

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.03.001

· 论 著 ·

临床分离革兰阴性菌金属 β -内酰胺酶基因检测及其同源性分析

赵亚楠¹, 郭育奇¹, 黄红兰¹, 武晓琳¹, 韦 珍¹, 孙 超², 赵春燕¹

(1 吉林大学基础医学院, 吉林 长春 130000; 2 沈州医院, 辽宁 沈阳 110000)

[摘要] **目的** 了解临床分离革兰阴性菌产 *IMP* 及 *VIM* 金属 β -内酰胺酶(M β Ls)基因的检出情况, 以及对 β -内酰胺类抗生素的耐药状况。**方法** 采用 K-B 法对临床分离的 113 株细菌进行药物敏感试验, 采用聚合酶链反应(PCR)检测耐药基因 *IMP* 和 *VIM*, 测序并进行 BLAST 比对分析。**结果** 1 株荧光假单胞菌检出 *VIM* 基因; 15 株菌中检出 *IMP* 基因, 其中肺炎克雷伯菌 6 株, 鲍曼不动杆菌 3 株, 大肠埃希菌 2 株, 罗尔斯顿菌、铜绿假单胞菌、无丙二酸柠檬酸杆菌、阴沟肠杆菌各 1 株。BLAST 结果显示, *VIM* 基因为 *VIM*-2 型, 与基因库中序列相似度 99%; *IMP* 基因均为 *IMP*-1 亚型, 相似度在 98%~99%, 高度同源。*IMP* 阳性菌株对头孢曲松、头孢噻肟、头孢西丁、氨曲南和亚胺培南的耐药率高于阴性菌株, 差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 不同菌株 *IMP* 基因高度同源, 均为 *IMP*-1 型, 表明 *IMP* 基因的传播能力很强, 可以突破种属的限制在不同细菌中传播。*IMP* 基因与细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药相关。

[关键词] 革兰阴性菌; 金属 β -内酰胺酶基因; *IMP*; *VIM*; 多重耐药性; 抗药性; 微生物; 医院感染

[中图分类号] R378 R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)03-0145-04

Detection and homology analysis on metallo- β -lactamases gene in clinically isolated gram-negative bacteria

ZHAO Ya-nan¹, GUO Yu-qi¹, HUANG Hong-lan¹, WU Xiao-lin¹, WEI Zhen¹, SUN Chao², ZHAO Chun-yan¹ (1 College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130000, China; 2 Shenzhou Hospital, Shenyang 110000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the detection of *IMP* and *VIM* metallo- β -lactamases (M β Ls) genes in clinically isolated gram-negative bacteria as well as bacterial resistance to β -lactam antimicrobial agents. **Methods** 113 clinically isolated bacteria were performed antimicrobial susceptibility testing by Kirby-Bauer method, drug-resistant genes *IMP* and *VIM* were detected by polymerase chain reaction (PCR), PCR products were sequenced and aligned with BLAST software.

Results *VIM* gene was detected in 1 *Pseudomonas fluorescens* strain, *IMP* gene was detected in 15 strains, they were *Klebsiella pneumoniae* ($n = 6$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 3$), *Escherichia coli* ($n = 2$), *Ralstonia pickettii* ($n = 1$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 1$), *Citrobacter amalonaticua* ($n = 1$), and *Enterobacter cloacae* ($n = 1$). BLAST results showed that *VIM* gene was *VIM*-2 subtype, similarity with gene bank was 99%; all *IMP* genes were *IMP*-1 subtype, which were highly homologous, similarity was 98% - 99%. Resistant rates of *IMP* positive strains to ceftriaxone, cefotaxime, cefoxitin, aztreonam and imipenem were all significantly higher than negative strains (all $P < 0.05$). **Conclusion** *IMP* genes of different strains are highly homologous, all are *IMP*-1 type, indicating that *IMP* genes are highly transmissible and can spread among different species of bacteria. *IMP* genes are related with resistance of β -lactam antimicrobial agents.

