

• 论 著 •

铜绿假单胞菌外排泵及整合子与碳青霉烯类耐药中的关系*

李 翔, 陈 辉, 伍 勇, 漆 涌, 陈 体
(中南大学湘雅三医院检验科, 长沙 410013)

摘要:目的 明确金属酶、整合子和外排泵在铜绿假单胞菌碳青霉烯类耐药中的作用。方法 对 42 株泛耐药铜绿假单胞菌采用 K-B 法检测 MIC 值, 双纸片扩散法测金属 β -内酰胺酶(MBL), PCR 扩增整合子并测序基因盒, real-time PCR 检测 oprM 基因表达, western blot 检测外膜蛋白。结果 亚胺培南耐药率高达 45.23%, 美罗培南耐药率 71.42%; 检出有 22 株产 MBL; I 类整合子检出率 52.30%, 携带 dhfrXII-orfF-aadA2 和 aacA4-blaVIM-4 两种类型的基因盒组合形式; oprM 基因高表达细菌是低表达细菌的 3.56 倍; 25 株高表达 MexAB-OprM 外膜蛋白。结论 金属酶、整合子均不是铜绿假单胞菌对碳青霉烯类耐药的主要原因, MexAB-OprM 高表达致美罗培南耐药。各种耐药机制相互影响, 并相互协同。

关键词:整合子类; 细菌外膜蛋白质类; 金属蛋白酶; 假单胞菌铜绿; 碳青霉烯类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0006-03

Interrelationship of outer membrane protein OprM, integron and metallo- β -lactamase among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains

Li Xiang, Chen Hui, Wu Yong, Qi Yong, Chen Ti

(Department of clinical laboratory, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To identify the role of different resistance mechanism that conferred to carbapenem resistance phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Methods** Forty-two pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from the Third Xiangya Hospital. MICs were determined by K-B test; double-disk synergy test were used to detect MBL; PCR assays were performed for identification of integron, and variable region were sequenced; quantitative real-time PCR were used to analyze the expression of oprM gene; the expression of outer membrane protein were investigated by Western blot. **Results** The isolates was highly carbapenem-resistant (MICs of meropenem and imipenem ranged 2~64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). 22 strains produced MBL. 22 strains (52.3%) contained class 1 integron, harboring variable region; dhfrXII-orfF-aadA2 and aacA4-blaVIM-4. The level of oprM in higher group is 3.56 times of the lower one. The isolates over-expressed efflux pumps MexAB-OprM. **Conclusion** Over-expression of MexAB-OprM contributes to the meropenem resistance of the strains. The contribution of MBL and integron to carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* were highly evaluated, however, they have a mutual enhancement for drug-resistance.

Key words: carbapenems; integron; outer membrane protein; metallo- β -lactamase; pseudomonas aeruginosa

铜绿假单胞菌是院内感染常见致病菌, 由于广谱抗生素的广泛应用, 加之铜绿假单胞菌对多种抗生素存在天然和获得性的多重耐药, 出现了多药耐药菌株(MDRPA), 甚至泛耐药菌株, 给由此导致的感染治疗加深了难度。碳青霉烯类抗生素通常被用作治疗多药耐药铜绿假单胞菌感染, 然而, 随着临床广泛应用, 对其耐药的铜绿假单胞菌比例也有所增加。鉴于其复杂的耐药机制, 本文从产金属 β -内酰胺酶(MBL)、外排泵高表达及整合子传递耐药性三方面, 分析铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制, 并分析三者之间的相互作用机制, 并报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 收集 2007 年 1~7 月本科微生物室分离所得的铜绿假单胞菌多药耐药株(排除同一患者同一部位重复分离的菌株)42 株。其中痰标本 33 株, 创面分泌物标本 5 株, 血液标本 2 株, 胸水标本 2 株。菌种鉴定采用 Vitek2 系统(BioMerieux, 法国), 亚胺培南、美罗培南由杭州默沙东制药有限公司生产。药敏判定标准按照美国临床和实验室标准协会(CLSI 2006)规定, 以铜绿假单胞菌(ATCC27853)为质控菌株。O1 群霍乱弧菌 SK10 为第一类整合子阳性对照; E. coli C600 为阴性对照由

