

# 糖尿病足创面感染铜绿假单胞菌的耐药性及其毒力基因分析

徐俊, 朱晓晴, 李梦君, 王素, 霍爱梅, 陈志晖, 吴卫辉, 王鹏华

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:81670766); 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所科学基金项目(编号:2012DX04)

作者单位: 300070 天津, 国家卫生健康委员会激素与发育重点实验室(天津医科大学), 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津医科大学朱宪彝纪念医院(代谢病医院) & 天津市内分泌研究所, 糖尿病足病科(徐俊, 李梦君, 王鹏华); 266000 山东, 青岛市第八人民医院内分泌科(朱晓晴); 300071 天津, 南开大学生命科学学院微生物学系(王素, 陈志晖, 吴卫辉); 300000 天津, 天津迪安执信医学检验所(霍爱梅)

作者简介: 徐俊(1980-), 男, 医学博士, 主治医师, 讲师, 研究方向: 糖尿病及糖尿病足的临床与基础研究。E-mail: xujun0602@163.com

通讯作者: 王鹏华(1960-), 男, 医学硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 糖尿病足的诊治。E-mail: wph200000@163.com



王鹏华, 天津医科大学代谢病医院糖尿病足病科主任, 主任医师, 硕士研究生导师。中华糖尿病分会糖尿病足与周围血管病变学组副组长, 全国创面修复联盟委员, 国际血管联盟中国分会糖尿病足专业委员会副主任委员, 中国医疗保健国际交流促进会糖尿病足分会副主任委员, 天津市糖尿病分会委员, 天津市糖尿病协会理事。发表与糖尿病足有关的学术论文70余篇, 其中SCI 10余篇, 主持完成或承担国家自然科学基金项目、天津市自然科学基金重点项目及其他项目7项。主持编译《糖尿病足临床诊疗实践和图解》和《糖尿病足及下肢慢性创面修复》等专著6部。

**[摘要]** **目的** 了解糖尿病足创面感染铜绿假单胞菌耐药特点并分析其与毒力基因的关系。**方法** 连续收集2018-01-01~2018-12-31在天津医科大学代谢病医院糖尿病足病科住院的糖尿病足患者中54株细菌培养报告为铜绿假单胞菌的菌株, 在药物敏感试验及菌落复种培养后, 交南开大学微生物实验室逐一进行铜绿假单胞菌固有 *pcrV* 基因检测, 以明确铜绿假单胞菌。另收集非糖尿病足创面感染铜绿假单胞菌21株作为对照组。对铜绿假单胞菌的3型分泌系统中毒力基因 *exoS* 和 *exoU* 进行检测及分析其与耐药的关系。对创面中连续2次(每次间隔1个月)及以上培养出的铜绿假单胞菌进行随访。**结果** 54株中筛查出8株不是铜绿假单胞菌, 46株明确为铜绿假单胞菌。糖尿病足组与对照组中, 主要致病基因均为含有 *exoS* 的铜绿假单胞菌, 糖尿病足组为91.3% (42/46), 耐药率为11.9%; 对照组为76.2% (16/21), 耐药率为6.3%。含有 *exoU* 的铜绿假单胞菌在糖尿病足组与对照组中均占比较少, 糖尿病足组中为8.7% (4/46), 耐药率为25.0%; 对照组中为23.8% (5/21), 耐药率为20.0%。在糖尿病足组中, 有6例患者连续2次及以上培养出铜绿假单胞菌, 合计19株。有5例患者感染含有 *exoS* 的铜绿假单胞菌, 其中有2例培养出耐药铜绿假单胞菌, 耐药率为23.5% (4/17), 均出现在治疗的初期和中期, 在末次培养时均转为敏感铜绿假单胞菌, 有1例患者创面中含有 *exoU* 的铜绿假单胞菌, 耐药率为50.0% (1/2), 首次培养为耐药菌, 末次培养为敏感菌。**结论** 糖尿病足创面中取得的铜绿假单胞菌中, 以含有 *exoS* 的铜绿假单胞菌为主, 但是在耐药菌方面, 含有 *exoU* 的铜绿假单胞菌的耐药率更高。同一患者创面的铜绿假单胞菌不会因为耐药与否出现 *exoS* 或 *exoU* 基因型改变。

