

• 临床检验研究论著 •

多重耐药铜绿假单胞菌的金属酶表型与基因型研究

杨小影¹, 吴洪秋², 肖奇志², 严长征¹, 杨东海¹

(1. 珠海市金湾区妇幼保健院/三灶医院检验科, 广东珠海 519040; 2. 珠海市妇幼保健院检验科, 广东珠海 519000)

摘要:目的 研究临床分离铜绿假单胞菌金属酶产生及其相关基因携带情况。方法 采用头孢他啶和亚胺培南分别进行铜绿假单胞菌金属酶初筛, 用 2-巯基丙酸(2-MPA)或 EDTA 组合纸片试验检测耐亚胺培南(IMP)和耐头孢他啶(CAZ)的铜绿假单胞菌进行表型确证, 初筛试验阳性菌株用 PCR 法检测金属酶基因型。结果 多重耐药菌株金属酶初筛实验阳性率为 10.9%, 用 CAZ/EDTA、CAZ/2-MPA、IMP/EDTA 和 IMP/2-MPA 检测多重耐药菌株金属酶阳性率分别为 7.5%、7.9%、8.8% 和 9.5%。PCR 扩增结果 *ipm1* 和 *vim* 基因阳性率分别达 10.4%、8.3%, 尚未发现 *spm*、*sim1* 及 *gim* 阳性菌株。结论 不同方法对金属酶检测结果不尽相同; 携带 *ipm1* 和 *vim* 金属酶基因是该院多重耐药的铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类的主要原因。

关键词:铜绿假单胞菌; 聚合酶链反应; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)15-1989-03

Study on genotypes and phenotypes of metallo- β -lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*Yang Xiaoying¹, Wu Hongqiu², Xiao Qizhi², Yan Changzheng¹, Yang Donghai¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Jinwan District Maternal and Child Health Care Hospital / Sanzao Hospital, Zhuhai, Guangdong 519040, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: Objective To study the generation of metallo- β -lactamase (MBLs) and its related gene carrying situation in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Methods Cefotaxime and imipenem were adopted to preliminarily screen MBLs of *Pseudomonas aeruginosa*. The phenotypic confirmatory of imipenem-resistant and ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* was performed by using 2-mercaptopyruvic acid (2-MPA) or EDTA synergy test and the MBLs genotypes of the positive strains in the preliminary screen were detected by PCR. Results The positive rate of the MBLs preliminary screen test in multi-resistant strains was 10.9%, and the positive rate of the MBLs in multi-resistant strains detected by CAZ/EDTA, CAZ/2-MPA, IMP/EDTA and IMP/2-MPA was 7.5%, 7.9%, 8.8% and 9.5% respectively. The positive rates of *ipm1* and *vim* gene by PCR were 10.4% and 8.3% respectively. The strains with positive *spm*, *sim1* and *gim* were not found. Conclusion The MBLs test results detected by different methods are different; MBLs genes carrying *ipm1* and *vim* are the main reason for carbapenem-resistant multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the hospital.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; polymerase chain reaction; genotype

铜绿假单胞菌(PAE), 又称绿脓杆菌, 是一种常见的医院感染致病菌。PAE 广泛存在于自然环境中、人体皮肤、呼吸道、肠道及医疗器械上, 属于条件致病菌, 易发生在免疫力低下的人群中。近年来, 随着碳青霉烯类抗菌药物在临床上广泛使用, 耐碳青霉烯类抗菌药物的 PAE 分离株日益增多。现已知 PAE 耐碳青霉烯类抗菌药物的机制最为主要的是因其产生可以有效水解碳青霉烯类等抗菌药物的金属 β -内酰胺酶(MBLs), 简称金属酶^[1-2], 产生金属酶造成 PAE 对碳青霉烯类等多种类别的抗菌药物广泛耐药已成为 PAE 多重耐药的重要原因之一, 为了解临床分离的 PAE 菌株产生金属酶的现状、耐药性及其基因型别, 笔者对 442 株 PAE 进行了表型及基因型的检测, 现报道如下。

1 材料与方

1.1 菌株来源 收集 2012 年 1 月至 2013 年 6 月间金湾区妇幼保健院和珠海市妇幼保健院两院住院患者自痰、胸腔积液、中段尿、脓液等无菌部位标本中分离的所有铜绿假单胞菌共计 442 株(没有重复菌株), 均用 VITEK-32 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司)鉴定到种。药敏试验采用 K-B 法进行, 其中药敏纸片购自 Oxoid 公司, 药敏试验结果判断采用美国 CLSI 2012 年标准; MH 平板购自广东江门凯林生物有限公司。检测 15 种抗菌药物: 哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、庆大