华南理工大学轻工与食品学院石磊教授提供。

1.2 仪器及试剂 Mini Gel 电泳槽、Mini-PROTEIN II cell 电泳仪、转印槽均购自美国 Bio-RAD 公司, GDS-800 UVP 凝胶成像系统为美国 UV 公司产品, real time PCR 仪(Eppendorf, 德国)。OprM 多克隆抗体(一抗)由 Tokai University School of Medicine, Japan, Eisaku Yoshihara 教授惠赠, 羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术公司。引物合成及测序均交上海生工公司。

1.3 方法 (1)双纸片协同实验检测金属酶:参照文献[1]报道的方法, 采用 EDTA 协同实验, 加 EDTA 的抑菌圈直径比不加的大于或等于 5 mm 判断为 MBL 阳性。(2)PCR 检测整合子:菌种复苏增殖后, 采用煮沸裂解法提取细菌总 DNA。分别以 I 类整合酶(上游 5'GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG 3', 下游 5'ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC 3')和整合子可变区(上游 5'GGC ATC CAA GCA GCA AG 3', 下游 5'AAG CAG ACT TGA CCT GA 3')设计引物扩增 I 类整合子和整合子可变区[2]。限制性片段长度多态性(RFLP)分析整合子基因盒插入区的扩增片段, 经 Hinf I 核酸内切酶酶切后电泳分析其类型。同一大小整合子可变区扩增片段经 Hinf I 酶

* 基金项目: 2006 年湖南省卫生厅科研基金(B2006091); 2008 年湖南省自然科学基金(08JJ3069); 2006 年中南大学研究生教育创新工程(2340-76313)。 Δ 通讯作者, E-mail: wuyong_xy@yahoo.com.cn。

切后,若得到相同的酶切图谱,可以推知同样大小的基因盒片段是相同的 DNA 序列。取不同大小的整合子可变区 PCR 产物送测序。(3) 外排泵 MexAB-OprM 的 oprM 的 real-time PCR: 采用 TransStart Green qPCR SuperMix UDG 试剂盒(北京全氏金公司)。oprM 引物序列(上游 5' CCA TGA GCC GCC AAC TGT C 3', 下游 5' CCT GGA ACG CCG TCT GGA T 3')。原核生物已知的 16 s DNA 作内参照基因。反应条件: 95 °C 7 min; 95 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 40 s, 40 个循环; 72 °C 40 s, 荧光信号于 72 °C 读取采集。(4) 外膜蛋白提取: 从血平板上挑取纯菌落到 LB 培养液中, 振荡, 过夜, 培养至对数生长期。以离心半径 8 cm 7 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 收集细菌, 用 PBS 洗涤并悬浮细菌。置冰浴超声碎菌 10 min, 每次 0.5 min, 间隔 5 s, 频率为 6 kg。以离心半径 8 cm 7 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 弃未破碎细胞。取上清液, 以离心半径 8 cm 10 000 r/min 4 °C 离心 2 h, 弃上清, 将沉淀颗粒悬浮于 1 mL PBS 中(内含 2% 十二烷基硫酸钠 SDS), 室温作用 30 min, 将此悬液室温离心 1 h, 弃上清, 并用 1% SDS 洗涤 1 次。离心提纯后的外膜蛋白依据量的多少悬浮于 20~60 μL PBS 中。用紫外分光光度计测吸光度 A, 采用公式: 蛋白浓度(mg/mL) = 1.5 × A₂₈₀ - 0.75 × A₂₆₀, 将蛋白浓度调至 40 mg/mL。(5) Western 印记: 取 50 mg 蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后转移到硝酸纤维素膜(NC)上, 封闭, 洗膜, 并用一抗 OprM(1 : 200) 兔多克隆抗体孵育, 再加二抗(羊抗兔 IgG 1 : 5 000), 化学发光(Pierce, 美国)检测结果。

2 结 果

2.1 碳青霉烯类抗生素耐药情况 亚胺培南耐药率 45.23% (19/42), MIC ≥ 16 μg/mL; 美罗培南耐药率 71.42% (30/42), MIC ≥ 16 μg/mL; 两者均耐药 30.95% (13/42)。

