

论著·临床研究

80 株铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药机制的研究*

哈 瑞¹, 李 刚², 师志云², 武 涛³, 赵志军⁴, 贾 伟^{2△}

(1. 宁夏医科大学, 宁夏银川 750004; 宁夏医科大学总医院; 2. 医学检验中心;
3. 预防保健科, 宁夏银川 750004; 4. 宁夏病原微生物重点实验室, 宁夏银川 750004)

摘 要:目的 检测和研究耐亚胺培南铜绿假单胞菌的临床特征及耐药机制。方法 对 2016 年 1 月至 2017 年 9 月该院临床分离的 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌的科室分布、标本类型及耐药性进行回顾性分析; 运用 PCR 检测耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药基因 bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{NDM-1}、bla_{SIM}、bla_{SPM}、bla_{GIM}、bla_{OXA-10} 及膜孔蛋白 OprD₂ 基因。结果 该院以神经外科送检标本的耐亚胺培南铜绿假单胞菌检出(28.0%)最多, 主要分离自呼吸道标本(86.0%)。80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对阿米卡星的耐药率最低(7.5%), 对复方磺胺甲噁唑的耐药率最高(97.5%)。耐药基因检测结果显示: bla_{VIM} 基因阳性 1 株(1.2%), bla_{OXA-10} 基因阳性 4 株(5.0%), 其他耐药基因均未检出; 膜孔蛋白 OprD₂ 基因缺失 67 株(83.8%)。结论 本研究中铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制是膜孔蛋白 OprD₂ 基因的缺失。

关键词:铜绿假单胞菌; 亚胺培南; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.014

中图法分类号:R372

文章编号:1673-4130(2019)21-2617-04

文献标识码:A

Mechanisms of imipenem resistance in 80 *Pseudomonas aeruginosa* strains*

HA Rui¹, LI Gang², SHI Zhiyun², WU Tao³, ZHAO Zhijun⁴, JIA Wei^{2△}

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Medical Laboratories; 3. Department of Prevention and Health Protection, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 4. Ningxia Key Laboratory of Pathogenic Microorganisms, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To detect and study the clinical characteristics and drug resistance mechanism of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** A retrospective analysis was made on the distribution, specimen type and drug resistance of 80 strains of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from January 2016 to September 2017. The resistance genes bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{NDM-1}, bla_{SIM}, bla_{SPM}, bla_{GIM}, bla_{OXA-10} and OprD₂ of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were detected by PCR. **Results** The highest detection number of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* was found in neurosurgical specimens(28.0%), mainly isolated from respiratory tract specimens(86.0%). A total of 80 strains imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* had the lowest resistance rate to amikacin(7.5%) and the highest resistance rate to compound neotamine(97.5%). The results of drug resistance gene detection showed that 1 strain(1.2%) was bla_{VIM} gene positive, 4 strains(5.0%) were bla_{OXA-10} gene positive, and no other drug resistance genes were detected; 67 strains(83.8%) were OprD₂ gene deleted. **Conclusion** The main mechanism of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem is the deletion of OprD₂ gene.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; imipenem; drug resistance gene

铜绿假单胞菌为条件致病菌,亦是医院感染的主要病原菌之一^[1]。亚胺培南属于碳青霉烯类药物中常用的一种,近年来,耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌引

起的感染不断增多,本研究初步对其耐药机制进行了探讨,旨在为临床合理使用抗菌药物治疗铜绿假单胞菌的感染提供较有价值的依据。

* 基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(NZ17149、NZ17169、2019AAC03216);宁夏高等学校一流学科建设基金资助项目(NXYLXK2017A05)。

作者简介:哈瑞,女,检验技师,主要从事临床病原微生物与免疫学检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail:13519299090@126.com。

本文引用格式:哈瑞,李刚,师志云,等. 80 株铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药机制的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21): 2617-2620.

1 材料与方法

1.1 菌株 随机挑选宁夏医科大学总医院 2016 年 1 月至 2017 年 9 月各类临床标本中分离的对亚胺培南耐药的非重复铜绿假单胞菌 80 株。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 仪器与试剂 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析系统及其配套鉴定卡购自法国梅里埃公司;K-B 法药敏纸片及分配器、M-H 药敏平板、PCR 扩增仪、电泳仪及凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司;PCR 反应试剂 2×Power Taq PCR MasterMix 购自中国北京百泰克生物技术有限公司;DL2000 Marker 购自中国北京全式金生物技术有限公司;合成的引物购自中国上海生物工程股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定及药敏试验 保存菌株室温复苏后转种培养 18~24 h,K-B 纸片扩散法测定其对抗菌药物的敏感性。实验方法及药敏结果判断参照 2016 年美国临床和实验室标准协会操作规程进行。

