

• 临床检验研究论著 •

76 例耐亚胺培南铜绿假单胞菌 B 类碳青霉烯酶与耐药现状研究

王丽娟¹, 李武平¹, 史皆然¹, 徐修礼², 刘冰¹, 孙慧英¹, 马春丽¹

(第四军医大学西京医院:1. 感染管理科;2. 检验科, 陕西西安 710032)

摘要:目的 调查耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药现状及其 B 类碳青霉烯酶和膜孔蛋白基因的存在情况, 指导临床合理使用抗菌药物。方法 连续收集 2012 年 2 月至 2012 年 8 月该院临床标本中分离的耐亚胺培南铜绿假单胞菌共 76 株, 采用聚合酶链反应技术(PCR) 检测耐亚胺培南铜绿假单胞菌产碳青霉烯酶耐药基因及膜孔蛋白基因情况, 并通过药物敏感试验了解耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征。结果 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌主要分布在神经外科 ICU、神经内科 ICU、烧伤科, 分别占 36.8%、25.0%、13.2%; 所检菌株对多黏菌素 B 敏感, 对其余 9 种抗菌药物均不同程度耐药; 50 株携带 VIM 基因, 17 株携带 IMP 基因, 2 株携带 SIM 基因, 膜孔蛋白基因均未检出。结论 耐亚胺培南铜绿假单胞菌多药耐药及泛耐药现象严重, 其原因可能与多耐药基因表达及膜孔蛋白缺失有关, 耐药基因以 VIM、IMP 为主, 应加强耐药性监测, 合理使用抗菌药物, 防止耐亚胺培南铜绿假单胞菌的蔓延。

关键词:假单胞菌, 铜绿; 亚胺培南; 碳青霉烯酶; 细菌外膜蛋白质类; 抗菌性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0559-03

Investigation of class B Carbapenemase genes and drug resistance in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Wang Lijuan¹, Li Wuping¹, Shi Jieran¹, Xu Xiuli², Liu Bing¹, Sun Huiying¹, Ma Chunli¹

(1. Department of Infection Management; 2. Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital of the Forth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the class B carbapenemase genes and drug resistance in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, to guide correct use of antibiotics in clinical treatment. **Methods** 76 strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from hospitalized patients' samples from Feb 2012 to Aug 2012, then, 6 kinds of class B carbapenemase genes and porin protein oprD2 gene were analyzed by PCR, the antimicrobial drug sensitivity of which were tested by K-B disc diffusion method. **Results** Totally 76 strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from the neurosurgery ICU (36.8%), neurology ICU (25.0%), burn unit (13.2%). Drug resistance rate of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to polymyxin B can achieve 0, the drug resistance to the other 9 antibiotics were very high. 50 strains carried VIM gene, 17 strains carried IMP gene, 2 strains carried SIM gene and oprD2 genes were all lost. **Conclusion** Drug resistance of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is serious, the cause of which might be multiple resistant gene imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* expresses and porin protein missing, mainly to VIM and IMP. It is important to control bacterial resistance and prevent the spreading of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *pseudomonas aeruginosa*; imipenem; carbapenemases; bacterial outer membrane proteins; drug resistance

铜绿假单胞菌(PA)又称绿脓杆菌, 属革兰氏阴性杆菌, 广泛分布于自然界及健康人群的皮肤、肠道及呼吸道, 为一种能引起人和动物感染的条件致病菌^[1]。随着抗菌药物的广泛应用和不合理使用, 铜绿假单胞菌耐药现象越来越严重, 临床已分离到对常用革兰阴性菌抗生素和全部第三代头孢菌素, 乃至碳青霉烯类, 如亚胺培南耐药的三重耐药菌株, 这给临床治疗带来了。耐亚胺培南铜绿假单胞菌临床检出率呈逐年递增趋势, 其耐药机制与产生碳青霉烯酶有关, 本研究运用聚合酶链反应技术(PCR), 检测耐亚胺培南铜绿假单胞菌产碳青霉烯酶耐药基因情况, 并通过药物敏感试验了解耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及耐药基因型别。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集某大型教学医院 2012 年 2 月至 2012 年 8 月临床送检的住院患者各类非重复标本, 细菌分离及鉴定按《全国临床检验操作规程》要求执行, VITEK-2 全自动微生物分析仪鉴定, K-B 法检测亚胺培南的敏感性, 根据 CLSI2010 标准判定耐药(R)、中介(I)和敏感(S), 筛选出耐亚胺培南铜绿假

