

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

刘双全, 宁建国, 王秋平, 张秋桂

(南华大学附属第一医院检验科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 探讨 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, 为临床合理使用抗菌药物提供依据。方法 对临床分离的 690 株铜绿假单胞菌进行回顾性分析; 并选取 52 株耐碳青霉烯类抗生素的铜绿假单胞菌, 利用 PCR 法检测其中 8 种主要 β-内酰胺酶编码基因的分布情况。结果 690 株铜绿假单胞菌中, 临床分布以痰标本为主, 占 56.52% (390/690), 其次为伤口分泌物, 占 11.88% (82/690); 病区分布以 ICU 检出率最高, 占 16.23% (112/690), 其次为神经外科和呼吸内科, 分别占 13.91% (96/690) 和 10.58% (73/690); 在检测的 15 种抗生素中, 耐药率超过 50% 的达 9 种 (60%), 耐药率最高为氨苄西林/舒巴坦 (98.00%), 其次为复方新诺明 (93.00%) 和替卡西林 (92.00%), 耐药率最低为多粘菌素 E (6.00%); β-内酰胺酶基因的 PCR 结果显示, IMP 阳性 25 份, VIM 阳性 17 份, IMP 和 VIM 均阳性 7 份, OXA 阳性 3 份, 其它 β-内酰胺酶耐药基因 (SPM, TEM, PER, GES, SHV) 均阴性。结论 临床分离铜绿假单胞菌主要来自呼吸道标本, 科室分布以 ICU、神经外科和呼吸科为主, 其耐药情况非常严重; 本地区铜绿假单胞对碳青霉烯类抗生素耐药可能主要与 β-内酰胺酶基因 IMP 和 VIM 相关。

关键词: 铜绿假单胞菌; 碳青霉烯类; β-内酰胺酶; 耐药性

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属假单胞菌属, 是一种常见的院内获得性感染的条件致病菌, 往往导致严重感染^[1]。该菌不仅对多种抗菌药物表现出天然耐药, 还可经抗生素诱导产生获得性耐药, 导致临床的抗感染治疗变得十分困难^[2-5]。碳青霉烯类抗生素常被作为治疗对其他 β-内酰胺类抗生素耐药的革兰阴性菌的一道重要防线^[6]。但是近年来随着碳青霉烯类抗生素在临床上的广泛应用, 导致 PA 对其耐药率呈逐年上升趋势^[2-7]。PA 耐碳青霉烯类抗生素的机制较多, 其中 β-内酰胺酶的产生是 PA 对 β-内酰胺类抗生素产生耐药性的一个主要机制, 目前报道的 β-内酰胺酶主要为 IMP、VIM、OXA、SPM、TEM、PER、GES 和 SHV^[2-4]。因此, 优先研究 PA 对碳青霉烯类抗生素的耐药机制显得尤为重

作者简介: 刘双全(1978-), 男, 湖南衡阳人, 博士, 副教授, 副主任技师, 硕士研究生导师,

研究方向: 微生物致病及耐药机制研究。

通讯作者: 张秋桂, E-mail:dantelliu@163.com

要。本研究收集了本地区临床标本中分离的耐碳青霉烯类抗生素而氨基糖甙类药物敏感的的PA 52株, 采用PCR方法检测8种主要β-内酰胺酶编码基因 (IMP、VIM、OXA、SPM、TEM、PER、GES和SHV) 分布情况, 进而探讨β-内酰胺酶基因与PA耐碳青霉烯类药物的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 菌株来源 2012年5月-2013年9月收自南华大学附一医院、附二医院、及中心医院中各类临床标本中分离的690株PA(无重复株)。

1.1.2 引物、主要试剂及仪器 β-内酰胺酶基因引物序列见表1。

表1 β-内酰胺酶基因引物序列

引物	序列	片段大小 (bp)	退火温度
IMP	上游 GAAGGYGTTTATGTTTCATAC	587	55℃
	下游 GTAMGTTTCAAGAGTGATGC		
VIM	上游 GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	56℃
	下游 AATGCGCAGCACCAGGATAG		
SPM	上游 CTGCTTGGATTCATGGGCGC	783	58℃
	下游 CCTTTCCGCGACCTTGATC		
PER	上游 AGTCAGCGGCTTAGATA	978	59℃
	下游 CGTATGAAAAGGACAATC		
SHV	上游 GGTTATGCGTTATATTCGCC	786	56℃
	下游 TCCCGCAGATAAATCACCA		
OXA	上游 GCAAATAMAGAATATGTSCC	495	57℃
	下游 CTCMACCCARCCRGTC AACC		
TEM	上游 AGGAAGAGTATGATTCAACA	535	57℃
	下游 CTCGTCGTTTGGTATGGC		
GES	上游 ATGCGCTTCATTCACGCAC	846	55℃
	下游 CTATTTGTCCGTGCTGAGC		

