药 学 文章编号:0253-3626(2009)04-0466-03

耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药性及相关基因研究

胥 飚[1],王东升[2],余显书[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016;2.重庆市第三人民医院检验科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药机制。方法:取 69 株临床分离的耐亚胺培南铜绿假单胞菌(Imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa,IRPA),经 K-B 法检测耐药性;用 PCR 法对铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关的金属酶 IMP、VIM 基因和外膜蛋白 OprD2 基因等 3 种主要耐药基因进行了检测与分析;结果:69 株 IRPA 均为多重耐药菌,对阿米卡星、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟敏感性较高;检出金属酶 IMP 和 VIM 型金属酶基因阳性的分别有 2 株(2/69,2.9%)和 4 株(4/69,5.8%),外膜蛋白通道 OprD2 基因检测为缺失的有 46 株(46/69,66.7%)。结论:IRPA 耐药情况严重。外膜蛋白通道 OprD2 基因缺失突变是本组铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的重要机制之一。

【关键词】铜绿假单胞菌;亚胺培南;耐药机制;基因

【中国图书分类法分类号】R378.991 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-21

A study of drug resistance and related genes of imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa

XU Biao, et al

(*Department of Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, 400016*)

【Abstract】*Objective*: To study the mechanisms of imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Methods*: Drug resistance of 69 isolates of imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa (IRPA) were tested by Kirby-Bauer disk diffusion method; IMP and VIM genes of metallo-β-lactamases, and outer membrane protein D2 (OprD2) gene of IRPA were detected and analyzed by PCR method. *Results*: All 69 isolates were multidrug resistant, and the sensitivity rates of AMK, CFS and FEP were highe. The positive rates for IMP gene and VIM gene were 2.9% (2/69) and 5.8% (4/69), respectively. 46 of 69 (66.7%) isolates presented with deletion for OprD2 gene. *Conclusion*: The drug resistance of IRPA is a serious issue. The deletion mutation of OprD2 gene is one of important mechanisms of imipenem resistance in these tested P.aeruginosa isolates.

【Key words】Pseudomonas aeruginosa; Imipenem; Resistance mechanism; Gene

对亚胺培南耐药的铜绿假单胞菌(Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa,IRPA)引起的医院感染成为抗菌感染治疗难点之一,国内外研究显示,铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药率有增长的趋势[1,2],碳青霉烯类抗菌药物耐药的机制主要表现为产生β-内酰胺酶、外膜通透性降低、主动外排系统过度表达和作用靶位改变 4 种情况[3-5]。采用分子生物学技术研究相关耐药基因,有助于明确耐药基因类型分布,了解耐药机制,制定有效的抗菌感染治疗方案。本文对与亚胺培南耐药相关的 3 种基因:金属酶 IMP、VIM 基因和外膜蛋白通道 OprD2 基因进行了检测和分析,现报道如下。

作者介绍:胥 飚(1969-),男,主管技师,研究方向:细菌耐药机制研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本实验所用的 69 株铜绿假单胞菌菌株为重庆市 2 家三甲医院 ICU 病房患者(均住院 3 d 以上)痰标本中分离到的耐亚胺培南铜绿假单胞菌株,所有菌株经 Microscan Walkaway-40 全自动微生物分析仪(美国 DADE 公司)鉴定,标准质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853、ATCC25922(重庆临床检验中心保存菌种)。

1.2 药敏试验

药敏纸片:亚胺培南(IMP)、美罗培南(MER)、头孢他啶(CAZ)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、头孢曲松(CRO)、氨曲南(AZT)、头孢吡肟(FEP)、头孢噻肟(CTX)、头孢哌酮/舒巴坦(CFS)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、妥

布霉素(TOB)；培养基采用 MH 琼脂平板，以上药敏纸片和培养基均为英国 Oxoi 公司产品。药敏试验采用 Kirby-Bauer 法检测，根据 2004 年美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)文件[6]判断药敏结果。

1.3 产 MBLs 菌株的表型筛选及 MBLs 的检测

琼脂稀释法测定 69 株亚胺培南耐药株的 MIC，标准质控菌 ATCC27853，ATCC25922，按 NCCLS 标准进行实验和判断结果。MBLs 的筛选采用表型筛选方法[7]。

