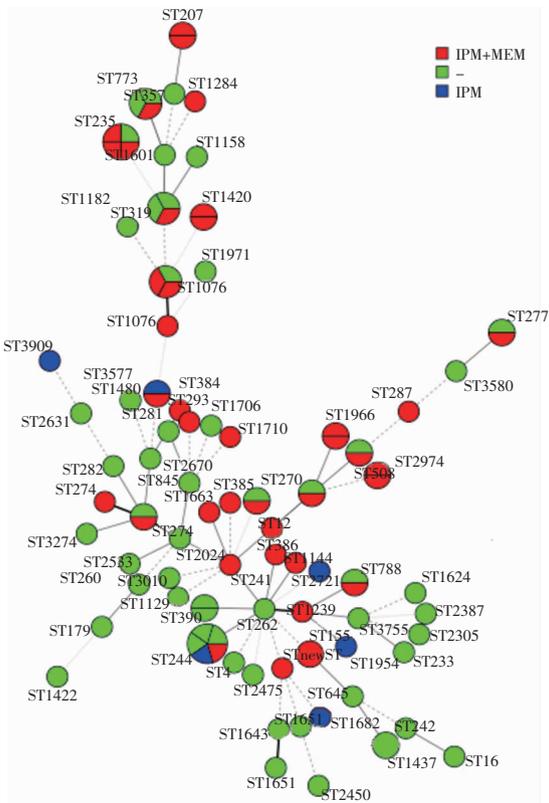
3 讨论

医院获得性感染 (healthcare-associated infection, HAI) 又称为医院感染, 是指患者在医院住院期间获得的感染, 包括住院期间发生的感染以及出院后才表现出来的感染。铜绿假单胞菌对环境具有高度的适应性, 同时具备产毒性和侵入性, 易引起人体多部位感染, 如呼吸道、肺部、尿路感染、烧伤、免疫受损、心脏瓣膜及手术等部位的感染, 甚至会通过血液引起全身感染, 是导致医院感染最重要的条件致病菌之一, 已成为医院重点防控的病原菌^[9]。调查收集的菌株来源于江苏省 13 个市中的 12 个市, 具有一定的代表性。

本研究结果显示, 江苏省临床分离的铜绿假单胞菌耐药情况严重, 所有分离株对氯霉素、复方磺胺甲噁唑、头孢噻肟、头孢唑林、四环素、氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸均耐药, 此 6 类 8 种抗菌药物为铜绿假单胞菌固有耐药^[10]。对其他抗菌药物存在不同程度的耐药性 (耐药率 2.97% ~ 45.54%)。国际上对细菌耐药的中介率较关注, 这是细菌耐药趋势的一个重要指标, 本研究发现有 23.76% 的分离株对头孢菌素类的头孢吡肟中介, 应引起高度关注。

碳青霉烯类抗生素 (如亚胺培南、美罗培南、厄他培南等), 是 70 年代研发的一种新型 β -内酰胺类抗生素, 通过干扰细胞壁的合成而抑制细菌复制, 因具有广谱、强效和低不良反应, 广泛应用于治疗由严重耐药革兰阴性菌引起的感染。但随着临床上的广泛应用, 铜绿假单胞菌对亚胺培南等一线药物的耐药性出现上升趋势^[11]。2017 年, WHO 将耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌列为极其重要的、急需开发新型药物和治疗手段的细菌之一。本研究发现对亚胺培南和美罗培南两种抗生素的耐药率已分别达 45.54%、39.60%, 高于国内湖北和广州医院感染分离株的耐药率。

临床分离的铜绿假单胞菌多重耐药严重, 本研究中收集的分离株全部为多重耐药菌, 耐药种类在固有耐药 (AMC-AM-SAM-CZ-CTX-C-TE-SXT) 的基础上递增, 甚至出现 1 株对所有抗菌药物耐药的超级耐药菌株, 耐 10 种抗菌药物的菌株达 63.37%。与国外药物敏感性监测结果^[12] (欧洲、美国、日本等医



注: IPM + MEM 为亚胺培南和美罗培南耐药; IPM 为亚胺培南耐药; - 为亚胺培南和美罗培南非耐药。
图 3 江苏省 101 株铜绿假单胞临床分离株 MLST 最小生成树图

Figure 3 Minimum spanning tree of 101 strains of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*, Jiangsu Province

院菌株)比较,本次分离的菌株耐药率以及多重耐药程度较高,提示需密切关注铜绿假单胞菌重点抗菌药物耐药性的变化。

铜绿假单胞菌能通过水平基因转移获得耐药基因(antimicrobial resistance gene, ARG),从而产生耐药性并形成超级耐药细菌,一旦出现在医院中,危害性极大,可导致原来没有感染的患者因其他疾病住院后反而感染超级耐药菌,严重的可导致患者死亡。本专题研究利用生物信息分析方法,通过测序技术得到菌株基因组信息,再在 ResFinder 数据库里对已知的耐药基因全面扫描分析,大大提高了效率,节约了成本。通过比对发现了 6 类共 18 种介导抗菌药物耐药相关的基因。铜绿假单胞菌可携带 β -内酰胺酶基因(*bla*_{OXA} 和 *bla*_{PAO})^[13], OXA 为 D 类碳青霉烯酶,有多个亚型,能水解多种青霉素类和头孢菌素类抗生素,一般由质粒介导并扩散。本研究的结果表明,大多数菌株携带一或两种此类抗性基因,并且对青霉素类抗生素氨苄西林和碳青霉烯类具有抗性,如对美罗培南具有一定的耐药性,耐药基因和耐药表型结果完全一致。此外 43 株菌株携带 *crpP* 基因,并与对喹诺酮类药物的耐药性呈现了 100% 的对应关系。