2.2 金属酶的检测 检出产金属酶 22 株, 阳性率 53.38%。经 χ^2 检验, MBL 在亚胺培南中敏感、耐药差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 14.092, P = 0.000$); 在美罗培南中差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.038, P = 1.000$)。由此可知, 本院分离的铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药性与产金属 β -内酰胺酶直接相关, 见表 1。

2.3 整合子检测 I 类整合子检出率 52.30% (22/42), 在整合子阳性的细菌中还检出 1.8、1.0 kb 两种大小的整合子可变区。经测序得知携带两种基因盒: dhfr VII-orfF-aadA2 和 aacA4-blaVIM-4, 分别编码对磺胺类、氨基糖苷类、碳青霉烯类的耐药。本研究, 将整合子对美罗培南 ($\chi^2 = 0.138, P = 0.710$) 以及亚胺培南 ($\chi^2 = 0.700, P = 0.403$) 的耐药率比较, 差异无统计学意义, 故细菌携带整合子不是碳青霉烯类抗生素耐药的原因。

2.4 外排泵结构基因 oprM 的表达检测 ATCC27853 (PA01) 作为外排泵系统的阴性对照株, 因为其对各种抗生素的敏感性稳定, 不携带耐药基因。real-time PCR 显示, 本实验临床分离株均有 oprM 的表达, 以 PA01 的 Ct(oprM) = 14.99 为标准, 有 17 株高表达 oprM 基因 (Ct > 14.99)。数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 计算可得细菌高表达 oprM 基因的表达水平是低表达细菌的 3.56 倍。

2.5 外排泵膜蛋白表达检测 外排泵在铜绿假单胞菌 ATCC27853 不表达, 故 Western 印记阳性株即为高表达株。实验发现 42 株临床分离株中, 有 25 株 (59.50%) 高表达相对分子质量为 51×10^3 的 OprM 外膜蛋白。表达外膜蛋白 OprM 的菌株中, 高表达组对美罗培南的耐药率为 76.00% (19/25) 与低表达组耐药率 24.00% (6/25) 比较, 差异有统计

学意义 ($\chi^2 = 5.203, P = 0.029$); 高表达组对亚胺培南耐药率 80.90% (17/21) 与低表达组耐药率 19.00% (4/21) 比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 4.365, P = 0.053$)。以上数据提示, MexAB-OprM 高表达与美罗培南的耐药有关联, 而与亚胺培南耐药性的产生关系不明确。

表 1 临床分离菌 42 株产 MBL 和整合子的统计分析情况 (n)

MBL 阳性	MBL 阴性	统计	INT 阴性	统计
IPM 耐药	17	4	13	8
IPM 敏感	5	16	8	13
MEM 耐药	16	14	15	15
MEM 敏感	6	6	7	—

注: MBL 为金属 β -内酰胺酶; INT 为整合子; 统计学处理采用 χ^2 检验。“—”表示无数据。

3 讨 论

2004~2005 年住院患者细菌耐药性监测显示, 革兰阴性菌中铜绿假单胞菌为第四大感染细菌, 占 34.30%, 其对美罗培南的耐药率为 2.20%, 对亚胺培南的耐药率为 9.80%。碳青霉烯类仍然是最强的抗生素, 头孢哌酮/舒巴坦也是对阴性杆菌抗菌谱很广的抗生素, 甚至超过碳青霉烯类, 具有重要的临床意义^[3]。然而, NPRS 2001 年结果提示, 亚胺培南不敏感的铜绿假单胞菌高达 20%~40%^[4]。本研究所选的细菌为临床多耐药菌株, 抗生素不敏感率相对较高。

本研究中金属 β -内酰胺酶检出率为 53.38%, 对 IMP 耐药的铜绿假单胞菌产 MBL 率为 84.20%, 对 MEM 耐药的铜绿假单胞菌产 MBL 率为 53.30%, 可见, 产金属 β -内酰胺酶更易导致对 IMP 的耐药。本院分离菌株中 MBL 的携带水平较高, 是 2007 年国内某地区的 MBL 检出率的十倍, 而国外金属 β -内酰胺酶检出率相对较低^[5-7]。随着时间的推移及药物应用日益广泛, 细菌对抗生素的耐药性在不断增强。有日本学者研究表明, 在强启动子下金属酶可以表达很高的活性, 而引起高水平的亚胺培南耐药, 推测本实验中 MBL 与 IMP 的耐药相关性有可能也是由此机制引起^[8]。