1.4 金属酶 IMP、VIM 基因和外膜蛋白通道 OprD2 基因检测

1.4.1 细菌处理 挑纯培养菌落置入含 100 μl 生理盐水的 0.5 ml 离心管内离心，去上清。加 200 ng/ml 蛋白酶 K 溶液 2 μl 混匀，56℃水浴 2 h，再 95℃水浴 10 min，15 000 r/min，离心 1 min，吸取上清液作为模板。以铜绿假单胞菌 ATCC27853 菌株作为参照菌株，以蒸馏水作模版为扩增的阴性对照。

1.4.2 引物设计 IMP、VIM 基因 PCR 扩增引物分别参照 GeneBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)已发布的序列设计，OprD2 基因引物序列参照文献[8]设计，见表 1。

3 种靶基因 PCR 扩增体系均为：总反应体系 20 μl（其中模板液 5 μl），预变性温度 94℃，3 min；94℃ 45 s，55℃ 45 s，70℃ 60 s，共 35 个循环，取出 10 μl 反应液于 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳，紫外透射仪下观察结果。

表 1 PCR 扩增引物序列

耐药基因	引物序列(5'→3')	产物长度 bp
IMP	P1：CTACCGCAGCAGAGTCTTTGC	594
	P2：GAACAACCAGTTTTGCCTTACC	
VIM	P1：ATGGTGTTTGGTCGTCTAT	510
	P2：TGGGCCATTCAGCCAGATC	
OprD2	P1：GCGCATCTCCAAGACCATG	193
	P2：GCCACGCGATTTGACGGAG	

2 结 果

2.1 药敏试验结果

69 株 IRPA 对 13 种抗菌药物的敏感性，见表 2。

2.2 产 MBLs 菌株的表型筛选

MBLs 表型筛选结果显示 69 株亚胺培南耐药菌中有 11 株产 MBLs 的表型。

2.3 金属酶 IMP、VIM

基因和外膜蛋白通道 OprD2 基因检测结果

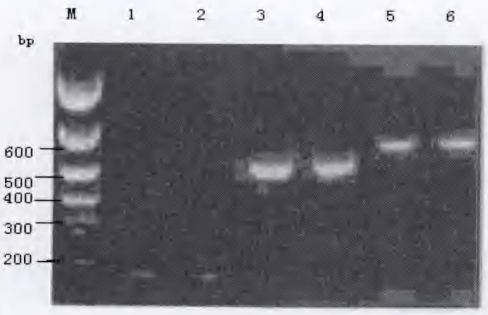
69 株 IRPA 中检出金属酶 IMP 和 VIM 型金属酶基因阳性的分别有 2 株(2/69，2.9%)和 4 株(4/69，5.8%)，外膜蛋白通道 OprD2 基因检测为阴性(缺失突变)的有 46 株(46/69，66.7%)，其中 1 株为 IMP、VIM 基因基因阳性，同时 OprD2 基因缺失。3种基因扩增产物的电泳结果见图 1。

3 讨 论

铜绿假单胞菌是一种常见的医院内获得性感染条件致病菌，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，治疗铜绿假单胞菌感染变得十分困难。碳青霉烯类抗生素中的亚胺培南被认为是治疗铜绿假单胞菌最有效的药物之一，但随着该药的广泛应用，细菌对其耐药性也逐步上升，严重影响其临床应用。本文研究分析了一组在重庆市 2 家大型综合医院 ICU 病房分离的 IRPA 耐药谱，结果表明 69 株 IRPA 均为

表 2 69 株亚耐胺培南铜绿假单胞菌的体外耐药率

抗菌药物	敏感		中介		耐药	
	株数	%	株数	%	株数	%
IMP	0	0.0	0	0.0	69	100.0
MER	0	0.0	0	0.0	69	100.0
CAZ	0	0.0	6	8.7	63	91.3
CRO	0	0.0	2	2.9	67	97.1
FEP	6	8.7	6	8.7	57	82.6
TZP	0	0.0	10	14.5	59	85.5
AZT	0	0.0	8	11.6	61	88.4
CTX	0	0.0	2	2.9	67	97.1
CFS	0	0.0	16	23.2	53	76.8
AMK	14	20.3	7	10.1	48	69.6
GEN	4	5.8	5	7.2	60	87.0
CIP	5	7.2	2	2.9	62	89.9
TOB	9	13.0	2	2.9	58	84.1



M.DNA Marker；1、2. OprD2 基因扩增片段(193 bp)；3、4. VIM 基因扩增片段(510 bp)；5、6. IMP 基因扩增片段(594 bp)