霉素、阿米卡星、左氧氟沙星、环丙沙星、氨基糖苷类、头孢他啶、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、复方新诺明、亚胺培南、美罗培南、妥布霉素。细菌鉴定与药敏均选用标准菌株大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 进行质控。

1.2 金属 β -内酰胺酶检测 用头孢他啶(CAZ)及亚胺培南(IMP)纸片进行金属酶初筛, 如果 CAZ 抑菌环直径小于或等于 14 mm, 或 IMP 抑菌环直径小于或等于 13 mm, 提示该菌株可能产生金属酶^[2-4]。采用双纸片法实验进行证实, 即以 EDTA 和 2-巯基丙酸(2-MPA)作抑制剂, 分别与 CAZ、IPM 纸片组合进行双纸片试验, 所有阳性菌株均应用 PCR 技术进行确证。

1.3 耐药基因检测 采用煮沸法提取细菌 DNA 后用 PCR 方法扩增 5 种编码金属酶基因 *gim*、*vim*、*spm*、*imp1*、*sim1* 进行扩增^[3], 其引物序列分别如下: *gim*(上游 5'-CTT GTA GCG TTG CCA GCT TTA-3', 下游 5'-CAG CCC AAG AGC TAA TTG AGG-3', 产物长度 562 bp)、*vim*(上游 5'-ATT CCG GTC GG(A/G) GAG GTC CG-3', 下游 5'-GAG CAA GTC TAG ACC GCC CG-3', 产物长度 633 bp)、*spm*(上游 5'-CTG CTT GGA TTC ATG GGC GCG-3', 下游 5'-CCT TTT CCC GAC CTT GCT CG-3', 产物长度 784 bp)、*imp1*[上游 5'-CGG CC (G/T) CAG GAG(A/C) G(G/T) CTT T-3', 下游 5'-AAC

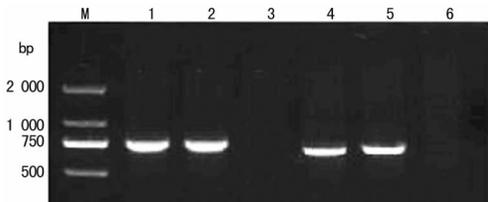
CAG TTT TGC(C/T) TTA C(C/T) AT-3', 产物长度 687 bp]、*sim1* (上游 5'-TAC AAG GGA TTC GGC ATC G-3', 下游 5'-TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG-3', 产物长度 467 bp)。PCR 循环参数为: 92 °C 预变性 5 min; 93 °C 60 s, 55~60 °C 60 s, 72 °C 60 s, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察分析, 记录结果。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 442 株铜绿假单胞菌对所选择 15 种抗菌药物的敏感率、中介率及耐药率的具体结果见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 金属酶检测结果 头孢他啶耐药率为 34.2% (151/442), 亚胺培南耐药率为 27.0% (119/442), 同时耐这两种抗菌药物的耐药率为 18.5% (81/442)。所有耐头孢他啶或者耐亚胺培南的菌株的金属酶初筛阳性率为 10.9% (48/442)。将金属酶初筛阳性的 48 株菌进行纸片组合试验, 其中 CAZ 和 CAZ/EDTA 检测阳性率 7.5% (33/442); CAZ 和 CAZ/2-MPA 阳性率 7.9% (35/442); IMP 和 IMP/EDTA 检测阳性率 8.8% (39/442); IMP 和 IMP/2-MPA 阳性率 9.5% (42/442)。

2.3 耐药基因检测结果 将 48 株协同试验阳性的菌株进行 5 种金属酶基因的检测结果显示: 共检出 9 株产金属酶菌株, 其余 39 株阴性, 其中 *ipm1* 阳性率达 10.4% (5/48), *vim* 阳性率达 8.3% (4/48), 尚未发现含 *spm*、*sim1* 及 *gim* 基因的菌株, 亦未发现其他耐药基因共同检出的耐药菌株。部分耐药基因检测结果见图 2。



