

耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药情况及其产金属酶的相关基因 VIM-2 的研究

马晓波 杜艳 穆玉姣 郭肿 陈端

作者单位: 650032 昆明市, 昆明医学院第一附属医院检验科(马晓波 杜艳 郭肿 陈端)

450000 郑州市, 河南省疾病预防控制中心(穆玉姣)

【摘要】 目的 了解临床分离耐亚胺培南铜绿假单胞菌(imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, IMPRPA)的耐药特征,探讨该菌产金属 β -内酰胺酶及其相关基因 VIM-2 对抗菌药物耐药性的影响。**方法** 收集 3 年临床分离的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)共 1426 株,采用 MIC 法测定抗生素耐药性;用复合纸片法筛查 IMPRPA 产金属 β -内酰胺酶的菌株;聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法对金属酶相关基因 VIM-2 进行检测并测序确定。采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行统计学分析。**结果** 1426 株 PA 中,IMPRPA 为 910 株(63.8%),非 IMPRPA 为 516 株(36.2%);IMPRPA 对 12 种抗生素的耐药率除四环素外,均显著高于非 IMPRPA,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。910 株 IMPRPA 均为多重耐药株,多重耐药率为 63.8%,显著高于非 IMPRPA 的 5.0%(71 株),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。910 株 IMPRPA 中检出产金属 β -内酰胺酶 168 株,占 18.5%(168/910);168 株 IMPRPA 采用 PCR 扩增,检出 135 株 IMPRPA(80.4%,135/168)携带有 blaVIM-2 型基因。**结论** IMPRPA 耐药性强,多重耐药现象严重,VIM-2 型金属酶基因型在产金属 β -内酰胺酶的 IMPRPA 菌株中检出率高,但该基因并不是 PA 产金属 β -内酰胺酶对 12 种抗菌药物耐药的主要原因。

【关键词】 铜绿假单胞菌,亚胺培南耐药;多重耐药;金属酶;VIM-2 基因

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.02.006

Analysis the drug resistant situation of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the metalloenzyme gene VIM-2

MA Xiao-bo¹, DU Yan¹, MU Yu-jiao², et al. ¹Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China ²Center for Disease Control and Prevention of Henan Province, Zhengzhou 450000, China

【Abstract】 Objective To investigate the antibiotic resistance status in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*(IMPRPA), and to analyze the affect to antibiotics from metalloenzyme and VIM-2 of IMPRPA. **Methods** 1426 strains IMPRPA were collected by clinical in 3 years. The drug resistant status of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) was detected by MIC tests. Composite paper method used to screening metallo- β -lactamase of IMPRPA. Metallo- β -lactamase VIM-2 gene was detected by PCR. All data were analyzed by SPSS 11.5 statistical software. **Results** There were 910 strains IMPRPA (63.8%) and 516 strains non-IMPRPA (36.2%) in 1426 strains PA. The drug resistant rates of IMPRPA were all higher than non-IMPRPA to 12 antibiotics, except tetracycline. And there were statistical significance in the differences between them ($P < 0.05$). 910 strains IMPRPA were all multi drug resistant PA (63.8%). It was higher than non-IMPRPA (71 strains, 5.0%), and there was statistical significance in the difference between them ($P < 0.05$). 168 strains IMPRPA were positive in metallo- β -lactamase (18.5%, 168/910), and there were 135 strains carried VIM-2 gene (80.4%, 135/168). **Conclusion** The multi drug resistant status of IMPRPA was severe. VIM-2 gene detection rate is high in product metallo- β -lactamase IMPRPA, but the VIM-2 gene is not the main reason of multi drug resistance.

