

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.07.001

• 论 著 •

耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的初步研究

董国伟, 郭洁

(中国中医科学院望京医院, 北京 100102)

[摘要] 目的 分析临床分离的耐亚胺培南铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药特征及对亚胺培南的耐药机制。方法 采用 BD Phoenix 100 全自动微生物分析仪进行细菌鉴定, 纸片扩散法(K-B法)进行药敏试验; 聚合酶链反应(PCR)检测碳青霉烯酶相关基因(*IMP*、*VIM*、*OXA*、*GES*)及外膜蛋白基因 *oprD2*。结果 耐亚胺培南铜绿假单胞菌对阿米卡星耐药率最低, 为 8.33%; 对庆大霉素、妥布霉素的耐药率 < 20%; 第三四代头孢菌素、氨曲南、美罗培南、复方磺胺甲噁唑、米诺环素等抗菌药物抗菌活性差, 耐药率 > 60%, 对氨苄西林/舒巴坦全部耐药。检测到 1 株 *OXA-17* 阳性菌, 阳性率 2.78%; *oprD2* 缺失率为 38.89%; 未检测到其余耐药基因。结论 耐亚胺培南铜绿假单胞菌除对氨基糖苷类抗生素耐药率较低外, 对其他常用抗菌药物耐药严重; 膜蛋白 *OprD2* 缺失与碳青霉烯酶产生等机制导致铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 亚胺培南; 碳青霉烯酶; 外膜蛋白; 耐药基因; 抗药性; 微生物; 多重耐药

[中图分类号] R969.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)07-0385-04

Antimicrobial resistance characteristics and mechanisms of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

DONG Guo-wei, GUO Jie (Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective** To investigate antimicrobial resistance characteristics and mechanisms of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) isolated from clinical specimens. **Methods** Bacterial strains were identified by BD Phoenix 100 automatic microbial analysis system, antimicrobial susceptibility testing was performed by Kirby-Bauer method; Carbapenemase genes (*IMP*, *VIM*, *OXA*, *GES*) and outer membrane protein gene *oprD2* were detected by polymerase chain reaction. **Results** Resistant rates of imipenem-resistant *P. aeruginosa* strains to amikacin was the lowest (8.33%); resistant rates to gentamicin and tobramycin were < 20%; resistant rates to the third and fourth generation cephalosporins, aztreonam, meropenem, compound sulfamethoxazole and minocycline were all > 60%, and all strains were resistant to ampicillin/sulbactam. The positive rate of *OXA-17* gene was 2.78% ($n = 1$), deletion rate of *oprD2* was 38.89%, the other drug-resistant genes were not detected. **Conclusion** Except aminoglycosides, resistance of imipenem-resistant *P. aeruginosa* to other antimicrobial agents is serious; resistance of *P. aeruginosa* to imipenem may be due to lacking of *OprD2* and production of carbapenemases.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; imipenem; carbapenemase; outer membrane protein; drug-resistant gene; drug resistance; microbial; multidrug resistance

[Chin Infect Control, 2014, 13(7): 385-388]

铜绿假单胞菌(PA)是一种分布十分广泛的条件致病菌, 能天然抵抗多种抗菌药物, 易产生变异而

形成多重耐药, 是医院感染最主要的致病菌^[1]。亚胺培南(IMP)为碳青霉烯类药物, 是一种新型的 β -

[收稿日期] 2013-08-05

[作者简介] 董国伟(1984-), 男(汉族), 北京市人, 主管技师, 主要从事微生物检验研究。

[通信作者] 郭洁 E-mail: gj7176@sina.com

内酰胺类抗生素,抗菌谱广,对革兰阴性菌、革兰阳性菌、需氧菌和厌氧菌皆有很强的抗菌活性。药物学研究发现,IMP 对大多数 β -内酰胺酶高度稳定(含 ESBLs、AmpC 酶),与青霉素结合蛋白(PBPs)亲和力强,并能够有效渗透细菌外膜进入周质间隙,具杀菌活性强的特点,目前是临床治疗感染性疾病最有效的药物。但随着 IMP 的广泛和过度使用,其耐药性也逐渐增加^[2-4]。本院临床由 PA 引起的感染较多,特别是肺部感染,而且该病原菌很难被清除,常反复发作。本研究分析了 2011 年 1 月—2012 年 12 月临床分离的 36 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌(IMPRPAE)对常用抗菌药物的耐药特点,并从碳青霉烯酶和金属酶产生、膜微孔蛋白丢失等方面,对其耐药机制进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源 2011 年 1 月—2012 年 12 月,望京医院住院患者送检标本分离 IMPRPAE 36 株,送检标本包括痰液、尿液、伤口分泌物和脓液等。