MLST 技术可对细菌进行基因分型及遗传进化分析,是当前分子流行病学研究中常用的工具之一。本研究 101 株菌被分为 75 个不同的 ST 型,表明本地区 ST 型丰富,感染来源和途径多样化,应加强各环节的消毒和感染控制。文献报道,全球多地的医院发现从患者体内分离泛耐药(extensively drug resistant, XDR)甚至是全耐药(pandrug-resistant, PDR)的铜绿假单胞菌^[14],这些严重耐药甚至全耐药的分离株主要集中在几种特别的 MLST 型中,如 ST 175、ST 235 及 ST 664 等;携带这些基因型的菌株在临床治疗上无药可用,一旦感染极度凶险,这些 ST 型聚在一起形成的克隆簇常被称为高危克隆簇。ST 235 分布广泛,本研究中发现 4 株 ST 235 基因型菌株,其中 1 株耐药严重,同时耐 18 种抗菌药物,因此需提高对该型菌株的警惕,如有暴发,周边医院或社区应提高重视,防范进一步的蔓延。

随着经济的发展,我国全面进入老龄化社会,本研究针对 2016—2021 年患者临床分离株进行药物敏感性试验和二代测序分析,结果显示江苏省临床分离的铜绿假单胞菌耐药情况严重,并有扩散的趋势,应引起高度重视。一方面要发展新的治疗手段,如新型抗菌药物或噬菌体治疗等;另一方面如空气、

水龙头、门把手等医院内经常接触到的重点部位的消毒灭菌需加强,防止泛耐药铜绿假单胞菌医院内扩散感染。由于新型冠状病毒感染疫情等各种因素影响,不同年份各地区收集的菌株数差异较大,对结果分析及特征描述产生一定的影响,下一步将优化工作流程,增加相关培训。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] 王雪玉,田芳英,赵明. 全球铜绿假单胞菌医院感染暴发事件的流行特征与应对策略[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(12): 1171-1178.
Wang XY, Tian FY, Zhao M. Epidemic characteristics and preventive strategies of worldwide outbreak of healthcare-associated infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2022, 21(12): 1171-1178.
- [2] Verdial C, Serrano I, Tavares L, et al. Mechanisms of antibiotic and biocide resistance that contribute to *Pseudomonas aeruginosa* persistence in the hospital environment [J]. Biomedicines, 2023, 11(4): 1221.
- [3] 刘宇阳,陈茶,黄彬. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药性研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(8): 763-768.
Liu YY, Chen C, Huang B. Research progress of heteroresistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(8): 763-768.
- [4] 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.
Song XC, Jin MJ, Ding W. Distribution and drug resistance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* causing infection in intensive care unit and common wards [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2021, 31(22): 3397-3401.
- [5] World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed[EB/OL]. (2017-02-27)[2023-07-12]. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- [6] Abdalhamid B, Reslane I, Mccutchen E, et al. Genotypic characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using whole-genome sequencing[J]. Microbiol Resour Annu, 2021, 10(32): e0060621.
- [7] Jácome PRLDA, Alves LR, Cabral AB, et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil [J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2012, 45(6): 707-712.
- [8] Magalhães B, Valot B, Abdelbary MMH, et al. Combining

standard molecular typing and whole genome sequencing to investigate *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units[J]. Front Public Health, 2020, 8: 3.

- [9] Cardoso O, Alves AF, Leitão R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(4): 375 - 379.
- [10] 邱红美, 陆建红, 杨勇, 等. 常见固有耐药细菌的感染分布及药敏分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(2): 179 - 182.
- Qiu HM, Lu JH, Yang Y, et al. Infection distribution and susceptibility analysis of common inherently resistant bacteria [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2019, 29(2): 179 - 182.
- [11] 陈勇, 史利宁, 胡毓安, 等. 产 KPC 铜绿假单胞菌的耐药分子机制及其临床分布[J]. 医学研究生学报, 2021, 34(6): 575 - 579.
- Chen Y, Shi LN, Hu YA, et al. Molecular mechanism and clinical distribution of drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* KPC[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2021, 34(6): 575 - 579.
- [12] Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing[J]. Euro Surveill, 2013, 18(42): 20611.
- [13] 杨菁菁, 艾效曼, 胡云建, 等. 泛耐药铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013,

13(1): 14 - 18.

Yang JJ, Ai XM, Hu YJ, et al. Examination of the mechanism of β -lactam resistance in pan-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2013, 13(1): 14 - 18.

- [14] Moloney EM, Deasy EC, Swan JS, et al. Whole-genome sequencing identifies highly related *Pseudomonas aeruginosa* strains in multiple washbasin U-bends at several locations in one hospital: evidence for trafficking of potential pathogens via wastewater pipes[J]. J Hosp Infect, 2020, 104(4): 484 - 491.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式: 聂俊伟, 周璐, 瞿志鹏, 等. 江苏省 2016—2021 年临床分离铜绿假单胞菌耐药及基因组特征分析[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(4): 467 - 474. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244776.

Cite this article as: NIE Jun-wei, ZHOU Lu, QU Zhi-peng, et al. Antimicrobial resistance and genome characteristics of clinically isolated *Pseudomonas aeruginosa*, Jiangsu Province, 2016 - 2021 [J]. Chin J Infect Control, 2024, 23(4): 467 - 474. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244776.