

重症监护病房耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药机制和分子分型的研究

周勇, 和鹏, 侯水平, 陶霞, 张晶, 胡玉山, 吴新伟

广州市疾病预防控制中心微生物检验部, 广东 广州 510440

摘要: **目的** 分析重症监护病房(intensive care unit, ICU)耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药特征及其耐药机制。 **方法** 收集 2018 年 1 月—2019 年 9 月广州市某医院 ICU 分离的 37 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌(imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*, IRPA), 使用微生物鉴定药敏分析系统分析菌株的抗菌药敏感性, 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)进行聚类分析, PCR 检测金属 β -内酰胺酶基因以及 *oprD2* 基因, 并对阳性株进行测序。 **结果** 37 株 IRPA 的抗菌药敏感性结果显示对 β -内酰胺类抗生素的耐药率均很高, 而氨基糖苷类和喹诺酮类抗菌药的耐药率很低。37 株 IRPA 有 11 株检出携带金属酶基因, 其中 7 株 blaVIM-2, 4 株 blaIMP-9。 *oprD2* 缺失和有意义突变合计 33 株, 占 89.2%。PFGE 分析结果显示菌株高度克隆多样性, 但携带金属酶基因的 11 株菌被分成了两个带型簇。 **结论** 本实验证实 *oprD2* 基因缺失, 发生有义突变, 是铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制; 携带 blaVIM-2 和 blaIMP-9 的 IRPA 菌株有在 ICU 引起暴发流行的风险。

关键词: 铜绿假单胞菌; 亚胺培南; 耐药; 金属 β -内酰胺酶; *oprD2* 基因; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R378.99⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2021)04-0446-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.04.010

Antimicrobial resistance mechanism and molecular subtyping of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in intensive care units

ZHOU Yong, HE Peng, HOU Shui-ping, TAO Xia, ZHANG Jing, HU Yu-shan, WU Xin-wei

Microbiology Testing Laboratory, Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510440, China

Corresponding author: WU Xin-wei, E-mail: Tomwu@126.com

Abstract: **Objective** To analyze the antimicrobial resistance characteristics and mechanisms of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in intensive care units (ICUs). **Methods** Thirty-seven imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates were obtained from ICUs of a hospital in Guangzhou from January 2018 to September 2019. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the isolates were determined by microbial identification and drug sensitivity analysis system. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to perform clustering analysis. Polymerase chain reaction (PCR) was applied to determining metallo- β -lactamase (MBL) production and *oprD2* gene, and the positive isolates were sequenced. **Results** All 37 IRPA isolates were resistant to the most beta-lactam antibiotics, but susceptible to aminoglycosides and quinolones. Eleven of the 37 IRPA isolates were MBL producers, including 7 isolates with blaVIM-2 and 4 isolates with blaIMP-9. The sequencing results of *oprD2* showed that the disrupted *oprD2* mutations rate was as high as 89.2% (33/37). PFGE revealed a high level of clonal diversity, but there were two clones represented in 11 MBL producers. **Conclusions** This study confirmed that imipenem resistance was driven by *oprD2* inactivation. The IRPA isolates carrying blaVIM-2 or blaIMP-9 may be prevalent in ICUs.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; imipenem; drug resistance; metallo- β -lactamase; *oprD2* gene; pulsed-field gel electrophoresis

铜绿假单胞菌是医院内感染最常见的机会致病菌之一。铜绿假单胞菌较少引起健康人群感染, 常见于有基础疾病和免疫力低下的住院患者, 特别是重症监护病房(intensive care unit, ICU)的住院患者。目前医

基金项目: 广州市医学重点学科建设项目(No. 2017-2019-07)

作者简介: 周勇(1978-), 男, 硕士研究生, 副主任技师, 研究方向: 细菌耐药。

通信作者: 吴新伟, E-mail: Tomwu@126.com。

院内感染的铜绿假单胞菌的耐药性较高, 除了多重耐药还出现了泛耐药和全耐药的铜绿假单胞菌, 给临床治疗带来极大挑战^[1-3]。碳青霉烯类抗生素是治疗革兰阴性菌铜绿假单胞菌感染的重要抗生素之一, 但铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率多年来一直保持较高水平。中国 2017 年铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率为 23.6%, 美罗培南为 20.9%, 铜绿假单胞菌碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究仍是值得重点

