

• 临床检验研究论著 •

西安地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药现状及碳青霉烯酶基因研究

王丽娟¹, 李武平², 徐修礼²,

(1. 西安医学院护理学院, 陕西西安 710021; 2. 第四军医大学西京医院, 陕西西安 710032)

摘要:目的 调查西安地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药现状及碳青霉烯酶耐药基因携带情况, 指导临床合理使用抗菌药。方法 连续收集 2012 年 8 月至 2013 年 7 月西安地区四所医院临床标本中分离的耐亚胺培南铜绿假单胞菌共 151 株, 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, 并采用聚合酶链反应技术(PCR) 检测碳青霉烯酶耐药基因在耐亚胺培南铜绿假单胞菌中的携带情况。结果 151 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌主要分布在神经外科 ICU (37. 1%)、神经内科 ICU (27. 1%) 及烧伤科 (19. 9%); 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; 94 株携带 VIM 基因, 32 株携带 IMP 基因, 5 株携带 SPM 基因, 3 株携带 SIM 基因。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, 其原因可能与产碳青霉烯酶耐药基因表达有关, 耐药基因以 VIM、IMP 为主, 临床应加强细菌耐药性监测, 合理有效使用抗菌药物, 防止耐亚胺培南铜绿假单胞菌的蔓延。

关键词:耐亚胺培南铜绿假单胞菌; 耐药分析; 碳青霉烯酶基因

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 14. 028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)14-1882-03

Investigation on drug resistance status quo of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Xi'an area and carbapenemase genes

Wang Lijuan¹, Li Wuping², Xu Xiuli²

(1. Nurse College, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China; 2. Xijing Hospital, Forth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance status quo of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenemase gene carrying in Xi'an area for guiding the clinical rational use of antibacterial drugs. **Methods** 151 strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples in 4 hospitals from August 2012 to July 2013 were continuously collected. Then the drug resistance characteristics of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were investigated by the antimicrobial drug sensitivity test. The PCR technique was adopted to detect the carrying situation of carbapenemase drug-resistance genes in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Results** Totally isolated 151 strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were mainly distributed in the neurosurgery ICU (37. 1%), neurology ICU (27. 1%) and the burn department (19. 9%); the detected strains were sensitive to polymyxin B and resistant to other 9 kinds of antibacterial drugs in different degrees; 94 strains carried VIM gene, 32 strains carried IMP gene, 5 strains carried SPM gene and 3 strains carried SIM gene. **Conclusion** The multidrug resistance and pan-drug resistance phenomenon of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is serious, its cause might be related with the carbapenemases-producing drug resistant gene expression, the drug resistance genes are dominated by VIM and IMP. Clinic should strengthen the bacterial drug resistance monitoring and use antibacterial drugs rationally and effectively for preventing the spreading of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; drug resistance; carbapenemase genes

以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗生素, 是目前抗感染治疗中抗菌谱最广、抗菌活性最强的一类抗菌药物。然而, 由于在临床上广泛、大量使用, 细菌对此类药物也产生了耐药。1991 年, Wantanabe 等^[1] 从一株对亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌中分离出分解碳青霉烯类药物的酶, 由 31-Mda 的 PMS350 质粒编码, 这种质粒可以诱导菌体对碳青霉烯类抗生素、庆大霉素和磺胺类等抗生素耐药, 并可以通过接合方式传递给其他铜绿假单胞菌菌株。随着耐亚胺培南铜绿假单胞菌检出率的增加, 给临床抗感染治疗带来了挑战, 患者对亚胺培南产生耐药, 不仅会延长住院时间, 增加住院费用, 更会大大提高患者病死率。及时准确了解亚胺培南铜绿假单胞菌耐药情况及分子流行病学特点, 对指导临床合理治疗耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定 收集西安地区四所三级医院 2012 年

