

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.07.002

· 论 著 ·

长沙地区产金属 β -内酰胺酶铜绿假单胞菌的分子流行病学特征

邬靖敏¹, 邹明祥², 李 军²

(1 长沙市第一医院, 湖南 长沙 410005; 2 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 了解长沙地区多重耐药铜绿假单胞菌(PA)产金属 β -内酰胺酶(MBL)菌株基因型和流行情况。方法 收集该地区 7 所综合医院临床分离的 PA, 对菌株进行鉴定和药敏试验, 采用 EDTA 协同试验、E-test MBL 进行 MBL 表型筛选, 聚合酶链反应(PCR)明确其基因型, 肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)进行同源性分析。结果 经 EDTA 协同和 E-test MBL 初步筛查, 81 株 PA 中仅 10 株为强阳性; PCR 结果显示, 18 株 PA MBL 基因阳性, 其中 IMP-9 型 11 株, IMP-1 型 1 株和 VIM-2 型 6 株, 未检测出 SIM、SPM、GIM 和 NDM-1 基因型。ERIC-PCR 分型结果显示, 12 株产 IMP PA 存在多个型别, 而 6 株产 VIM-2 菌株为同一型别。结论 长沙地区多重耐药 PA 以 IMP-9 和 VIM-2 基因型最常见。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 金属 β -内酰胺酶; 金属酶; 基因型; 肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应

[中图分类号] R181.3⁺ 2 R378.99⁺ 1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)07-0447-05

Molecular epidemiological characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Changsha

WU Jing-min¹, ZOU Ming-xiang², LI Jun² (1 The First Hospital of Changsha, Changsha 410005, China; 2 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the genotypes and epidemic of metallo- β -lactamase-(MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) in Changsha. **Methods** *P. aeruginosa* isolated from seven comprehensive hospitals in Changsha were collected and performed identification and antimicrobial susceptibility testing, phenotypes of MBL were detected with EDTA-disk synergy test and E-test, genotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR), homology analysis were conducted by enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR). **Results** Preliminary screening by EDTA-disk synergy test and E-test showed that only 10 of 81 isolates were strong positive; PCR result showed that 18 isolates were positive for MBL, 11 of which were IMP-9-type MBL, 1 was IMP-1-type, and 6 were VIM-2-type. SIM, SPM, GIM, and NDM-1-types were not found. ERIC-PCR showed that 12 strains of IMP-producing *P. aeruginosa* has multiple types, 6 VIM-2-producing strains were of the same type. **Conclusion** IMP-9 and VIM-2 are main genotypes in *P. aeruginosa* in Changsha.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; metallo- β -lactamase; metalloenzyme; genotype; enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction

[Chin J Infect Control, 2016, 15(7): 447-451]

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种常见的引起医院获得性感染的条件致病菌。金属 β -内酰胺酶(metallo- β -lactamase, MBL), 简称

金属酶, 是致使 PA 对碳青霉烯类抗生素耐药的重要机制之一。产 MBL PA 检出日益增加^[1], 泛耐药 PA 的出现^[2], 以及有效酶抑制剂的缺乏^[3], 给临床

[收稿日期] 2016-04-11

[基金项目] 湖南省发改委(湘发改高技[2012]1493号; 湘发改投资[2014]658号); 湖南省自然科学基金(14JJ7003)

[作者简介] 邬靖敏(1987-), 女(汉族), 江西省宜春市人, 检验技师, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 邹明祥 E-mail: zoumingxiang@126.com

抗感染治疗和医院感染防控带来极大困难。本研究拟对长沙地区7所综合医院81株多重耐药PA进行MBL基因检测,并对产IMP/VIM-2酶菌株进行同源性分析,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株与来源 收集2011年1—6月长沙地区7所综合性医院临床分离的非重复多重耐药PA 81株,其中中南大学湘雅医院46株,中南大学湘雅三医院14株,浏阳市人民医院7株,长沙市第三医院6株,湖南省第二人民医院4株,长沙市第一医院3株,湖南省人民医院1株。标本类型有痰、支气管分泌物、咽拭子、创面分泌物、血、尿、导管尖端和引流液等。多重耐药菌PA的判断标准参照李春辉等^[4]翻译的文献。产IMP和VIM-2阳性对照菌株为临床分离菌株,已通过测序证实。铜绿假单胞菌ATCC 27853购自卫生部临床检验中心。

