

黏液型铜绿假单胞菌药物敏感性的试验方法及治疗策略探索

张雨虹 王云英^{通讯作者}

重庆医科大学附属第二医院，重庆，400010；

摘要： [目的] 本研究旨在探讨黏液型铜绿假单胞菌的危险因素、药物敏感性检测方法及联合药敏试验，通过改良的肉汤微量稀释法和棋盘法，评估浮游型与生物膜型菌株的药物敏感性，为临床治疗提供更准确的抗生素使用依据。 [方法] 分析黏液型铜绿假单胞菌感染患者的临床数据，以及黏液型与非黏液型铜绿假单胞菌的药敏结果；使用橡胶片作为细菌生物膜载体，模拟黏液型铜绿假单胞菌在体内形成生物膜的过程，采用微量肉汤稀释法测 56 株黏液型铜绿假单胞菌浮游型与生物膜型的 MIC 值，肉汤稀释棋盘法测 20 株黏液型铜绿假单胞菌生物膜型联合药物敏感性试验的 MIC 值。 [结果] 黏液型铜绿假单胞菌感染的患者以慢性阻塞性肺病/支气管扩张伴感染为主；黏液型铜绿假单胞菌的体外药物敏感性总体优于非黏液型铜绿假单胞菌；其生物膜型的 MIC 值要比浮游型高，耐药率与浮游型相比有显著差异；联合药物敏感试验，头孢他啶与阿奇霉素或磷霉素、环丙沙星与磷霉素协同作用较好，协同率达到 60%。 [结论] 新的检测方法基本能够准确检测黏液型铜绿假单胞菌生物膜型的 MIC，对于黏液型铜绿假单胞菌感染的治疗，联合用药比单独用药效果更好。

关键词： 黏液型铜绿假单胞菌；生物膜；药物敏感性试验；联合用药

DOI:10.69979/3029-2808.24.12.006

铜绿假单胞菌(PA)是医院感染的重要病原体之一，可引起肺囊性纤维化、慢性阻塞性肺病等疾病。铜绿假单胞菌转变为黏液型 PA 最常见的突变为 *mucA*，即海藻酸盐过度产生后^[1]表现出黏液表型，易粘附于支气管管壁上，通过繁殖形成有结构的小菌落，小菌落进一步发育成广泛的三维蘑菇状结构，形成成熟的生物膜结构^[2]。生物膜对宿主免疫防御机制和抗生素的抗性很强，这导致黏液型 PA 临床抗生素治疗效果不佳，反复感染。

研究^[3]发现黏液型 PA 的体外药敏试验结果较好，但因生物膜的存在在临床治疗中表现出高耐药性。目前药物敏感试验无法真实反映黏液型 PA 药敏结果，为找出黏液型 PA 最佳药物敏感性检测方法，采用一种改良微量肉汤稀释测量黏液型 PA 浮游型与生物膜型的 MIC 值，希望为临床治疗黏液型 PA 提供准确抗菌药物使用信息。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

本研究使用菌株分离于重庆医科大学附属第二医院 56 例感染黏液型 PA 的患者。所有菌株均经过 Clin-TOFII 飞行时间质谱系统鉴定，并采用纸片扩散法对菌株进行体外药物敏感试验。

1.1.2 仪器与试剂

哥伦比亚血平板和 MH 平板(赛默飞)；Clin-TOFII 飞行时间质谱系统(北京毅新博创)；LB 肉汤、MH 肉汤；生物安全柜(上海力康生物)；二氧化碳培养箱(赛默飞)；六孔板、96 孔板；哌拉西林、阿米卡星、氨曲南、头孢吡肟、头孢他啶、妥布霉素、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星和左氧氟沙星粉剂(大连美仑生物)。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集

对 2020 年-2022 年 201 例感染黏液型 PA 患者进行临床资料的收集及分析。

1.2.2 临床分离株的药敏结果分析

2022 年重庆医科大学附属第二医院的患者中共检出铜绿假单胞菌 1665 株，其中黏液型 PA244 株，非黏液型 PA1421 株，用 WHONET5.6 软件对数据进行统计分析。

