

亚胺培南耐药PA的基因型及耐药机制研究

陈宏标¹, 苏丽贤², 吴紫娟²

1. 深圳市龙华新区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518109; 2. 深圳市福田区妇幼保健院, 广东 深圳 518000

摘要: **目的** 了解亚胺培南耐药铜绿假单胞菌分离株的基因型特征, 探讨OprD₂基因及金属β-内酰胺酶(MBL)在亚胺培南耐药机制中的作用。 **方法** 2011年1月至2013年8月, 收集福田区妇幼保健院的医院感染铜绿假单胞菌菌株, 采用纸片扩散法进行药敏试验并筛选亚胺培南耐药菌株; 脉冲场凝胶电泳法对亚胺培南耐药菌株进行基因分型, 电泳结果用Bionumerics V4.0软件进行聚类分析; PCR法对耐亚胺培南铜绿假单胞菌的金属β-内酰胺酶(IMP、VIM及SPM)和外膜孔蛋白OprD₂基因等4种主要耐药基因进行检测。 **结果** 共分离到97株铜绿假单胞菌, 其中有10株为亚胺培南耐药株, 当中4株为多重耐药菌。对10株耐亚胺培南菌株进行脉冲场凝胶电泳, PFGE图谱显示10株菌分为6个型, 相似度在75.7%~100.0%之间。PCR法检测到10株亚胺培南耐药菌中有7株表现为外膜孔蛋白OprD₂缺失, 4株携带VIM-2型金属β-内酰胺酶, 其中有3株在产金属酶的同时还伴有外膜孔蛋白OprD₂缺失, IMP及SPM金属酶基因未检出。 **结论** 分离的亚胺培南耐药铜绿假单胞菌的基因多态性集中, 外膜孔蛋白OprD₂缺失及携带VIM-2型金属β-内酰胺酶是导致该院亚胺培南耐药的主要原因。

关键词: 铜绿假单胞菌; 亚胺培南; 脉冲场凝胶电泳; 基因型; 耐药机制

中图分类号: R378.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2015)08-928-04 **DOI:** 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2015.08.06

Research on genotypic characterization and anti-resistant mechanism of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

CHEN Hong-biao¹, SU Li-xian, WU Zi-juan

1. Longhua New District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518109, Guangdong, P.R. China

Abstract: **Objective** To understand the molecular characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, then made a research of detecting OprD₂ and metallo-β-lactamase (MBL) among these collected strains. **Methods** Strains were collected from one tertiary hospital in Shenzhen from January 2011 to August 2013. Disc diffusion method was conducted to select imipenem-resistant strains; A Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method was used for molecular typing on these isolates, then analyzed by using Bionumerics 4.0 software; Detected metallo-β-lactamase (including IMP, VIM and SPM) and outer membrane porin OprD₂ by PCR on these imipenem-resistant strains. **Results** A total of 97 *Pseudomonas aeruginosa* strains were obtained, 10 ones resistant to imipenem and 4 ones were multiple antibiotic-resistant (resistant to 3 antibiotics or more). The PFGE result of these 10 *Pseudomonas aeruginosa* strains showed it can be clustered into 6 patterns, with a clustering similar value between 75.7% and 100.0%. PCR results revealed that 7 strains were loss of outer membrane porin OprD₂ and 4 strains were carrying VIM-2 metallo-β-lactamase, 3 strains were loss of OprD₂ in company with carrying VIM-2. No IMP and SPM metallo-β-lactamase was detected out among these 10 imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Conclusion** The results indicate that a high degree genetic homology was among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in this hospital, loss of outer membrane porin OprD₂ and carrying VIM-2 metallo-β-lactamase were the main reason to contribute to imipenem-resistance.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; Imipenem; Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); Genotype; Anti-resistant mechanism

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是临床常见的条件致病菌, 可引起多种机会性感染疾病。碳青霉烯类抗生素如亚胺培南是对PA抗菌活性最强的抗生素, 已成为临床上治疗该菌感染的重要抗生素之一^[1]。近年来, 亚胺培南耐药株的检出率不断攀升, 成为临床治疗的另一难题^[2]。PA的耐药机制十分复杂, 主要耐药机制可能是PA膜蛋白OprD基因的缺失和产金属β-内酰胺酶(IMP、VIM及SPM等)的高