单胞菌 76 株, 其中痰液标本 58 株, 伤口或创面分泌物标本 11 株, 尿液标本 5 株, 引流液标本 2 株。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922, 铜绿假单胞菌 ATCC27853 为该院检验科保存。

1.2 仪器与试剂 VITEK-2 全自动微生物分析仪; 电热恒温培养箱及恒温摇床(上海基伟实验仪器公司); 超净工作台(苏州净化有限公司); 低温冰箱(ULT2178623V, 美国); PCR 扩增仪(ABI9600 型); DYYⅢ 2 型电泳仪(北京六一仪器厂); 数字化凝胶成像系统(上海日复)。M-H 琼脂和营养肉汤为北京奥博星生物技术公司产品, 药敏纸片购自英国 Oxoid 公司, 2×Taq PCR Master Mix、2000bp DNA Marker 为北京奥科生物技术有限公司产品, PCR 引物参照文献, 由西安沃尔森生物技术有限公司合成, 见表 1。

1.3 方法

1.3.1 制备细菌 DNA 模板 将实验菌株接种于 M-H 平板上, 置于 37℃ 恒温孵育箱中过夜孵育, 挑取单克隆菌落于 5 mL LB 培养液中, 37℃ 恒温摇床过夜, 吸取 0.5 mL 菌液于离心管中, 12 000 r/min 离心 1 min, 离心半径 8 cm, 弃上清液, 加入

300 μ L ddH₂O,置 98 ℃ 水浴箱中水浴 20 min 后于-20 ℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 PCR 扩增体系及反应条件 PCR 总反应体系为 20 μ L,其中 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 10 μ L,DNA 模板 2 μ L,上下游引物各 1 μ L,最后用灭菌双蒸水补足 20 μ L。PCR 反应条件为 93 ℃ 预变性 2 min,然后 93 ℃ 变性 60 s,55 ℃ 退火 60 s,72 ℃ 延伸 70 s,进行 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。产物长度小于 500 bp 的,反应条件为 93 ℃ 预变性 2 min,然后 93 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,进行 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。反应结束后将 PCR 产物保存于 4 ℃ 冰箱。1%琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶电泳成像仪下观察结果并拍照保存。其中 ATCC27853 作为阴性对照。

1.3.3 基因测序与对比 测序要求 PCR 体系为 50 μ L,使用试剂盒进行纯化胶回收后送天根生化科技有限公司测序,核苷酸序列与 GenBank 上的基因序列对比。

1.3.4 药敏试验 采用 K-B 法对头孢他啶、环丙沙星、复方新诺明、阿米卡星、头孢吡肟、哌拉西林/他巴唑坦、头孢哌酮/舒巴坦、美洛培南、多黏菌素 B、米诺环素进行药敏试验。

表 1 PCR 引物序列及目的产物长度		
基因名称	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)
IMP	P1:CGGCCCKCAGGAGMGKCTT	587
	P2:AACCAGTTTTGTCYTACYAT	
VIM	P1:ATTCCGGTCGGMGAGGTCCG	633
	P2:GAGCAAGTCTAGACCGCCCG	
SPM	P1:CTGCTTGGATTCATGGGCGCG	786
	P2:CCTTTTCCGCGACCTTGATCG	
GIM	P1:CCTGTAGCGTTGCCAGCTTTA	562
	P2:CAGCCCAAGAGCTAATTGAGG	
SIM	P1:ACAAGGGATTGGCATCGGTT	355
	P2:TTATCTTGAGTGTGTCCTGG	
NDM-1	P1:CGGCC(G/T)CAGGAG(A/C)G(G/T)CTTT	832
	P2:AACCAGTTTTGC(C/T)TTAC(C/T)AT	
oprD2	P1:GCGCATCTCCAAGACCATG	193
	P2:GCCACGCGATTGACGGAG	

2 结 果

2.1 菌株分布流行病学特征 所分离的 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌患者中,男 58 例(76.3%),女 18 例(23.7%);年龄 23~91 岁,平均(63.3 $\pm$ 8.2)岁,60 岁及以上者 51 例(67.1%)。分布前 3 位科室分别是神经外科监护室 28 例(36.8%),神经内科监护室 19 例(25.0%),烧伤科 10 例(13.2%)。

2.2 药敏试验结果 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对 10 种抗菌药物的药敏试验结果见表 2。