**[关键词]** 糖尿病足; 铜绿假单胞菌; 毒力基因; 抗生素耐药

**[中图分类号]** R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)12-1267-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.12.03

**Antibiotic resistance and virulence gene analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in diabetic foot wound infection**  
 XU Jun, ZHU Xiao-qing, LI Meng-jun, et al. National Health Commission Key Laboratory of Hormones and Development (Tianjin Medical University), Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Department of Diabetic Foot, Tianjin Medical University Chu Hisen-I Memorial Hospital (Metabolic Diseases Hospital) & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin 300070, China

**[Abstract] Objective** To investigate the trait of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in diabetic foot wound infection and analyze the relationship between the antibiotic resistance and its virulence genes. **Methods** Fifty-four strains of *Pseudomonas aeruginosa* were continuously collected from the diabetic foot patients in the Department of Diabetic Foot of Metabolic Disease Hospital of Tianjin Medical University during January 1, 2018 and December 31, 2018. In the bacterial culture report, the 54 strains were *Pseudomonas aeruginosa*. After the antibiotic sensitivity test was carried out, and the colonies were replanted and cultured, the inherent *pcrV* gene of *Pseudomonas aeruginosa* was detected one by one in the Microbial Laboratory of Nankai University, in order to identify the *Pseudomonas aeruginosa*. At the same time, 21 strains of *Pseudomonas aeruginosa* from nondiabetic wound infection were collected as the control group. The virulence genes *exoS* and *exoU* in the type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* were detected and analyzed. The relationship between the antibiotic resistance and its virulence genes was analyzed. The *Pseudomonas aeruginosa* cultured in the wound for two times (one month interval) or more were followed up. **Results** Eight out of fifty-four strains were not *Pseudomonas aeruginosa*, and the forty-six strains were *Pseudomonas aeruginosa*. In the diabetic foot group and the control group, the main pathogenic gene of *Pseudomonas aeruginosa* was *exoS*, with 91.3% (42/46) in the diabetic foot group in which the antibiotic resistance rate was 11.9%, and 76.2% (16/21) in the control group in which the antibiotic resistance rate was 6.3%. *Pseudomonas aeruginosa* with *exoU* was less in the diabetic foot group and the control group, with 8.7% (4/46) in the diabetic foot group in which the antibiotic resistance rate was 25.0%, and 23.8% (5/21) in the control group in which the antibiotic resistance rate was 20.0%. In the diabetic foot group, *Pseudomonas aeruginosa* was cultured twice or more in 6 patients with diabetic foot, with a total of 19 strains. Five patients were infected with *Pseudomonas aeruginosa* with *exoS* among whom 2 patients were cultured with drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the antibiotic resistance rate was 23.5% (4/17) and these conditions occurred in the early and middle stages of treatment, and they all turned into sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in the last culture. In one patient, *Pseudomonas aeruginosa* with *exoU* was found in the wound, and the drug resistance rate was 50.0% (1/2). In this patient, the first culture was drug-resistant, and the last culture was sensitive. **Conclusion** Among the strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from diabetic foot wounds, the *Pseudomonas aeruginosa* with *exoS* is the main one. However, the antibiotic resistance rate of *Pseudomonas aeruginosa* with *exoU* is higher. The *Pseudomonas aeruginosa* in the same wound of a diabetic patient will not change its *exoS* or *exoU* gene because of changing of antibiotic resistance.