表达^[3]。本研究通过研究亚胺培南耐药PA的基因型特征及外膜孔蛋白OprD₂和金属β-内酰胺酶的携带情况, 探讨耐药菌株的同源关系及耐药机制, 预防控制措施和临床治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2011年1月—2013年8月, 对福田区妇幼保健院住院患者送检的痰液、血液、尿液、粪便

和脓液等样本,进行PA分离鉴定,菌株经VITEK232全自动细菌鉴定仪(法国Bio2Merieux)鉴定,并剔除同一患者同一样本重复菌株。质控菌株ATCC27853购自广东省临床检验中心。

1.1.2 试剂及仪器 阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、头孢唑啉(CZO)、头孢他啶(CAZ)、头孢氨噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、氨曲南(ATM)、氨苄西林(AMP)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、哌拉西林/三唑巴坦(TZP)、复方新诺明(SXT)、环丙沙星(CIP)及左氧氟沙星(LVX)等抗生素纸片均为英国Oxoid公司产品。限制性内切酶SpeI、蛋白酶K以及PCR试剂均购自大连宝生物(TaKaRa)公司,低熔点琼脂糖为美国Cambrex公司生产的SeaKem Gold Agarose。所有试剂均在有效期内使用。CHEF MAPPER 脉冲场凝胶电泳仪和GEL Doc EQ凝胶成像分析系统为美国Bio-Rad公司产品;比浊仪为美国DADE BEHRING公司产品;PCR仪及低温超速离心机均为德国Biotetra公司产品。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 采用纸片扩散法(K-B法)进行抗生素敏感性试验。按美国国家临床实验室标准化委员会美国实验室标准化研究所(CLSI)2007年版标准对结果进行判读,以敏感(S)、中介(I)、耐药(R)报告结果。

1.2.2 染色体组DNA脉冲场凝胶电泳(PFGE) 根据Johnson JK^[4]和Romao CM^[5]报道方法适当改进,将培养过夜的细菌用细胞悬浮液配置成OD值为0.5的悬液,加入蛋白酶K并用低熔点胶灌模;将胶块取出并在5 mL含有蛋白酶K的细胞裂解液中裂解20 h,洗涤;切取2 mm胶块浸入200 μ L酶切体系(含SpeI酶20U),37℃水浴6h;将酶切后的样品胶置于样品梳上,用0.5×TBE液配制1%SeaKem Gold,加热溶解后冷至56℃,缓缓倒入模具中,冷却20min后,拔去样品梳,去除挡板,将胶块放入已加入0.5×TBE缓冲液的电泳槽中电泳:电压6V/cm,夹角120度,脉冲参数2.16~63.8s,电泳19h,电泳温度14℃;电泳结束后,将凝胶置于EB中染色30min,去离子水脱色90min;在凝胶成像仪读胶;用Bionumerics V4.0软件对数据进行聚类分析,方法采用UPGMA,聚类相似系数(距离)采用的是基于条带比较的Dice。

1.2.3 基因检测 采用PCR法,引物依据参考文献^[6]设计,由英俊生物有限公司合成,各种靶基因引物序列见表1。采用50 μ L反应体系,PCR扩增产物热循环参数为:93℃预变性7min;94℃变性45s;54℃退火45s;再以72℃延伸60s,循环30次,最后72℃延伸

10min。VIM型金属酶基因扩增产物由大连宝生物有限公司纯化,应用ABI PRISM 3730型测序仪分别测序,经过16S rRNA基因测序与GenBank中登录的VIM-2基因序列(FR695889)进行同源性比对。

表1 PCR扩增引物的名称及序列

Table 1 Names and sequence of the PCR amplification primer

基因型	上/下引物序列(5'-3')	目的片段(bp)
Genotype	Primer sequences(5'-3')	Target ragments(bp)
OprD-1	ATGAA AGTGA TGAAG TGGAG CG	1 330
OprD-2	TTACA GGATC GACAG CGGAT AG	
IMP-1	GAAGG YGTTT ATGTT CATA C	587
IMP-2	GTAMG TTTCA AGACT GATGC	
VIM-1	GTTTG GTCGC ATATC GCAAC	382
VIM-2	AATGC GCAGC ACCAG GATAG	
SPM-1	CTGCT TGGAT TCATG GCGC	783
SPM-2	CCTTT TCCGC GACCT TGATC	