[Key words] gram-negative bacteria; metallo- β -lactamase gene; *IMP*; *VIM*; multidrug resistance; drug resistance, microbial; healthcare-associated infection

[Chin Infect Control, 2015, 14(3): 145 - 148]

[收稿日期] 2014-07-21

[作者简介] 赵亚楠(1988-), 女(汉族), 河北省张家口市人, 硕士, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 赵春燕 E-mail: zhaocy@jlu.edu.cn

β -内酰胺类抗生素是临床最常用的一类抗感染性药物,通过共价键与细胞壁合成有关的青霉素结合蛋白(PBPs)结合,抑制细菌细胞壁的合成^[1]。革兰阴性(G^-)菌所合成的金属 β -内酰胺酶(metallo- β -lactamases, M β Ls)是对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要原因, M β Ls 可以广泛地水解抗生素,包括青霉素类、广谱头孢菌素类和碳青霉烯类等,对临床常用 β -内酰胺酶抑制剂,如克拉维酸、舒巴坦等不敏感^[2]。所以,产 M β Ls 的 G^- 细菌成为公认的多重耐药病原菌,日益成为临床治疗的重大难题,加强对 M β Ls 基因的研究尤为重要。M β Ls 的基因型众多,从临床意义和流行病学两个方面来说,IMP 和 VIM 这两种基因型是最重要的^[3]。本研究主要探讨临床分离菌株对 β -内酰胺类抗生素耐药性,以及 M β Ls 基因分型及其相似性分析,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2012—2013 年沈阳医学院沈州医院临床分离的 G^- 菌 113 株。经法国生物梅里埃公司 VITEK 全自动细菌鉴定仪鉴定,其中肺炎克雷伯菌 57 株,大肠埃希菌 12 株,铜绿假单胞菌

11 株,鲍曼不动杆菌 10 株,阴沟肠杆菌 9 株,荧光假单胞菌 6 株,黏质沙雷菌 3 株,木糖氧化产碱菌、奇异变形杆菌、罗尔斯顿菌、嗜麦芽窄食单胞菌和无丙二酸柠檬酸杆菌各 1 株。

1.2 标准菌株 肺炎克雷伯菌 ATCC 700603,铜绿假单胞菌 ATCC 27853,大肠埃希菌 ATCC 25922,均购自吉林省临床检验中心。

1.3 药物敏感试验 应用 Kirby-Bauer(K-B)纸片法对临床分离菌株进行 11 种 β -内酰胺类抗生素的药敏试验,药敏判断标准按美国临床实验室标准化协会(CLSI) M100-S20 2010 年版规定执行。

1.4 M β Ls 基因型检测 提取细菌总 DNA 为模板,检测 VIM 和 IMP 基因,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,序列详见表 1。聚合酶链反应(PCR)扩增体系为:10 \times PCR 缓冲液(Mg²⁺ plus) 3 μ L, dNTPs (10 mol/mL) 2.5 μ L,上下游引物(10 mol/mL)各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, TaqDNA 聚合酶(5 mol/ μ L) 0.5 μ L, 灭菌双蒸水 20 μ L。循环参数为:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min;变性 94 $^{\circ}$ C 45 s,退火温度见表 1,均为 45 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 M β Ls 基因 PCR 扩增引物

Table 1 PCR primers of M β Ls genes

Primers	Sequences (5' - 3')	Annealing temperature($^{\circ}$ C)	Length of primers(bp)
IMP-A	F: AAAGACGGTAAGGTTCAA R: CGCCTGCTCTAATGTAAG	55	778
IMP-B	F: ACATTTCCATAGCGACAG R: TGTTCCCATGTACGTTTC	56	741
VIM	F: ATTCCGGTCGGRGAGGTCCG R: GAGCAAGTCTAGACCGCCC	60	633

1.5 序列测定与分析 采用胶回收试剂盒 TIAN-GEN Quick Gel Extraction 进行产物回收、纯化,纯化产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序,测序结果进行 BLAST 相似性比对分析。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计描述分析,对耐药率分析采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 M β Ls 基因检测结果 仅在 1 株荧光假单胞菌中检出 VIM 基因。15 株菌中检出 IMP 基因,其中肺炎克雷伯菌 6 株,鲍曼不动杆菌 3 株,大肠埃希

菌 2 株,罗尔斯顿菌、铜绿假单胞菌、无丙二酸柠檬酸杆菌和阴沟肠杆菌各 1 株。见表 2、图 1。

表 2 113 株细菌 M β Ls IMP 基因检测结果

Table 2 IMP M β Ls gene detection results of 113 bacterial strains

Pathogens	No. of detected isolates	No. of positive isolates	Positive rates (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	57	6	10.53
<i>Escherichia coli</i>	12	2	16.67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	1	9.09
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10	3	30.00
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	1	11.11
<i>Ralstonia pickettii</i>	1	1	100.00
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	1	100.00

2.2 测序结果分析 将上述阳性菌株的测序结果与 GenBank 数据库中已知序列比较, *VIM* 基因为 *VIM-2* 型, 相似度 99%; *IMP* 基因均为 *IMP-1* 亚型, 相似度均在 98%~99%。