表 2 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对 10 种抗菌药物的耐药率		
抗菌药物	耐药株数(<i>n</i>)	耐药率(%)
头孢他啶	40	52.6
环丙沙星	59	77.6
复方型诺明	56	73.7

续表 2 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对 10 种抗菌药物的耐药率		
抗菌药物	耐药株数(<i>n</i>)	耐药率(%)
阿米卡星	38	50.0
头孢吡肟	67	88.2
哌拉西林/他唑巴坦	53	69.7
头孢哌酮/舒巴坦	66	86.8
美洛培南	71	93.4
米诺环素	52	68.4
多黏菌素 B	0	0

2.3 耐药基因类型检测 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中,均检出了 oPrD2 基因,检出携带 IMP 基因 17 株,携带 VIM 基因 50 株,携带 SIM 基因 2 株,携带 SPM 基因 3 株;未检出 NDM-1、GIM 耐药基因。有 22 株同时携带两种或两种以上耐药基因,见表 3。

表 3 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药基因检测阳性率		
基因名称	耐药株数(<i>n</i>)	检出率(%)
IMP	17	22.4
VIM	50	65.8
SPM	3	3.9
SIM	2	2.6
GIM	0	0.0
NDM-1	0	0.0
oprD2	76	100
VIM+IMP	18	23.7
VIM+SPM	3	3.9
VIM+IMP+SPM	1	1.3

3 讨 论

铜绿假单胞菌是院内感染检出率最高的革兰阴性菌之一,患者一旦感染,将大大延长住院时间,增加患者经济负担。临床上用于治疗铜绿假单胞菌感染的抗菌药物包括抗绿脓 β -内酰胺类、妥布霉素、阿米卡星及四代头孢,抗绿脓 β -内酰胺类中的碳青霉烯类是抗菌谱最广、抗菌活性最强。亚胺培南及美洛培南是碳青霉烯类抗生素代表药物,其抗菌活性强,对包括超广谱 B 内酰胺酶和头孢菌素酶在内的多数 β -内酰胺酶稳定,与第三代头孢菌素无交叉耐药性,被认为是临床上治疗具有多重耐药性的铜绿假单胞菌感染的重要抗菌药物^[2]。近年来,随着亚胺培南在临床治疗中的广泛应用,越来越多的铜绿假单胞菌对亚胺培南产生了耐药性^[3-4]。国外学者应用分子生物学技术发现,铜绿假单胞菌可获得 TEM、SHV、IMP、VIM、SPM 等 β -内酰胺酶及金属 β -内酰胺酶,所表达的产物可水解 β -内酰胺类和碳青霉烯类抗菌药物^[5]。大量研究表明,造成铜绿假单胞菌耐亚胺培南的原因包括以下方面:抗生素灭活酶水解、膜孔蛋白 oprD2 和 MexA-Mexg-OprM 等多药主动外排系统过度表达^[6]。因此,产酶和外膜蛋白通道的改变是铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的重要原因^[7]。被认为是亚胺培南扩散的特异性通道,铜绿假单胞菌异常低通透性的外膜结构在抗

生素耐药中起着重要的作用^[8]。本研究中 76 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌 OprD2 全部缺失,表明 OprD2 基因缺失是该院临床分离的耐碳青霉烯类药物的主要原因。

碳青霉烯酶是能够明显水解碳青霉烯类抗菌药物的一类 β -内酰胺酶,它包括 Ambler 分子分类中的 A、B、D 类 3 类酶,其中 B 类为金属酶,属 Bush 分类中的 3 组,是铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类药物的主要 β -内酰胺酶,可由染色体、质粒或转座子介导^[9]。目前发现细菌的金属 β -内酰胺酶有 6 种基因型:IMP、VIM、GIM、SPM、SMI 和 NDM-1,临床最常见的是 IMP 和 VIM^[10]。本研究检测到 IMP 阳性 6 株,阳性率 13.6%,耐药基因 VIM 阳性 50 株,阳性率 6.8%。其余耐药基因 GIM、SPM 和 IMI 未检出。铜绿假单胞菌中以 IMP 和 VIM 基因型多见,与文献报道这两种基因在碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌中的检出率相近^[11],但该院 VIM 基因型检出率最高,与国内报道的以 IMP 基因检出率最高有差异,可能与该院用药习惯有关,需进一步研究。本研究首次报道出耐亚胺培南铜绿假单胞菌可携带两种及其以上 B 类碳青霉烯类耐药基因,其耐药性极强,此次检测出一株同时携带三种耐药基因的铜绿假单胞菌,仅对多黏菌素 B 敏感,是唯一 1 株对其余 9 种抗菌药物均耐药样本,需引起临床重视。