1.2.3 菌株的培养、鉴定

将保存在-80℃的黏液型 PA 菌株取出，接种到血平板培养 24h，挑取单菌落传代 1 次后用于细菌鉴定及药敏试验。

1.2.4 用微量肉汤稀释法测黏液型 PA 浮游型和生物膜型的 MIC

(1) 细菌生物膜的建立

使用橡胶片作为细菌生物膜载体，探究黏液型 PA

在体内形成生物膜的过程。将橡胶片放入 6 孔板中，加入 0.5 麦氏浊度 100 μ l 菌液与 4.5mlLB 培养液培养 48 h。后将橡胶片取出，用生理盐水洗涤一次，结晶紫染色，于光学显微镜下观察。

橡胶片细菌量的确定：将不同大小的橡胶片放入 0.5 麦氏浊度 100 μ l 菌液与 4.5mlLB 培养液培养 24h 后，取出用生理盐水中洗涤一次，再放入装有 1mlLB 培养液中充分振荡，于血平板上接种 10 μ l 振荡后的液体，并进行菌落计数，最后取菌落计数在 106CFU/mL 左右的 3 mm $\times$ 3mm $\times$ 1mm 橡胶片。

(2) 药物选择

根据 CLSI M100 Ed33 选择哌拉西林、阿米卡星、氨曲南、头孢吡肟、头孢他啶、妥布霉素、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、左氧氟沙星进行体外药物敏感性试验。根据《中国铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识（2022 年版）》选择美罗培南、环丙沙星、头孢他啶分别与阿奇霉素、磷霉素联合。

(3) 微量肉汤稀释法测黏液型 PA 浮游型与生物膜型的 MIC 值

使用 96 孔无菌微孔板，每孔加入 100uLMH 肉汤，将生物膜型细菌橡胶片放入 96 孔板中，再加入各种浓度的抗菌药物混匀；浮游型细菌配为 0.5 麦氏浊度菌液，每孔加入 100uL 菌液，再加入各种浓度的抗菌药物混匀，35℃ 孵育培养 48h。以抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC 值。

(4) 微量肉汤稀释棋盘法测生物膜型联合药物的 MIC 值

根据肉汤稀释法测定的 MIC 值确定联合药物浓度，从 4 倍 MIC 浓度用 MH 肉汤倍比稀释，取 7 个稀释浓度，分别排列在 96 孔板的行与列上，然后加入培养好的橡胶片及 100uLMH 肉汤混匀，35℃ 孵育培养 48h，读取 MIC 值。通过部分抑菌指数(FIC) 计算公式，判断联合效果。计算公式：FIC=MIC 联合时 A 药的 MIC/MICA 药的 MIC+MIC 联合时 B 药的 MIC/MICB 药的 MIC。结果判读：FIC $\leq$ 0.5 为协同作用，0.5<FIC $\leq$ 1 为相加，1<FIC $\leq$ 2 为无关，>2 为拮抗。

1.2.5 统计学方法

组间耐药性比较采用 χ^2 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料结果

201 例患者临床资料比较（见表 1）。感染黏液型 PA 的患者中，60 岁以上的居多（69.65%），女性居多（59.70%），且大部分来自呼吸内科（62.19%），送检标本以痰培养为主（88.56%），临床诊断主要是慢性阻塞性肺病/支气管扩张伴感染（76.12%），PCT、CRP 结果一半以上患者升高，WBC 结果无明显异常，CT 结果显示大多数患者有肺部感染/肺炎（91.88%）。

表 1 患者一般资料比较

组别	个数	比例（%）
年龄 30-60 岁	61	30.35%
60 岁以上	140	69.65%
性别 男性	81	40.30%
女性	120	59.70%
科室 呼吸内科	125	62.19%
其他科室	76	37.81%
送检标本 痰培养	196	97.52%
其他	5	2.48%
临床诊断		
慢性阻塞性肺病/支气管扩张伴感染	153	76.12%
降钙素原（PCT）	182	
PCT>0.05	96	52.75%
白细胞数（WBC）	198	
正常 WBC（3.5-9.5 $\times$ 10 ⁹ ）	146	73.74%
WBC<3.5 $\times$ 10 ⁹	3	1.52%
WBC>9.5 $\times$ 10 ⁹	49	24.74%
C 反应蛋白（CRP）	189	
CRP>10mg/L	105	55.56%
CT 结果	160	
肺部感染/肺炎	147	91.88%
支气管扩张	89	55.63%

