

50 株铜绿假单胞菌的耐药性及耐药基因分析

何 敏(广州中医药大学第一附属医院检验科, 广州 510405)

【摘要】 目的 分析铜绿假单胞菌的耐药性及其耐药基因类型, 指导临床合理应用抗生素。**方法** 收集广州中医药大学第一附属医院临床送检标本中分离的 50 株铜绿假单胞菌, 用 K-B 纸片扩散法进行抗生素敏感性试验; 筛选出 20 株多重耐药铜绿假单胞菌, 采用聚合酶链反应检测 β -内酰胺酶基因类型。**结果** 铜绿假单胞菌对临床常用抗生素存在不同程度的耐药现象, 其中最常用的亚胺培南耐药率达 96%, 20 株多重耐药铜绿假单胞菌中检出 TEM (40%)、OXA-2 群 (5%)、OXA-10 群 (5%)、CARB (30%) 4 种 β -内酰胺酶基因, 未检出质粒型 AmpC 酶和金属 β -内酰胺酶基因。膜孔蛋白编码基因 oprD2 均为缺失型。**结论** 铜绿假单胞菌的耐药现象严重, 其原因可能与铜绿假单胞菌多重耐药基因表达有关。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 耐药性; β -内酰胺酶; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.23.016 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)23-2846-02

Analysis of the drug resistance and the genes types of *Pseudomonas aeruginosa* in 50 cases HE Min (Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong 510405, China)

【Abstract】 Objective To analyze the drug resistance and the genes types of *Pseudomonas aeruginosa*, and to provide guidelines for the reasonable application of clinical antibiotic. **Methods** 50 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were collected from clinical inspection specimens, the antimicrobial drug sensitivity of which were tested by K-B disc diffusion method. 20 strains of multiple drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* were screened, and we used polymerase chain reaction (PCR) method to detect beta-lactamase gene types. **Results** The *Pseudomonas aeruginosa* had various degrees of drug resistance. The irologic resistance which was the most commonly used imipenem reached 96%, followed by four genes of beta-lactamase, namely TEM (40%), OXA-2 group (5%), OXA-10 group (5%), and CARB (30%), but plasmid model AmpC enzyme and metal beta-lactamase genes were not detected, and the film hole protein coding genetic oprD2 were missing from all 20 strains of pseudomonas aeruginosa of multiple drug-resistant. **Conclusion** Drug-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* is serious, the cause of which might be related with the resistant gene that *Pseudomonas aeruginosa* expresses.

【Key words】 pseudomonas aeruginosa; drug resistant; beta-lactamase; resistance gene

铜绿假单胞菌是院内感染的常见条件致病菌, 特别是免疫力低下的患者常可引起严重感染, 如呼吸机相关肺炎、泌尿系感染、烧伤创面等。近年来随着广谱抗生素的广泛使用, 铜绿假单胞菌引起的院内感染率呈上升趋势^[1]。了解本院铜绿假单胞菌对常用抗生素的耐药率及耐药基因流行特点, 作者检测了临床送检标本中分离的 50 株铜绿假单胞菌的耐药率, 并筛选出多重耐药的铜绿假单胞菌 20 株, 采用聚合酶链反应 (PCR) 法检测 β -内酰胺酶基因, 并进行测序分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2010 年 1 月至 2011 年 1 月临床送检的非重复标本, 分离出铜绿假单胞菌 50 株, 菌株使用 VITEK2 细菌鉴定仪鉴定。质控菌株为 ATCC 35218 大肠埃希菌及 ATCC 27853 铜绿假单胞菌, 由国家病原菌耐药性监测中心提供。

1.2 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法, 结果判断根据美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 2007 年版标准进行。11 种临床常用抗铜绿假单胞菌抗生素, 包括亚胺培南、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、氯霉素、庆大霉素、四环素、环丙沙星、阿米卡星、头孢曲松、左氧氟沙星及米诺环素, 以上药物药敏纸片购自天津金章生物公司。根据药敏结果耐药达 3 种药物以上为多重耐药, 并筛选出 20 株多重耐药铜绿假单胞菌进行基因分析。