关注的问题^[4]。

铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制复杂,主要有β-内酰胺酶的产生,如碳青霉烯酶、AmpC酶、OXA 酶等;外膜通透性的下降,如膜孔蛋白 OprD 的缺失;主动外排系统的高表达,如 MexAB-OprM;还有生物被膜的形成以及青霉素结合蛋白的改变等。铜绿假单胞菌对碳青霉烯类耐药往往是多种耐药机制联合作用的结果。为了解医院 ICU 耐亚胺培南铜绿假单胞菌(imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*, IRPA)的耐药机制,本研究收集了广州市某医院 2018 年 7 月—2019 年 9 月从 ICU 分离的 37 株 IRPA,对菌株进行耐药特征研究和聚类分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2018 年 7 月—2019 年 9 月,广州市某大型综合三级甲等医院上送 37 株初步鉴定为亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌,菌株全部分离自 ICU 患者痰液。所有菌株上送后在广州市疾病预防控制中心实验室再次通过 VITEK2-compact(法国生物梅里埃)进行生化鉴定。

1.2 抗菌药敏感性试验 抗生素的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)使用 Biofosun 微生物鉴定药敏分析系统(上海复星公司)分析,选择非发酵革兰阴性菌药敏卡进行鉴定,包括:哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林、头孢噻肟、头孢替坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星等 15 种抗菌药物。药敏试验结果按美国临床实验室标准化委员会 CLSI(2018 版)文件标准进行判读。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.3 检测碳青霉烯耐药基因和膜孔蛋白基因 根据文献合成引物(见表 1),PCR 扩增碳青霉烯耐药基因 *blaVIM*-、*blaIMP*、*blaNDM*、*blaKPC* 以及外膜蛋白基因 *oprD2*^[6,7],扩增条件为:94℃预变性 5 min,(94℃变性 1 min,52℃退火 50 s,72℃延伸 3 min)×35 循环,72℃延伸 10 min。将 PCR 扩增产物送广州昊天生物科技有限公司进行测序。膜孔蛋白 *oprD2* 基因测序的结果与 GenBank 上保存的铜绿假单胞菌 PAO1 的 *oprD2* 序列进行比对分析。

表 1 碳青霉烯酶基因和膜孔蛋白基因 PCR 引物序列

| 引物 | 序列 | 扩增长度(bp) |
|------|----------------------------------|----------|
| KPC1 | 5'-ATG TCA CTG TAT CGC CGT C-3' | 863 |
| KPC2 | 5'-AAT CCC TCG AGC GCG AGT-3' | |
| VIM1 | 5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3' | 382 |

续表 1

| 引物 | 序列 | 扩增长度(bp) |
|--------|-----------------------------------------|----------|
| VIM2 | 5'-AAT GCG CAG CAC CAG GAT AGA A-3' | |
| IMP1 | 5'-CCW GAT TTA AAA ATY GAR AAG CTT G-3' | 522 |
| IMP2 | 5'-TGG CCA HGC TTC WAH ATT TGC RTC-3' | |
| NDM-A | 5'-CAC CTC ATG TTT GAA TTC GCC-3' | 984 |
| NDM-B | 5'-CTC TGT CAC ATC GAA ATC GC-3' | |
| OprD-F | 5'-CGC CGA CAA GAA GAA CTA GC-3' | 1 412 |
| OprD-R | 5'-GTC GAT TAC AGG ATC GAC AG-3' | |

1.4 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 参考文献的方法并做了适当调整^[8],限制性内切酶选 SpeI 酶,伤寒沙门菌 H9812 作为质控菌株进行脉冲场电泳。电泳参数为 5~15 s,9 h;15~50 s,9 h。电泳结束后,使用 EB 染色 30 min,再用超纯水脱色 1.5 h。在凝胶成像仪中成像,并转换成 TIFF 图像格式保存。PFGE 图像录入 BioNumerics 7.6 软件进行处理,识别图像条带,经统一的分子质量标准,进行聚类,构建聚类树。

2 结果

2.1 耐药特点 本研究中 IRPA 菌株除全部对哌拉西林、亚胺培南耐药外,对头孢他啶的耐药率和中介率分别是 56.76%及 43.24%;头孢吡肟的敏感率也只有 35.14%;而美罗培南只有 12 株耐药,耐药率 32.43%;氨基糖苷类的抗生素如阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素的耐药率都是 0.00%;喹诺酮类抗菌药如环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率也是 0.00%,但分别有 32.43%及 10.81%的中介率,见表 2。