1.1.2 仪器与试剂 PHOENIX100 全自动微生物分析仪(BD 公司),FTGENE 5D PCR 扩增仪(TECHNE 公司),15K Refrigerated Centrifuge(SIGMA 公司),JeDa JD801 系列专业数码凝胶成像与分析系统(江苏省捷达科技发展有限公司),M-H 培养基(天津金章科技发展有限公司)。耐药基因检测试剂由北京博迈德科技发展有限公司提供。

1.1.3 药敏纸片 阿米卡星(AMK)、氨基糖苷类(ATM)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、头孢他啶(CAZ)、头孢曲松(CRO)、头孢吡肟(FEP)、头

孢哌酮/舒巴坦(SCF)、哌拉西林(PFP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、IMP、美罗培南(MEM)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、米诺环素(MIN)、庆大霉素(GEN)、妥布霉素(TOB)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、替卡西林/克拉维酸(TIM),均购自英国 OXOID 公司。

1.1.4 质控菌株 铜绿假单胞菌 ATCC 27853 与大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.2 方 法

1.2.1 细菌分离、鉴定 采用常规方法分离细菌;严格按照操作规程,用全自动微生物分析仪进行细菌鉴定。

1.2.2 药敏试验 采用纸片扩散法进行药敏试验,操作及结果判定参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2010 年标准。

1.2.3 细菌处理 挑取纯培养菌落置于盛有 0.2 mL 无菌双蒸水的 1.0 mL 离心管内,浓度约 2 麦氏单位;100℃煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 3 min,用移液器吸取上清液至另一新的 1.0 mL 离心管内作模板液,置 -20℃冰箱备用。

1.2.4 基因扩增 耐药基因扩增引物序列参照文献[5],见表 1。所有引物均由 BIOMED 生物科技有限公司合成。聚合酶链反应(PCR)扩增体系(25 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L,引物各 0.2 μ L,模板 2 μ L,双蒸水补齐体积。*oprD2* 基因 PCR 扩增条件:热循环参数为 94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,57℃延伸 30 s,72℃退火 60 s,共 35 个循环,最后 72℃延伸 7 min。其余基因 PCR 扩增条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃延伸 30 s,72℃退火 60 s,35 个循环,最后 72℃延伸 7 min。反应结束后将 PCR 产物保存于 4℃冰箱。其中 ATCC 27853 作为阴性对照。

表 1 耐药基因引物序列

Table 1 Primer sequences of drug-resistant genes

Gene	Primer sequence (5'→3')	Length of product(bp)
IMP	P1: CGGCC(G/T)CAGGAG(A/C)G(G/T)CTTT	587
	P2: AACCAGTTTTGC(C/T)TTAC(C/T)AT	
VIM	P1: ATTCCGGTCGG(A/G)GAGGTCCG	633
	P2: GAGCAAGTCTAGACCGCCCG	
OXA-10 group	P1: GTCTTTC(A/G)AGTACGGCATT	822
	P2: GATTTTCTTAGCGCAACTTA	
GES	P1: ATGCGCTTCATTACGCAC	864
	P2: CTATTTGTCCGTGCTCAGG	
<i>oprD2</i>	P1: GCGCATCTCCAAGACCATG	193
	P2: GCCACGCGATTTGACGGAG	

1.2.5 结果判断 取 5 μL 扩增产物点样于 1% 琼脂糖凝胶, 在 110 V 电压电泳 40 min, 出现目的条带即为检测基因阳性, 用凝胶成像系统观察并照相。

1.2.6 基因测序与对比 测序要求 PCR 体系为 25 μL。使用试剂盒进行纯化胶回收后送 BIOMED 生物科技有限公司测序, 核苷酸序列与 GenBank 上的基因序列对比。

1.3 数据处理 应用 WHONET 5.6 软件对数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 IMPRPAE 的耐药特点 IMPRPAE 对 AMK 的耐药率最低, 为 8.33%; 对 GEN、TOB 的耐药率 <20%, 对 CIP、LVX、PFP、TZP、SCF 的耐药率为 40%~60%; 对 CAZ、CRO、FEP、ATM、MEM、SXT、MIN 等抗菌药物的抗菌活性差, 耐药率 >60%; 对 SAM 全部耐药。见表 2。