1.2 试剂与仪器 VITEK-2 GN鉴定板和E-test MBL购自法国生物梅里埃公司。亚胺培南药敏纸片和M-H培养基干粉购自英国OXOID公司,0.5 mol/L EDTA溶液为自行配制,聚合酶链反应(PCR)试剂购自美国OMEGA,D2000 Marker购自天根生化科技,所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 MBL表型筛选

1.3.1 EDTA协同试验 将0.5麦氏单位待测菌液涂布于MH平板,静置10 min,待干燥后在平板中间贴亚胺培南药敏纸片(10 μg/片)和EDTA纸片(0.5 mol/L EDTA溶液4 μL),纸片边缘相距10~15 mm。35℃过夜培养后,若靠近亚胺培南药敏纸片处出现抑菌圈扩大或“匙孔现象”则为阳性。

1.3.2 E-test MBL试验 在涂有0.5麦氏单位菌液的MH平板上贴商品化E-test条,该E-test条两端分别为亚胺培南(4~256 μg/mL)和亚胺培南(1~64 μg/mL)+EDTA(320 μg/mL)。35℃过夜培养后,若IP/IPI的MIC比值≥8倍则为阳性。

1.4 DNA提取及MBL基因PCR 采用煮沸法提取DNA。35℃过夜培养,挑取单个待测菌落置于盛有300 μL无菌双蒸水的EP管中,95℃煮10 min并置冰上快速冷却,13 000 r/min低温离心10 min,上清则为细菌DNA模板,分装并于-20℃保存备用。MBL基因PCR:根据参考文献^[5-6]设计引物,并用Primer premier 5.0软件验证引物。引物序列见下

表1。PCR反应体系为25 μL,即2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL、上下游引物各1 μL、DNA模板2 μL,无菌蒸馏水8.5 μL。PCR反应条件:预变性94℃ 2 min;变性94℃ 1 min,退火72℃ 1 min,共30个循环;最后72℃再延伸5 min。取5 μL扩增产物进行1.5%琼脂糖电泳,条件为100 V 40 min。PCR产物测序由北京六合华大基因有限公司完成,将测序结果在GenBank上进行BLAST比对分析。

表1 耐药基因PCR扩增引物

Table 1 Primers of PCR amplification of drug-resistant genes

基因	引物序列 (5'-3')	退火温度 (℃)	扩增产物 长度(bp)
IMP	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG	57	587
	AACCAGTTTTGCCTTACCAT		
VIM-2	AAAGTTATGCCGACTCACC	55	865
	TGCAACTTCATGTTATGCCG		
NDM-1	GAATGTCTGGCAGCACACTT	57	480
	TTGGCCTTGCTGCTCTTGAT		
SIM-1	TACAAGGGATTCCGCATCG	55	741
	TAATGGCCTGTTCCCATGTG		
SPM-1	GCGTTTTGTTGTTGCTC	55	786
	TTGGGGATGTGAGACTAC		
GIM	CTTGTAGCGTTGCCAGCTTTA	55	562
	CAGCCCAAGAGCTAATTGAGG		

1.5 菌株同源性分析 采用肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应(enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, ERIC-PCR)分别对产IMP和VIM-2 PA进行同源性分析。引物序列为ERIC-2:5'-AAGTAAGTGACT-GGGGTGAGCG-3'。判定标准为:主要的条带位置和数量相同则是同一基因型^[7]。PCR反应体系是2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL,引物1 μL,DNA模板2 μL,无菌蒸馏水补足至25 μL。PCR反应条件是95℃预变性5 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 45 s,共30个循环;最后72℃再延伸3 min。取5 μL PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳分离,100 V电泳40 min。紫外灯下观察结果,并用凝胶成像系统进行拍照。