【Key words】 IMPRPA; Multi drug resistance; Metalloenzyme; VIM-2

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种常见的引起院内获得性感染的条件致病菌,文献报道^[1,2],ICU 分离出的致病菌中,PA 的数量占第

一位。近年来,PA 对亚胺培南的耐药率逐年上升,由 bla_{imp} 基因编码产生的质粒介导的金属 β -内酰胺酶是耐亚胺培南铜绿假单胞菌(imipenem-resistant

Pseudomonas aeruginosa, IMPRPA) 产生的主要原因^[3]。因此,本文对 IMPRPA 产金属 β-内酰胺酶的相关基因进行研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2007 年 1 月至 2009 年 12 月我院临床分离的 PA 共 1426 株(剔除同一病例相同部位重复分离的菌株),质控菌株为 PA ATCC 27853,购自卫生部临床检验中心。

1.1.2 试剂 细菌鉴定卡(GN)及药敏卡(AST-GN10)为法国梅里埃生物公司产品,DNA 提取试剂由上海 Sangon 公司提供,引物合成及 PCR 扩增产物测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.1.3 仪器 Thermo Forma 3111 型二氧化碳培养箱为美国 Thermo Fisher 公司产品;VITEK-2 全自动微生物分析仪为法国生物梅里埃生物公司产品,5700 型 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司;Tanon EPS-300 电泳仪、Tanon 3500 紫外凝胶成像系统及配套软件购自上海天能科技有限公司;5415C 高速离心机为德国 eppendorf 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 菌种鉴定及药物敏感性试验 实验操作按照 VITEK-2 全自动微生物分析仪操作说明书进行;根据 2007 年美国临床实验室标准化协会(clinical and laboratory standard insitute, CLSI)规定的常规药敏试验标准,选择 AST-GN10 药敏卡上的亚胺培南(imipenem, IMP)、美洛培南(meropenem, MEM)、头孢吡肟(cefepime, FEP)、四环素(tetracycline, TE)、庆大霉素(gentamicin, GN)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、左旋氧氟沙星(levofloxacin, LEV)、哌拉西林(piperacillin, PIP)、阿米卡星(amikacin, AMK)、氨曲南(aztreonam, ATM)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、哌拉西林/他唑巴坦(piperacillin/tazobactam, TZP)、头孢哌酮/舒巴坦(cefoperazone/sulbactam, SCF)13 种抗生素进行药敏试验。药敏试验采用 MIC 法,结果判读按 CLSI2007 年版标准进行。

1.2.2 产金属 β-内酰胺酶的检测 复合纸片法筛检金属酶表型按文献^[4]进行,各纸片间距 20 mm。判读结果:IPM+EDTA-Na₂ 纸片比 IPM 纸片出现的抑菌环大 7 mm,同时 CAZ+EDTA-Na₂ 纸片比 CAZ 纸片出现的抑菌环大 4 mm,表明协同实验阳性,为产金属酶阳性。

1.2.3 金属酶基因型分析 ①细菌总 DNA 的提取:用 sangon 公司的 DNA 抽提试剂盒抽提模板 DNA,

具体操作步骤按说明书进行。②引物:blaVIM-2 上游引物:5'-CAGATTGCCGATGCTGTTTGG-3';下游引物:5'-AGGTGGGCCATTCAGCCAGA-3'',长度为 523 bp。③反应体系(总体积为 50 μl):Buffer 缓冲液(×10)5 μl,镁离子(1.5 mmol/L) 3 μl,Tag DNA 多聚酶(5 U/μl) 1μl,4× dNTP(10 mmol/L)1 μl,引物 1 (25 μmol/L) 1μl, 引物 2 (25 μmol/L)1 μl, 模板 DNA 3 μl,双蒸水 35 μl;循环参数:预变性 94 ℃ 4 min 后,25 个循环:94 ℃变性 1 min,61 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,最后 72 ℃延伸 10 min 后扩增完毕。④目的片段验证:上述 PCR 扩增产物经电泳初步检测,目的条带切胶纯化后送上海生工生物公司进行正反两个方向的测序反应以进一步验证目的片段。⑤DNA 序列分析:PCR 产物的测序结果直接在 GenBank 中进行序列对比分析,以明确金属酶的基因分型。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件对所有数据进行统计分析。组间率的比较采用χ² 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1426 株 PA 的耐药情况分析 1426 株 PA 中,IMPRPA910 株(63.8%),非 IMPRPA516 株(36.2%)。IMPRPA 和非 IMPRPA 均对 TE 完全耐药;IMPRPA 对其他 11 种药物的耐药率均显著高于非 IMPRPA,差异均有统计学意义(P 均<0.05)。见表 1。