1.3.2 PCR 引物设计 本次试验所要检测的耐药基因引物均参照国内外文献设计^[2-7],所有 PCR 扩增所需的引物都委托中国上海生物工程有限公司合成。见表 1。

表 1 靶基因的引物序列			
基因名称		引物序列(5'-3')	引物大小(bp)
bla _{IMP}	F:	CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	591 ^[3]
	R:	AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	
bla _{VIM}	F:	ATG TTC AAA CTT TTG AGT A	801 ^[2]
	R:	CTA CTC AAC GAC TGA GCG	
bla _{NDM-1}	F:	GGT TTG GCG ATC TGG TTT C	621 ^[7]
	R:	CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC	
bla _{SIM}	F:	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G	571 ^[3]
	R:	TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	
bla _{GIM}	F:	ATG GGT TGG TAG TTC TGG ATA	355 ^[3]
	R:	ACT CAT GAC TCC TCA CGA GG	
bla _{SPM}	F:	CTG CTT GGA TTC ATG GGC GCG	784 ^[4]
	R:	CCT TTT CCG CGA CCT TGA TCG	
bla _{OXA-10}	F:	TCA ACA AAT CGC CAG AGA AG	277 ^[6]
	R:	TCC CAC ACC AGA AAA ACC AG	
OprD ₂	F:	GCG CAT CTC CAA GAC CAT G	193 ^[5]
	R:	GCC ACG CGA TTT GAC GGA G	

1.3.3 耐药基因检测 采用煮沸法提取模板 DNA, -20 ℃保存备用。PCR 反应采用 50 μL 体系,PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 35 s,适宜温度退火 35 s,72 ℃延伸 1 min,重复 30 个循环;72 ℃

再延伸 10 min。PCR 扩增产物用含 GoldView I 型核酸染色剂的 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析(电压 80 V,时间 35 min),凝胶成像。

1.4 统计学处理 采用 WHONET5.6 软件进行耐药性分析。

2 结果

2.1 临床特征 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌的科室分布以神经外科(28.0%)、ICU(16.0%)、呼吸内科(15.0%)所占比例较高。标本类型以呼吸道标本为主,占 86.0%。见表 2、3。

表 2 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌主要科室分布		
科室	<i>n</i>	构成比(%)
神经外科	22	28.0
ICU	13	16.0
呼吸内科	12	15.0
急诊科	8	10.0
神经内科	6	7.0
胃肠外科	6	7.0
肝胆外科	3	4.0
其他	10	13.0
合计	80	100.0

表 3 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌的标本分布		
标本种类	<i>n</i>	构成比(%)
呼吸道标本	68	86.0
脓性分泌物	3	4.0
引流液	3	4.0
胆汁	2	2.0
穿刺液	2	2.0
尿	1	1.0
血液	1	1.0
合计	80	100.0

2.2 药敏试验结果 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌对阿米卡星的耐药率最低(7.5%),对复方磺胺甲噁唑的耐药率最高(97.5%)。见表 4。

表 4 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌药敏试验结果(%)			
抗菌药物	敏感	中介	耐药
哌拉西林	46.3	31.2	22.5
头孢他啶	61.3	12.5	26.2
头孢吡肟	65.0	13.8	21.2
哌拉西林/他唑巴坦	46.3	38.7	15.0
亚胺培南	0.0	0.0	100.0
氨基曲南	37.5	13.8	48.7
阿米卡星	87.5	5.0	7.5

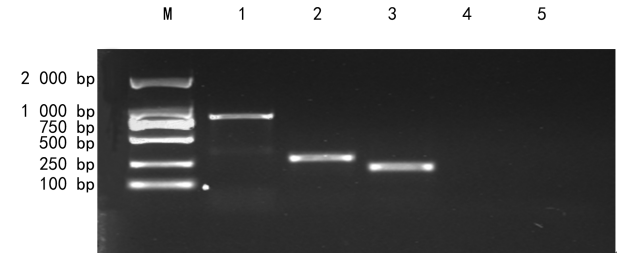
续表 4 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌药敏试验结果 (%)

抗菌药物	敏感	中介	耐药
庆大霉素	71.3	12.5	16.2
妥布霉素	87.5	1.2	11.3
环丙沙星	56.2	16.3	27.5
复方磺胺甲噁唑	2.5	0.0	97.5

2.3 耐药基因检测结果 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中, bla_{VIM} 基因阳性 1 株 (1.2%), bla_{OXA-10} 基因阳性 4 株 (5.0%), 其他耐药基因均未检出。膜孔蛋白 OprD₂ 缺失 67 株 (83.8%)。见表 5、图 1。