1.3 统计学分析 采用WHONET 5.4软件对药敏试验原始数据进行分析,SPSS13.0软件对计数资料进行率的比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 菌株的来源及分布 共分离到97株PA,菌株的科室分布是:ICU(45株,46.4%)、外科(21株,21.6%)、内科(19株,19.6%)、儿科(8株,8.2%)及其他病房(4株,4.1%)。标本来源包括:痰(65株,67.0%)、血(10株,10.3%)、粪便(8株,8.2%)、中段尿(8株,8.2%)、创口分泌物(4株,4.1%)及引流物(2株,2.1%)。

2.2 药敏试验结果 97株PA中有10株对亚胺培南耐药,耐药率为10.3%,其中有4株为多重耐药,多重耐药率为4.1%。三年间菌株的耐药逐年上升,头孢氨噻肟、头孢吡肟、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星及左氧氟沙星的耐药性变化均有统计学意义,均呈上升趋势,见表2。

2.3 亚胺培南耐药菌株的基因分型 10株耐亚胺培南的PA经限制性内切酶SpeI酶切后进行PFGE电泳,每株菌约出现13~20个电泳条带,分子量在30~700kb之间。经Bionumerics V4.0软件进行聚类分析,相似度在75.7%~100.0%之间,可分为6个型(相似度为100.0%视为同一PFGE型别)。共出现两组相似值为100.0%的菌株,第一组的2株菌均分离自2012年10月的神经外科,第二组的4株菌分别分离于2012年的2月(1株)、4月(1株)与7月(2株),其中3株分离自ICU病房,1株来自呼吸内科,均为多重耐药菌株,见图1。

2.4 外膜孔蛋白OprD及金属 β -内酰胺酶检测 10

表2 97株PA对15种常用抗生素耐药性结果比较(%)
Table 2 Resistance to 15 commonly used antibiotics among 97 strains of *Pseudomonas aeruginosa*(%)

抗生素 Antibiotics	总体耐药 Antibiotics resistance(n=97)	2011年 (n=24)	2012年 (n=43)	2013年 (n=30)	χ^2	P
亚胺培南(IPM)	10.3	4.2	7.0	20.0	4.28	0.118
美罗培南(MEM)	9.3	4.2	7.0	16.7	2.82	0.244
头孢唑啉(CZO)	99.0	100.0	97.7	100.0	1.64	0.440
头孢他啶(CAZ)	12.4	4.2	9.3	23.3	5.08	0.079
头孢噻肟(CTX)	62.9	45.8	60.5	80.0	6.86	0.032
头孢吡肟(FEP)	8.2	0.0	7.0	16.7	13.33	0.001
氨曲南(ATM)	3.1	4.3	4.8	0.0	2.24	0.326
氨苄西林(AMP)	97.9	100.0	100.0	93.3	4.70	0.096
氨苄西林/舒巴坦(SAM)	99.0	100.0	100.0	96.7	2.37	0.306
哌拉西林/三唑巴坦(TZP)	41.2	37.5	42.9	43.3	0.20	0.905
阿米卡星(AMK)	7.2	0.0	2.3	20.0	10.76	0.005
庆大霉素(GEN)	16.5	4.2	7.0	40.0	16.42	0.000
复方新诺明(SXT)	100.0	100.0	100.0	100.0	—	—
环丙沙星(CIP)	4.1	0.0	0.0	13.3	9.78	0.008
左氧氟沙星(LVX)	4.1	0.0	0.0	13.3	9.78	0.008

注:n表示菌株数量。Note: “n” means the number of strains

株耐亚胺培南PA中共有8株检出所检耐药基因,检出率达80%,其中检出外膜孔蛋白OprD₂缺失7株,携带金属酶VIM基因4株,有3株携带VIM并伴有OprD₂缺失。IMP及SPM型金属β-内酰胺酶未检出。经过16SrRNA基因测序与GenBank中登录的VIM-2基因序列(FR695889)进行比对,同源性为99.0%。

3 讨论

PA是临床上最常见的条件致病菌之一,已成为医院感染的主要病原菌,而碳青霉烯类药物的使用会加大感染泛耐药PA的危险性^[7]。本研究菌株主要分布在ICU病房及神经外科,标本来源主要为痰,说明