表 1 1426 株 PA 对 12 种抗生素的耐药情况[n(%)]

抗生素	IMPRPA n= 910	非 IMPRPA n= 516	χ ² 值	P 值
AMK	372(40.9)	95(18.4)	74.46	0.00
CIP	765(84.1)	206(39.9)	293.31	0.00
ATM	865(95.1)	268(51.9)	372.34	0.00
GN	798(87.7)	144(27.9)	522.27	0.00
CAZ	551(60.5)	170(32.9)	99.27	0.00
FEP	719(79.0)	134(26.0)	383.23	0.00
LEV	764(84.0)	201(39.0)	302.78	0.00
PIP	775(85.2)	66(12.8)	709.91	0.00
TE	910(100.0)	516(100.0)	-	-
MEM	828(91.0)	0(0.0)	1115.85	0.00
TZP	283(31.1)	0(0.0)	198.25	0.00
SCF	252(27.7)	0(0.0)	171.67	0.00

2.2 IMPRPA 和非 IMPRPA 的多重耐药情况分析 1426 株 PA 中,多重耐药菌株共 981 株,多重耐药率为 68.8%,其中 910 株 IMPRPA 全部为多重耐药株,多重耐药率为 63.8%,516 株非 IMPRPA 中仅有 71

株为多重耐药株,多重耐药率为 5.0%。IMPRPA 的多重耐药率显著高于非 IMPRPA,差异具有统计学意义($\chi^2=1136.77, P<0.05$)。见表 2。

表 2 IMPRPA 和非 IMPRPA 的多重耐药情况比较[n(%)]

菌株	多重耐药	非多重耐药	合计
IMPRPA	910(63.8)	0(0.0)	910(63.8)
非 IMPRPA	71(5.0)	445(31.2)	516(36.2)
合计	981(68.8)	445(31.2)	1426(100.0)

2.3 金属酶表型筛选结果 对 910 株 IMPRPA 进行复合纸片协同实验,采用 EDTA-Na₂ 做酶抑制剂,检出表型为金属 β -内酰胺酶的共 168 株 (18.5%)。复合纸片协同法结果见图 1。

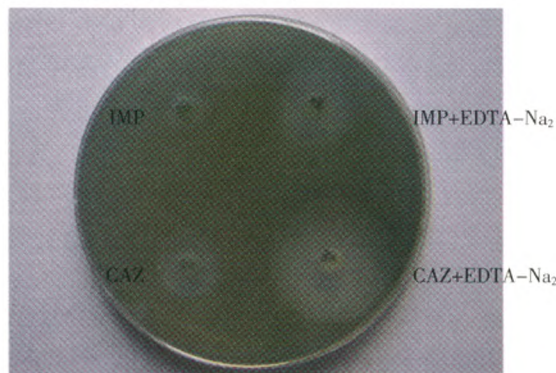


图 1 IMP+EDTA-Na₂、CAZ+EDTA-Na₂ 金属酶检验阳性结果

2.4 PCR 检测耐药基因结果 168 株产金属 β -内酰胺酶 IMPRPA 均用 blaVIM-2 引物进行 PCR 扩增,结果显示 blaVIM-2 引物扩增后有 135 株菌 (80.4%, 135/168) 呈阳性,其扩增片段大小为 523 bp, blaIMP-1 引物扩增均呈阴性。将 PCR 扩增产物纯化后送上海生工生物公司进行正反两个方向进行测序,所得片段序列运用 NCBI 的 Blast-2 工具进行比对分析,blaVIM-2 阳性的扩增产物的基因序列与 VIM-2 型金属酶基因序列(注册号:EU571945.1)同源率为 99%一致,说明 135 株菌所产金属酶基因型均为 VIM-2 型。见图 2。