以上引物由上海生物工程有限公司合成; 细菌 DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; PCR 反应配套试剂以及 DNA Marker DL100 均购自上海生物工程有限公司; 美国 Bio-Rad PCR 仪, HEMA 数字化凝胶成像分析仪。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及药敏实验 采用法国梅里埃公司的药敏系统进行药敏分析。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922, 金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 绿脓假单

胞菌 ATCC27853。选取其中 52 株碳青霉烯类抗生素耐药而氨基糖甙类药物敏感的铜绿假单胞菌进行 β -内酰胺酶基因的检测。

1.2.2 细菌 DNA 提取 用接种环挑取纯菌落接种于 2mL LB 肉汤培养液，37℃，18-20 小时培养至细菌生长对数期。按照 DNA 提取试剂盒操作方法提取细菌基因组 DNA。

1.2.3 PCR 扩增 β -内酰胺酶基因 反应体系如下：总体积 50 μ L，含上、下游引物各 1 μ L，dNTP 1 μ L，Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L)0.4 μ L，模板 DNA 2 μ L，10 \times PCR 缓冲液 5 μ L，ddH₂O39.6 μ L。稍离心混匀，94℃预变性 5min，（94℃变性 30s, 52℃退火 45s，72℃延伸 1min） \times 30 循环，72℃延伸 10min。

2 结果

2.1 690 株 PA 的分布情况 690 株 PA 临床标本分布情况为：以痰标本为主，占 56.52%（390/690），其次为伤口分泌物，占 11.88%（82/690）。具体见表 2

表 2 690 株 PA 的标本分布

标 本	检出株数	构成比（%）
痰液	390	56.52
伤口分泌物	82	11.88
全血	51	7.39
尿液	49	7.10
腹水	25	3.62
脓液	16	2.31
胆汁	13	1.88
其它	64	9.27
合计	690	100

690 株 PA 科室分布情况为：以 ICU 检出率最高，占 16.23%（112/690）；其次为神经外科和呼吸内科，分别占 13.91%（96/690）和 10.58%（73/690）。见表 3。

表 3 690 株 PA 临床科室分布

病 区	检出株数（n）	构成比（%）
ICU	112	16.23
神经外科	96	13.91
呼吸内科	73	10.58
神经内科	65	9.42
感染科	46	6.67
EICU	43	6.03
骨外	39	6.23
胸外	29	4.20

儿科	27	3.91
其他	160	23.19
合计	690	100

2. 690 株 PA 的药敏结果 在检测的 15 种抗生素中，耐药率超过 50%的达 9 种（60.0%），耐药率最高为氨苄西林/舒巴坦（98.00%），其次为复方新诺明（93.00%）和替卡西林（92.00%），耐药率最低为多粘菌素 E（6.00%），可见 PA 耐药情况非常严重。结果详见表 4。

