

• 临床检验研究论著 •

耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药表型及基因型分析

胡 琴¹, 聂署萍², 吴润香², 凌利芬², 王 琼², 黄 烈^{2△}

(1. 广东省深圳市龙岗区人民医院检验科 517182; 2. 广东医学院附属
深圳市福田区人民医院检验医学部 518033)

摘要:目的 了解深圳福田人民医院铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制,为临床合理使用抗生素提供参考依据。方法 用 E-test 试剂条检测铜绿假单胞菌对哌拉西林、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星 7 种抗生素的最小抑菌浓度,用三维实验对产 AmpC、KPC 酶菌株的耐药表型进行确认,金属酶的表型确证实验则采用 EDTA 双纸片扩散法。用 PCR 方法检测 *AmpC*、*VIM-1*、*VIM-2*、*IMP-1*、*SPM*、*KPC* 及 *OprD* 7 个基因型,并分析表型和基因型之间的关系,质粒接合实验用来证实耐药基因的传播性。结果 29 例铜绿假单胞菌均为多重耐药菌株,且对亚胺培南、美罗培南及庆大霉素耐药率最高,3 种药物最小抑菌浓度分别为 32、32、256 $\mu\text{g/mL}$ 。26 株携带有 *AmpC* 基因的铜绿假单胞菌仅有 5 株为持续高表达菌株,18 株金属酶阳性菌中有 15 株与 *VIM-2* 基因型检测一致,其余 3 株 *VIM-2* 基因型阴性,并有 1 株为 *VIM-2* 基因型阳性但金属酶阴性。29 株中检测出 8 株携带 *OprD* 基因,外膜蛋白缺失率为 72% (21/29),其余基因型均阴性。结论 该院铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的耐药机制主要为产金属酶及外膜蛋白缺失,碳青霉烯类抗生素的不合理使用将加剧该类药物的耐药性。

关键词:铜绿假单胞菌; 碳青霉烯类; 耐药性; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)11-1305-03

Genotypes and phenotypes analysis of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Hu Qin¹, Nie Shuping², Wu Runxiang², Ling Lifeng², Wang Qiong², Huang Lie^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Longgang District People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 517182, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Futian Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518033, China)

Abstract: **Objective** To explore the present levels and major drug-resistant mechanisms to Carbapenems of *Pseudomonas aeruginosa* in People's Hospital of Futian Shenzhen, and to provide references for reasonable usage of antibiotics. **Methods** Minimal inhibitory concentration (MIC) of *Pseudomonas aeruginosa* to 7 antibiotic agents, including piperacillin, ceftazidime, imipenem, meropenem, gentamicin, tobramycin and ciprofloxacin were determined by E-test strips. MBLs, KPC and AmpC were detected by double disks synergy tests, 3-D tests and 3-D tests respectively. 7 genes, including *AmpC*, *VIM-1*, *VIM-2*, *IMP-1*, *SPM*, *KPC* and *OprD*, were detected by polymerase chain reaction. The correlation between phenotype and genotype were analyzed. Transmission of resistant genes were proved by plasmid conjugation test. **Results** All 29 Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were multidrug-resistant strains, with high resistant rate to imipenem, meropenem and gentamicin, with MIC of 32, 32 and 256 $\mu\text{g/mL}$ respectively. 5 of 26 *Pseudomonas aeruginosa*, carrying *AmpC* resistant gene, were with persistent hyperexpression of AmpC beta-lactamase. 18 strains were positive with MBLs, 15 strains of which were coincident with the *VIM-2* genotypes, and the other 3 MBLs positive strains were negative with *VIM-2* gene, but 1 strain was *VIM-2* gene positive and MBLs negative. 8 strains of 29 *Pseudomonas aeruginosa* were positive with *OprD* gene, and the miss rate of outer membrane protein was 72% (21/29). Other genes could not be detected in this research. **Conclusion** Major drug-resistant mechanisms to Carbapenems were producing MBLs and loss of outer membrane protein. Unreasonable usage of Carbapenems might aggravate their drug-resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenem; drug resistance; genotype

碳青霉烯类抗生素常被认为是治疗多重耐药革兰阴性杆菌感染的最后一道防线,也是目前临床上治疗多重耐药铜绿假单胞菌感染较为有效的药物^[1],但是随着该类药物在临床上的广泛使用,其耐药性问题也日渐凸显,Volter 等^[2]报道在波多黎医疗中心医院,铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率高达 46.9%。目前,耐碳青霉烯铜绿假单胞菌已是一个全球性问题,铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的机制主要有产生碳青霉烯酶、金属酶、外膜蛋白缺失、主动外排泵等^[3-4],为了解铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制,为临床合理使用抗生素提供参考依据,本文在基因水平上对碳青霉烯几种水解酶及外膜蛋白进行分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 从深圳市福田区人民医院 2005 年 8 月至 2007 年 9 月收集的铜绿假单胞菌临床分离株保存菌种中挑选出对碳青霉烯类抗生素(亚胺培南和/或美罗培南)表现不敏感的菌株,所有菌株均经法国生物梅里埃公司细菌鉴定系统鉴定到种。质控菌株:大肠杆菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2 方法