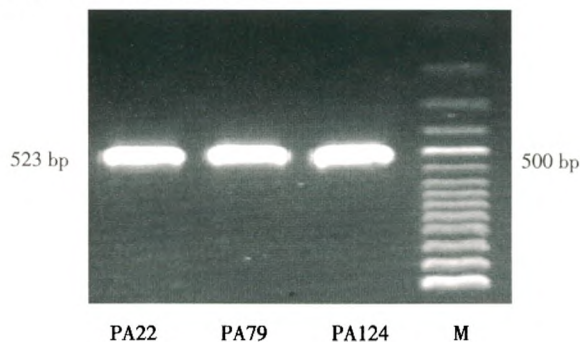


图 2 blaVIM-2 基因 PCR 扩增

注:22、79、124 为 PA 扩增的条带,M 代表 100 bp 的 DNA 分子标

3 讨论

PA 对 IMP 耐药率之高,发展速度之快令人担忧。本文研究的 1426 株 PA 中,有 910 株为 IMPRPA,耐药率为 63.8%,与王金果等^[5]报道的耐药率为 67.7%基本一致。耐药谱表明,910 株 IMPRPA 均为多重耐药菌株,与国内报道^[6]基本一致。IMPRPA 与非 IMPRPA 的耐药情况比较发现,二者除均对 TE 完全耐药外,对其他 11 种抗生素的耐药率 IMPRPA 均显著高于非 IMPRPA,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。

金属 β -内酰胺酶的产生被认为是 PA 对碳青霉烯类抗菌药物产生耐药性的重要机制^[7]。本文研究采用复合纸片协同实验共分离到 168 株产金属 β -内酰胺酶菌株,占全部 IMPRPA (910 株)的 18.5%,稍高于国内有关报道^[3,8,9],提示在本院及本地区引起院内感染的 PA 中已有产金属酶 IMPRPA 的产生并且占一定比例,产金属 β -内酰胺酶的 PA 会对所有的 β -内酰胺类抗生素(包括三代、四代头孢菌素)和碳青霉烯类抗生素产生耐药,导致临床抗感染治疗的失败,给临床上治疗 PA 引起的感染带来很大的困难。

目前,已发现的金属酶基因型有 IMP、VIM、SPM、SIM 和 GIM 型五大家族,其中最主要的 IMP 和 VIM 已发展到 IMP-16、VIM-12^[10]。本文研究对产 VIM-2 的扩增显示耐亚胺培南铜绿假单胞菌所产金属 β -内酰胺酶的 168 株 IMPRPA 进行 VIM-2 基因的扩增,结果显示,有 135 株 IMPRPA 呈 blaVIM-2 基因阳性(80.4%)。说明本院产金属 β -内酰胺酶的 IMPRPA 该基因频率较高。但该基因可能不是使产金属 β -内酰胺酶的 IMPRPA 产生耐药的主要原因,尚有待进一步研究证实。

由于 PA 所产金属酶多由质粒介导,极易在不同菌株间水平传播,因此应加强监测,对检出 IMPRPA 的科室实施严格的消毒隔离措施,防止产金属 β -内酰胺酶的 PA 在医院内暴发流行。

4 参考文献

- 1 陈民钧,王辉.中国重症监护病房革兰阴性菌耐药性连续 7 年监测研究.中华医学杂志,2003,85:375-381.
- 2 弓红梅,赵俊萍,崔雪萍,等.铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性分析.实用检验医师杂志,2011,3:233-235.
- 3 苏维奇,朱元祺,孔繁荣.青岛地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶检测及耐药性分析.中华医院感染学杂志,2009,19:205-207.
- 4 Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase producing clinical isolate of