表 5 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药基因检测结果

耐药基因名称	阳性菌株	检出率 (%)
bla _{IMP}	0	0.0
bla _{VIM}	1	1.2
bla _{NDM-1}	0	0.0
bla _{SIM}	0	0.0
bla _{GIM}	0	0.0
bla _{SPM}	0	0.0
bla _{OXA-10}	4	5.0
膜孔蛋白 OprD ₂ 基因缺失	67	83.8



注: M 表示 DNA 标准带; 1 表示 bla_{VIM} 基因的扩增条带; 2 表示 bla_{OXA-10} 基因的扩增条带; 3 表示膜孔蛋白 OprD₂ 基因的扩增条带; 4 表示膜孔蛋白 OprD₂ 基因缺失; 5 表示空白对照

图 1 耐药基因 PCR 结果

3 讨 论

亚胺培南等碳青霉烯类抗菌药物是对多种 β-内酰胺酶高度稳定的、非典型的一类 β-内酰胺类抗菌药物, 具有强大的杀菌活性, 常作为治疗铜绿假单胞菌感染的最后防线。然而近年来随着此类抗菌药物的不规范使用, 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌不断增多, 且呈现一定比例的多重耐药性^[8], 给临床治疗带来严峻挑战。

铜绿假单胞菌的医院科室分布广泛, 而且具有集中于部分科室的趋势, 该院以神经外科 (28.0%)、ICU (16.0%) 送检标本的耐亚胺培南铜绿假单胞菌检出率较高, 有别于巫俊琴等^[9]报道的呼吸内科检出率最高, 可能因为该院这 2 个科室标本送检率高, 患者住院时间长, 病情危重且抵抗力低下, 较多呈昏迷状态,

常需使用器械性和侵入性治疗手段维持生命体征。80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌主要分离自呼吸道标本 (86.0%), 与陈燕等^[10]、张晓兰等^[11]的报道基本一致, 呼吸道本身有定植铜绿假单胞菌, 而住院患者呼吸道分泌功能减退, 纤毛活动减弱, 分泌物增加, 机体免疫力降低, 更容易受铜绿假单胞菌侵袭, 这二者共同导致呼吸道标本中铜绿假单胞菌检出率较高。

本研究药敏结果显示, 耐亚胺培南铜绿假单胞菌对阿米卡星的耐药率最低, 为 7.5%, 与 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测报道基本一致^[12]。对其他两种氨基糖苷类药物妥布霉素和庆大霉素的耐药率也较低, 可能是因为其具有耳毒性和肾毒性, 而且单独用于治疗铜绿假单胞菌感染往往失败, 故临床一般不单独使用; 对复方磺胺甲噁唑及氨曲南耐药性较强, 耐药率分别为 97.5%、48.7%, 高于巫俊琴等^[9]报道的 67.0% 和 26.0%, 可能与该院临床较多使用此类药物有关; 对常用的 β-内酰胺类抗菌药物哌拉西林、头孢他啶、头孢吡肟的耐药率分别为 22.5%、26.2%、21.2%, 与高世华等^[13]所报道的较一致, 说明该院对常规使用的抗菌药物敏感性较好, 可能与该院临床医师规范使用抗菌药物, 医院严格进行药物监管措施等有关。该院耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌呈现一定的多重耐药, 但程度相对较轻, 建议治疗此类细菌感染考虑联合用药, 如 β-内酰胺类 + 氨基糖苷类、β-内酰胺类 + 喹诺酮类、喹诺酮类 + 氨基糖苷类或双 β-内酰胺类。基于本研究的结果, 头孢吡肟联合阿米卡星可以用于绝大多数铜绿假单胞菌感染的治疗。

铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物的耐药机制复杂多样, 主要包括: (1) 碳青霉烯酶的产生, 能水解碳青霉烯类药物, 导致出现耐药^[14]。铜绿假单胞菌产生的主要碳青霉烯酶是 B 类金属酶 (MBL) 及 D 类苯唑西林水解酶 (OXA 类酶)。目前在铜绿假单胞菌中发现的 MBL 主要有 6 种基因型: bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{NDM-1}、bla_{SIM}、bla_{SPM}、bla_{GIM}, OXA 类酶基因主要包括 bla_{OXA-10}、bla_{OXA-14}、bla_{OXA-23} 等。该院耐药基因检测结果显示, 80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中, bla_{VIM} 基因阳性 1 株 (1.2%), bla_{OXA-10} 基因阳性 4 株 (5.0%), 其他耐药基因均未检出, 提示产生碳青霉烯酶不是本地区铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制。(2) 外膜通透性障碍, 膜孔蛋白 OprD 的改变或缺失, 使抗菌药物进入细菌受阻而产生耐药。OprD 分为 OprD₁、OprD₂、OprD₃^[15], 其中 OprD₂ 孔道具有配体特异性, 能形成亚胺培南的特异性结合位点, 为亚胺培南进入细菌的快速特异性通道^[5], 膜孔蛋白 OprD₂ 的缺失或表达降低是铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的重要机制。沈继录等^[16]发现亚胺培南耐药