8 月至 2013 年 7 月临床住院患者各种标本的非重复耐亚胺培南铜绿假单胞菌, 细菌分离及鉴定按《全国临床检验操作规程》要求执行, K-B 法检测亚胺培南的敏感性, 根据 CLSI2010 标准判定耐药(R), 筛选出耐亚胺培南铜绿假单胞菌, 质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2 主要仪器及设备 超净工作台(苏州净化有限公司); 电热恒温培养箱及恒温摇床(上海基伟实验仪器公司); VITEK-2 全自动微生物分析仪; DYY III 2 型电泳仪(北京六一仪器厂); PCR 扩增仪(ABI9600 型); 数字化凝胶成像系统(上海日复)。

1.3 试剂 北京奥博星生物技术公司生产的 M-H 琼脂和营养肉汤, 药敏纸片购自英国 Oxoid 公司, PCR 引物参照文献[2], 由西安沃尔森生物技术有限公司合成, 引物序列详见表 1, 2 000 bp DNA Marker、2×Taq PCR Master Mix 为北京奥科生物技术有限公司产品。

1.4 方法

1.4.1 药敏试验 采用 K-B 法对头孢他啶、环丙沙星、复方磺胺甲噁唑、阿米卡星、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、美洛培南、多黏菌素 B、米诺环素进行药敏试验。

1.4.2 制备细菌 DNA 模板 参考 Chu 等^[3] 的文献报道,将实验菌株接种于 M-H 平板上,置于 37 ℃ 恒温孵箱中过夜孵育,挑取单克隆菌落置于放有 10 mL 肉汤培养液的 EP 管中,于 37 ℃ 恒温摇床过夜增菌;取 3 mL 过夜培养菌液,1 200 r/min 离心 2 min,弃上清液后加入无菌水 200 μL 及 2 mg/mL 蛋白酶 K 0.2 mL,震荡摇匀,重悬细菌;60 ℃ 预热 5 min,95 ℃ 水浴 10 min;1 200 r/min 离心 2 min,上清液即为 DNA 提取液,置于-20 ℃ 冰箱密封保存备用。

1.4.3 PCR 扩增体系及反应条件 总反应体系为 20 μL,包括 DNA 模板 2 μL,2×Taq PCR Master Mix 10 μL,上下游引物各 1 μL,最后用灭菌双蒸水补足 20 μL。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。

1.4.4 扩增产物检测 琼脂糖凝胶为 1% 浓度,取 PCR 产物 5 μL 上样,2 000 bp DNA Marker 5 μL 为分子量标准,电泳缓冲液为 1×TAE 工作液,电泳条件为电压 100 V,电泳时间 30 min,其中 ATCC27853 作为阴性对照。紫外凝胶电泳成像仪下观察结果并拍照保存。

1.4.5 基因测序与对比 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。

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:AACCAGTTTTCGYTACYAT	
VIM	P1:ATTCCGGTCGGMGAGGTCCG	633
	P2:GAGCAAGTCTAGACGCCCG	
SPM	P1:CTGCTTGGATTCATGGGCGCG	786
	P2:CCTTTTCCGCGACCTTGATCG	
SIM	P1:ACAAGGGAATTCGGCATCGGTT	355
	P2:TTATCTTGAGTGTGTCTCTGG	
GIM	P1:CCTGTAGCGTTGCCAGCTTTA	562
	P2:CAGCCCAAGAGCTAATTGAGG	
NDM-1	P1:CGGCC(G/T)CAGGAG(A/C)G(G/T)CTTT	832
	P2:AACCAGTTTTCG(C/T)TTAC(C/T)AT	

2 结 果

2.1 菌株分布流行病学特征 所分离的 151 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌的患者中,男性 97 例(64.2%),女性 54 例(35.8%),年龄 23 ~ 91 岁,平均(66.3±8.7)岁,60 岁及以上者 102 例(67.5%);在菌株标本类型中,痰液最多,共 98 例,其次为分泌物,有 33 例;分布前三位的科室分别是神经外科监护室 56 例(37.1%),神经内科监护室 41 例(27.1%),烧伤科 30