M: DNA 标记物; 1, 2: 部分 PAE 中的 *ipm1* 基因阳性 PCR 产物; 4, 5: 部分 PAE 中的 *vim* 基因阳性 PCR 产物; 3, 6: 大肠埃希菌 ATCC 25922 阴性对照。

图 2 部分产生 *ipm1* 和 *vim* 基因菌株的 PCR 产物电泳图

3 讨 论

碳青霉烯类抗菌药物是由青霉素结构改造而成的一类新型 β -内酰胺类抗菌药物, 其结构与青霉素类的青霉环相似, 不同之处在于噻唑环上的硫原子为碳所替代, 且 C2 与 C3 之间存在不饱和双键; 另外, 其 6 位羟乙基侧链为反式构象^[6-7]。研究证明, 这个构型特殊的基因, 使该类化合物具有超广谱的、极强的抗菌活性, 以及对质粒介导的 β -内酰胺酶、超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs)、染色体及质粒介导的头孢菌素酶 (AmpC 酶) 均具有高度稳定性, 但可被金属 β -内酰胺酶水解灭活, 造成碳青霉烯类抗菌药物耐药^[4-5, 8-9]。近 10 年来, 国内、外临床已陆续分离出耐碳青霉烯类药物耐药的 PAE^[1-2, 4, 9]; 现已知产金属酶是 PAE 对碳青霉烯类药物耐药的最主要原因之一^[3-5, 9-10], 它能水解除单环类抗菌药物以外的几乎所有 β -内酰胺酶类抗菌药物。本次研究临床分离的 443 株 PAE 对 15 种抗菌药物的耐药谱中显示 (图 1), 未发现泛耐药及全敏感的菌株, 耐药率达 50% 以上的有氨曲南、哌拉西林及复方新诺明, 说明本地区治疗 PAE 应避免使用哌拉西林及复方新诺明, 建议首选头孢他啶; 属于碳青霉烯类的亚胺培南及美罗培南的耐药率分别是 27.0%、24.4%, 这比其他国内地区的 63.8% 的耐药率要低^[11], 与同为广东地区的文献报道 22% 稍高^[12], 说明本地区的亚胺培南的耐药率相比其他地区还处于中间水平, 临床应控

制使用碳青霉烯类抗菌药物。

目前, 对于金属酶的表型检测方法有很多, 共 7 种, 但国际上还没有统一的标准, 虽然 MBLs E 试验准确性高, 但成本较高, 不适合大量标本的筛查, 在中国检测 PAE 产金属酶最好是方法是组合纸片法^[13], 因为金属酶的活性激活需要锌离子 (Zn^{2+}) 的存在, 所以用金属离子的螯合剂可以螯合酶活性位点上的 Zn^{2+} , 从而导致金属酶失活。本试验将耐亚胺培南及耐头孢他啶的所有菌株分别用协同实验和组合纸片法实验进行金属酶检测, 协同实验阳性率为 10.9%, 与国内和国外研究结果相比都低^[11-14]; 组合纸片法结果显示, CAZ、IMP 及其相应抑制剂检测金属酶的结果也并不一致, 其中, IMP 和 IMP/EDTA 和 IMP 和 IMP/2-MPA 检测的阳性率较高 (8.8%~9.5%), 虽然组合纸片法的检出率较高, 但由于 2-MPA 具有一定的毒性, 在临床应用会受到限制。所以, 在临床医院使用协同纸片法检测金属 β -内酰胺酶的方法简便、结果可满足初筛需求, 且成本低廉, 特别适合基层临床微生物学实验室对革兰阴性杆菌产金属酶的初步筛查。

迄今, 文献^[13]报道共发现 *ipm*、*vim*、*spm*、*gim* 和 *sim* 5 个不同家族的金酶。本次检测结果显示: 检测到 *imp1*、*vim*, 其中 *imp1* 阳性率最高达 10.4% (5/48), *vim* 阳性率为 8.3% (4/48), 尚未发现携带 *spm*、*gim* 和 *sim1* 的菌株, 说明本地区 PAE 存在两种金属酶基因, 不同金属酶基因携带水平存在一定水平的差异, 具有 *imp1* 型和 *vim* 型金属酶可能是本地区住院患者对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因之一。因为没有检测所有的金属酶基因亚型, 所以并不能确定用纸片法检测阳性而此次基因扩增检测阴性的菌株是否真的未携带金属酶基因。值得注意的是本次检测的 PAE 金属酶表型阳性率结果明显高于基因检测结果, 这可能是由于筛查试验有人为判断因素、纸片法存在某些干扰因素而致一定的假阳性率; 同时也因本次检测的耐药基因型与亚型有限, 有可能存在一定水平的金属酶其他型别或亚型的耐药基因, 或者还有金属酶以外的耐药机制, 为了完整了解本地区的 PAE 等细菌的金属酶及其相关基因携带情况尚需进行大样本、全基因型别与亚型的基因检测。

