

· 论 著 ·

铜绿假单胞菌获得性金属  $\beta$ -内酰胺酶及其相关基因研究\*蓝 锴, 陈 茶, 庞雪云, 张 文, 林海标  
(广东省中医院检验科, 广州 510120)

**摘要:**目的 了解该院铜绿假单胞菌(Pae)金属酶的产生及其相关基因携带情况。方法 采用多种方法进行 Pae 金属酶初筛、确证试验,并检测 4 种金属酶基因。结果 产金属酶菌株初筛阳性率为 53.5%,用头孢他啶(CAZ)/乙二胺四乙酸(EDTA)、CAZ/2-巯基丙酸(2-MPA)、亚胺培南(IMP)/EDTA、IMP/2-MPA 检测阳性率分别为 13.95%、15.12%、17.44%、18.60%。PCR 扩增结果仅 IMP-1 出现阳性,阳性率达 16.28%,其余 3 种金属酶基因均为阴性。结论 不同方法对金属酶检测结果不尽相同;携带 IMP-1 金属酶基因是该院 Pae 耐碳青霉烯类等多种药物的主要原因。

**关键词:**铜绿假单胞菌;金属酶;耐药基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.002

中图分类号:R378.991;R969.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)23-3155-03

Study on acquired metallo- $\beta$ -lactamases and its related genes in *Pseudomonas aeruginosa*\*

LAN Kai, CHEN Cha, PANG Xue-yun, et al.

(Department of Clinical Laboratory, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong 510120, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the production of metallo- $\beta$ -lactamases and its related genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** Firstly, we screened MBLs by K-B method. Then we validated the results by CAZ and IMP disk with its corresponding inhibitors. Finally, we amplified four different MBLs genes by PCR. **Results** Among total 86 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, about 53.5% strains showed resistance to CAZ or IMP. When validated the MBLs by two different disks with inhibitors, the positive rate varied from 13.95% to 18.60%. Among the four kind of detected MBLs genes, only IMP-1 showed positive amplification whose rate was 16.28%. **Conclusion** We got different results when applied different methods to detect metallo- $\beta$ -lactamases. The most reasons why *Pseudomonas aeruginosa* isolated in our hospital show resistant to carbanpenems and other kinds of antibiotics was IMP-1 gene.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; metallo- $\beta$ -lactamases; drug-resistance genes

金属  $\beta$ -内酰胺酶(metallo- $\beta$ -lactamases, MBLs)属  $\beta$ -内酰胺酶 Bush 分类 3 群, Ambler 分类 B 类, 通常简称金属酶。该类酶的最大特点是可以水解碳青霉烯类等抗生素,而对哌拉西林和氨基曲南影响较小;其活性不被克拉维酸等  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抑制,但可被乙二胺四乙酸(EDTA)抑制。金属酶可由染色体和质粒介导,已在铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, Pae)、嗜麦芽窄食单胞菌、粘质沙雷菌、肠杆菌属、肺炎克雷伯菌、嗜水气单胞菌和不动杆菌属等细菌中检出此类酶<sup>[1-2]</sup>。由于产生 MBLs 造成 Pae 对碳青霉烯类等多种抗生素耐药已成为 Pae 多重耐药的重要原因。为了解本院分离的 Pae 菌株金属酶产生状况,采用多种方法进行了金属酶检测,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌株来源** 收集 2009 年 8~9 月本院住院患者的痰、胸腔积液、中段尿、脓液等标本,从其中分离的 Pae 共计 86 株,均用法国家生物梅里埃 Vitek-2 全自动细菌鉴定/药敏分析仪鉴定到种。鉴定卡质控采用的标准菌株为阴沟肠杆菌 ATCC700323(广州华鑫科技有限公司惠赠)。

**1.2 药物敏感试验** 采用 K-B 法进行药敏试验。MH 平板购自广州迪景生物有限公司;药敏纸片购自 Oxoid 公司;药敏试验结果判断采用美国 CLSI2009 年标准<sup>[3]</sup>。检测 15 种抗菌药:哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、庆大霉素、阿米卡星、左氧氟沙星、环丙沙星、氨基曲南、头孢他啶(CAZ)、头孢哌酮、头孢哌