该院PA引起的医院感染主要以呼吸道感染,可能与ICU病房及神经外科的患者有较严重的基础疾病,加之气管插管和呼吸机的使用等有关系^[8]。

药敏结果显示菌株对15种常用的抗生素的耐药性逐年递增,且对亚胺培南和美罗培南耐药性增长速度快,耐药率分别从2011年的4.2%和4.2%到2013年的20.0%和16.7%,与高辉^[9]报导的基本一致;另外,二代头孢的头孢唑啉、青霉素类的氨苄西林、酶抑制剂的氨苄西林/舒巴坦及磺胺类的复方新诺明耐药性均接近100.0%,说明该几种药物已完全丧失其治疗意义,而目前敏感性较高的是单环类的氨曲南、喹诺酮

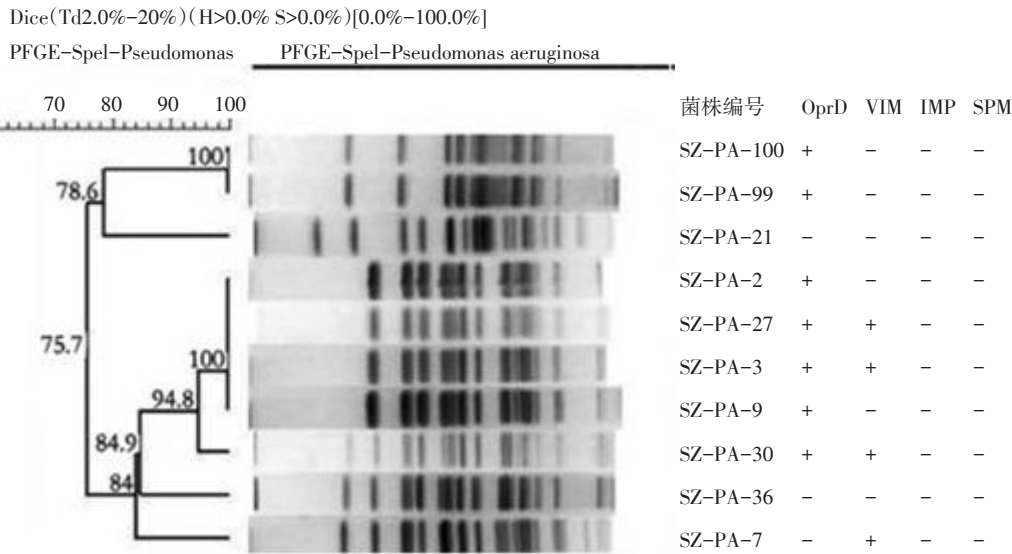


图1 10株耐亚胺培南PA的PFGE聚类分析图
Fig.1 PFGE clustering among 10 imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains

类的环丙沙星及左氧氟沙星,耐药性均在5%以下,但此类药物因有中枢神经系统反应和影响软骨发育的副作用,临床上应慎重使用;而氨基糖甙类药物因其有耳毒性、肾毒性,临床上不建议作为首选药物。所以在治疗PA感染的临床用药选择上显得尤为棘手。

脉冲场凝胶电泳基因分型方法被广泛地认为是分子流行病学研究的“金标准”。本研究对10株耐亚胺培南PA进行PFGE基因分型,图谱经Bionumerics V4.0软件进行聚类,结果显示菌株间有高度的同源性,相似度在75.7%~100.0%之间,出现两组完全同源菌株,第一组的两株菌分离自2012年10月的神经外科,第二组的4株菌分别分离于2013年的2月(1株)、4月(1株)与7月(2株),其中3株分离自ICU病房,1株来自于呼吸内科,这种时间、地点的高聚集性说明存在院内交叉感染可能,提示该菌株可能在该院广泛分布且长期存在,一旦出现大规模的流行,后果将难以控制。新近研究表明^[10],院内感染的发生与空气、医护人员手及物表合格率密切相关。