1.3 菌株处理 挑取筛选出的 20 株多重耐药铜绿假单胞菌的培养纯菌落, 置入 0.5 mL 离心管内 (内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 μ L), 56 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 改 95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 加入 Chelex-100 40 μ L, 15 000 r/min 离心 30 s, 上清液即为基因检测的模板液。

1.4 基因检测 用 PCR 法, 靶基因 PCR 扩增体系均为: 每反应体系 P1、P2 引物各 0.5 μ mol/L, 三磷酸脱氧核糖核苷 (dNTPs) 各 200 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 mmol/L, MgCl_2 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5%, 牛血清清蛋白 (BSA) 0.02% (w/v), Taq DNA pol 1 U。总反应体积 20 μ L (其中模板液 5 μ L)。PCR 扩增热循环参数 (PCR 产物长度大于 500 bp) 为: 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 60 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 出现与阳性对照分子相当的目的条带为阳性。耐药基因检测试剂盒、靶基因 PCR 引物序列和阳性对照 DNA 由无锡市克隆遗传技术研究所提供。阳性基因测序用美国 ABI3730 PCR 直接全自动荧光法。

1.5 统计学处理 数据分析采用 WHONET5.4 软件。

2 结 果

2.1 药物敏感试验结果 分离出的 50 株铜绿假单胞菌对临床常用的 11 种抗生素存在不同程度的耐药, 其中对头孢哌酮/

舒巴坦的耐药率较低,仅为 18%,对庆大霉素、四环素、米诺环素、亚胺培南、头孢他啶耐药率较高。具体结果见表 1。

2.2 PCR 结果 筛选出的 20 株多重药耐药铜绿假单胞菌中检出 TEM (40%)、OXA-2 群(5%)、OXA-10 群(5%)、CARB (30%) 4 种 β -内酰胺酶基因,未检出质粒型 AmpC 酶和金属 β -内酰胺酶基因,膜孔蛋白编码基因 oprD2 均为缺失型。

表 1 50 株铜绿假单胞菌对 11 种抗生素的耐药率

抗生素	耐药株数	耐药率(%)
亚胺培南	48	96
头孢他啶	44	80
头孢哌酮/舒巴坦	9	18
氯霉素	34	68
庆大霉素	50	100
四环素	50	100
环丙沙星	11	22
阿米卡星	19	38
头孢曲松	27	54
左氧氟沙星	14	28
米诺环素	50	100

3 讨 论

铜绿假单胞菌广泛分布于自然界、土壤、水、空气,人体皮肤、肠道、呼吸道均有存在,为条件致病菌,是院内感染的主要病原菌之一^[2]。 β -内酰胺类抗生素(如 3、4 代头孢菌素和亚胺培南)曾经是铜绿假单胞菌感染治疗的有效药物,但是随着 β -内酰胺类抗生素的广泛应用和不合理使用,使得铜绿假单胞菌的耐药性越来越强,出现了大量的多重耐药菌株^[3-4]。国外学者应用分子生物学技术发现,铜绿假单胞菌可以获得 TEM、SHV、OXA、PER、GES、IMP、VIM、SPM 等 β -内酰胺酶和金属 β -内酰胺酶基因,所表达的产物可以水解 β -内酰胺类和碳青霉烯类药物^[5]。研究表明铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类抗生素耐药机制包括:抗生素灭活酶水解、膜孔蛋白 oprD2 基因编码缺失和 MexA-Mexg-OprM 等多药主动外排系统过度表达^[6]。

铜绿假单胞菌携带的各种 β -内酰胺酶编码基因(广谱或超广谱产 β -内酰胺酶,如 TEM、SHV、OXA、Ampc、金属 β -内酰胺酶等)和 oprD2 基因缺失是导致铜绿假单胞菌对产 β -内酰胺类抗生素耐药的重要原因^[7]。 β -内酰胺类抗生素对铜绿假单胞菌的作用靶位是细菌内膜上的青霉素结合蛋白(PBP2)。该类药物要达到其作用靶位必须首先经过外膜通道进入周浆间隙。如果细菌外膜蛋白通道缺失,药物难以到达其作用靶位,细菌将产生耐药。oprD2 被认为是亚胺培南扩散的特异性通道。铜绿假单胞菌异常低通透性的外膜结构在抗生素耐药中起着重要作用^[8]。