**[Key words]** Diabetic foot; *Pseudomonas aeruginosa*; Virulence gene; Antibiotic resistance

随着糖尿病患病率的不断攀升,糖尿病足作为糖尿病的慢性并发症其发病率也逐年增加。有研究<sup>[1]</sup>显示,40%~80%的糖尿病足创面存在糖尿病足感染(diabetic foot infection, DFI)。DFI患者早期由于神经病变不易发现,发现时往往创面较深、持续时间长、感染较重,糖尿病患者本身免疫功能相对较低,这使得一些条件致病菌,如铜绿假单胞菌成为DFI中最常见的革兰阴性致病菌之一<sup>[2,3]</sup>。近年来多重耐药的铜绿假单胞菌(multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, MDRPA)的检出率增高,造成截趾截肢率升高且临床愈合差<sup>[4,5]</sup>。为了解铜绿假单胞菌在糖尿病足创面中的致病情况,控制铜绿假单胞菌感染,本研究旨在对糖尿病足创面中铜绿假单胞菌耐药特点及其与3型分泌系统(type III secretory system, T3SS)的毒力因子的关系进行分析,报告如下。

## 1 资料与方法

**1.1 铜绿假单胞菌的收集** 连续收集2018-01-01~2018-12-31在天津医科大学代谢病医院糖尿病足病科住院的糖尿病足患者的患足创面中培养报告为铜绿假单胞菌54株(均为创面深部组织取材),同时

进行抗生素敏感试验、菌落复种培养和铜绿假单胞菌固有*pcrV*基因检测。收集非糖尿病创面感染铜绿假单胞菌21株作为对照组。本研究经天津医科大学代谢病医院伦理委员会批准,所有参与研究的糖尿病患者均签署知情同意书。

**1.2 抗生素敏感试验** 按照美国国家临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS, 2004年)的标准进行抗生素敏感性试验[最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)法]。据2011欧美国际专家组建议多重耐药的诊断标准:对头孢菌素类、碳青霉烯类、喹诺酮类、氨基糖苷类、半合成青霉素+ $\beta$ 内酰胺酶抑制剂、单环内酰胺类、磷酸类、多黏菌素类8类抗生素中至少3类耐药,即可判定为多重耐药<sup>[6]</sup>,本研究中提到的耐药均为多重耐药。

**1.3 铜绿假单胞菌固有基因*pcrV*及毒力基因*exoS*和*exoU*检测**

**1.3.1 PCR模板** 冻存菌株复苏,在LB琼脂平板上划线,37℃恒温培养箱培育。第2天将单菌落挑置于10  $\mu$ l LB液体中,99℃水浴15 min,以12 000 g

离心条件离心 1 min,取 1 μl 上清液作为 PCR 模板。

1.3.2 引物设计 *perV*:上游 CACGCTATATGGC-TATGC,下游 GGTATCCAGATTGCTCAG;*exoS*:上游 GCATATTCAATCGCTTCAG,下游 CCTCAATCTGTC-CCAAAC;*exoU*:上游 GTTGAGTGCTTACATTCC,下游 TTGAACACCACCTAATTGC。

1.3.3 PCR 反应体系(20μl) 加入下列各组分: 10×缓冲液 2 μl、dNTP(2.5 mM) 2 μl、DMSO 1 μl、上游引物 0.5 μl、下游引物 0.5 μl、模板 1 μl、*rtaq* 0.2 μl、ddH<sub>2</sub>O 12.8 μl。

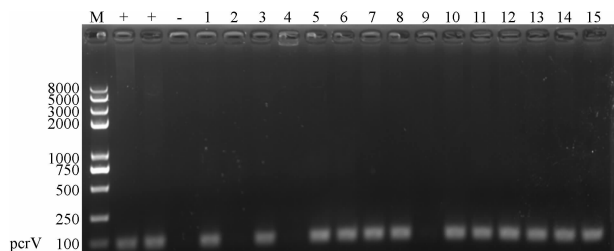
1.3.4 PCR 程序 (1)95 °C,5 min;(2)95 °C,30 s;(3)55 °C,30 s;(4)72 °C,30 s[(2)~(4)循环 30 次];(5)72 °C,10 min。

