

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.17.007

ICU 多重耐药铜绿假单胞菌 oprD2 基因缺失的研究*

彭咏麟, 刘立君

湖南省衡阳市中心医院检验科, 湖南衡阳 421001

摘要:目的 探讨 ICU 多重耐药铜绿假单胞菌(MDRP)外膜孔蛋白 oprD2 基因的缺失情况。方法 通过 ICU 60 株 MDRP 采用 K-B 法筛选出对亚胺培南耐药的菌株;采用 PCR 法检测对亚胺培南耐药的 MDRP oprD2 基因。结果 60 株 MDRP 对亚胺培南耐药有 37 株,耐药率 61.7%(37/60);37 株对亚胺培南耐药的 MDRP 有 30 株缺失 oprD2 基因,缺失率 81.1%(30/37)。结论 ICU MDRP 对碳青霉烯类药物耐药严重;细菌外膜孔蛋白 oprD2 基因缺失导致菌体包膜通透性改变是 ICU MDRP 耐药机制的主要原因。

关键词:铜绿假单胞菌; 多重耐药; 重症监护室; 外膜蛋白

中图分类号:R378.99+1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)17-2453-03

Analysis of the absence of oprD2 gene of multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa in ICU*

PENG Yonglin, LIU Lijun

Department of Clinical Laboratory, Hengyang Central Hospital, Hengyang, Hunan 421001, China

Abstract: Objective To investigate the absence of the outer membrane porin oprD2 gene of sixty strains of multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa(P. aeruginosa) in the ICU of this region. **Methods** A total of 60 strains of multidrug-resistant P. aeruginosa in the ICU were screened for imipenem-resistant strains by K-B method. The absence of oprD2 gene of the selected multidrug-resistant P. aeruginosa were detected by PCR. **Results** Thirty-seven of 60 strains of multidrug-resistant P. aeruginosa were resistant to imipenem, and the resistance rate was 61.7% (37/60). 30 of the 37 imipenem-resistant strains of oprD2 gene were absent, with an absence rate of 81.1% (30/37). **Conclusion** The multi-drug resistant P. aeruginosa in the ICU is highly resistant to carbapenems. The absence of bacterial outer membrane pore protein oprD2 gene leads to the change of bacterial envelope permeability in the ICU might be the main aspects of bacterial resistance mechanisms.

Key words: pseudomonas aeruginosa; multidrug-resistant; ICU; outer membrane protein

在 ICU 合并感染患者中,以多重耐药铜绿假单胞菌(MDRP)感染的危害性大且其分离率高。MDRP 可引起呼吸道感染、泌尿道感染和囊性纤维变性等疾病,给 ICU 患者带来更为严重的后果和经济损失。铜绿假单胞菌的耐药机制复杂多样,其中包括菌体包膜通透性改变。据研究,oprD2 介导耐药的 MDRP 与 ICU 的自来水密切相关,从而导致医院感染的发生^[1]。有研究表明,铜绿假单胞菌外膜蛋白 oprD2 孔道是碳青霉烯类药物进入菌体的特异性通道,当 oprD2 丢失时可导致菌体包膜通透性改变,从而导致铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物耐药^[2]。本研究通过筛选 ICU MDRP 中耐亚胺培南的菌株,检测其外膜蛋白 oprD2 基因的缺失以了解本院 ICU MDRP 耐药的发生机制,为 ICU 临床医师抗 MDRP 感染提供合理的用药指导和理论依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2015—2016 年本院 ICU 临床标本

中分离的 60 株 MDRP,所有试验菌株均经法国生物梅里埃公司 VITEK-2 型全自动细菌鉴定/药敏分析系统鉴定。质控菌株为 ATCC27853。oprD2 基因检测的试验菌株为 ATCC27853 和对亚胺培南耐药多重耐药株。

1.2 药品与试剂 亚胺培南、药敏纸片购自 Oxoid 公司, MH 琼脂购自法国生物梅里埃公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒、dNTP、100 bp DNA Ladder、Taq DNA Polymerase 为天跟生物公司产品; LB 肉汤培养基购自法国生物梅里埃公司;低温高速离心机、PCR 扩增仪、Genegenius 紫外凝胶成像分析系统为 Eppendorf 公司产品;电泳仪为北京六一仪器厂产品。