酮/舒巴坦、头孢吡肟、复方新诺明、亚胺培南(IMP)、美罗培南、妥布霉素。药敏质控所用标准菌株为大肠埃希菌 ATCC25922, PaeATCC27853, 购自卫生部临床检验中心。

**1.3 MBLs 检测** 用 CAZ 及 IMP 纸片进行金属酶初筛,如果 CAZ $\leq$ 14 mm, 或 IMP $\leq$ 13 mm, 提示该菌株可能产生金属酶<sup>[4]</sup>。按参考文献[5]采用双纸片协同法进行金属酶确证实验,以 EDTA 和 2-巯基丙酸(2-MPA)作抑制剂,分别与 CAZ、IPM 纸片组合进行双纸片协同试验。

**1.4 耐药基因检测** 采用煮沸法提取细菌 DNA 后,用 PCR 对 4 种编码金属酶基因 IMP-1、GIM、SPM、VIM 进行扩增<sup>[6]</sup>,其引物序列和目的产物长度见表 1。PCR 扩增体系为:P1、P2 引物各 0.5  $\mu$ mol/L, KCl 10 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, Tris-HCl(pH9.0)10 mmol/L, 0.5% NP40, 0.02% BSA(质量浓度), Taq DNAase 1 u, 共 15  $\mu$ L, 另加入模版 DNA5  $\mu$ L。循环参数为:92  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;93  $^{\circ}$ C、60 s, 55  $^{\circ}$ C、60 s, 72  $^{\circ}$ C、60 s, 循环 35 次;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察分析,记录结果。

## 2 结 果

**2.1 药敏试验结果** 86 株 Pae 对所选择 15 种抗菌药的敏感率、中介率及耐药率结果见表 2。

**2.2 金属酶检测结果** CAZ 耐药率为 44.2%, IMP 耐药率

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770935),广东省卫生厅资助项目(A2009234)。

为 27.9%，同时耐这两种药的菌株有 18 株(21.2%)。对 CAZ 或 IMP 耐药的总菌株数为 46 株，金属酶产生率为 53.5%。将这 46 株阳性菌株进行金属酶确证试验，其中 CAZ/EDTA 阳性 12 株(13.95%)；CAZ/2-MPA 阳性 13 株(15.12%)；IMP/EDTA 阳性 15 株(17.44%)；IMP/2-MPA 阳性 16 株(18.60%)，见表 3。

表 1 耐药基因引物序列及目的产物长度

耐药基因	引物序列	产物长度 (bp)
IMP-1	P1:5'-CGG CCG CAG GAG AGG CTT T-3'	587
	P2:5'-AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT-3'	
GIM	P1:5'-CTT GTA GCG TTG CCA GCT TTA-3'	562
	P2:5'-CAG CCC AAG AGC TAA TTG AGG-3'	
SPM	P1:5'-CTG CTT GGA TTC ATG GGC GCG-3'	784
	P2:5'-CCT TTT CCC GAC CTT GCT CG-3'	
VIM	P1:5'-ATT CCG GTC GGA GAG GTC CG-3'	633
	P2:5'-GAG CAA GTC TAG ACC GCC CG-3'	

表 2 86 株 Pae 药敏试验检测结果

药物名称	敏感		中介		耐药	
	菌株数	敏感率(%)	菌株数	敏感率(%)	菌株数	敏感率(%)
哌拉西林	10	11.6	8	9.3	68	79.1
哌拉西林/ 他唑巴坦	54	62.8	1	1.2	31	36.0
氨曲南	35	40.7	3	3.5	48	55.8
头孢他啶	42	48.8	6	7.0	38	44.2
头孢哌酮	40	46.5	5	5.8	41	47.7
头孢哌酮/ 舒巴坦	57	66.3	7	8.1	22	25.6
头孢吡肟	41	47.7	10	11.6	35	40.7
亚胺培南	59	68.6	3	3.5	24	27.9
美罗培南	63	73.2	2	2.3	21	24.4
庆大霉素	48	55.8	5	5.8	33	38.4
阿米卡星	63	73.3	2	2.3	21	24.4
左氧氟沙星	47	54.7	2	2.3	37	43.0
环丙沙星	48	55.8	2	2.3	36	41.9
复方新诺明	6	7.0	0	0	80	93.0
妥布霉素	53	61.6	7	8.1	26	30.3