1.4 随访 对创面中连续 2 次(每次间隔 1 个月)及以上培养出的铜绿假单胞菌进行随访。

1.5 统计学方法 应用 SPSS21.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用 *t* 检验,计数资料以百分率(%)表示,采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 铜绿假单胞菌的 *perV* 基因检测结果 糖尿病足创面中的 54 株菌株中有 8 株不含有 *perV* 基因,即不是铜绿假单胞菌,另 46 株明确为铜绿假单胞菌。对照组 21 株菌株含有 *perV* 基因,确认为铜绿假单胞菌。检测结果见图 1。



选取 15 株临床培养出的铜绿假单胞菌进行其固有 *perV* 基因检测,其中 2、4、9 道未显示 *perV* 条带,故 2、4、9 株不是铜绿假单胞菌

图 1 铜绿假单胞菌固有基因 *perV* 检测结果(以其中 15 株为例)

2.2 两组带有毒力基因 *exoS* 或 *exoU* 的铜绿假单胞菌检测结果 以 PAK 为携带 *exoS* 的阳性菌,以 PA14 为携带 *exoU* 的阳性菌,对 88 株铜绿假单胞菌进行毒力基因的检测。结果显示,在糖尿病足创面中的 46 株铜绿假单胞菌中,含有 *exoS* 的铜绿假单胞菌为 42 株,含有 *exoU* 的铜绿假单胞菌为 4 株。对照组 21 株铜绿假单胞菌中,含有 *exoS* 的铜绿假单胞菌为 16 株,含有 *exoU* 的铜绿假单胞菌为 5 株。两组均以含有 *exoS* 的铜绿假单胞菌为主。检测结果见图 2。

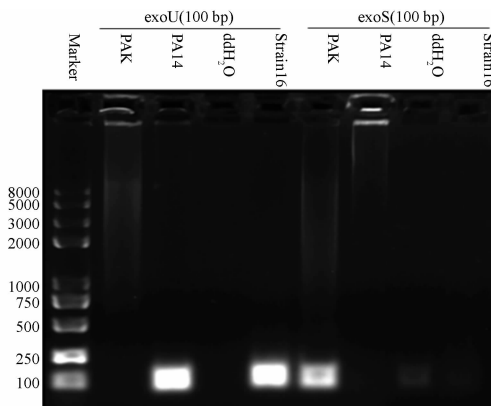


图 2 毒力因子 *exoU* 和 *exoS* 检测结果(以菌株 16 为例)

2.3 两组携带毒力基因 *exoS* 或 *exoU* 的铜绿假单胞菌的抗生素敏感性比较 在糖尿病足组中铜绿假单胞菌的 *exoS* 的携带率为 91.3% (42/46),其中耐药率为 11.9%;对照组中铜绿假单胞菌的 *exoS* 的携带率为 76.2% (16/21),其中耐药率为 6.3%。糖尿病足组中含 *exoS* 的铜绿假单胞菌的耐药率与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。铜绿假单胞菌的 *exoU* 携带率在糖尿病足组与对照组中均较低,在糖尿病足组中为 8.7% (4/46),其耐药率为 25.0%;在对照组中为 23.8% (5/21),其耐药率为 20.0%。两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。两组总体耐药率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 两组携带毒力基因 *exoS* 或 *exoU* 的铜绿假单胞菌的抗生素敏感性比较

组别	<i>exoS</i>			<i>exoU</i>			合计		
	敏感	耐药	耐药率(%)	敏感	耐药	耐药率(%)	敏感	耐药	耐药率(%)
糖尿病足组	37	5	11.9	3	1	25.0	40	6	13.0
对照组	15	1	6.3	4	1	20.0	19	2	9.5
$\chi^2$			0.022			0.394			0.000
<i>P</i>			0.881			0.530			0.995