1.3 方法

1.3.1 MDRP 对亚胺培南的药敏试验 采用 K-B 法药敏试验检测菌株对亚胺培南的耐药性。药敏判断标准按照 2015 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI) M100-S19-2B-1 规定执行。

* 基金项目:湖南省卫生计生委基金项目(湘卫计委 B2015-158)。

作者简介:彭咏麟,男,副主任技师,主要从事微生物耐药机制研究。

1.3.2 PCR 检测外膜蛋白 oprD2 基因

1.3.2.1 PCR 引物 rpsL 管家基因参考 www.pseudomonas.com/(ID:PA4268)上的 rpsL 基因序列自行设计,所有引物委托 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成。

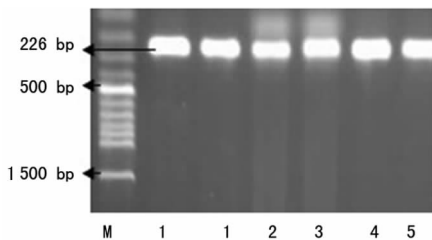
1.3.2.2 细菌 DNA 提取 用接种环挑取纯菌落接种于 5 mL LB 肉汤培养液,将装有 LB 培养液的试管置于震荡培养箱中,37 °C,200 r/min,18~20 h 培养至细菌生长对数期。然后取 3 mL 培养液,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明进行操作,提取的 DNA 模板置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.3.2.3 普通 PCR PCR 反应体系参照天跟生物公司 Taq DNA Polymerase 说明书:Template 1.5 μL, primer-F 0.5 μL, primer-R 0.5 μL, 10 × Taq Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture 2.0 μL, Taq DNA Polymerase 0.5 μL, ddH₂O 补至 25.0 μL。PCR 反应循环:94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s(rpsL 58.8 °C, oprD2 55 °C), 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 4 min。PCR 产物电泳分析:取 5.0 μL 扩增产物与 1.0 μL 上样缓冲液混匀,点样于 1% 琼脂糖凝胶,在 120 V 电压下电泳 25 min,出现条带后,用凝胶成像系统观察并照相。

2 结 果

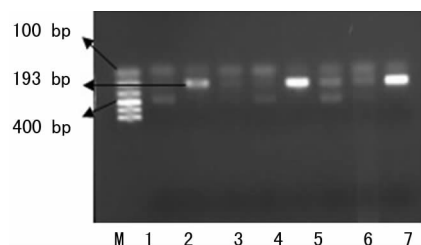
2.1 MDRP 对亚胺培南的耐药试验 60 株 MDRP 对亚胺培南耐药有 37 株,耐药率 61.7%(37/60)。

2.2 PCR 检测外膜蛋白 oprD2 基因 所有试验菌株均能扩增出 rpsL 基因条带(PCR 扩增产物电泳见图 1)。37 株多重耐药株耐亚胺培南株中有 30 株缺失 oprD2 基因(PCR 扩增产物电泳见图 2),占 81.1%(30/37)。阳性产物随机选取 1 例送 Invitrogen 公司测序,测序结果在 GenBank 进行比对,BLAST 结果显示:oprD2 基因与登录号 AY841858.1 的铜绿假单胞菌的 oprD2 基因同源性为 99%。