表 2 37 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌的抗菌药敏感性结果

| 抗菌药 | 敏感 | | 中介 | | 耐药 | |
|-----------|----|--------|----|-------|----|--------|
| | 株数 | 率(%) | 株数 | 率(%) | 株数 | 率(%) |
| 哌拉西林 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 37 | 100.00 |
| 哌拉西林/他唑巴坦 | 20 | 54.05 | 0 | 0.00 | 17 | 45.95 |
| 替卡西林/克拉维酸 | 28 | 75.68 | 0 | 0.00 | 9 | 24.32 |
| 头孢他啶 | 0 | 0.00 | 16 | 43.24 | 21 | 56.76 |
| 头孢吡肟 | 13 | 35.14 | 10 | 27.03 | 14 | 37.84 |
| 亚胺培南 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 37 | 100.00 |
| 美罗培南 | 25 | 67.57 | 0 | 0.00 | 12 | 32.43 |
| 阿米卡星 | 37 | 100.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| 庆大霉素 | 37 | 100.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| 妥布霉素 | 37 | 100.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| 环丙沙星 | 25 | 67.57 | 12 | 32.43 | 0 | 0.00 |
| 左氧氟沙星 | 33 | 89.19 | 4 | 10.81 | 0 | 0.00 |

2.2 PCR 检测碳青霉烯酶基因和 oprD2 基因以及其

2.3 PFGE 分型与聚类分析 37 株 IRPA 基因组经 SpeI 酶切后进行 PFGE 分子分型, 采用 BioNumerics 软件对电泳条带进行聚类分析, 37 株菌共分为 34 种不同的带型, 相似度为 46.2%~100%。37 株菌中包含 2 个 PFGE 带型相似度较高的簇, 其中簇 1 包含 4 株检出 *blaIMP-9* 的菌株, 平均相似度为 95.1%, 簇 2 包含 7 株检出 *blaVIM-2* 的菌株, 平均相似度为 88.2%, 见图 1。

3 讨 论

本研究中分离的 IRPA 菌株对 β -内酰胺类抗生素的耐药率均很高,37 株 IRPA 均对哌拉西林耐药,头孢他啶、头孢吡肟、美罗培南等的耐药率分别是 56.8%、37.8%和 32.4%。酶抑制剂抗菌药物哌拉西林/他唑巴坦和替卡西林/克拉维酸的耐药率也较高,分别是 46.0%和 24.3%,这可能与该地区临床头孢二、三代类药物的广泛使用有关,值得临床注意。37 株 IRPA 对氨基糖苷类和喹诺酮类抗菌药的耐药率很低,如对阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素和妥布霉素全部敏感,提示临床治疗铜绿假单胞菌感染应减少 β -内酰胺类抗生素的使用,首选敏感的氨基糖苷类和喹诺酮类抗菌药治疗。