- Pseudomona spp. J Clin Microbiol, 2002, 40: 3798-3801.
- 5 王金果, 余方友. 革兰阴性杆菌对亚胺培南耐药率的变迁. 中国抗生素杂志, 2008, 33: 300-302.
- 6 饶绍琴, 周忠华, 喻华, 等. Mohnarín 2006-2007 年度报告: 西南地区细菌耐药检测. 中国抗生素杂志, 2008, 33: 622-628.
- 7 Quale J, Bratu S, Gupta J, et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50: 1633-1641.
- 8 熊薇, 赖晓全, 涂敏, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药机制研究. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7: 400-403.
- 9 赵书平, 姜梅杰, 田鑫, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶基因研究. 中华医院感染学杂志, 2008, 18: 1509-1511.
- 10 Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouveleakis LS, et al. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resemble a VIM1/VIM2 hybrid. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 5153-5156.

(收稿日期: 2012-04-29)

(本文编辑: 李霜)

消息

感染性疾病的病原学诊断及临床应用新进展学习班

为加强临床微生物学检验流程的规范化, 促进与临床的沟通, 并将实验室诊断的最新进展介绍给各级医院的中级以上职称的医技人员, 使检验能更好地满足临床的需求, 定于 2012 年 7 月 2 日至 7 月 7 日举办国家级继续教育项目“感染性疾病的病原学诊断及临床应用新进展学习班”【2012-11-00-023(国)】。

学习班由北京大学人民医院主办, 将邀请陈民钧、王辉、张正、李若瑜、杨铁生等多名国内知名微生物检验专业专家、教授讲课。学习班面向全国各级医院微生物实验室工作人员以及相关临床科室, 意在促进微生物检验学科的建设与发展, 使微生物检验更好的服务于临床医疗工作。本次学习班为培训合格学员授予国家 I 级继续教育学分 10 分。相关事宜通知如下:

1 培训内容

- 1) 临床微生物学检验和感染疾病诊治指导意义;
- 2) ISO15189 与微生物检验;
- 3) 寄生虫病的临床和实验室诊断进展;
- 4) 真菌病的实验室诊断和新进展;
- 5) 不明原因肺炎的临床和实验室诊断进展;
- 6) 下呼吸道标本采集、运送和处理规范;
- 7) 无菌体液微生物检验的规范流程;
- 8) 临床不常见菌的培养和快速鉴定;
- 9) 药敏试验折点建立和抗菌药物的 PK/PD;
- 10) 2012 年 CLSI 药敏试验更新;

11) 细菌耐药监测和药敏谱统计的规范方法;

12) 最新 CLSI 推荐的分枝杆菌、奴卡菌、其他需氧放线菌的药敏试验规程;

13) 病原微生物的快速分子诊断进展;

14) 病原菌的分子进化研究进展;

15) 实验室的生物安全、质量控制和质量保证;

16) 厌氧菌和弯曲菌的培养、鉴定和药敏试验新进展;

17) 微生物检验与 LIS 系统。

2 培训时间及地点

2012 年 7 月 2 日全天报到(国二招宾馆); 7 月 3 日-7 月 7 日授课(北京大学人民医院科教楼多功能厅); 7 月 7 日 13:00 后撤离。

3 培训费用

提前注册 RMB1200 元/人, 现场注册 RMB1500 元/人(含资料费和餐费); 北京地区费用 (RMB1000 元/人, RMB1300 元/人, 不含晚餐)。

提前注册截至日期为 2012 年 6 月 26 日, 以费用缴纳为准。住宿统一安排, 费用自理。本学习班不安排接送。

4 联系方式

联系人: 全宇: 18801063310; 张淑谦: 13801362827。

电话: 010-88597680

传真: 010-88597578

邮箱: meeting-2@bjxie.com