2.2 临床药敏回顾分析结果

对黏液型 PA 与非黏液型 PA 的药物敏感性试验结果进行分析（表 2）。黏液型 PA 对除阿米卡星外的其他抗菌药物的耐药率都比非黏液型 PA 要低，说明黏液型 PA 体外药物敏感性试验结果总体比非黏液型 PA 要好，尤其是氨曲南、亚胺培南、美罗培南这三种药物在黏液型与非黏液型 PA 的耐药中具有明显差异（ P 值 <0.05 ）。

表 2 黏液型 PA 与非黏液型 PA 对抗菌药物的耐药率（%）比较

抗生素名称	非黏液型 PA 耐药率（%）	黏液型 PA 耐药率（%）	P 值
哌拉西林	33.82%	29.69%	0.5334
哌拉西林/他唑巴坦	29.81%	18.03%	0.0504
头孢他啶	26.34%	17.62%	0.1372
头孢吡肟	20.71%	17.63%	0.5775
氨曲南	31.92%	19.68%	0.0486
亚胺培南	38.68%	24.61%	0.0321
美洛培南	37.71%	19.71%	0.0049
左旋氧氟沙星	31.09%	25.83%	0.4062
环丙沙星	20.66%	20.18%	0.9301
庆大霉素	4.91%	4.46%	0.8937
妥布霉素	4.28%	3.26%	0.7115
阿米卡星	1.83%	2.91%	0.6076

2.3 微量肉汤稀释法测黏液型 PA 浮游型与生物膜型的 MIC 值

2.3.1 黏液型 PA 浮游型与生物膜型 MIC 值

黏液型 PA 浮游型与生物膜型对不同抗菌药物的 MI

C50、MIC90 以及两者耐药率的比较（见表 3、表 4）。以 MIC50 或 MIC90 之间差距大于等于两个梯度， P 值 <0.05 为有差异，黏液型 PA 生物膜型对氨曲南、头孢吡肟、头孢他啶、亚胺培南、哌拉西林的 MIC 值要比浮游型高，而且耐药率与浮游型相比有显著差异。

表 3 黏液型 PA 浮游型与生物膜型药敏试验结果

抗菌药物名称	浮游型 MIC			生物膜型 MIC		
	MIC 范围	MIC50	MIC90	MIC 范围	MIC50	MIC90
妥布霉素	0.25-2	0.5	1	0.25-4	0.5	2
氨曲南	0.5-128	4	32	0.5-128	16	128
头孢吡肟	0.5-64	8	16	2-128	16	128
头孢他啶	0.5-128	4	32	0.5-128	16	128
亚胺培南	0.06-16	2	16	0.25-32	16	32
美罗培南	0.06-16	1	16	0.06-16	2	16
哌拉西林	0.5-128	8	128	0.5-128	128	128
阿米卡星	0.5-16	4	8	1-32	4	16
环丙沙星	0.06-16	0.5	8	0.125-32	1	16
左氧氟沙星	0.06-16	1	8	0.5-32	2	16

表 4 黏液型 PA 生物膜型和浮游型对抗菌药物的耐药率（%）比较

抗生素名称	生物膜型耐药率（%）	浮游型耐药率（%）	P 值
妥布霉素	3.62%	0.01%	0.0555
氨曲南	42.91%	14.35%	<0.05
头孢吡肟	46.42%	10.72%	<0.05
头孢他啶	35.72%	14.31%	<0.05
亚胺培南	60.73%	35.72%	<0.05
美罗培南	32.08%	21.44%	0.0874
哌拉西林	67.92%	35.72%	<0.05
阿米卡星	0.03%	0.03%	1
环丙沙星	50.02%	28.62%	<0.05
左氧氟沙星	42.91%	32.13%	0.1147