2.4 同一创面连续多次培养出铜绿假单胞菌的随访分析结果 在糖尿病足组中,有 6 例患者连续 2 次(每

次间隔 1 个月)及以上培养出铜绿假单胞菌,合计 19 株。对照组不存在连续 2 次及以上培养出铜绿

假单胞菌的情况。有 5 例糖尿病足患者感染携带 *exoS* 的铜绿假单胞菌,其中有 2 例培养出耐药铜绿假单胞菌,耐药率为 23.5% (4/17),均出现在治疗的初期和中期,在末次培养时均转为敏感铜绿假单

胞菌;有 1 例患者创面中含有携带 *exoU* 的铜绿假单胞菌,耐药率为 50.0% (1/2),首次培养为耐药菌,末次培养为敏感菌。见表 2。

表 2 多次培养出铜绿假单胞菌的抗生素敏感性随访结果

随访次数	1		2		3		4		5		6		7		临床结局
	敏感性	毒力基因	敏感性	毒力基因	敏感性	毒力基因	敏感性	毒力基因	敏感性	毒力基因	敏感性	毒力基因	敏感性	毒力基因	
1	敏感	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>	耐药	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>	耐药	<i>exoS</i>	耐药	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>	愈合
2	敏感	<i>exoS</i>	耐药	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>									愈合
3	敏感	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>									愈合
4	耐药	<i>exoU</i>	敏感	<i>exoU</i>											愈合
5	敏感	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>											愈合
6	敏感	<i>exoS</i>	敏感	<i>exoS</i>											愈合

注:每月随访 1 次

### 3 讨论

**3.1 糖尿病的最大危害是其并发症,随着糖尿病患病率的升高,其并发症的发生率也呈上升趋势。糖尿病足是糖尿病患者最严重的并发症之一,也是糖尿病患者住院医疗费用高昂的常见原因<sup>[7]</sup>。40%~80%的糖尿病足创面发生 DFI。DFI 是导致患者病情恶化、截肢和死亡的最重要原因之一,也是住院和医疗费用增加的常见原因<sup>[8,9]</sup>。足溃疡患者感染发生率高,40%~70%的足溃疡患者就医时已经发生 DFI<sup>[10,11]</sup>。总体来说,我国糖尿病足感染革兰阳性菌与革兰阴性菌比例大致相当<sup>[12]</sup>,但由于我国地域广阔,不同地区之间感染的病原学也各有特点<sup>[10,13]</sup>。概括来说,浅表的足溃疡感染以革兰阳性菌为主,多以单一菌感染为主;深部足溃疡感染以革兰阴性菌为主,且混合菌感染比例较高<sup>[12-15]</sup>。多次重复住院以及抗生素的不规范使用是导致条件致病菌(如铜绿假单胞菌)成为 DFI 最常见的革兰阴性致病菌之一<sup>[2,3,16,17]</sup>。近年来由于抗生素的不规范使用,MDRPA 检出率越来越高,使铜绿假单胞菌感染治疗愈加困难<sup>[18-20]</sup>。铜绿假单胞菌具有 I、II、III、V、VI 5 种不同的蛋白分泌系统,其中 T3SS 是主要的毒力系统。目前确定的铜绿假单胞菌 T3SS 的效应蛋白有 ExoS、ExoU、ExoT、ExoY。当细菌与宿主细胞相互接触作用时 T3SS 激活,先在宿主细胞膜表面形成一个小孔,然后细菌高效地将毒力蛋白注入到宿主细胞中,造成宿主细胞的感染和病变,使得宿主细胞的形态变圆并最终导致死亡<sup>[21]</sup>。研究证明 *exoS* 与 *exoU* 基因是互斥的,即其产生的毒力蛋白 ExoS 与 ExoU 一般不能同时存在。ExoS 是一个具有 GTP 酶激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP)活性和磷酸腺苷核**