2 结果

2.1 MBL表型初筛 经EDTA协同和E-test MBL初步筛查,81株PA中仅10株为强阳性,见图1~2。

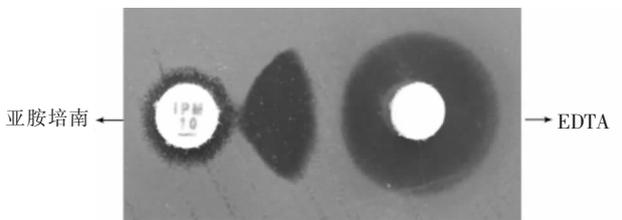


图1 EDTA协同试验检测结果

Figure 1 Result of EDTA-disk synergy test

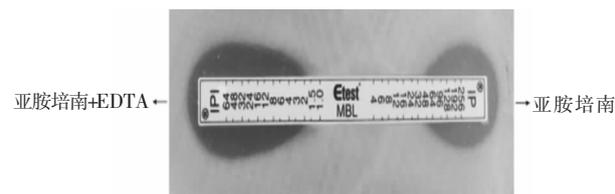
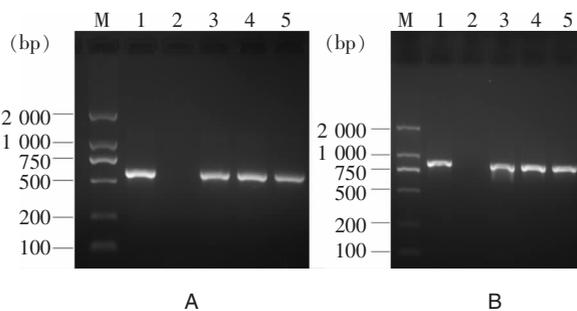


图2 E-test MBL试验检测结果

Figure 2 Result of E-test for MBL

2.2 MBL基因确证 全部菌株提取DNA直接进行MBL基因扩增,结果显示,18株PA扩增出明显条带。经产物测序及BLAST比对,其中IMP-9型11株,IMP-1型1株和VIM-2型6株。未检测到SIM-1、SPM-1、GIM和NDM-1基因阳性的PA。见图3。



A: IMP基因;B:VIM-2基因;M:D2000 DNA Marker;1:阳性对照;2:铜绿假单胞菌 ATCC 27853;3—5:PCR扩增阳性的临床样本

图3 IMP和VIM-2基因扩增产物电泳图

Figure 3 Electrophoresis map of PCR amplification products of IMP and VIM-2 genes

2.3 表型检测与基因确证相符性 EDTA协同试验MBL表型阳性的10株PA均扩增到MBL基因,而12株产IMP PA中4株表型初筛阴性,6株产VIM-2 PA 4株表型初筛阴性。

2.4 产IMP和VIM-2型MBL PA的标本来源 产MBL PA菌株分布于长沙地区多所医院,主要分离于重症监护病房(ICU)和烧伤科。详见表2。

表2 产IMP和VIM-2型MBL PA来源

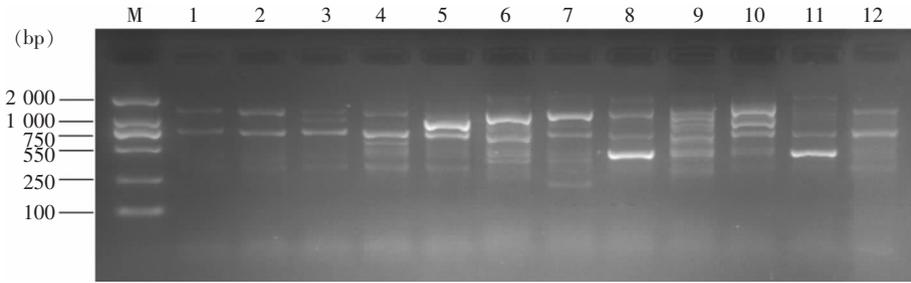
Table 2 Sources of IMP-type and VIM-2-type MBL-producing *P. aeruginosa*

MBL	菌株编号	标本来源	患者诊断	科室分布	医院来源
产IMP型	3	痰	重型颅脑外伤	神外ICU	X1
	11	尿	左股骨头坏死	中西医结合	X1
	13	痰	I型呼吸衰竭	神内	SS
	14	痰	慢性呼吸衰竭	ICU	SS
	15	痰	多器官功能障碍综合征	ICU	SS
	35	导管尖端(股静脉)	重型颅脑外伤	ICU	X1
	36	痰	脑出血	门诊	X1
	T15	痰	脑梗死	神内ICU	X1
	T26	痰	脑出血后遗症	神内ICU	X1
	T40	创面分泌物	全身多处压伤	ICU	X1
	843	痰	肺炎	儿科	SR
	SY7	痰	脑梗死	神内ICU	SY
	产VIM-2型	23	分泌物	全身衰竭肾病综合征	ICU
31		分泌物	全身多处电击伤	烧伤科	X3
37		创面分泌物	全身多处烧伤	烧伤科	X1
38		血	急诊患者无诊断	门诊	X1
39		创面分泌物	火焰烧伤64%	烧伤科	X1
T27		咽拭子	慢阻肺急性加重期	呼吸内科	X1