表 2 36 株 IMPRPAE 对 17 种抗菌药物的药敏结果 (%)

Table 2 Antimicrobial susceptibility testing results of 36 imipenem-resistant *P. aeruginosa* strains to 17 kinds of antimicrobial agents (%)

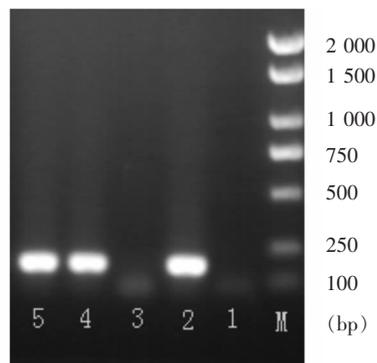
Antimicrobial agent	Antimicrobial resistance rate	Antimicrobial susceptibility rate
PFP	58.33	33.33
SCF	50.00	19.44
SAM	100.00	0.00
TIM	70.44	30.56
TZP	55.56	33.33
CAZ	63.89	25.00
CRO	94.44	2.78
FEP	66.67	25.00
ATM	75.00	8.33
MEM	69.44	13.89
AMK	8.33	86.11
GEN	19.44	72.22
TOB	19.44	80.56
CIP	44.44	44.44
LVX	41.69	38.89
SXT	91.67	8.33
MIN	88.89	11.11

Intermediate strains were not included

2.2 耐药基因检测 36 株 IMPRPAE 中, 检测到 OXA-17 阳性 1 株, 阳性率 2.78%; *oprD2* 基因缺失 14 株, 缺失率 38.89%; 未检出其余耐药基因 (*VIM*、*IMP*、*GES*)。耐药基因电泳结果见图 1~2。

2.3 *bla*OXA-10 群基因测序 1 株 OXA 基因

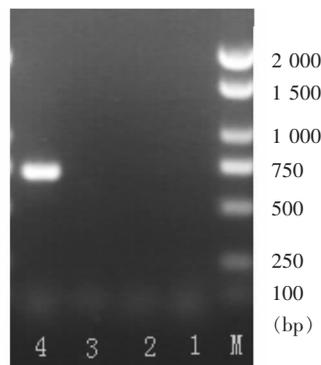
PCR 扩增结果阳性, 产物送博迈德科技发展有限公司测序。用 BLAST (NCBI) 对所得基因序列进行比对, 结果发现 PA 的 OXA 扩增产物与基因库里的 *bla*OXA-17 同源率为 100%, 见图 2。



M: DNA molecular mark; 1: Negative control; 2: Positive control; 3: Negative specimen; 4-5: Positive specimens

图 1 *oprD2* 基因 PCR 产物电泳结果

Figure 1 PCR amplification result of *oprD2* gene



M: DNA molecular mark; 1: Negative control; 2-3: Negative specimens; 4: Positive specimen

图 2 OXA-10 群基因 PCR 产物电泳结果

Figure 2 PCR amplification result of OXA-10 group gene

3 讨论

PA 是医院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, 增加经济负担。临床上用于治疗 PA 感染的抗菌药物包括抗 PA β-内酰胺类、TOB、AMK 及第三四代头孢菌素, 抗 PA β-内酰胺类药物中的碳青霉烯类抗菌谱最广、抗菌活性最强。IMP 及 MEM 是碳青霉烯类抗生素的代表药物, 其抗菌活性强, 对包括超广谱 β-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 PA 感染的重要抗菌药物^[6]。近年来, 随着 IMP 在临床治疗中的广泛应用, 越来越

多的 PA 对 IMP 产生了耐药性^[7-8]。本院 2011—2012 年分离的 36 株 IMPRPAE 对 AMK 的耐药率最低,为 8.33%;对 GEN、TOB 的耐药率 < 20%,对 CIP、LVX、PFP、TZP、SCF 的耐药率为 40%~60%;对 CAZ、CRO、FEP、ATM、MEM、SXT、MIN 等抗菌药物的抗菌活性差,耐药率 > 60%;对 SAM 全部耐药。因此,应重视和加强细菌耐药性监测,合理应用和优先选用低耐药可能性的抗菌药物,这将有助于控制细菌耐药,避免 IMPRPAE 引起医院感染流行。