例(19.9%)。

2.2 药敏试验结果 151 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。

2.3 多重耐药检出情况

2.3.1 多重耐药定义^[4] 多重耐药(MDR):对亚胺培南、头孢他啶、环丙沙星均耐药。广泛耐药(XDR):对亚胺培南、头孢他啶、环丙沙星、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟均耐药。泛耐药(PDR):对所有抗菌药物均耐药。

2.3.2 多重耐药检出情况,见表 3。

表 2 151 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对 10 种抗菌药物的情况

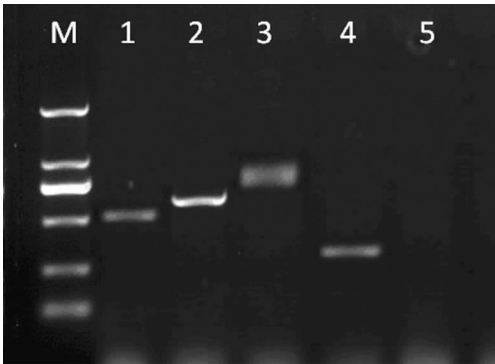
抗菌药物	耐药株数(n)	耐药率(%)
头孢哌酮/舒巴坦	122	80.8
头孢吡肟	120	79.4
环丙沙星	116	76.8
复方磺胺甲噁唑	108	72.0
哌拉西林/他唑巴坦	104	68.9
米诺环素	101	66.9
美洛培南	93	61.6
头孢他啶	87	57.6
阿米卡星	78	51.7
多黏菌素 B	0	0.0

表 3 151 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌的多重耐药率(%)

类型	检出株数	检出率(%)
MDR	48	31.8
XDR	23	15.2
PDR	0	0.0

表 4 151 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药基因检测情况

基因名称	株数(n)	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
VIM+IMP	18	23.7
VIM+SPM	3	3.9
VIM+IMP+SPM	1	1.3



M:marker;1:IMP 型;2:VIM 型;3:SPM 型;4:SIM 型;5:铜绿假单胞菌 ATCC27853。

图 1 PCR 产物电泳图谱

2.4 耐药基因类型检测 151 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中,检出携带 VIM 基因 94 株,携带 IMP 基因 32 株,携带 SPM 基因 3 株,携带 SIM 基因 2 株;未检出 GIM、NDM-1 耐药基因。有 22 株同时携带两种或两种以上耐药基因,见表 4,基因电泳图见图 1。

3 讨 论

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,碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌同时对其他抗菌药物也呈现出很高的耐药性^[5]。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,对其余抗菌药物均表现出大于 50% 的高耐药率,且多重耐药率达 31.8%,远远高于普通铜绿假单胞菌报道的 9.1%^[6],耐药形势相当严峻。

本组 151 株耐亚胺培南的铜绿假单胞菌对美罗培南的敏感率为 61.6%,提示亚胺培南与美罗培南耐药机制不尽相同。美罗培南是不经过特殊通道扩散的,细菌外膜的低通透性合并主动外排系统起作用是对铜绿假单胞菌形成低水平耐药性的主要机制。国外有研究表明,对美罗培南耐药的铜绿假单胞菌 94.7% 对亚胺培南耐药,而对亚胺培南耐药的菌株只有 47% 对美罗培南耐药,且美罗培南体外活性是亚胺培南的 2 倍,对部分耐亚胺培南菌株有效,故临床上用美罗培南治疗亚胺培南耐药的菌株,但仍需密切监测药敏结果^[7]。

产碳青霉烯酶是铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药的重要原因。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,最主要的有 6 种基因型:IMP、VIM、GIM、SPM、SMI 和 NDM-1,铜绿假单胞菌中以 IMP 和 VIM 基因型多。本研究检测到 IMP 阳性 32 株,阳性率 21.2%,VIM 阳性 94 株,阳性率 62.3%,还检出 5 株携带 SPM 基因及 3 株携带 SIM 基因,耐药基因 GIM 和 NDM-1 暂未检出,与文献^[8]报道的以 IMP、VIM 基因为主相同。但本地区 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^[6],可能本地区用药习惯有关,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以上碳青霉烯酶耐药基因,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,药物敏感试验证实,此菌株除多黏菌素 B 以外,对其余 9 种抗菌药物均耐药,需引起临床重视。