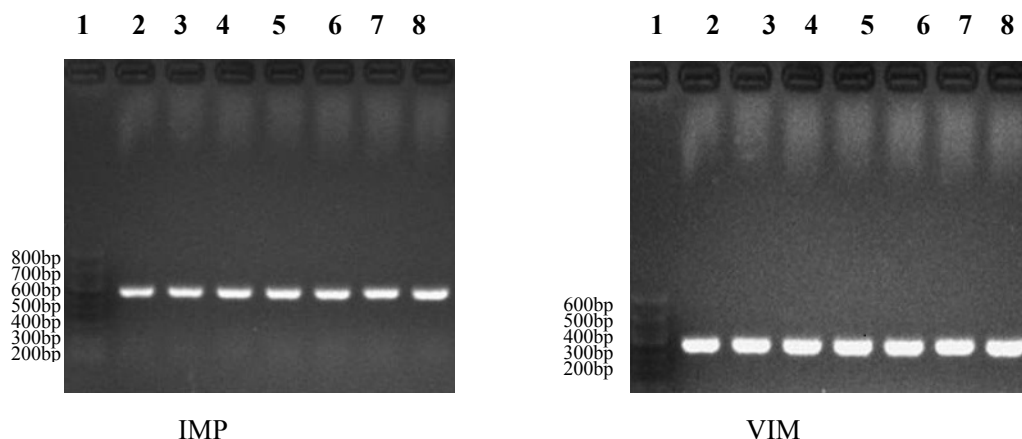
表 4 690 株 PA 对 15 种抗菌药物的耐药率（%）

抗生素名称	耐药	中介	敏感
阿米卡星	47.00	3	50.00
氨苄西林/舒巴坦	98.00	1.00	1.00
多粘菌素 E	6.00	0	94.00
复方新诺明	93.00	0	7.00
环丙沙星	39.00	7.00	54.00
美洛培南	29.00	6.00	65.00
庆大霉素	68.00	2.00	30.00
替卡西林 PYO	92.00	3.00	5.00
替卡西林+棒酸 PYO	65.00	3.00	32.00
头孢他啶	51.00	7.00	42.00
头孢吡肟	58.00	10.00	32.00
妥布霉素	62.00	2.00	36.00
亚胺培南	27.00	4.00	69.00
哌拉西林 PYO	83.00	4.00	13.00
哌拉西林+三唑巴坦 PYO	47.00	12.00	41.00

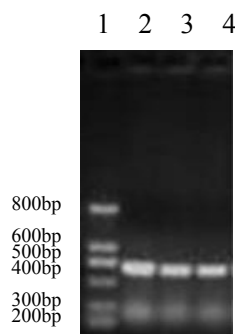
3. 52 株碳青霉烯类抗生素耐药而氨基糖甙类药物敏感的 PA 的 β -内酰胺酶编码基因的分布情况 52 株耐碳青霉烯类 PA 的 β -内酰胺酶编码基因 PCR 扩增结果见表 5 及图 1，2。结果显示，IMP 阳性 25 份，VIM 阳性 17 份，IMP 和 VIM 均阳性 7 份，OXA 阳性 3 份，其它 β -内酰胺酶耐药基因（SPM，TEM，PER，GES，SHV）均阴性。所有扩增的 β -内酰胺酶基因产物经测序分析和 BLAST 比对分析，证实为目的序列。

表 5 β -内酰胺酶细菌检出情况

β -内酰胺酶基因的种类	检出数	构成比
IMP	25	48.08%
VIM	17	32.69%
IMP，VIM	7	13.46%
OXA	3	5.76%
SPM，TEM，PER，GES，SHV	0	0
合计	52	100%



1. DNA Maker; 2-8. 阳性标本
图 1 PCR 检测 IMP, VIM 基因琼脂电泳结果



1. DNA Maker; 2-4. 阳性标本
图 1 PCR 检测 OXA 基因琼脂电泳结果

3 讨 论

PA 为常见的条件致病菌，广泛存在于正常人体的皮肤、呼吸道和泌尿道^[39]。近年来，随着广谱抗菌药物的广泛应用，以及各种侵入性诊疗手段的广泛应用，导致 PA 的临床感染率及对常见抗菌药物的耐药率呈现逐年上升趋势，已成为目前院内感染的主要病原菌^[1-8]。部分菌株对美罗培南、亚胺培南等碳青霉烯类抗菌药物也产生了耐药，出现多重耐药甚至泛耐药 PA，给临床抗感染治疗带来了极大的困难^[1-8]。

本地区检出的 PA 以呼吸道标本中分离率最高，占 56.52%，说明 PA 可能是引起呼吸系统感染的重要病原菌。临床科室分布以 ICU 最多，其次为神经外科、呼吸科等。这可能与 ICU 和神经外科患者大多基础情况差、病人病情危重、住院时间长、留置针管和插管等各种侵入性操作多以及大量使用抗菌药物有关^[9]。