糖基转移酶(ADP-ribosyl transferase, ADPRT)活性的双功能蛋白,ADPRT 会引起宿主细胞骨架的破坏,抑制 DNA 合成、囊泡运输和内存作用<sup>[22]</sup>。ExoU 是一种毒力强大的磷脂酶,其毒力比 ExoS 大 100 倍以上,可以使细胞膜损伤而导致细胞快速坏死<sup>[22]</sup>。ExoU 还可抑制半胱天冬酶-1(caspase-1)介导的促炎症细胞因子的产生<sup>[23]</sup>。在急性肺感染的小鼠模型中,ExoU 可导致广泛的组织损伤,并可以杀死中性粒细胞,导致局部免疫抑制<sup>[24]</sup>。

**3.2 无论在糖尿病足创面,还是非糖尿病的创面,都是以携带 *exoS* 的铜绿假单胞菌为主,而携带毒力较强的 *exoU* 基因的铜绿假单胞菌较少。携带 *exoS* 和携带 *exoU* 的铜绿假单胞菌均存在抗生素耐药情况,但携带 *exoU* 的铜绿假单胞菌的耐药率要高于携带 *exoS* 的铜绿假单胞菌。从整体来看,虽然糖尿病创面和对照组耐药率差异无统计学意义,但糖尿病创面中的铜绿假单胞菌有发生耐药的趋势。这与糖尿病患者长期高血糖,导致自身清除细菌的能力下降有关,也与糖尿病足感染患者病程较长,感染部位较深,使用抗生素时间较长有关,对一些优势细菌杀灭以后,导致这些如铜绿假单胞菌在内的条件致病菌成为创面的主要致病菌,且往往存在多重抗生素耐药,给临床治疗带来了困难<sup>[4]</sup>。**

**3.3 由于糖尿病足创面病程较长,故在本研究中,有 6 例 DFI 患者至少 2 次以上培养出铜绿假单胞菌。这对于动态研究铜绿假单胞菌有重要意义。课题组发现携带 *exoS* 的铜绿假单胞菌与携带 *exoU* 的铜绿假单胞菌不会同时共存于糖尿病足创面,但是抗生素敏感的铜绿假单胞菌与 MDRPA 可以同时出现在一个创面中,这就提示我们可以针对携带 *exoS***

的铜绿假单胞菌与携带 *exoU* 的铜绿假单胞菌采取不同的策略来清除。虽然铜绿假单胞菌的存在使糖尿病足创面愈合时间明显延长,但本研究中大部分患者最终创面愈合。

**3.4** 本课题对于铜绿假单胞菌的 T3SS 的毒力因子进行了鉴定,并分析了其与抗生素敏感性的关系。本研究的一个优势就是对于创面连续多次培养出的铜绿假单胞菌进行随访,并得到了初步的结果。但这些携带不同毒力基因的铜绿假单胞菌与抗生素耐药的关系,还需要进一步去研究其机制,从而为临床消灭铜绿假单胞菌提供更好的基础。

综上所述,在糖尿病足创面中,以携带 *exoS* 的铜绿假单胞菌为主。在整个感染过程中,尽管抗生素的敏感性会发生改变,但细菌的类型不会发生改变。携带 *exoS* 和 *exoU* 的铜绿假单胞菌均可以导致抗生素耐药。感染铜绿假单胞菌临床治疗时间长,往往需要抗生素联合外科手术治疗,但大多数创面经过综合治疗最终可以愈合。