1.2.1 最小抑菌浓度(MIC)的测定 用 E-test 法检测耐碳青霉烯铜绿假单胞菌对哌拉西林、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星 7 种抗生素的 MIC,严格遵守临床实验室标准化协会(CLSI)相关操作规程。

△ 通讯作者, E-mail: amwgqjo@126.com。

1.2.2 酶表型确证实验 根据参考文献的方法^[5], 分别对 AmpC 酶、金属酶及 KPC 酶进行表型确证实验, 其中 AmpC 酶及 KPC 酶确证实验均采用三维实验, 酶粗提液采用反复冻融法, AmpC 酶确证采用的纸片为头孢西丁, KPC 酶确证采用的纸片为亚胺培南, 35℃培养过夜后若在画线处有大肠埃希菌的矢状生长则视为 AmpC 酶或 KPC 酶阳性。金属酶表型确

证实验采用 EDTA 双纸片扩散法, 严格遵守药敏实验操作规程, 加 EDTA 的亚胺培南或美罗培南纸片抑菌圈直径比不加 EDTA 的大 7 mm 或 7 mm 以上, 则为金属酶阳性。

1.2.3 几种耐药基因的 PCR 检测及 DNA 测序 对 *AmpC*、*VIM-1*、*VIM-2*、*IMP-1*、*SPM*、*KPC* 及 *OprD* 几种耐药基因进行 PCR 检测, 并用 DNA 测序进行比对, PCR 引物见表 1。

表 1 几种耐药基因的 PCR 引物

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物长度(bp)
<i>AmpC</i>	TGG CGC TGC AAC CTA CAC AGG A	CCG CTC GGC ATT GGG ATA G	174
<i>IMP-1</i>	TAC GGC TAA AGA TAC TGA A	TAA CCG CCT GCT CTA ATG T	491
<i>SPM-1</i>	CCC CAC TAC GAA AGC CCA CA	TCC CGC AAC GAG CAA CAA	459
<i>OprD</i>	CGG CGA CAT CAG CAA CAC C	CTG GCG GAT ACG GAA CGA CAG	431
<i>KPC</i>	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GC	GGT CGT GTT TCC CTT TAG CC	174
<i>VIM-1</i>	CAG TCT CCA CGC ACT TTC A	GCA CAA CCA CCG TAT AGC AC	268
<i>VIM-2</i>	TCC GAC AGT CAG CGA AAT	GCA GCA CCA GGA TAG AAG A	435

1.2.4 质粒接合实验 根据文献^[6]方法进行改良。将铜绿假单胞菌供体菌和大肠埃希菌 ATCC25922 受体菌制成 0.5 个麦氏单位的菌悬液, 将供体菌和受体菌加入 1 mL LB 液体培养基中, 混匀, 35℃孵育 1 h, 将混合菌悬液接种到含 10 μg/mL 头孢他啶的麦康凯选择平板上, 并用灭菌水代替铜绿假单胞菌同上述操作分别在含 10 μg/mL 头孢他啶的麦康凯选择平板和不含抗生素的麦康凯平板上画线做空白对照和阳性对照, 大肠杆菌 ATCC25922 分别做空白及阳性对照, 35℃培养 24~48 h, 挑取单个粉红色菌落转种在含 10 μg/mL 头孢他啶的麦康凯选择平板上, 35℃过夜培养, 菌株经 ATB Expression 细菌鉴定仪 API ID 32 GN 鉴定试条鉴定后提取细菌总 DNA 进行 PCR 确证。

2 结 果

2.1 菌株来源 本实验从 119 株铜绿假单胞菌中检测出 29 株(24.4%)对碳青霉烯类抗生素(亚胺培南和/或美罗培南)表现不敏感的分离株, 这 29 株耐碳青霉烯铜绿假单胞菌中有 89.7%(26/29)来源于痰标本, 来自分泌物、膀胱尿液及粪便标本各 1 株, 患者平均年龄为 50 岁。

2.2 MIC 测定结果 29 株铜绿假单胞菌均为多重耐药菌株, 且对亚胺培南、美罗培南及庆大霉素耐药率最高, 均为 89.7%, 哌拉西林居第 2 位, 耐药率为 75.9%, 以下依次是妥布霉素、环丙沙星及头孢他啶, 耐药率分别为 72.4%、69.0% 和 44.9%。哌拉西林 MIC 最高达到 256 μg/mL, 亚胺培南、美罗培南及环丙沙星 MIC 最高达到 32 μg/mL, 庆大霉素、头孢他啶 MIC 最高达到 256 μg/mL, 妥布霉素 MIC 最高达 1 024 μg/mL。