**2.3 耐药基因检测结果** 将阳性菌株进行 4 种金属酶基因检测结果显示：IMP-1 阳性 14 株(16.28%)，而 GIM、SPM、VIM 均无阳性检出。双纸片协同试验及 IMP-1 阳性结果见表 3。

表 3 PCR 与纸片法阳性结果比较

编号	CAZ/ EDTA	CAZ/ 2-MPA	IMP/ EDTA	IMP/ 2-MPA	PCR (IMP-1)
2	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+

表 3(续) PCR 与纸片法阳性结果比较

编号	CAZ/ EDTA	CAZ/ 2-MPA	IMP/ EDTA	IMP/ 2-MPA	PCR (IMP-1)
10	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	+
20	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+
39	-	+	+	+	-
47	+	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+
53	+	+	+	+	+
61	-	-	+	+	+
66	+	+	+	+	-
77	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+
85	-	-	-	+	-
阳性株数	12	13	15	16	14

### 3 讨论

用纸片法进行 MBLs 检测的原理是利用金属螯合剂可以与酶活性位点上的  $Zn^{2+}$  结合从而抑制金属酶活性。常用抑制剂有 EDTA、2-MPA、2-巯基乙醇、巯基乙酸(SMA)。金属酶的检测目前国际上尚无统一标准，从本组检测结果来看，CAZ、IMP 及其相应抑制剂检测结果也并不一致。其中，用 IMP/2-MPA 检测的阳性率最高。有学者在大样本的 Pae 和鲍曼不动杆菌金属酶表型筛选方法的研究中发现，EDTA 对 Pae 的敏感性好，而 2-MPA 对鲍曼不动杆菌的敏感性好<sup>[5]</sup>。已有资料显示，使用 2-MPA 能有效地将 IMP-1 酶与丝氨酸 AmpC 酶等分开，其特异性和敏感性接近于用 IMP-1 做引物检测的结果<sup>[7]</sup>，且简单易行，可操作性强。但是 2-MPA 具有一定的毒性，在临床应用上会受到一定限制。此外，还可以用 E-test 法和微量稀释法检测金属酶<sup>[8]</sup>。

Pae 作为一种条件致病菌随着抗生素滥用而呈现日益增多的趋势，2002 年全国细菌耐药性监测网所属 57 家三级甲等医院调查发现，Pae 临床分离率仅次于大肠埃希菌列第 2 位，且该菌对多种临床常用药物的耐药率为 15.2%~78.4%<sup>[9]</sup>。金属酶是一个异基因家族，不同的酶相互之间的一级结构表现出低水平的序列相似性，但三维结构呈现高水平的相似性，综合起来有以下主要特征：(1)能水解碳青霉烯类抗生素；(2)对单环类药物敏感；(3)对螯合剂敏感；(4)对锌离子有依赖性。到目前为止，共发现 IMP、VIM、SPM、GIM 和 SIM 5 个不同家族的金属酶<sup>[5,10]</sup>。产 MBLs 造成 Pae 对碳青霉烯类等多种抗生素耐药已成为 Pae 多重耐药的重要原因。据文献报道，IMP 和 VIM 是两类最主要的 MBLs，而在本组检测中，仅 IMP-1 出现阳性结果，VIM、SPM、GIM 检测均呈阴性，说明不同地区 Pae 金属酶基因携带情况不尽相同。到 2004 年底，IMP 家族共发现了 10 余种不同亚型的金属酶，包括 IMP1~16。IMP-1 是最早发现的 Pae 所产金属酶，水解底物较广，包括青霉素类、

头孢菌素类、头霉素类、碳青霉烯类,但不能水解单环  $\beta$ -内酰胺类<sup>[11-13]</sup>。本组检测结果显示,具有 IMP-1 型金属酶可能是本院住院患者对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因。

多重耐药菌株的不断出现使碳青霉烯类抗生素使用量激增,将为金属酶提供选择压力,可能会使更多沉默的金属酶基因激活表达,进一步恶化耐药形势。应该一方面加强管理,合理应用抗生素,抑制金属酶产生,阻断金属酶在不同细菌间传播;另一方面提供准确快速的金属酶检测结果,使之规范化、标准化,也便于监控金属酶的产生,防止产酶细菌的暴发和流行。由此看来,检测金属酶对临床、微生物实验室和药物开发都具有重要意义。

#### 参考文献:

[1] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2):306.