X1:中南大学湘雅医院;X3:中南大学湘雅三医院;SR:湖南省人民医院;SY:长沙市第一医院;SS:长沙市第三医院

2.5 产酶菌株ERIC-PCR分型 12株产IMP PA为多个克隆型,呈现5种型别。其中3、11、13、14、15和SY7为A型,36和T26为B型,T15和843

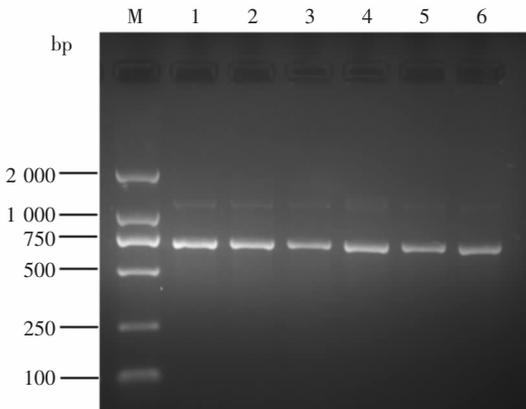
为C型,35为D型,T40为E型,片段大小为250~2000 bp,见图4。而6株产VIM-2铜绿假单胞菌为同一克隆型。见图5。



M: D2000 DNA Marker; 1—12 泳道依次为 3、11、13、14、15、35、36、T15、T26、T40、843、SY7 号菌株

图 4 产 IMP PA 的 ERIC-PCR 电泳图

Figure 4 ERIC-PCR electrophoresis map of IMP-producing *P. aeruginosa*



M: D2000 DNA Marker; 1—6 泳道依次为 23、31、37、38、39、T27 号菌株

图 5 产 VIM-2 PA 的 ERIC-PCR 电泳图

Figure 5 ERIC-PCR electrophoresis map of VIM-2-producing *P. aeruginosa*

用此方法进行 MBL 表型筛选时,若 IP 侧 MIC ≤ 4 μg/mL 则无法检测出具体的 MIC 值,不适用于检测亚胺培南中介或敏感的菌株,且 E-test MBL 试纸条较为昂贵,相比之下,EDTA 协同试验是筛选 MBL 较为简单经济的方法。本研究未检测到产 NDM-1 PA,而国际上已开始有此类菌株的报道^[10]。

本研究采用 ERIC-PCR 进行菌株同源性分析,原因是其具有操作简单、成本低、分辨效果好、可重复性较好等优点,也常用于临床实验室分子流行病学初步监测;而脉冲场凝胶电泳方法操作复杂、周期长、耗费高,而且还需配备专门的仪器。ERIC-PCR 结果显示,12 株产 IMP PA 为多个克隆型,散在分布于多个医院不同病区,以痰标本来源为主(占 75%,9/12)。医护人员在诊治过程中需高度重视,加强手卫生,防止耐药菌株播散^[11]。6 株产 VIM-2 PA 为同一克隆型,有 4 株分离自中南大学湘雅医院,其中 2 株来自烧伤科,另外 2 株分别来自于中南大学湘雅三医院烧伤科、长沙市第一医院 ICU。各医院尤其是 ICU 和烧伤科医生需高度警惕呼吸道和创面多重耐药 PA 感染^[12],感染控制部门应加强早期监测,督促临床科室早期隔离相关病例,防止多重耐药 PA 的暴发流行。

综上所述,长沙地区产 MBL PA 的分离情况不容乐观,各医院需加强此类菌株的耐药监测和实施医院感染控制措施。本研究不足之处为菌株主要来源于中南大学湘雅医院,其他医院菌株收集较少,菌株代表性不足。

3 讨论

近年来,PA 对以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗生素的耐药率逐年上升,甚至出现泛耐药菌株,成为临床棘手的难题。由于细菌存在地域和医院间差异,准确地掌握长沙地区 PA 产酶菌株的分子流行病学特征对临床治疗和感染控制具有重要的意义。