注:M 为标志物;A 为 ATCC27853;1,2,3,4,5 为多重耐药株

图 1 rpsL 基因扩增产物



注:M 为标志物;A 为 ATCC27853;1,2,3,4,5 为多重耐药株

图 2 oprD2 基因扩增产物

3 讨 论

碳青霉烯类抗生素是一类高效广谱的 β-内酰胺类抗生素,对包括超广谱 β-内酰胺酶和头孢菌素酶(AmpC 酶)在内的多数 β-内酰胺酶稳定,与第三代头孢菌素无交叉耐药性,被认为是治疗铜绿假单胞菌感染的最有效药物之一^[4]。然而,本研究显示,60 株 MDRP 对亚胺培南耐药有 37 株,耐药率 61.7%(37/60),这提示了碳青霉烯类抗生素可能对大部分 ICU MDRP 耐药。本研究 ICU MDRP 对亚胺培南的耐药率 61.7%与潘本凤等^[5]研究的耐药率为 72.97%基本一致,说明了临床上对于这类细菌的用药可能单用碳青霉烯类抗生素大部分是无效的,也间接说明了 ICU MDRP 的抗感染治疗如果使用碳青霉烯类抗生素可能需要联合用药,但相关的证据需要进一步的实验即碳青霉烯类抗生素与其他药物的联合药敏试验来证实。

由于没有相应基因的阳性标本作阳性对照,本研究将铜绿假单胞菌的管家基因 rpsL 基因作为阳性对照基因进行测试(引物自行设计),所有试验菌株均能扩增出 rpsL 基因条带,显示结果可靠。

oprD2 是目前所知的铜绿假单胞菌中唯一有助于抗生素通透的孔道蛋白,能形成碳青霉烯类药物特异性结合位点,所以目前认为外膜孔蛋白 oprD2 的缺失或者表达减少是耐碳青霉烯类药物的主要机制^[6]。本研究选用了 37 株耐亚胺培南多重耐药株进行 oprD2 基因扩增,结果表明,有 30 株 oprD2 基因缺失(缺失率 81.1%,30/37),这提示了细菌外膜孔蛋白 oprD2 基因缺失导致菌体包膜通透性改变是 ICU MDRP 耐药机制的主要方面。本研究 oprD2 基因缺失率 81.1%,与华东地区的袁莉莉等^[7]报道的缺失率 85.6%和黑龙江地区的刘沫然等^[8]报道的缺失率 86.03%大致相符,但有差异,这可能是由于地区差异性和菌株异质性所造成的。但是本研究 oprD2 基因缺失率与睦阳等^[9]报道的 16.13%差异很大,可能与菌株来源的临床科室不同有关。由于 MDRP 对碳青霉烯类药物耐药的机制非常复杂,笔者在以往的研究中^[10]发现 OXA 基因携带率仅为 6.25%,可能说明了产抗生素水解酶机制在其介导耐药的过程中并不占主导地位。然而也有研究指出产 MBL 和外膜孔蛋白 oprD2 基因缺失是引起铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要原因^[11],这种现象与本研究有明显的差异,究其原因可能与筛选的菌株来源和标准不一样有关。ICU MDRP 的耐药机制复杂,除了菌体包膜通透性改变,还包括主动外排泵的作用、产抗生素水解酶、整合子介导的耐药基因盒转移和水平传播、抗生素修饰酶的作用和生物被膜的作用等,谁占主导地位有待进一步探讨。

综上所述,本地区 ICU MDRP(下转第 2458 页)

肌损伤有较好的诊断价值,其诊断效能优于心肌酶谱。

参考文献

[1] 任江萍,陈恩富. 轮状病毒流行病学与疫苗研究进展[J]. 浙江预防医学, 2015, 27(8): 801-804.

[2] 吕榜军,黎明强,覃彦香. 轮状病毒感染性腹泻流行及疫苗的研究进展[J]. 现代预防医学, 2016, 43(4): 739-741.

[3] 杨兰萍. 轮状病毒性肠炎患儿肝功能、心肌酶谱指标的变化及临床意义[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(23): 2883-2885.

[4] 宋文君,曹巧玲. 轮状病毒感染性脓毒症患儿血清 CRP、免疫球蛋白水平变化及其与心肌酶谱的相关性研究[J]. 海南医学, 2015, 26(7): 958-960.

[5] 郭敏,余楠,肖密丝,等. 手足口病与心肌酶谱变化的关系[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(5): 622-625.

[6] 刘晓鸽,潘小燕,刘爱胜. 联合检测 h-FABP、Mb、cTnI 和 CK-MB 在儿童手足口病合并心肌损伤早期诊断的临床价值[J]. 中国医学装备, 2016, 13(10): 89-92.