研究^[9]表明,造成 IMPRPAE 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。碳青霉烯酶是能够明显水解碳青霉烯类抗生素的一类 β-内酰胺酶,它包括 Ambler 分子,分为 A、B、D 3 类酶,其中 B 类为金属酶,属 Bush 分类中的 3 组,是 PA 耐碳青霉烯类抗生素的主要 β-内酰胺酶,可由染色体、质粒或转座子介导。目前发现的获得性金属酶包括 IMP、VIM、GIM、SPM 4 种,以 IMP 和 VIM 常见。A 类酶是青霉素酶,对 IMP 的水解活性强于 MEM,可引起青霉素类、氨基糖苷类和碳青霉烯类耐药,对第三代头孢菌素敏感,他唑巴坦、克拉维酸可以抑制此类酶。A 类碳青霉烯酶包括 GES、KPC、SME、IMI/NMC-A、SHV-38 和 SFC-1 六个不同的群,GES 酶主要分布于 PA,但也见于肠杆菌科细菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌;产 GES 碳青霉烯酶的菌株主要分布于欧洲、南非和远东等,在希腊、法国、葡萄牙、南非、圭亚那、巴西、阿根廷、韩国和日本也有报道。产 GES 碳青霉烯酶菌株多为散发感染,然而,表达 GES-2 的 PA 已在南非引起了 8 例患者小范围的医院感染暴发^[10]。D 类 β-内酰胺酶即 OXA 酶,常见于不动杆菌属,在 PA 中发现 OXA 型酶基因主要包括 OXA-10、OXA-14、OXA-17、OXA-2、OXA-23、OXA-51 等基因^[11]。本研究中 OXA-17 阳性菌株占 2.78%,未检测到其他金属酶和碳青霉烯酶,提示产 D 类碳青霉烯酶是 PA 对 IMP 耐药的机制之一。有研究^[12]发现,OprD2 是以 IMP 为代表的碳青霉烯类抗生素(MEM 除外)进入菌体的特异性通道,OprD2 的缺失是 PA 对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因,MEM 可经除 OprD2 外的其他外膜蛋白通道进入菌体。对于仅因 OprD2 缺失引起的 IMP 耐药的菌株,对 MEM 仍敏感,临床上可将 MEM 用于对 IMP 耐药菌株感染的治疗。

本研究 36 株 IMPRPAE 中,*oprD2* 缺失率为 38.89%,表明 *oprD2* 基因缺失是本院临床分离 PA

对 IMP 耐药的主要原因。与国内相关报道^[13-14]差别不大,结论相同。总之,IMPRPAE 对常用抗菌药物耐药情况非常严峻,应重视和加强细菌耐药性检测,合理应用和优先选择低耐药可能的抗菌药物,这将有助于控制细菌耐药,避免 IMPRPAE 引起医院感染的暴发流行。PA 对 IMP 耐药机制复杂,产酶、膜孔蛋白 *oprD2* 基因缺失等机制可同时或单独导致 PA 对 IMP 的耐药。

[参考文献]

- [1] 贾育红. 重症监护室医院下呼吸道感染常见非发酵菌的耐药性与危险因素[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(2): 104-108.
- [2] 付建荣. 铜绿假单胞菌 β-内酰胺类抗生素耐药相关基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(7): 429-431.
- [3] 吴蓉, 府伟灵. 重庆地区铜绿假单胞菌医院感染及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(1): 97-99.
- [4] 杨海红. 某院 2010 年下呼吸道感染病原菌分布及其耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10(6): 464-466.
- [5] 颜英俊, 糜祖煌, 刘华, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(6): 627-630.
- [6] 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.
- [7] 王德, 江婵娟, 曹玉妍, 等. 重症监护室呼吸机相关性肺炎病原菌分布及耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10(3): 217-219.
- [8] 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.
- [9] Cunha B A. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy[J]. Semin Respir Infect, 2002, 17(3): 231-239.
- [10] Poirel L, Weldhagen G F, De Champs C, et al. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β-lactamase GES-2 in South Africa[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(3): 561-565.
- [11] 陈华彬, 王冬国, 王红戟, 等. 多药耐药铜绿假单胞菌耐药基因的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(3): 488-491.
- [12] Rodriguez-Martinez J M, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(11): 4783-4788.
- [13] 王丽娟, 李武平, 史皆然, 等. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(5): 559-561.
- [14] 熊薇, 王洪波, 徐敏, 等. 铜绿假单胞菌外膜蛋白 OprD2 缺失和金属 β-内酰胺酶与亚胺培南耐药的的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(10): 1193-1197.