总之, 多重耐药 PAE 和耐碳青霉烯类药物的铜绿假单胞菌的流行逐年增多, 给医务工作者再次敲响了警钟, 临床医生一定要注意合理用药, 以减少金属酶产生的机会, 阻断金属酶在不同细菌间传播。实验室工作人员应加强耐药菌的监测以及对产酶菌株进行筛查, 及时发现产酶菌株, 为临床医生准确地提供检测结果, 以便合理有效抗菌治疗; 同时要配合医院院感部门, 做好感染控制工作, 防止产酶菌的暴发流行。因此, 检测金属酶对临床治疗、医院感控和微生物实验室以及药物研发都具有重要意义。

参考文献

- [1] Arunagiri K, Sekar B, Sangeetha G, et al. Detection and characterization of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* by phenotypic and molecular methods from clinical samples in a tertiary care hospital[J]. West Indian Med J, 2012, 61(8): 778-783.
- [2] Yogeesh BK, Kumari A, Kumar A, et al. Role of Imipenem-resistant metallo-beta-lactamase positive *pseudomonas aeruginosa* carriers in nosocomial infections[J]. J Nat Sci Biol Med, 2013, 4(1): 181-186.
- [3] Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, et al. Efficacy of humanized carbapenem exposures against new delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-producing enterobacteriaceae in a murine infection model[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(8): 3936-3940.

2 结 果

2.1 配对差异实验 低浓度基础样本均值为 0.07 mmol/L, s 为 0.002 mmol/L; 高浓度基础样本均值为 0.38 mmol/L, s 为 0.005 mmol/L。低浓度基础样本 d_{max} 为 0.007 mmol/L, d_{max}/s 为 3.5; 高浓度基础样本 d_{max} 为 0.038 mmol/L, d_{max}/s 为 7.6。因此, 低、高浓度水平的重测次数均为 3 次。配对差异试验结果显示: 342 mol/L FBil, 342 mol/L CBil, 1450 浊度乳糜、5 g/L Hb 对 D3H 测定均无干扰; 0.03 g/L vit C 对低浓度 D3H 的 d_{obs} 和 d_c 分别为 0.11 和 0.002 5, 对高浓度 D3H 的 d_{obs} 和 d_c 分别为 0.06 和 0.005, d_{obs} 均大于 d_c , 说明 0.03 g/L vit C 对 D3H 检测有干扰。

2.2 剂量效应实验 剂量效应结果显示, vit C 对低、高浓度 D3H 测定可产生线性正干扰, 干扰效应结果见图 1、2。

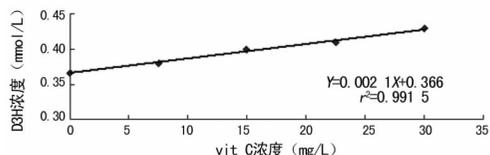


图 1 vit C 对低浓度 D3H 干扰的剂量效应图

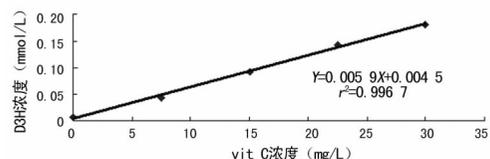


图 2 vit C 对高浓度 D3H 干扰的剂量效应图

2.3 vit C 干扰改进试验 取 D3H 试剂添加 2 500 U/L 维生素 C 氧化酶(实验试剂), 与未添加维生素 C 氧化酶的对照试剂进行维生素 C 干扰的“配对差异试验”, 结果显示, 添加 2 500 U/L 维生素 C 氧化酶的实验试剂, 0.03 g/L vit C 对低浓度 D3H 的 d_{obs} 和 d_c 分别为 0 和 0.002 5, 对高浓度 D3H 的 d_{obs} 和 d_c 分别为 0 和 0.005, d_{obs} 均小于对应 d_c , 说明 0.03 g/L vit C 对该试剂检测 D3H 无干扰作用, 添加维生素 C 氧化酶可对抗 vit C 对 D3H 检测的干扰作用。