2.3 酶表型确认实验结果 通过头孢西丁三维实验证实有 5 株为 AmpC 酶持续高表达菌株, 而金属酶表型确证实验的结果表明有 18 株为金属酶阳性菌株, KPC 酶确证实验均显示为阴性。

2.4 基因型检测及 DAN 测序结果 *AmpC* 阳性菌株 26 株, 携带率为 89%, *VIM-2* 阳性菌株 16 株, 携带率 55%, *OprD* 阳性 8 株, 外膜蛋白缺失率为 72%(21/29), 其余基因均阴性, 其中有 6 株携带有 *VIM-2* 基因并且外膜蛋白缺失, 尚有 4 株检测出 *OprD* 且没有携带 *VIM-2*。通过 DNA 测序并进行 BLAST 比对发现 *AmpC* 基因与登录号为 AB211126.1 的同源

性达 99%, *VIM-2* 基因与登录号为 EF645360.1 的同源性达 100%, 与登录号为 EF693947.1 的同源性达 99%, *OprD* 基因与登录号为 X63152.1 的同源性达 99%。

2.5 质粒接合实验结果 本研究挑选了 5 株携带 *VIM* 基因且金属酶表型确证实验均阳性的菌株作为质粒接合实验的供体菌, 经与受体菌按比例共同培养 24~48 h 后, 仅有 1 株证实为接合子。

3 讨 论

本研究中亚胺培南和/或美罗培南表现不敏感的菌株有 29 株(24.4%), 明显高于 Gales 等^[7]的报道(15%), 这可能与标本的来源及区域有关, 这 29 株铜绿假单胞菌中 89.7%来自老年患者的痰标本, 抗生素的不合理使用及长期的药物选择压力使得这些细菌极易产生获得性耐药。笔者同时对 AmpC 酶、金属酶、KPC 酶表型及其基因型进行了检测, 结果表明 26 株携带有 *AmpC* 基因的铜绿假单胞菌中仅有 5 株为持续高表达菌株, 这提示在本院 AmpC 酶虽不是碳青霉烯耐药的主要机制, 但是碳青霉烯类抗生素的不合理使用必然将对铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的现状雪上加霜。在 18 株金属酶阳性的菌株中有 15 株与 *VIM-2* 基因检测一致, 3 株确证实验阴性但 *VIM-2* 基因阴性, 尚有 1 株 *VIM-2* 基因阳性但确证实验阴性, 这提示有其他金属 β-内酰胺酶存在, 尚需进一步研究。还有 1 株 *VIM-2* 基因型阳性但确证实验阴性, 这可能与酶活性降低或消失和酶表达量较低有关。通过基因的检测分析还发现有 16 株携带 *VIM-2* 基因, 8 株携带 *OprD* 基因, 外膜蛋白缺失率为 72%(21/29), 其余基因型均阴性, 其中有 6 株携带有 *VIM-2* 基因并且外膜蛋白缺失, 这说明本院铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类抗生素的机制主要为产金属酶及外膜蛋白缺失, 并且部分菌株同时存在这 2 种耐药机制, 本研究还发现有 4 株检测出 *OprD* 且没有携带 *VIM-2*, 这说明铜绿假单胞菌还存在其他耐碳青霉烯机制。金属酶编码基因存在于染色体或质粒整合子的转位子上, 提示该类酶基因可在革兰阴性菌中水平传播。笔者用质粒接合实验验证这一结论, 结果有 1 株成功获得接合子, 这表明本院检测出的金属酶编码基因具有一定的传播性, 由于其既可能存在于可结合质粒上, 也可存在于非结合质粒上, 还可能以整合子的形式存在于染色体上, 因此检测出携带有金属酶耐药基因的菌株应引起临床及医院感染管理的足

够重视。KPC 酶是近年出现的一种新的碳青霉烯水解酶,该酶能水解碳青霉烯类、哌拉西林、头孢菌素和氨基糖苷类,酶抑制剂能抑制其活性,KPC 酶最先从肺炎克雷伯菌中分离出来,在美国国家较为流行^[8],本研究中基因型及表型均没有检测出 KPC 酶。

全国医院感染监测系统报告显示 1998~2002 年对亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌增加了 15%,有研究报道减少亚胺培南的使用并降低其暴露率能使健康人对亚胺培南的敏感性从 83%提高到 95%,使患者对亚胺培南的敏感性从 65%提高到 83%^[9],这表明限制并减少碳青霉烯类抗生素的使用将是改善其耐药性问题的有效方法。

参考文献

- [1] Maniati M, Ikonomidis A, Mantzana P, et al. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blaVIM-4/blaP1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(1): 132-135.
- [2] Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 β -Lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(4): 1660-1664.
- [3] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.
- [4] Urban C, Mariano N, Rahal JJ, et al. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin a-

gainst multidrug-resistant *acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2732-2734.