图 1 IRPA 与亚胺培南耐药相关的 3 种基因 PCR 扩增产物电泳结果

多重耐药菌，其中 AMK 敏感率最高，但也仅为 30.4%，对第 3 代头孢菌素和酶抑制剂的复合制剂耐药率为 76.8%~97.1%。

碳青酶烯类抗生素是一类高效广谱的 β-内酰胺类抗菌药物，对革兰阳性菌和革兰阴性菌、需氧菌、厌氧菌皆有很强抗菌活性，对大多数 β-内酰胺酶高度稳定，与青霉素结合蛋白亲和力强，并能够有效渗透细菌外膜达到作用靶位，具杀菌活性强大的特点。但随着广泛使用和过度使用，其耐药性也逐渐增加，其中铜绿假单胞菌表达产生的碳青霉烯酶水解碳青霉烯类抗菌药物是重要的耐药机制。碳青霉烯酶与传统的 β-内酰胺酶不同，其活性中心为金属离子，因此又称金属酶。铜绿假单胞菌所产生的金属酶主要为获得性金属酶，分为两类：IMP 型和 VIM 型，其亚型目前有 20 多种[9]。在本文中两种型别均有检出，但有 5 株表型产金属酶的菌株未检出 IMP、VIM 基因，说明本地区可能还有其他类型的金属酶基因存在。

铜绿假单胞菌的外膜蛋白有 OprC、OprD2、OprE、OprF、OprG、OprH，是半渗透性的，多数亲水性小分子利用非特异性的通道渗入胞质，而一些渗透不充分或渗透性较小的分子通过特异性孔蛋白通道进入胞质。碳青霉烯是一类分子量较小的亲水性 β-内酰胺类抗生素，对革兰阴性菌（包括铜绿假单胞菌）的作用靶位是内膜上的青霉素结合蛋白-2（PBP-2）与 PBP-3[10]，它可以通过细菌外膜上具有通透性功能的孔蛋白 OprC、OprD2、OprE 扩散，但 OprD2 是亚胺培南通过特异性通道，亚胺培南进入胞质间隙后与靶位结合，并对大多数 β-内酰胺酶具有高度稳定性，所以亚胺培南在临床治疗中能取得良好疗效。鉴于铜绿假单胞菌 OprD2 基因突变除存在 1 204 bp 大片段缺失外，11 bp 小片段缺失形式也可以存在[8]，因此，本文所用的上游引物 3'端正好包涵该 11 个碱基，如存在此 11 bp 的缺失，也表现出无 PCR 产物扩增（检出为阴性），即外膜 OprD2 表达改变或缺失，抗菌药物将不能进入细菌内膜到达作用靶位而致耐药。本研究中的 69 株 IRPA 有46 株（66.7%）检测发现 OprD2 基因缺失突变，说明该机制在我们分离的 IRPA 菌株中对亚胺培南耐药起了非常重要的作用。另外本实验也发现有 18（26.1%）株耐药菌 OprD2 基因阳性，且未检出金属酶基因 IMP、VIM，这也提示 IRPA 对亚胺培南的耐药机制，除以上 3 种原因之外，还存在着其他的耐药机制，尚需要进一步研究分析。

参 考 文 献

[1] Fass R J, Barnishan J, Ayers L W, et al. Emergence of bacterial resistance to imipenem and ciprofloxacin in a university hospital[J]. J Antimicrob Chemother, 1995, 36(2): 343-353.

[2] 李丰良，韩妮萍，杜廷义，等.铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药性的动态变化特征及分析[J]. 中国药房，2006，17(10)：765-767.

[3] Majumdar S, Kirby A, Berry N, et al. An outbreak of imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in an intensive care unit[J]. J Hosp Infect, 2004, 58(1): 160-161.

[4] Higgins P G, Fluit A C, Milatovic D, et al. Antimicrobial susceptibility of imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 50(1): 299-301.

[5] Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, et al. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(2): 560-578.

[6] National committee for clinical laboratory standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Fourteenth informational supplement. Wayne, PA: NCCLS, 2004: 102-103.

[7] 徐元宏，沈继录，杨伯侠，等. 产金属酶合并外膜蛋白缺失的铜绿假单胞菌的检测[J]. 中华医院感染学杂志，2005，15(10)：1085-1089.

[8] Wang C X, Mi Z H. Imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa producing IMP-1 metallo-β-lactamases and lacking the outer-membrane protein OprD2[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(1): 353-354.

[9] Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, et al. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of Pseudomonas aeruginosa and an alcaligenes xylosoxidans strain[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(6): 2014-2016.

[10] Nikaino H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux[J]. Science, 1994, 264(5157): 382-388.

（责任编辑：关蕴良）