本实验中分离出的 50 株铜绿假单胞菌的耐药情况严重,对临床常用的庆大霉素、四环素、米诺环素耐药达 100%,亚胺培南的耐药率达到 96%,且对头孢他啶、氯霉素、环丙沙星、阿米卡星、头孢曲松、左氧氟沙星也存在不同程度的耐药,但对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率相对较低,为 18%。国内外学者在临床分离的铜绿假单胞菌中发现了多种 β -内酰胺酶基因,如:TEM、SHV、VEB-1、PER、GES、持续高产 AmpC 酶、IMP、VIM 等^[9]。本实验中筛选出的 20 株多重耐药铜绿假单胞菌中检出 TEM、OXA-2 群、OXA-10 群及 CARB 4 种 β -内酰胺酶基因,未检出质粒型 AmpC 酶和金属 β -内酰胺酶基因。且这 20 株铜绿假单胞菌的膜孔蛋白编码基因 oprD2 均为缺失,此通道缺失,药物则不能到达其作用靶位而产生耐药^[10]。本研究结

果表明,亚胺培南耐药率为 96%,其表型与基因型基本相符,表明 oprD2 缺失而非产金属酶是本院铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制。但是有文献报道,单纯 oprD2 基因缺失仅表现为亚胺培南低水平耐药^[11]。而本实验中的 20 株菌中全部检测到有 oprD2 基因缺失,有 3 株检测到 CARB,未检测到其余产 β -内酰胺酶基因,却呈高水平耐亚胺培南,此现象有待进一步探讨。

临床上铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药情况严重,因而合理使用抗生素,加强细菌耐药性监测,采取有效措施控制耐药菌株的出现,是临床抗感染治疗面临的重要课题。

参考文献

[1] 王继东,金辉,廖祖煌,等. 医院感染铜绿假单胞菌菌株亲缘性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(12):1337-1339.

[2] 吴安华,任南,文细毛,等. 医院内感染非发酵革兰阴性杆菌的病原学与耐药性监测研究[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(11):764.

[3] 陈建中,黄支密,单浩,等. 4 种非发酵糖革兰阴性杆菌 β -内酰胺酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(8):862-864.

[4] 林赛玲,肖艳辉,徐金花. 318 株铜绿假单胞菌的临床分布与药敏结果[J]. 检验医学与临床,2009,6(9):673-674.

[5] Quale J, Bratu S, Gupta J, et al. Interplay of efflux system, AmpC, and oprD expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50(5):1633-1641.

[6] Cunha BA. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapy[J]. Semin Respir Infect,2002,17(3):231-236.

[7] Doi Y, Adams JM, Yamane K, et al. Identification of 16S rRNA methylase-producing Acinetobacter baumannii clinical strains in North America[J]. Antimicrob Agents Chemother,2007,51(11):4209-4210.

[8] Douglas JE, Schuerer K, Zack JE, et al. Effect of chlorhexidine/silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters in an intensive care unit with a low blood stream infection rate after implementation of an Educational Program: a before-after trial[J]. Surg Infect,2007,8(4):445-454.

[9] Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, et al. Hospital outbreak of multiple clones of Pseudomonas aeruginosa carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4 [J]. Antimicrob Chemother, 2003,51(6):1409-1414.

[10] 钱小毛,赵仲民,王亚玲. 铜绿假单胞菌 β -内酰胺类抗菌药物耐药相关基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(3):249-251.

[11] Kang SG, Lee DY, Shin SJ, et al. Changes in patterns of anti-microbial susceptibility and class 1 integron carriage among Escherichia coli isolates[J]. J Vet Sec,2005,6(3):201-205.