[2] 赵书平,姜梅杰,田鑫,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属  $\beta$ -内酰胺酶基因研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2008, (18)11:1509.

[3] Matthew A. Wikler, Fracklin R. Cockerill, Karen Bush, et al. CLSI document M100-S19. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testings; Nineteenth Informational Supplement[S]. USA: Wayne, 2009.

[4] Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:40.

[5] 陶晶,张俊丽,翟婷婷,等.铜绿假单胞菌金属  $\beta$ -内酰胺酶分布及产金属酶方法比较[J]. *检验医学*, 2009, 24(2):145.

[6] 金辉,糜祖煌,钱小毛,等.铜绿假单胞菌耐药基因的分子流行病学研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(2):

134.

[7] 杨佰侠,徐元宏.金属  $\beta$ -内酰胺酶及其检测方法的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2006;27(2):164.

[8] Berges L, Rodriguez-Villalobos H, Deplano A, et al. Prospective evaluation of imipenem/EDTA combined disc and Etest for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(4):812.

[9] 马越,李景云,张新妹,等.2002 年临床常见细菌耐药性监测[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(1):38.

[10] 曹孟淑,张德平.金属  $\beta$ -内酰胺酶的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2006, 26(4):260.

[11] Da Silva GJ, Correia M, Vital C, et al. Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolatee in Portugal[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 215(1):33.

[12] Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, et al. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-13, harbored by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52(4):583.

[13] Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, et al. Integron carrying a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6)-30/aac(6')-Ib' report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(12):4693.

(收稿日期:2010-06-13 修回日期:2010-08-06)

(上接第 3154 页)

ciated with later onset of systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2007, 16(6):401.

[7] Levy GD, Munz SJ, Paschal J, et al. Incidence of hydroxychloroquine retinopathy in 1,207 patients in a large multi-center outpatient practice[J]. *Arthritis & Rheum*, 1997, 40(8):1482.

[8] 朱向军,朱爱平,李大林,等.脱氧核糖核酸免疫吸附治疗狼疮性肾炎的疗效比较[J]. *河北医学*, 2009, 15(3):305.

[9] Traynor AE, Barr WG, Rosa RM, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for severe and refractory lupus. Analysis after five years and fifteen patients [J]. *Arthritis & Rheum*, 2002, 46(11):2917.

[10] 吴晓霞.榻国维辨治系统性红斑狼疮经验[J]. *辽宁中医杂志*, 2008, 35(5):673.

[11] 张稔,王萍.张志礼教授治疗系统性红斑狼疮的临床经验[J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2003, 2(3):135.

[12] 郑筱英.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国医

药科技出版社, 2002:111.

[13] 王松珍,史临平,何珍.补肾消斑汤加减治疗系统性红斑狼疮[J]. *河南医学*, 1996, 16(4):225.

[14] 郭群英,叶任高,阳晓,等.活动性狼疮性肾炎中西医结合治疗 163 例[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2001, 2(1):36.

[15] 张治礼,安家丰.中西医结合治疗系统性红斑狼疮的临床及实验研究[J]. *中国中医药科技*, 1996, 3(4):11.

[16] 查旭山,范瑞强.榻国维教授中西医结合治疗系统性红斑狼疮 32 例[J]. *新中医*, 2001, 33(8):31.

[17] 李遇梅,杨晓文.系统性红斑狼疮的中西医结合治疗[J]. *内蒙古中医药*, 1999, 18(4):25.

[18] 吴京海,朱丽芬.雷公藤对系统性红斑狼疮补体水平的影响[J]. *上海医科大学学报*, 1996, 23(6):472.

[19] 陈新谦.新编药理学[M]. 12 版.北京:人民卫生出版社, 1986:645.

(收稿日期:2010-09-25)