2.3.2 肉汤稀释棋盘法测联合药敏试验 MIC

美罗培南、头孢他啶、环丙沙星与阿奇霉素、磷霉素联合用药的 FIC 指数（见表 5）。美罗培南与阿奇霉素联用，部分为相加作用（40%），头孢他啶与磷霉素联用，主要是协同作用（60%）；美罗培南与磷霉素联用，头孢他啶与阿奇霉素联用，环丙沙星与阿奇霉素或磷霉素联用，均为协同或相加作用。

表 5 黏液型 PA 生物膜型联合药敏 FIC 指数百分比（%）

联合药物	FIC			
	≤ 0.5	0.5-1	1-2	> 2
美罗培南+阿奇霉素	0%	40%	60%	0%
美罗培南+磷霉素	50%	50%	0%	0%
头孢他啶+阿奇霉素	60%	40%	0%	0%
头孢他啶+磷霉素	60%	20%	20%	0%
环丙沙星+阿奇霉素	40%	60%	0%	0%
环丙沙星+磷霉素	60%	40%	0%	0%

3 讨论

根据 2022 年中国耐药网监测（CHINET）的数据显示，临床呼吸道分离的菌种中铜绿假单胞菌占 13.0%，位列第三，说明呼吸道是铜绿假单胞菌感染最常见的发

生部位。但是有研究^[4]发现，铜绿假单胞菌在反复感染过程中转变为黏液型 PA，黏液型 PA 的生物膜可以物理屏蔽抗菌药物的渗入以及逃避机体的免疫系统，即使使用抗菌药物后，感染黏液型 PA 的患者仍然反复感染，难以治愈。然而常规药敏试验的方法是检测浮游菌的，用于检测黏液型 PA 生物膜型不够准确，并没有检测出其真实的 MIC 值，不能更好的为临床提供抗菌药物使用信息。

本研究创新性地使用橡胶片作为细菌生物膜载体，模拟黏液型铜绿假单胞菌在体内的生物膜形成过程，并通过改良的肉汤微量稀释法检测浮游型与生物膜型菌株的 MIC 值。结果显示，生物膜型菌株的 MIC 值显著高于浮游型，表明该方法能够更准确地反映黏液型铜绿假单胞菌的耐药性。

为了更好地服务临床，采用肉汤稀释棋盘法进行联合药物敏感试验，探索联合用药效果。选择环丙沙星、头孢他啶两种 1 级药物，美罗培南一种 2 级药物，阿奇霉素具有一定的抑制生物膜形成的效果，磷霉素可以通过抑制细胞壁合成，破坏其完整性，使得抗菌药物更好地渗入菌体^[5]，这两种药物本身的抗菌活性较弱，所以我们选择这两种药物与三种常规抗菌药物联合使用。结果显示头孢他啶与阿奇霉素、环丙沙星与磷霉素都是 60%协同作用，40%相加作用，头孢他啶与磷霉素 60%协同作用，20%相加作用，说明这几种药物联合使用效果比较好。

参考文献

[1] 李莎, 杜晶辉, 商希鹏, 刘旭. 抗生物膜治疗黏液型铜绿假单胞菌感染的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(05): 384-387.

[2] 游六勇, 罗文英. 铜绿假单胞菌生物膜干预治疗的研究[J]. 医学信息, 2022, 35(06): 37-40.

[3] 廖一群, 刘德东, 席徐翔, 赵琴飞, 钟田雨, 江丽霞. 黏液型铜绿假单胞菌的临床分布和耐药特点分析[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(22): 3320-3322.

[4] 顾悦, 薛河东. 某地区支气管扩张症患者感染黏液型铜绿假单胞菌的耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(15): 1825-1828.

[5] Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. The revival of Fosfomycin[J]. Int J Infect Dis, 2011; 15(11): 732-739.

作者简介: 张雨虹, 女 (1994-05-), 汉族, 重庆市奉节县, 本科, 初级检验技师, 研究方向: 微生物。