2.3 *IMP* 阳性菌株与阴性菌株对 11 种抗菌药物的耐药率比较 *IMP* 阳性菌株对头孢曲松、头孢噻肟、头孢西丁、氨基曲南、亚胺培南的耐药率高于阴性菌株, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 其余抗菌药物二者耐药率比较, 差异无统计学意义。见表 3。

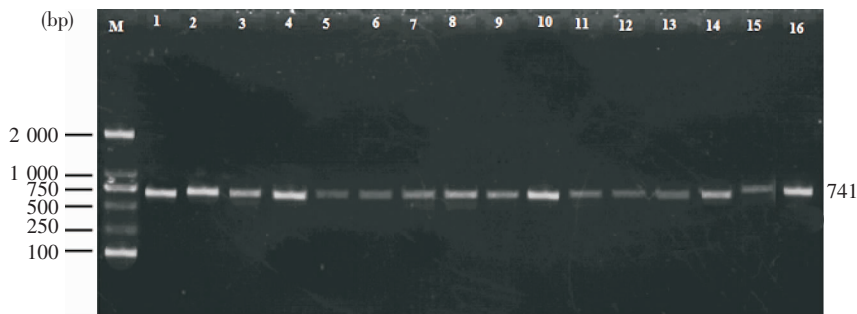


图 1 *IMP* 基因 PCR 电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR products of *IMP* gene
M: marker DL2 000, Lane 1: Positive control, Lane 2—16: Positive strains

表 3 *IMP* 阳性菌和阴性菌耐药率比较(%)

Table 3 Comparison in antimicrobial resistant rates between *IMP*-positive and-negative bacterial strains (%)

Antimicrobial agents	<i>IMP</i>		χ^2	<i>P</i>
	Positive strains	Negative strains		
Amoxicillin	60.00	42.86	1.64	0.21
Ampicillin	66.67	71.43	0.14	0.71
Piperacillin	60.00	48.98	0.63	0.42
Cefazolin	46.67	61.22	1.14	0.29
Ceftriaxone	66.67	37.76	4.48	0.03
Cefotaxime	80.00	39.80	8.49	0.04
Ceftazidime	60.00	39.80	2.17	0.14
Cefepime	60.00	56.12	0.64	0.43
Cefoxitin	73.33	38.78	6.326	0.01
Aztreonam	66.67	32.65	6.45	0.01
Imipenem	40.00	13.27	6.65	0.01

3 讨论

M β Ls 是一类活性位点含有金属离子的 β -内酰胺酶, 对 β -内酰胺类抗生素具有广泛水解作用的酶, 可水解青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类等(单环类 β -内酰胺类抗生素除外), 产生耐药^[4]。M β Ls 的基因型众多, 其中以 *IMP* 和 *VIM* 两种为主^[5], 在过去的十几年中, 基因型 *VIM* 出现了多种亚型, 根据核苷酸序列不同可分为 1~7 类。本研究在 1 株荧光假单胞菌中分离出 1 株 *VIM-2* 基因型, 有报道^[6-8]显示在广州、无锡等地区同样在铜绿假单胞菌中分离出 *VIM-2* 型临床菌株, 我国流行的主要是

VIM-2 基因型。M β Ls *IMP* 基因最早由 1991 年日本学者在铜绿假单胞菌中发现, 该基因所处的位置是质粒中的 I 类整合子上, 现已报道的 *IMP* 基因型有 20 余种^[6-7], 地域分布也已不局限于日本, 已分布至亚洲、欧洲和美洲等多个国家。在我国, 武汉、深圳^[8-9]地区在铜绿假单胞菌中检出 *IMP-1* 基因型, 广州地区在铜绿假单胞菌中检出 *IMP-9* 基因型^[10], 重庆地区在肺炎克雷伯菌中发现 *IMP-8* 基因型^[11]。本研究分离出 15 株 *IMP-1* 型菌株, 且本次分离的 *IMP* 阳性菌株的种属分布广泛, 包括肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌、罗尔斯顿菌和无丙二酸柠檬酸杆菌 7 种细菌, 表明 *IMP* 基因的传播能力很强, 传播范围广, 可以突破种属的限制, 在不同细菌中传播, 易导致耐药细菌感染的暴发。研究^[12]表明, 其传播机制可能与整合子上的耐药基因盒通过质粒或转座子介导传播有关。整合子是一种位于细菌质粒或染色体上, 用于基因转移和表达的单位。目前, 已经在整合子上发现了 60 多种不同的耐药基因盒, 通过对位点的基因重组机制, 使耐药基因水平移动, 在细菌间传递耐药性。M β Ls 基因盒在整合酶的帮助下可以发生转移, 整合子本身不能移动, 在质粒或转座子的帮助下可在细菌的质粒或染色体之间转移。基因盒的兼容性很高, 同种基因盒可被不同整合子整合。整合子的存在方式具有灵活性, 为细菌耐药性传递提供了便利条件^[13]。来自相同患者的几种致病菌

