

• 论 著 •

胸腔积液分离的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药机制研究

程绍云, 于 莉

(青岛市第三人民医院检验科, 山东青岛 266041)

摘要:目的 分析该院近 3 年来感染患者胸腔积液培养所分离的铜绿假单胞菌的耐药表型, 并检测相关耐药基因, 为临床抗感染治疗提供依据。方法 采用法国梅里埃 Bact/ALERT 3D 120 型血培养仪培养胸腔积液标本。西门子 MicroScan Walk-Away 96 微生物鉴定系统和进行药敏试验。亚胺培南-EDTA 双纸片法检测金属酶。PCR 检测耐药基因(OprD、VIM 和 IMP)。结果 38 株铜绿假单胞菌中 14 株对亚胺培南耐药, 其中有 2 株为多重耐药株, 4 株产金属酶。14 株耐药株中 OprD 基因 PCR 检测发现两株缺失, 而 IMP、VIM 金属酶基因检测结果有 2 株为阳性。结论 胸腔积液分离的铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率较高, 耐药机制包括产金属酶(VIM 和 IMP 基因)和 OprD 缺失。

关键词:铜绿假单胞菌; 胸腔积液; 亚胺培南; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)12-1686-02

Study of pleural isolated *Pseudomonas aeruginosa*s of the resistance mechanisms to carbapenems

Cheng Shaoyun, Yu Li

(Department of Clinical Laboratory, the third People's Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong 266041, China)

Abstract: **Objective** To analyze the antibiotic phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*s that were isolated from pleural samples in our hospital and test relative genes that may cause antibiotic resistance in order to provide information for clinical treatment. **Methods** BioMerieux Bact/ALERT 3D 120 blood culture system was used to culture pleural samples. Simens MicroScan Walk-Away 96 was employed for bacterial identification and susceptibility test. Imipenem-EDTA double disk method was used for screening MBL-producing isolates. PCR was used for testing OprD, VIM and IMP. **Results** 14 of 38 *Pseudomonas aeruginosa*s isolates showed resistance to Imipenem and 2 were with multi-resistance. 4 isolates produced MBL. Only two were found lack of OprD gene among the 14 isolates, and IMP and VIM genes were detected in 2 isolates. **Conclusion** The *Pseudomonas aeruginosa*s from pleural infection show relative higher resistant rate to Imipenem, and the existing mechanisms of Imipenem resistance included MBL(VIM and IMP genes) and lack of OprD.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*s; pleural fluid; Imipenem; antibiotic resistance

铜绿假单胞菌(PA)引起的感染多发生在衰弱或免疫受损的住院患者, 是医院内感染的主要病原菌之一。PA 感染可引起渗出性胸腔积液。及时对胸腔积液进行细菌培养对患者感染的诊断、治疗和预后均有着重要意义^[1-3]。碳青霉烯类药物是治疗 PA 感染的重要药物。然而, 随着耐碳青霉烯类抗菌药物的 PA 的日趋增多, 对其耐药机制的探索也逐渐深入。但是目前仍缺少对胸腔积液标本分离 PA 的耐药性研究。本文对本院胸腔积液感染患者所分离的 PA 进行耐药表型分析, 并检测相关耐药基因。

1 材料与方法

1.1 材料 收集本院 2011 年 1 月 1 日至 2013 年 12 月 31 日胸腔积液标本培养、分离到的铜绿假单胞菌共 38 株, 去除重复患者及同一患者的不同标本。PCR 仪 Eppendorf 公司 Mastercycler gradient。PCR 反应配套试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 胸腔积液标本采集方法 未经抗菌药物治疗、患者寒战或高热时, 严格无菌操作抽取静脉血或胸腔积液, 迅速注入专用需氧血培养瓶中, 及时送检。

1.3 培养方法 血培养瓶及时放入法国梅里埃 Bact/ALERT 3D 120 型血培养仪培养; 其余送检标本立即接种于血平板、麦

康凯平板和巧克力平板, 置 37℃ 培养箱中培养 18~24 h, 严格按照《全国临床检验操作规程》第 3 版进行。

1.4 细菌鉴定及药敏试验 血培养仪提示阳性后, 革兰染色镜检, 及时报告临床医生; 转种血平板、巧克力平板和麦康凯平板。置 37℃ 培养箱中培养 18~24 h。采用西门子 MicroScan WalkAway 96 微生物鉴定系统和进行药敏试验。药敏试验按美国临床实验室标准化委员会(CLSI)2012 年指南进行并判读结果。

1.5 金属酶筛查 亚胺培南-EDTA 酶抑制试验^[4]: 在每片 10 μg 亚胺培南纸片中加入 750 μg EDTA, 同时用未加 EDTA 的 10 μg 亚胺培南的抗菌药物纸片作为对照, 在 MH 平板上用常规纸片扩散法测定 23 株 PA 临床分离株及一株阴性对照株(ATCC 27853)、一株阳性对照株(产 VIM-4 酶 PA)的抑菌圈直径 d(mm)。判断标准为 Δd=(亚胺培南-EDTA)-d(亚胺培南)≥7 mm, 则为产酶株。

1.6 耐药基因 PCR 检测 PCR 反应体系及条件参照试剂盒说明书, 引物设计见表 1。

1.7 质量控制 以标准菌株铜绿假单胞菌(ATCC27853)、大肠埃希菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)作质控菌株。平板及药敏培养基质控合格。