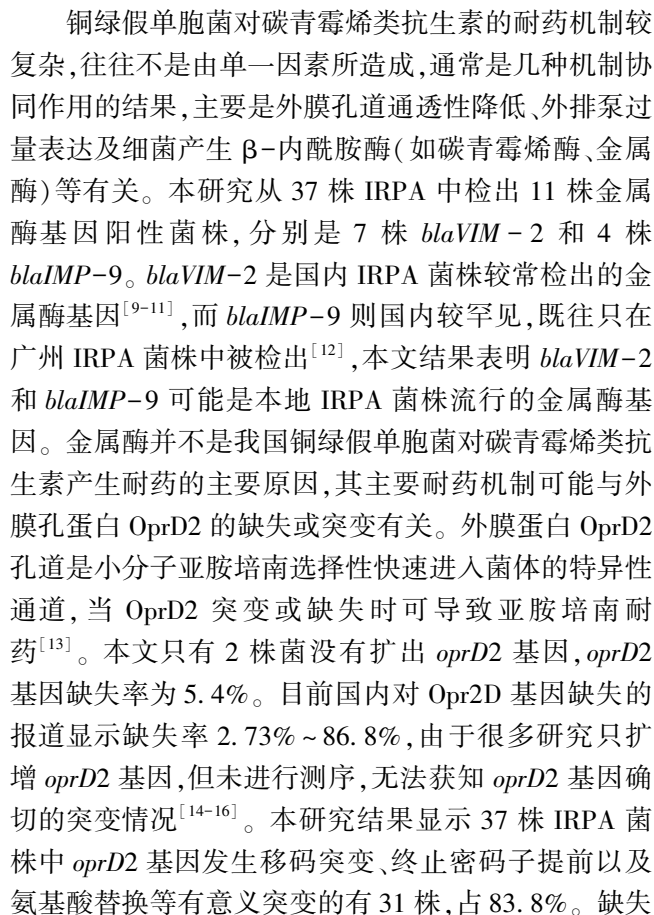


图 1 37 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌 PFGE 聚类图谱

和有意义突变合计 33 株,占 89.2%,表明本研究中 IRPA 菌株主要耐药原因为 *oprD2* 基因缺失和突变。国内研究中 *oprD2* 基因变异阳性率的差异性可能是不同地区之间菌株本身的差异,同时不同医院之间抗生素治疗策略存在差异,最后导致细菌在耐药机制方面也会存在差异。

本研究中有 4 株 IRPA 既无携带金属酶基因又无 *oprD2* 基因缺失和突变,考虑有其他耐药机制参与其对亚胺培南的耐药。比如铜绿假单胞菌外排泵的过度表达使其对抗生素产生耐药^[17]。铜绿假单胞菌外排泵以 MexAB-OprM 最为多见,常引起菌株对美罗培南耐药,但本文这 4 株菌只对亚胺培南耐药,并不对美罗培南耐药,因此这 4 株菌对亚胺培南的耐药机制需要进一步研究探索。

PFGE 分型结果显示,广州市某医院 ICU 分离的 IRPA 并无大范围单克隆流行情况,而以多克隆散发为主。但本文发现携带金属酶基因的 11 株菌被分成了两个带型簇,提示这些菌株有引起小规模暴发流行的可能,需密切关注。

综上所述,广州市某医院 ICU 分离的 37 株 IRPA 对 β -内酰胺类抗生素的耐药率均很高,对氨基糖苷类和喹诺酮类抗生素的耐药率很低。菌株 *oprD2* 基因发生缺失和有意义突变合计 33 株,占 89.2%,而携带金属酶基因的菌株检出 11 株,以 *blaVIM-2* 和 *blaIMP-9* 型为主,说明这 37 株 IRPA 对亚胺培南耐药机制主要是 *oprD2* 基因突变造成。PFGE 表明携带金属酶的 IRPA 菌株有在 ICU 引起暴发流行的风险。应加强对产酶株的检测和监控,防止耐药性的传播和流行。

参考文献

- [1] Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies [J]. Biotechnol Adv, 2019, 37(1):177-192.
- [2] Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(7):1211-1220.
- [3] 方芳,赵丽丽,徐庆嵩,等.呼吸科住院病例医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 预防医学,2020,32(4):369-371.
- [4] 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,2018,18(3):241-251.
- [5] Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective [J]. Clin Exp Optom, 2018, 101(2):162-171.
- [6] Dallenne C, Da Costa A, Decré D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3):490-495.
- [7] Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(11):4783-4788.
- [8] Hu H, Manos J. Pulsed-field gel electrophoresis of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1301:157-170.
- [9] 刘双全,宁建国,王秋平,等. β -内酰胺酶基因与铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类药物的关系研究[J]. 实用预防医学,2015,22(1):100-103.
- [10] 潘本凤,董泽令,陈泽慧,等. 铜绿假单胞菌多重耐药情况分析[J]. 检验医学与临床,2017,14(3):399-401.
- [11] 刘心伟,王志盛,许晓娜,等. 河南省中医院 881 株铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶流行情况分析[J]. 现代预防医学,2018,45(18):3389-3392.
- [12] Fang ZL, Zhang LY, Huang YM, et al. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China [J]. Infect Genet Evol, 2014, 21:124-128.
- [13] Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, et al. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(11):e01589-17.
- [14] 杨春,刘建芝,朱效茹,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(2):173-176.
- [15] 李飞,李丽娟,梁德志,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 分子诊断与治疗杂志,2019,11(2):101-140.
- [16] 高倩倩,孟小斌,陈雪芹,等. 亚胺培南和阿米卡星双耐药铜绿假单胞菌的特性分析[J]. 热带医学杂志,2019,19(4):404-408.
- [17] Chalhoub H1, Sténié Y, Rodríguez-Villalobos H, et al. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations [J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 48(6):740-743.

收稿日期:2020-03-12