此外,本研究检测到 36 株耐药基因阴性的耐亚胺培南铜绿假单胞菌,占 23.8%,此类菌株的耐药机制可能与外膜通透性障碍,主动外排泵,改变抗菌药物作用的靶位,生物膜形成等有关,需进一步研究考证。

综上所述,本地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性强,且多重耐药现象严重,耐药机制主要是产生了碳青霉烯酶耐药基因。亚胺培南等碳青霉烯类抗菌药物耐药现象的不断加和流行,使临床面临几乎无药可选的境地,严重地威胁到人类健康,加强细菌耐药监测及耐药机制研究,对及时控制医院感染及临床合理使用抗菌药物具有重要意义。

参考文献

[1] Wantanabe M, Joybe M, Inoue M, et al. Transferable imipenem resistance in *P. aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 35(3): 147-151.

[2] Kouda S, Ohara M, Onodera M, et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima [J]. Antimicrob Chemother, 2009, 64(1): 46-51.

[3] Chu YW, Afzal SM, Houang ET, et al. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. In Korean hospitals [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(7): 868.

[4] Clinical and laboratory standards institute. Performanca standards for antimicrobial susceptibil ity testing; seventeenth informational [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

[5] Huang YS, Long Y, Fang L. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteria metal detection of β-lactamase and related genes [J]. Chin J Clin Physic, 2010, 4(9): 120-123.

[6] 于勇, 常东, 蒋伟, 等. 烧伤病区抗生素使用与铜绿假单胞菌耐药水平变化的关系 [J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(24): 92-95.

[7] Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; risk factors and clinical impact [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(1): 43-48.

[8] Liu Y, Zhang B, Cao Q, et al. Two clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* carrying plasmid-borne blaIMP-4, blaSHV-12, and armA isolated at a Pediatric Center in Shanghai, China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(4): 1642-1644.

(收稿日期: 2013-12-28)

(上接第 1881 页)

okines and chemokine receptors as promoters of prostate cancer growth and progression [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2013, 23(1): 77-91.

[6] 郭清, 吴小华, 吕英璞, 等. CXCL12-CXCR4 趋化因子轴与卵巢上皮性癌关系的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(21): 1677-1680.

[7] 陈聪, 刘志峰, 任炳成, 等. 胶质母细胞瘤微环境中 CXCL12/CXC 趋化因子受体 4 的表达分布及其在肿瘤侵袭迁移中的作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(6): 1271-1274.

[8] Amedei A, Prisco D, D'Elis MM. The use of cytokines and chemokines in the cancer immunotherapy [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2013, 8(2): 126-142.

[9] 彭婷, 刘莉, 李剑. 趋化因子 2 对血液肿瘤生物学行为的影响 [J]. 广东医学, 2013, 34(13): 2106-2108.

[10] Zhukovsky MA, Lee PH, Ott A, et al. Putative cholesterol-binding

sites in human immunodeficiency virus (HIV) coreceptors CXCR4 and CCR5 [J]. Proteins, 2013, 81(4): 555-567.

[11] 沈晓燕, 王绍海, 汪宏波, 等. CXCR4 及其配体 SDF-1α 在卵巢癌 SKOV3 细胞黏附和侵袭中的作用 [J]. 肿瘤, 2009, 29(9): 852-856.

[12] Kim JH, Gupta SC, Park B, et al. Turmeric (Curcuma longa) inhibits inflammatory nuclear factor (NF)-κB and NF-κB-regulated gene products and induces death receptors leading to suppressed proliferation, induced chemosensitization, and suppressed osteoclastogenesis [J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(3): 454-465.

[13] Hunger C, demis V, Engele J. Expression and function of the SDF-1 chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 during mouse limb muscle development and regeneration [J]. Exp Cell Res, 2012, 318(17): 2178-2190.

(收稿日期: 2014-01-08)