2 结 果

2.1 铜绿假单胞菌的耐药性 38 株铜绿假单胞菌中 14 株对亚胺培南耐药,其中有 2 株为多重耐药株。胸腔积液分离的 38 株铜绿假单胞菌耐药率分别为阿米卡星 33.8%、庆大霉素 76.7%、头孢他啶 35.0%、氨基曲南 45.1%、亚胺培南 36.8%、复方磺胺甲噁唑 91.2%、头孢哌酮/舒巴坦 23.5%、头孢吡肟 40.0%。

2.2 亚胺培南-EDTA 酶抑制试验 测量各菌株亚胺培南-

EDTA 纸片和亚胺培南纸片抑菌圈直径,计算两者差值(Δ)。阳性对照(产 VIM-4 酶)的 $\Delta=13\text{ mm}$,阴性对照(ATCC 27853)的 $\Delta=1\text{ mm}$,四株碳青霉烯敏感株的 $\Delta\leq 2\text{ mm}$;而 14 株耐亚胺培南的菌株中有 4 株 $\Delta=8\text{ mm}$,初判为产金属酶的铜绿假单胞菌。其他 10 株耐药株 $\Delta\leq 4\text{ mm}$ 。

2.3 耐药基因 PCR 检测结果 14 株耐药株 OprD 基因 PCR 检测发现两株缺失,而 IMP、VIM 金属酶基因检测结果有 2 株为阳性。

表 1 PCR 扩增引物序列及终产物长度

引物名称	目的基因引物序列	终产物长度(bp)
oprD	5'-CGG CC(G/T) CAG GAG (A/C)G(G/T) CTT T-3'	587 bp
	5'-AAC CAG TTT TGC (C/T)TT AC(C/T) AT-3'	
vim	5'-CTT TAC CAG ATT GC(C/T) GAT GG-3'	593 bp
	5'-GG(C/T) AG(A/G) CCG TGC CC(G/C) GGA AT-3'	
imp	5'-GCG CAT CTC CAA GAC CAT G-3'	193 bp
	5'-GCC ACG CGA TTT GAC GGA G-3'	

3 讨 论

铜绿假单胞菌在院内获得性胸腔感染患者中较为常见,究其原因,可能与患者患有慢性阻塞性肺部疾病,长期住院或待在重症监护病房,曾有过细菌的定植史,医生的非正确性的经验治疗等密切相关。铜绿假单胞菌位列本院胸腔积液分离培养菌第 2 位,金黄色葡萄球菌为第 1 位。与全国细菌耐药性监测网监测结果有所不同,其发现的顺序为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌^[5]。对铜绿假单胞菌耐药情况的调查和耐药机制的研究已经较为深入。本研究补充了胸腔积液分离的铜绿假单胞菌的耐药情况和可能机制。本院分离的 38 株胸腔积液感染铜绿假单胞菌中,有 14 株对亚胺培南耐药。对庆大霉素和复方磺胺甲噁唑耐药率高,分别为 76.7%和 91.2%。本组资料显示,第三代头孢菌素中对 PA 最敏感的是头孢他啶(耐药率为 35%),与已有报道一致^[6]。阿米卡星、头孢他啶、头孢吡肟和氨基曲南的耐药率为 33%~45%。

铜绿假单胞菌外膜的低通透性(如 OprD 缺失)、金属酶的产生(IMP 和 VIM)、主动外排泵过度表达(如 MexAB-OprM)是耐碳青霉烯类抗菌药物的主要机制,且多数菌株为多种耐药机制并存^[7-9]。本此实验发现 14 株耐药株 OprD 基因 PCR 检测发现两株缺失。金属酶产生的判断实验中有 4 株为阳性,但 IMP、VIM 金属酶基因检测结果只有 2 株为阳性,可见是否有其他碳青霉烯酶存在,还需进一步调查。临床上应重视实验室做出的结果,充分考虑其耐药机制,选用耐药率低的抗菌药物。同时,应监测抗菌药物使用的合理性,减少多重耐药菌株的传播^[10-11]。

参考文献

[1] Davies HE, Davies RJ, Davies CW, et al. Management of pleural infection in adults; British Thoracic Society Pleural Disease Guide-

line 2010[J]. Thorax, 2010, 65(2): 41-53.

[2] Kosykowska E, Szymanek-Majchrzak K, Walter de Walthoffen S, et al. Molecular analysis of carbapenem-resistant strains of pseudomonas aeruginosa isolated from patients hospitalized in various transplanta-tion wards between 2008 and 2011 [J]. Transplant Proc, 2014, 46(8): 2576-2578.

[3] Lisboa T, Waterer GW, Lee YC. Pleural infection; changing bacteriology and its implications [J]. Respirology, 2011, 16(4): 598-603.

[4] Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of pseudomonas spp. and acinetobacter spp [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3798-3801.

[5] 孟灵, 李光迪, 王应芳, 等. Mohnarin 2008 年度报告: 胸水来源细菌耐药监测 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 8(35): 609-613.

[6] 杨菁菁, 艾效曼, 胡云建, 等. 泛耐药铜绿假单胞菌对 β 内酰胺类抗生素的耐药机制研究 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(1): 14-18.

[7] 何萍, 丁云芳. 铜绿假单胞菌耐药机制的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 850-851.

[8] Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes [J]. Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res, 2010, 10(4): 441-451.

[9] Li H, Luo YF, Williams BJ, et al. Structure and function of OprD protein in Pseudomonas aeruginosa: From antibiotic resistance to novel therapies [J]. Int J Med Microbiol, 2012, 302(2): 63-68.

[10] 蒋燕群, 朱文欣, 王坚强, 等. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌耐药机制研究 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 20(1): 31-33.

[11] 季萍, 朱震宏, 张朝霞. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药机制研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 22(6): 1061-1063.