690 例 PA 的药敏结果显示, 耐药率超过 50% 的达 9 种 (60.0%), 耐药率最高为氨苄西林/舒巴坦 (98.00%), 其次为复方新诺明 (93.00%) 和替卡西林 (92.00%), 耐药率最低为多粘菌素 E (6.00%), 美罗培南、亚胺培南等碳青霉烯类抗菌药物的耐药率也接近 30%, 对其他抗菌药物的耐药率大多都在 60% 以上, 可见 PA 耐药情况非常严重, 应加强对 PA 的耐药性监测, 控制其流行已刻不容缓。因此, 有学者将 PA 称为“革兰阴性的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)^[7-10]”。本研究显示, 本地区临床分离 PA 对多粘菌素 E 敏感性较高 (94.00%), 可作为重症感染经验治疗的备选药物, 但是由于其副作用大, 临床应慎重选择。而碳青霉烯类抗菌药物则成为首选, 但应加以保护性使用, 以延缓耐药性产生。总之, 在治疗 PA 感染时, 在药敏结果没出来前应结合当地流行病学数据经验用药, 药敏结果出来后应及时调整方案, 合理使用抗菌药物。

产 β -内酰胺酶是革兰阴性细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要机制^[3-5]。目前已有研究报道的 β -内酰胺酶主要有 IMP、VIM、SPM、TEM、PER、GES 和 SHV 等。为了减少其他耐药机制 (如氨基糖甙类的耐药机制) 对实验结果的影响, 本研究从碳青霉烯类抗生素耐药菌株中选取了 52 株对氨基糖甙类药物敏感的 PA 进行了 β -内酰胺酶耐药基因的检测, 探讨其与铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类药物的关系。PCR 检测结果显示: 52 份 PA 标本中, MP 阳性 25 份, VIM 阳性 17 份, IMP 和 VIM 均阳性 7 份, OXA 阳性 3 份, 其它 β -内酰胺酶耐药基因 (SPM, TEM, PER, GES, SHV) 均阴性。这说明本地区 PA 对碳青霉烯类抗生素药可能主要与 β -内酰胺酶基因 IMP 和 VIM 关。

OXA 型 ESBLs 是从丝氨酸 β -内酰胺酶中分离出来单独成为一类, 其除耐氨苄西林、头孢唑吩外, 对其他头孢菌素的水解能力不一, 但对苯唑西林等具有很强的水解能力, 因此命名为 OXA 型酶^[4, 5]。本研究发现 52 株的 PA OXA 阳性仅 3 株, 说明产 OXA 型 ESBLs 可能不是本地区 PA 耐碳青霉烯类抗生素的主要机制。

为了全面解析 β -内酰胺酶基因在铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类药物中的作用, 尚需进一步加大检测标本的数量, 同时进行基因表达水平 mRNA 的检测。

参考文献

- [1] Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil [J]. Clin Infect Dis.

2011,52(9):1138-1143.

- [2]Karimi H, Montevalian A, Motabar AR, et al. Epidemiology of PAdiatric burns in Iran [J]. Ann Burns Fire Disasters. 2012,25(3):115-120.
- [3]Iida T, Kaido T, Yagi S, Yoshizawa A, et al. Posttransplant bacteremia in adult living donor liver transplant recipients [J]. Liver Transpl. 2010,16(12):1379-1385.
- [4]Jeannot K, Fournier D, Müller E, et al. Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing extended-spectrum β -lactamase SHV-2a [J]. Clin Microbiol. 2013, 51(2):673-675.
- [5] 田亚玲. 刘艳君. 2012年医院常见病原菌分布及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2013,20(11):1368-1370.
- [6]Bernini C, Andruniów T, Olivucci M, et al. Effects of the protein environment on the spectral properties of tryptophan radicals in *Pseudomonas aeruginosa* azurin [J]. Am Chem Soc. 2013,135(12):4822-4833.
- [7]Wang X, Li M, Liu L, et al. DsbM, a novel disulfide oxidoreductase affects aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by OxyR-regulated response [J].Microbiol.2012 50(6):932-638.
- [8]Antonela Antoniu S. Inhaled ciprofloxacin for chronic airways infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012,10(12):1439-1446.
- [9]Menichetti F, Tagliaferri E. Antimicrobial resistance in internal medicine wards [J]. Intern Emerg Med. 2012, Suppl 3:S271-281.
- [10]Abbasi H, Sharafi H, Alidost L, et al. Response surface optimization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples [J]. Prep Biochem Biotechnol. 2013,43(4):398-414.