本组研究结果显示,长沙地区产 MBL PA 菌株以 IMP-9 和 VIM-2 基因型为主,与李俏俏^[8]报道的台州地区的基因型相近。产酶菌株分布于长沙地区多所医院,主要分离于 ICU 和烧伤科,这可能与患者年龄大、长期卧床、接受机械通气、留置中心静脉管、导尿管等侵袭性操作有关^[9]。E-test MBL 试验基于 EDTA 可螯合 Zn²⁺ 导致 MBL 失活原理,采

[参 考 文 献]

[1] Li Y, Zhang X, Wang C, et al. Characterization by phenotypic and

- genotypic methods of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis[J]. Mol Med Rep, 2015,11(1):494-498.
- [2] 陈越,孙景勇,倪语星,等. 2012 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(3):199-203.
- [3] Livermore DM, Mushtaq S, Morinaka A, et al. Activity of carbapenems with ME1071 (disodium 2,3-diethylmaleate) against Enterobacteriaceae and *Acinetobacter spp.* with carbapenemases, including NDM enzymes[J]. J Antimicrob Chemother, 2013,68(1):153-158.
- [4] 李春辉,吴安华. MDR、XDR、PDR 多重耐药菌暂行标准定义——国际专家建议[J]. 中国感染控制杂志,2014,13(1):62-64.
- [5] 陶晶,张俊丽,瞿婷婷,等. 铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶分布及产金属酶检测方法比较[J]. 检验医学,2009,24(2):145-148.
- [6] Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China[J]. J Antimicrob Chemother, 2011,66(6):1255-1259.
- [7] 李永丽,应春妹,陈艺升. ERIC-PCR 技术在鲍曼不动杆菌基因型中的应用评估[J]. 检验医学,2013,28(7):621-624.
- [8] 李俏俏. 台州地区产金属 β -内酰胺酶的铜绿假单胞菌的检测及其耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志,2015,40(2):132-136.
- [9] 蔡兴俊,吴华,黄奕江,等. 泛耐药铜绿假单胞菌感染危险因素及产金属 β -内酰胺酶调查分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(3):534-536.
- [10] Rahman M, Prasad KN, Pathak A, et al. RmtC and RmtF 16S rRNA methyltransferase in NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Emerg Infect Dis, 2015,21(11):2059-2062.
- [11] 黄勋,邓子德,倪语星,等. 多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(1):1-9.
- [12] Shanthi J, Pazhanimurugan R, Gopikrishnan V, et al. Mechanism of drug resistance, characterization of plasmid-borne determinants and transformation study in *P. aeruginosa* from burn and ICU units-its susceptibility pattern[J]. Burns, 2013,39(4):643-649.

(本文编辑:周鹏程)

• 信息 •

《中国感染控制杂志》征订征稿启事

《中国感染控制杂志》(月刊,ISSN 1671-9638;CN 43-1390/R;邮发代号 42-203)是国家教育部主管,中南大学(湘雅医院)主办的国内外公开发行的国家级感染性疾病专业学术期刊。本刊为中国科技论文统计源与核心期刊,北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》期刊,并被《美国化学文摘》(CA)、《俄罗斯文摘》杂志(AJ)、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》(WPRIM)、《中国生物医学文献数据库》(CBM)、《中国期刊全文数据库》(CNKI)、《万方—数字化期刊群》及《中文生物医学期刊文献数据库》(CMCC)等国内外重要检索机构收录。

本刊以感染预防控制为主,涵盖临床医学、临床流行病学、临床微生物学、医院感染监测与控制等,主要刊载感染病学理论、实践、科研、教学和管理的最成果和经验;栏目包括专家论坛、论著、经验交流、病例报告、综述、译文、国内外学术动态等。欢迎各相关专业医务人员及疾病预防与控制人员订阅(15元/期,全年180元)、赐稿(网址:www.zggrkz.com)。

本刊承诺,投至本刊的国家级基金项目或高质量研究论文经审稿通过,在收稿2~4个月内刊登;省级基金项目审稿通过,在收稿4~6个月内刊登。稿件一经刊用,编辑部将致薄酬并赠送第一作者《中国感染控制杂志》12期。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号中国感染控制杂志社(编辑部) 邮编:410008

网址:www.zggrkz.com;www.cjicp.com

E-mail:zggrkz2002@vip.sina.com

电话(传真):0731-84327658