对碳青霉烯类耐药PA的机制研究,外膜孔蛋白OprD₂及金属β-内酰胺酶一直是研究的热点^[11]。外膜蛋白中OprD₂是以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗菌药物进入菌体的特异性通道,其表达减少甚至缺失将导致亚胺培南耐药的主要机制^[12];金属酶(MBL)是最大的一群能够水解碳青霉烯类抗菌药物的β-内酰胺酶,近年来在耐药PA中不断有新的亚型如VIM-14、IMP-29被发现,使细菌对青霉素、头孢菌素类和碳青霉烯类药物广泛耐药,其耐药基因由染色体或质粒介导,可通过转座子,质粒或I类整合子等造成扩散,易引起PA的暴发流行^[13-14]。本研究的10株亚胺培南耐药菌中有7株检测出OprD₂缺失,有4株携带VIM-2型MBL,其中有3株在携带VIM-2的同时还伴有OprD₂缺失,说明该院亚胺培南耐药PA的主要机制是外膜孔蛋白OprD₂缺失和产VIM-2型MBL,两者独立或协同介导亚胺培南耐药,与深圳市南山区^[15]和福田区^[16]报导基本一致;而在这10株菌中,仍有2株未检出所测耐药基因,提示有更复杂的机制需证实。结合药敏资料、PFGE图谱及耐药基因检测结果,发现3株VIM-2阳性菌株的同源性极高,且对阿米卡星、氨基糖甙之外的抗生素均耐药,说明金属酶介导的耐药更为广泛、严重;而两组同源性为100%的菌株均为外膜孔蛋白OprD₂缺失,其中有2株还携带VIM-2型MBL,提示携带该耐药基因的菌株更容易在病房中传播。

研究结果提示该院在2012—2013年期间,已存在不同程度的由亚胺培南耐药PA介导的院内交叉感染。今后应进行及时、连续的药敏监测和耐药机制研

究,通过分子流行病学对医院感染病原体进行同源性分析,追踪传染源及传播途径,可以更好的预防和控制PA引起的院内感染。

参考文献

- [1] Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26: 185-230.
- [2] 韦柳华.耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药机制及同源性研究[J]. 中国当代医药, 2014.21(11):4-7.
- [3] 谢永平, 伦秀红, 何嘉颖, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌的耐药性及耐药基因检测分析[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(4): 345-347.
- [4] Johnson JK, Arduino SM, Stine OC, et al. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45:3707-3712.
- [5] Romão C M, Faria Y N, Pereira L R, et al. Susceptibility of clinical isolates of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005, 100(5):541-548.
- [6] Jose-Manuel, Rodríguez-Martínez, Laurent Poirer, et al. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53 (11):4783 - 4788.
- [7] 毕嘉琦, 胡卓越, 黄伟煌, 等. 医院泛耐药铜绿假单胞菌流行现状及其危险因素研究[J]. 现代预防医学, 2013, 40(4):612-615.
- [8] 廖丽韶, 卢兰芬, 叶晓涛, 等. 院内铜绿假单胞菌感染检出分布及药敏分析[J]. 中国热带医学, 2010, 10(2):203-204.
- [9] 高辉, 王杨, 黄云昆, 等. 2005-2009年医院感染铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学, 2011, 21(7): 1434-1436.
- [10] Flores, A.E., M.J. Diedrick and P. Ferrieri, Development of a Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) method for molecular typing of clinical isolates of *Aerobacterium haemolyticum*[J]. Microbiol Methods, 2011, 86(3): 387-389.
- [11] Jimeno A, Alcalde M M, Blazquez A. Metallo-β-lactamase-mediated resistance among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2011, 115(4): 1208-1213.
- [12] 闫玉兰, 郭世辉, 李萌, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药机制研究[J]. 中华医院感染学, 2014, 24(15): 3650-3652.
- [13] Mazzariol A, Mammina C, Koncan R, et al. A novel VIM-type metallo-β-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(5): 722-724.
- [14] Jeannot K, Poirer L, Robert-Nicoud M, et al. IMP-29, a novel IMP-type metallo-β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(4):2187-2190.
- [15] 袁梦, 袁月明, 陈宏彬, 等. 铜绿假单胞菌抗生素耐药性及耐药相关基因检测[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 40(4):612-615.
- [16] 胡琴, 聂署萍, 吴润香, 等. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌耐药表型及基因型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 6(33):1305-1307.

收稿日期:2015-04-14 编辑:符式刚