[7] 刘爱玲,雷永革,刘爱胜,等. 四指标联合检测在儿童手足口病合并心肌损害的早期诊断价值[J]. 临床输血与检验, 2017, 19(1): 71-74.

[8] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2015: 58.

[9] 曾令恒,赵艳华,姜朝新,等. 心肌损伤标志物在诊断急性心肌梗死中的临床诊断界值分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(6): 826-828.

[10] 陈卫,张强. 心型脂肪酸结合蛋白检测对早期心肌损伤辅助诊断的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(4): 454-456.

[11] 葛金莲,唐婧,罗德梅,等. 化学发光微粒子免疫分析在丙型肝炎诊断中的应用价值[J]. 重庆医学, 2016, 45(23): 3226-3228.

[12] 刘晓婷,王霞,李佳,等. 心型脂肪酸结合蛋白与老年人急性重度一氧化碳中毒心肌损伤的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(6): 1431-1433.

[13] 徐传彬,黄华,杨小星,等. 血清心型脂肪酸结合蛋白检测在手足口病患儿心肌损伤中的诊断意义[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 38(14): 1973-1974.

[14] 吴勤如,刘飞. H-FABP 与 cTnT 在急性心肌梗死中的诊断价值[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(5): 749-751.

[15] 江婷,郭苑莉. 血清 H-FABP 和 NT-proBNP 对过敏性紫癜患儿心肌缺血状态的评估价值[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(5): 77-80.

[16] SONG C, YIBING C, GUO Y, et al. Risk factors of severe hand, foot and mouth disease complicated with cardiopulmonary collapse[J]. Infect Dis, 2015, 47(7): 1-5.

[17] 秦明明,陶青松,张士发,等. 心型脂肪酸结合蛋白对诊断新生儿心肌损伤的临床价值[J]. 医学理论与实践, 2017, 30(14): 2029-2031.

(收稿日期:2019-03-05 修回日期:2019-06-13)

(上接第 2454 页)

感染患者对碳青霉烯类药物耐药率较高,临床医师应该进一步减少或严格监控碳青霉烯类药物的使用,尤其是 ICU 相关医护人员要做好 MDRP 的医院感染控制工作,以防止其医院感染暴发流行。

参考文献

[1] TRAN-DINH A, NEULIER C, AMARA M, et al. Impact of the relocation of an ICU and role of tap water on an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* expressing OprD-mediated resistance to imipenem[J]. J Hosp Infect, 2018, 100(3): e105-e114.

[2] 袁翊,叶帮芬,万小涛,等. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药机制[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(11): 1602-1604.

[3] 范友芬,崔胜勇,张淳,等. 烧伤患者铜绿假单胞菌获得性耐药基因和菌株亲缘性研究[J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34(2): 83-87.

[4] 敖翔,唐爱国. 绿脓杆菌主动外排泵抑制剂的研究现状[J]. 实用预防医学, 2007, 14(3): 960-962.

[5] 潘本凤,董泽令,陈泽慧,等. 铜绿假单胞菌多重耐药情况分析[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(3): 399-401.

[6] ADEWOYE L, SUHERLAND A, SRIKUMAR R, et al.

The mexR repressor of the MexAB-OprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity[J]. Bacteriol, 2002, 184(15): 4308-4312.

[7] 袁莉莉,丁百兴,沈震,等. 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药性及分子流行病学研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(3): 289-292.

[8] 刘沫然,肖钢,杨秀静,等. 136 株住院患者感染铜绿假单胞菌的耐药状况及机制研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(5): 543-546.

[9] 睦阳,王滢,于文,等. 烧伤患者亚胺培南耐药铜绿假单胞菌耐药情况和耐药基因研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(3): 688-690.

[10] 彭咏麟,杨良勇,刘立君. 重症监护室多重耐药铜绿假单胞菌产 OXA 酶基因的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(10): 791-794.

[11] 李进,胡韦维,张峰领,等. 重庆某三甲医院 2014—2016 年铜绿假单胞菌耐药表型及金属酶、外膜孔蛋白耐药基因型分析[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(22): 2200-2205.

(收稿日期:2019-01-24 修回日期:2019-05-21)