3 讨 论

酮体是脂肪代谢的产物, 健康人体内的每个细胞均含有脂

肪酸, 当体内需要更多的能量时, 就要求脂肪细胞释放脂肪酸进入血液, 然后脂肪酸被运输到肝脏转化为酮体。酮体包括丙酮、乙酰乙酸和 D3H, 这三者处于动态平衡之中, 其中 D3H 水平最多。酮体和血糖一样, 是检测代谢控制的一项重要标记物, I 型糖尿病患者的最重要的特征之一就是易发展成为酮症酸中毒, 因此及时准确地检测 D3H 水平是十分关键的预知酮症酸中毒的重要手段^[3-5]。本文利用 EP7-A2 文件“干扰筛选”方法考察临床常见的干扰物 FBil、CBil、vit C、乳糜和 Hb 对 D3H 试剂测定的影响, 初步对其临床应用抗干扰性能进行评价, 结果显示, 342 mol/L FBil、342 mol/L CBil、1 450 FTU 乳糜、5 g/L Hb 对低、高浓度 D3H 测定无干扰, 0.03 g/L vit C 对低、高浓度 D3H 测定有干扰。根据文件规定, 对于经干扰筛查证明对被评价方法有明显干扰作用的可能干扰物, 需对其在不同浓度下对测定结果的干扰效应进行评价^[1], 根据干扰效应曲线, 可初步判断不同浓度的干扰物质对检测的干扰, 有助于临床诊断分析。本实验 5 个浓度系列的剂量效应结果显示, vit C 对 D3H 测定可产生线性正干扰, 而此干扰效应可通过往试剂中添加 2 500 U/L 维生素 C 氧化酶对抗。

参考文献

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP15-A2 Interference testing in clinical chemistry[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.
- [2] Ji JZ, Meng QH. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(17/18): 1550-1553.
- [3] Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Clin Chem, 2011, 57(6): 1-47.
- [4] 王立军, 梁常喜, 胡邦浩. 53 例不同病程糖尿病患者血清 D-3-羟丁酸水平与尿酮体含量的对比分析[J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(7): 793-795.
- [5] 李天勇. D3 羟丁酸在临床中的研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(33): 447-448.

(收稿日期: 2014-01-28)

(上接第 1990 页)

- [4] Takamitsu I, Fukui Y, Ono N, et al. Examination of metallo-beta-lactamase-producing different types of Serratia marcescens detected in the same patient[J]. Kansenshogaku Zasshi, 2013, 87(2): 189-194.
- [5] Berges L, Rodriguez-Villalobos H, Deplano A, et al. Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and E test for detection of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(4): 812-813.
- [6] Doosti M, Ramazani A, Garshasbi M. Identification and characterization of metallo-beta-lactamases producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in University Hospital from Zanjan Province, Iran [J]. Iran Biomed J, 2013, 17(3): 129-133.
- [7] Fast W, Sutton LD. Metallo-beta-lactamase: inhibitors and reporter substrates[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834(8): 1648-1659.
- [8] Tang XL, Liu P, Cai SY, et al. Roseomonas mucosa Isolated from Bloodstream of the MDS Patient[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2013, 7(2): 1279-1283.
- [9] 辜依海, 罗燕萍, 张文莉, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药性分析及金属 beta-内酰胺酶检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15

(3): 339-341.

- [10] Fujisaki M, Sadamoto S, Hishinuma A. Evaluation of the double-disk synergy test for New Delhi metallo-beta-lactamase-1 and other metallo-beta-lactamase producing gram-negative bacteria by using metal-ethylenediaminetetraacetic acid complexes [J]. Microbiol Immunol, 2013, 57(5): 346-352.
- [11] 杜艳, 陈瑞春, 穆玉娇, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌及其产金属酶的相关基因 blaVIM-2 研究[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(7): 507-509.
- [12] 付玉梅, 杨晓仪, 梁惠芬, 等. 社区感染耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属酶的筛选及基因分析[J]. 广东医学, 2013, 34(12): 1880-1882.
- [13] 王兴力, 多丽波, 铜绿假单胞菌金属酶及其检测方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(9): 2252-2254.
- [14] Franco MR, Caiiffa-Filho HH, Burattini MN, et al. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in a Brazilian university hospital[J]. Clinics, 2010, 65(9): 825-829.

(收稿日期: 2014-02-18)