在本课题组之前的研究中, 曾在 1 株全耐药的铜绿假单胞菌中检测到了 1.8 kb 的整合子可变区, 与耐药表型相符合, 证实了整合子在耐药传播, 特别是多重耐药菌株的产生与水平播散中起着非常重要的作用。测序可知, 整合子上携带了多种抗生素的耐药基因盒, 其中 2 株携带有 blaVIM-4, 编码碳青霉烯类抗生素的耐药性。该株细菌还产 MBL, 经测序可知携带 1.0 kb 的 I 类整合子, 其基因盒包含 blaVIM-4 基因, 说明此株细菌产金属 β -内酰胺酶为 VIM 亚型, 且由整合子携带传播。

外排泵家族成员很多, 可导致 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类等的交叉耐药或敏感性降低^[9]。OprD 作为亚胺培南的特异性通道, 其缺失普遍被认为与亚胺培南耐药有关, RND 家族的 4 个成员 MexAB-OprM、MexEF-OprN、MexCD-OprJ、MexXY-OprM 也证实与铜绿假单胞菌的耐药性有关^[10-11]。MexAB-OprM 可以有效地将美罗培南排出菌体, MexEF-OprN 介导包括喹诺酮类抗生素的耐药, 而 MexCD-OprJ 则不连续表达, 对抗生素抗性的影响甚微^[12]。本实验中 PA06、PA23、PA26、PA38 对碳青霉烯类抗生素全耐药, 但却没有外膜蛋白 OprM 表达, 推测有其他未知耐药机制起作用, 表明铜绿假单胞菌的耐药性是由多种机制决定, 是多方力量的协同和拮抗的表现^[13]。

以上 3 种耐药机制, 都在一定程度上诱导了耐碳青霉烯类

的铜绿假单胞菌的产生,尤其外膜蛋白 MexAB-OprM 高表达,及整合子携带的 MBL 传播,同时,还有三者之间的协同作用,加速了医院获得性耐药菌的流行。但不可否认,细菌耐药并非由 1 种机制决定,医院应及时监测细菌耐药情况,调整抗生素的合理使用,延缓耐药细菌的迅速蔓延。

参考文献

- [1] Lee K, Chong Y, Shin HB, et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(2): 88-91.
- [2] 伍勇, 李翔, 陈辉, 等. 肝移植术后感染致病菌的整合子基因序列分析[J]. *检验医学*, 2008, 23(3): 242-245.
- [3] 顾俊明, 李家泰, 王镇山, 等. 2004~2005 年住院患者细菌耐药监测研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(6): 615-622.
- [4] 王辉, 陈民均. 中国 NPRS 耐药监测网 1994~2001 年中国重症监护病房非发酵糖菌的耐药变迁[J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(7): 385-390.
- [5] 王贵年, 姜波, 吴金英. 铜绿假单胞菌产金属 β -内酰胺酶的临床调查研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(10): 899-901.
- [6] Sadera HS, Castanheira M, Mendes RE, et al. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program[J]. *Int J Antimicrob*, 2005, 25: 57-61.
- [7] Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, et al. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11): 4062-4070.
- [8] Shinobu T, Toru N, Fumiaki I, et al. Overproduction of a Metallo- β -Lactamase by a strong promoter causes high-level imipenem resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Chemotherapy*, 2008, 54: 181-187.
- [9] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare[J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 34: 634-640.
- [10] Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47: 247-250.
- [11] Mine T, Morita Y, Kataoka A, et al. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43: 415-417.
- [12] Dumas JL, Van Delden C, Perron K, et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 254: 217-225.
- [13] 魏树全, 赵子文, 钟维农, 等. 泛耐药铜绿假单胞菌肺炎危险因素病例对照研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(6): 373-376.