- [5] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1791-1796.
- [6] Pagani L, Colinson C, Migliavacca R. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo- β -lactamase[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3824-3828.
- [7] Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(4): 315-321.
- [8] Leavitt A, Chmelnitsky I, Ofek I, et al. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(2): 243-248.
- [9] Pakyz AL, Oinonen M, Polk RE. Relationship of carbapenem restriction in 22 university teaching hospitals to carbapenem use and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(5): 1983-1986.

(收稿日期: 2012-01-09)

(上接第 1304 页)

重视。本研究 196 例 CA 患者中, 20 岁以下者 4 例, 70 岁以上者 2 例(包括 1 例 70 岁的患者), 60 岁以上者 12 例, 20~60 岁者 180 例, 占患者总数的 91.84%(180/196); 提示肛门及肛管 CA 主要发生于性活跃的群体; 肛门及肛管 CA 往往容易复发, 这与 CA 治疗后, 其周围皮肤中仍然存在 HPV 有关^[9]。本研究 196 例肛门及肛管 CA 患者只有 133 例检出 HPV 阳性, 有 63 例为 HPV 阴性, 这说明 63 例 HPV 阴性的 CA 患者中存在着两种情况, 一是 HPV 阴性的 CA 中可能存在着 HPV 6、11、42、43、44 型以外的型别, 提示试剂厂家应开发出符合中国 CA 感染谱的低危型别的 HPV 检测试剂, 二是 HPV 阴性的 CA 在组织形态学上非常像 CA, 但实际上又不是 HPV 引起的病变, 也就是说很可能是一种假性湿疣。本研究的 196 例肛门及肛管 CA 患者中没有检测到 42、43、44 型 HPV, 提示 42、43、44 型 HPV 不是引起南京地区肛门及肛管 CA 病变的型别。本研究采用的高通量 HPV 分型检测技术不但能对细胞, 也能对组织标本进行检测, 不但能对新鲜标本进行实时研究, 而且还可对石蜡组织进行回顾性研究, 是 HPV 分型检测的一种快捷、实用、高通量的检测方法, 值得推广。

总之, 对直肠、肛门及肛管的 HPV 感染的研究才刚刚开始, 还有许多的问题需要研究者去探索 and 发现。由于 HPV 是人类良、恶性肿瘤的重要诱因, 值得研究者对其进行多中心大样本量的基因研究, 为肛门直肠恶性肿瘤的防治提供科学的依据^[8, 10-12]。

参考文献

- [1] Rasai J. 阿克曼外科病理学(上卷)[M]. 回允中, 译. 9 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 856-871.

- [2] 范文生, 李亚里, 杨怡卓, 等. 基因芯片技术检测宫颈病变中 HPV 感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(7): 745-747.
- [3] 毕蕙, 赵健, 陈锐, 等. 宫颈上皮内瘤变患者人乳头状瘤病毒感染亚型的分布差异[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(6): 367-370.
- [4] 耿建祥, 王旭波. 人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 144-230.
- [5] 王建英, 范明明, 吴效科, 等. 人乳头状瘤病毒感染及端粒酶 hTERT 表达与宫颈癌关系的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(12): 1321-1324.
- [6] 李海, 邓志勇, 张阳, 等. 人乳头瘤病毒在阴茎鳞癌组织中的表达及意义[J]. 现代实用医学, 2010, 22(9): 391-393.
- [7] 兰建云, 邵伟伟, 袁苏娟, 等. 外耳道乳头状瘤中的人乳头瘤病毒检测及其临床意义[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(4): 391-393.
- [8] 张金浩, 耿建祥, 吴崑崙, 等. 结直肠肿瘤中 HPV 感染的基因分析[J]. 医学研究生学报, 2011, 24(2): 154-157.
- [9] 赵敏, 张万宏, 董汉生, 等. 尖锐湿疣复发危险因素分析[J]. 中国皮肤性病杂志, 2010, 24(4): 337-339.
- [10] Papaconstantinou HT, Lee AJ, Simmang CL, et al. Screening methods for high-grade dysplasia in patients with anal condyloma[J]. J Surg Res, 2005, 127(1): 8-13.
- [11] Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions[J]. Vaccine, 2008, 26(1): 17-28.
- [12] Jiang P, Liu J, Zeng X, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 197(2): 174-178.

(收稿日期: 2011-08-08)