#### 参考文献

- 1 Prompers L, Huijberts M, Schaper N, et al. Resource utilisation and costs associated with the treatment of diabetic foot ulcers. Prospective data from the Eurodiale Study [J]. *Diabetologia*, 2008, 51 (10): 1826 – 1834.
- 2 Ertugrul BM, Oncul O, Tulek N, et al. A prospective, multi-center study: factors related to the management of diabetic foot infections [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(9): 2345 – 2352.
- 3 Shanmugam P, Jeya M, Linda SL, et al. The bacteriology of diabetic foot ulcers, with a special reference to multidrug resistant strains [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(3): 441 – 445.
- 4 Zhang J, Chu Y, Wang P, et al. Clinical outcomes of multidrug resistant pseudomonas aeruginosa infection and the relationship with type III secretion system in patients with diabetic foot [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2014, 13(3): 205 – 210.
- 5 孙 茜,王鹏华,李代清. 糖尿病足多重耐药铜绿假单胞菌感染情况及危险因素分析 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2012, 5(1): 15 – 18.
- 6 Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(3): 268 – 281.
- 7 Whiting DR, Guariguata L, Weil C, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94(3): 311 – 321.
- 8 Jiang Y, Ran X, Jia L, et al. Epidemiology of type 2 diabetic foot problems and predictive factors for amputation in China [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2015, 14(1): 19 – 27.
- 9 Hicks CW, Selvarajah S, Mathioudakis N, et al. Burden of Infected Diabetic Foot Ulcers on Hospital Admissions and Costs [J]. *Ann Vasc Surg*, 2016, 33: 149 – 158.

- 10 李永恒,何利平,王 椿,等. 糖尿病足合并感染患者 532 株病原菌分布及耐药性分析 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2011, 3(4): 296 – 300.
- 11 Jia L, Parker CN, Parker TJ, et al. Incidence and risk factors for developing infection in patients presenting with uninfected diabetic foot ulcers [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177916.
- 12 姜玉峰,付小兵,陆树良,等. 中国人群体表慢性难愈合创面病原微生物学特征分析 [J]. *感染、炎症、修复*, 2011, 12(3): 134 – 138.
- 13 徐 波,杨彩哲,刘朝阳,等. 糖尿病足感染患者病原菌分布及其药物敏感试验 [J]. *中华传染病杂志*, 2016, 34(6): 344 – 348.
- 14 郭 婕,王鹏华,褚月颖,等. 不同深度糖尿病足感染患者的临床表现、病原菌特点及耐药性研究 [J]. *中国全科医学*, 2012, 15(34): 4012 – 4015.
- 15 农月稠,黄秀禄,谭小燕,等. 负压引流治疗糖尿病足溃疡合并耐药菌感染的效果观察 [J]. *中国临床新医学*, 2015, 8(5): 465 – 467.
- 16 中华医学会糖尿病学分会,中华医学会感染病学分会,中华医学会组织修复与再生分会. 中国糖尿病足防治指南(2019 版) (III) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2019, 11(4): 238 – 247.
- 17 国际糖尿病足工作组编著,徐俊译,王鹏华审. 第六章, IWGDF 糖尿病足感染与诊断指导 [A]. 国际糖尿病足工作组预防和处埋糖尿病足问题指导(2015 版) [M]. 天津:天津科技翻译出版有限公司, 2019: 83 – 149.
- 18 Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, et al. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options [J]. *Pharmacotherapy*, 2005, 25 (10): 1353 – 1364.
- 19 Bradbury R, Champion A, Reid DW, et al. Poor clinical outcomes associated with a multi-drug resistant clonal strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the Tasmanian cystic fibrosis population [J]. *Respirology*, 2008, 13(6): 886 – 892.
- 20 Yang MA, Lee J, Choi EH, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children over ten consecutive years: analysis of clinical characteristics, risk factors of multi-drug resistance and clinical outcomes [J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(5): 612 – 618.
- 21 Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9): 654 – 665.
- 22 Iwańska A, Nowak J, Skorupa W, et al. Analysis of the frequency of isolation and drug resistance of microorganisms isolated from the airways of adult CF patients treated in the Institute of Tuberculosis and Lung Disease during 2008 – 2011 [J]. *Pneumonol Alergol Pol*, 2013, 81(2): 105 – 113.
- 23 Diaz MH, Shaver CM, King JD, et al. *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(10): 4414 – 4421.
- 24 Stentz FB, Kitabchi AE. Activated T lymphocytes in Type 2 diabetes: implications from in vitro studies [J]. *Curr Drug Targets*, 2003, 4(6): 493 – 503.