株的 OprD₂ 基因缺失率明显高于敏感株。本研究中,膜孔蛋白 OprD₂ 基因缺失率为 83.8%,表明膜孔蛋白 OprD₂ 基因缺失是导致该院铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要原因,与胡琴等^[17]报道的 72.0%较为一致,低于四川地区报道的 100.0%^[15],国外 AR-ABESTANI 等^[18]也有报道耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌中 OprD₂ 基因呈高表达,说明铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物的耐药机制存在地域差异,而且各地区耐药的主要原因也不尽相同。根据本研究中的耐药性统计分析,该院耐亚胺培南铜绿假单胞菌对 β-内酰胺类药物耐药不甚严重,推断膜孔蛋白 OprD₂ 缺失主要介导铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药,对其他药物的作用较小。本研究中,80 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中,有 72 株检测到碳青霉烯酶基因 bla_{VIM}、bla_{OXA-10},或者有膜孔蛋白 OprD₂ 基因的缺失,剩余 8 株耐药菌可能由其他耐药机制介导,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物的耐药机制还有主动外排泵的过度表达、药物作用靶位的改变、细菌生物膜的形成以及整合子的介导等,笔者会在后续研究中进一步阐明。

4 结 论

铜绿假单胞菌的耐药性日趋严重,因此,临床医师应积极送检微生物标本,严格参考药敏结果,合理选用抗菌药物,以减少细菌耐药的发生。该院铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制是膜孔蛋白 OprD₂ 的缺失,实验室应重视此类蛋白的流行病学检测,加强医院感染控制。

参考文献

- [1] MADHUSUDHAN K T, MCLAUGHLIN R, KOMORI N, et al. Identification of a major protein upon phosphate starvation of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI[J]. Basic Microbiol, 2003, 43(1): 36-46.
- [2] BAHAR M A, JAMALI S, SAMADIKUCHAKSARAEI A. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo-β-lactamase gene bla VIM in a level I Iranian burn hospital[J]. Burns, 2010, 36(6): 826-830.
- [3] LEE M F, PENG C F, HSU H J, et al. Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(6): 475-480.
- [4] ZAHRA T, REZVAN M, AHMAD K, et al. Detection and characterization of multidrug resistance and extend-

ed-spectrum-beta-lactamase-producing (ESBSL) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in teaching hospital[J]. African Journal of Microbi Res, 2011, 9, 5(20): 3223-3228.

- [5] 刘永芳,吕晓菊,俞汝佳. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药性及其耐药表型与外膜蛋白 OprD₂ 的关系[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(9): 564-568.
- [6] 茅利明,许德顺. 铜绿假单胞菌中 OXA 基因的分布与耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(16): 3329-3331.
- [7] 潘婉仪,黄宪章,杨洁等. 广州地区产金属 β-内酰胺酶铜绿假单胞菌的流行病学研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(8): 1893-1895.
- [8] KOUTSOGIANNOU M, DROUGKA E, LIAKOPOULOS A, et al. Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(2): 665-668.
- [9] 巫俊琴,程曦. 2014—2016 年某院铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(11): 1285-1288.
- [10] 陈燕,罗欲承. 2013—2015 年铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(10): 1798-1800.
- [11] 张晓兰,胥振阳,李晓辉,等. 309 株铜绿假单胞菌的分布及耐药性[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(4): 440.
- [12] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 16(3): 241-251.
- [13] 高世华,池细梯,李国玉,等. 2013—2017 年耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌感染情况调查及耐药性变迁[J]. 福建医药杂志, 2018, 40(6): 35-39.
- [14] 刘洋,邓琼,余阳,等. 碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌的耐药机制及同源性分析[J]. 中华烧伤杂志, 2014, 30(1): 15-20.
- [15] 袁翊,叶帮芬,万小涛,等. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药机制[J]. 检验医学与临床, 2017, 11(3): 1602-1604.
- [16] 沈继录,朱德妹,吴卫红,等. 碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌外膜孔蛋白 OprD₂ 的研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(4): 281-286.
- [17] 胡琴,聂署萍,吴润香,等. 耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药表型及基因型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(11): 1305-1307.
- [18] ARABESTANI M R, RAJABPOUR M, MASHOUF R Y, et al. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical samples using qRT-PCR[J]. Arch Iran Med, 2015, 18(2): 102-108.

(收稿日期:2019-02-24 修回日期:2019-05-08)