往往含有同一类型的整合子,表明整合子可在患者机体上的不同菌种间发生转移。整合子的水平转移是一种新的传播机制,该机制可以解释许多关于耐药性传递的新问题。研究^[14]表明,铜绿假单胞菌中 *IMP* 基因型和 *VIM* 基因型在整合子中的位置相同,说明转座子对携带 *MβLs* 基因的 I 类整合子的传播起重要作用。虽然绝大多数获得性 *MβLs* 基因的转移是通过整合子机制完成的,但是少数 *MβLs* 基因借助于可移动的共同区域进行转移。目前,关于可移动的共同区域,以及其耐药性基因转移的机制还不明确,有待进一步研究。在临床分离的耐药 G^- 菌株中,整合子的阳性率很高,含整合子的菌株比不含整合子的菌株表现出更强的耐药性,尤其对氨基糖苷类和第三代头孢菌素类^[15]。

本组结果显示,分离自不同菌种的各 *IMP* 阳性菌株 PCR 产物序列相似度很高,说明这些菌株中 *IMP* 基因来源于相同或相似的传播株;*IMP* 阳性菌株对头孢曲松、头孢噻肟、头孢西丁、氨曲南、亚胺培南的耐药率高于阴性菌株,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),*IMP* 阳性菌株对上述抗菌药物的耐药率均 $> 60\%$,特别是对头孢噻肟的耐药率达到了 80% ,而阴性菌株对其耐药率仅 39.80% 。说明 *IMP* 基因与细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药相关,是细菌对此类抗菌药物耐药的原因之一。

随着产 *MβLs* 的菌株在临床中的出现和流行, β -内酰胺类抗生素耐药率逐年上升,这已成为临床抗感染的严峻课题,合理应用抗菌药物,加强对 *MβLs* 的研究和监测,对于防止耐药基因在医院菌株中的传播具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Walsh T R, Toleman M A, Poirel L, et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2):306-325.
- [2] Bush K, Macielag M J. New β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors[J]. Expert Opin Ther Pat, 2010, 20(10):

1277-1293.

- [3] Borra P S, Leiros H K, Ahmad R, et al. Structural and computational investigations of VIM-7: insights into the substrate specificity of VIM metallo- β -lactamases[J]. J Mol Biol, 2011, 411(1):174-189.
- [4] Agrawal G, Lodhi R B, Kamalakar U P, et al. Study of metallo-beta-lactamase production in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Indian J Med Microbiol, 2010, 26(4): 349-351.
- [5] 叶勇,何建方,王伟洪,等.铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶及其相关耐药基因的检测分析[J].中华医院感染学杂志,2012,9(3): 1773-1776.
- [6] 王继东,周丽珍,宫玲玲,等.铜绿假单胞菌的多重耐药基因研究[J].中华医院感染学杂志,2006,16(3):241-244.
- [7] 余广超,徐霖,袁广卿,等.亚胺培南耐药铜绿假单胞菌的金属 β -内酰胺酶检测[J].中国抗生素杂志,2011,36(3):223-227.
- [8] 雷延昌,张正茂,丁红晖,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药性与金属 β -内酰胺酶的关系[J].中华医院感染学杂志,2007, 17(4):370-374.
- [9] 谭萍,祝玲玲,张松,等.产金属 β -内酰胺酶铜绿假单胞菌的耐药性和基因检测[J].中国感染控制杂志,2008,7(2):114-116,121.
- [10] 唐慧琴,陈定强,吴爱武.耐亚胺培南铜绿假单胞菌的金属 β -内酰胺酶检测[J].中国卫生检验杂志,2014,24(6):831-833.
- [11] 孙秋,黄文祥,史方静,等.临床分离肠杆菌科细菌金属 β -内酰胺酶检测[J].中国感染控制杂志,2014,13(6):321-326.
- [12] 李芳,张锦,贾伟.肺部感染革兰阴性杆菌产超广谱 β -内酰胺酶的耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2008,18(8):1167-1170.
- [13] Koh T H, Wang G C, Sng L H. IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(6):2334-2336.
- [14] 张若文.烧伤病房耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌耐药机制及分子流行病学研究[D].吉林:吉林大学,2012.
- [15] Gebreyes W A, Thakur S. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(2):503-511.

(本文编辑:黄勋)