本研究发现该院耐亚胺培南铜绿假单胞菌的流行病学特征:主要引起老年、病情危重患者呼吸道感染,以及烧伤后潮湿厌氧创面的感染,入住监护室、使用呼吸机及其他侵入性操作患者是高危人群。因此,医疗过程中应加强对重点人群的监控。

综上所述,耐亚胺培南铜绿假单胞菌膜孔蛋白基因缺失及产碳青霉烯类耐药基因是导致其耐药的重要原因,且携带多种耐药基因菌株耐药性较携带单一耐药基因强。本研究检测到耐亚胺培南铜绿假单胞菌仅对多黏菌素 B 耐药率为 0,临床医生可根据患者具体情况将多黏菌素 B 作为经验用药的选择之一。对感染患者实行“感染控制程序”,即住院患者进行定期耐药菌检测,并实施隔离治疗^[12],避免不必要的抗菌药物使用,防止耐药菌株的蔓延。

参考文献

[1] 吴安华,任南,文细毛,等. 医院内感染非发酵革兰阴性杆菌的病

原学与耐药性监测研究[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(11):764-766.

[2] 徐洪伟,多丽波,张联博,等. 院内感染亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌的分布及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(5):1137-1138.

[3] 曹阳,魏殿军,Diallo MC,等. 医院感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌与 oprD2 基因相关的 ERIC 分型研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(12):1667-1669.

[4] Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, et al. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(10):1217-1222.

[5] Quale J, Bratu S, Gupta J, et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(5):1633-1641.

[6] Cunha BA. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy[J]. Semin Respir Infect, 2002, 17(3):231-239.

[7] 朱晓艳,谭银玲. 铜绿假单胞菌耐药机制及其耐药现状[J]. 重庆医学,2010,39(8):986-987.

[8] Schuerer DJ, Zack JE, Thomas J, et al. Effect of chlorhexidine/silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters in an intensive care unit with a low blood stream infection rate after implementation of an educational program: a before-after trial[J]. Surg Infect, 2007, 8(4):445-454.

[9] Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleakis LS, et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(12):5153-5156.

[10] Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, et al. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(6):1409-1414.

[11] 费静娴,吴莲凤,彭定辉,等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药性[J]. 中国公共卫生,2010,26(10):1258-1260.

[12] 李武平,郑文芳. 医院感染控制[M]. 西安:第四军医大学出版社,2012:247.

(收稿日期:2012-11-09)

(上接第 558 页)

epoetin therapy with intravenous Iron therapy in hemodialysis patients[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(3):530-538.

[3] 吴志美,袁建芬,苏敏. 慢性肾衰竭患者止血功能的变化[J]. 检验医学与临床,2011,08(1):32-33.

[4] Locatelli F, Aljama P, Bárány P, et al. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(suppl 2):1-47.

[5] 王晶,张臻,姜枫. 慢性肾衰竭贫血应用促红细胞生成素的研究进展[J]. 中华现代护理杂志,2011,17(12):1479-1481.

[6] Agarwal R, Leehey DJ, Olsen SM, et al. Proteinuria induced by parenteral Iron in chronic kidney disease—a comparative randomized controlled trial[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2011, 6(1):114-121.

[7] Bhandari S, Brownjohn A, Turney J. Effective utilization of eryth-

ropoietin with intravenous Iron therapy[J]. J Clin Pharm Ther, 1998, 23(1):73-78.

[8] 苏媛,董泽华,付培荣,等. 血必净注射液对严重脓毒症患者血小板参数及凝血功能的影响[J]. 中国急救医学,2011,31(7):599-601.

[9] 陈慧春,徐元宏. 病毒性肝炎患者血小板和凝血功能指标联合检测的临床意义[J]. 中国基层医药,2011,18(12):1649-1650.

[10] 康强,叶莱锦,严争,等. 早产儿 D-二聚体及凝血功能动态变化的临床意义[J]. 重庆医学,2009,38(22):2865-2866.

[11] 张良满,边旭娜,邵琳娜,等. 静脉铁剂科莫非治疗缺铁性贫血的临床观察[J]. 内科急危重症杂志,2010,16(5):248,259.

[12] 陈倡林,饶进,徐秀蓉,等. 科莫非对维持性血液透析患者肾性贫血的疗效观察[J]. 四川医学,2008,29(9):1149-1150.

(收稿日期:2012-12-21)