

· 基础论著 ·

## PER-1 型超广谱 $\beta$ -内酰胺酶在铜绿假单胞菌中的流行分析

李慧 李军 金柯 韩亚萍 梅亚宁 黄祖瑚

**【摘要】 目的** 调查超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)以及具碳青霉烯酶活性的 OXA 酶在铜绿假单胞菌中的流行状况。**方法** 针对 1997~2003 年间本院收集的具临床意义的铜绿假单胞菌,采用 8 对通用 Class A 和 Class D 类超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因引物对其进行聚合酶链反应(PCR),根据结果再进行长片段引物扩增和序列测定;对 PCR 扩增阳性株与受体菌利福平耐药铜绿假单胞菌 PU21 行转移接合试验;采用琼脂平皿稀释法测定所有受试菌的 MIC;运用脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法确定菌株间的遗传相关性。**结果** 47 株临床分离铜绿假单胞菌中共检出 28 株 PER 阳性菌株,经部分长片段产物序列测定证实为 PER-1 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶;该产酶菌株经转移接合试验无法将耐药性传递给受体菌;药敏结果显示耐药表型与基因型间有很好相关性,对哌拉西林和头孢他啶高度耐药,同时产酶株对亚胺培南呈现 100% 的耐药性,对哌拉西林-三唑巴坦亦有一定程度的耐药;PFGE 结果显示各菌株间存在垂直传播或有较近遗传相关性。**结论** 本院存在产 PER-1 型 ESBLs 铜绿假单胞菌的流行。

**【关键词】** 铜绿假单胞菌;超广谱  $\beta$ -内酰胺酶;PER-1 型

**The analysis of high prevalence of PER-1 type ESBLs harbored in *Pseudomonas aeruginosa*** Li Hui, Li Jun, Jin Ke, HAN Ya-ping, MEI Ya-ning, HUANG Zu-hu. Department of Infectious Diseases, the People's Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Li Jun, Email: dr-lijun@vip.sina.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the distribution of ESBLs and OXA-type of carbapenemase harbored in *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** Non-repeated and clinical important *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from the People's Hospital of Jiangsu Province from 1997 to 2003. Eight pairs of versatile primers were used to detect the appearance of ESBLs, according to PCR results, a pair of PER-1 gene primers were adopted to amplify and partial of the products were determined by DNA sequencing. Conjugation testing were used to transfer the resistance from wild-type

项目资助:江苏省卫生厅预防医学资助项目(No. 2006029)

作者单位:210029 南京,江苏省人民医院感染病科(李慧、李军、金柯、韩亚萍、黄祖瑚),江苏省人民医院检验科(梅亚宁)

通讯作者:李军,Email: dr-lijun@vip.sina.com.cn

*Pseudomonas aeruginosa* to recipient cell rifampin resistant *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PU21; Agar dilution methods were exerted to determine the MIC value of four antipseudomonal antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, according to CLSI standards; Finally, the homology of PER-1 producing isolates was determined by PFGE. **Results** Of 47 isolates, 28 harbored bla PER-1. None of other ESBLs was detected. The PER-1 harbored *Pseudomonas aeruginosa* couldn't confer the resistance to the recipient cell *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Results of antimicrobial agent susceptibility demonstrated that there were high co-relationship between genotype and resistance, exhibiting high resistance to piperacillin and ceftazadime. PER-1 producer also displayed an overall resistance to imipenem and a relevant resistant rate to piperacillin-tazobactam. PFGE typing revealed that vertical transmission occurred among those isolates. **Conclusions** PER-1 type of ESBL harbored *Pseudomonas aeruginosa* disseminated in our hospital.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; Extended spectrum beta-lactamases; PER-1 type

铜绿假单胞菌是条件致病菌, 可以导致免疫缺陷或紊乱人群以及具有严重基础疾病如肝硬化、糖尿病等患者发生呼吸道、胆道、泌尿道等多部位感染<sup>[1]</sup>。近年来, 由于日趋严重的多重耐药性以及院内感染中较高的分离率, 其为临床治疗带来的困难日益凸现。其耐药机制各地报道不尽一致, 可能主要是膜渗透屏障改变, 主动外排泵系统以及金属酶和染色体高产 AmpC 酶等<sup>[2]</sup>。国内外近期的文献还显示了 ESBL, 如 SHV、TEM、OXA 等产酶机制也多有报道<sup>[3-5]</sup>。我们为调查本院临床分离铜绿假单胞菌中 ESBLs 和具碳青霉烯酶活性的 OXA 酶产生情况, 采用分子生物学手段进行了初步的分析。现将结果报告如下。

## 材料与方法

### 一、菌株来源与实验所用标准菌株

分离自 1997 至 2003 年间我院各临床科室铜绿假单胞菌共 47 株, 排除同一患者同一部位的重复菌株; 质量控制菌株铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯杆菌 ATCC700603 由安徽医科大学第一附属医院李家斌教授惠赠, 铜绿假单胞菌 PU21 由法国 Patrice Nordmann 教授惠赠。

### 二、试剂及仪器

ExTaq PCR 试剂盒, 限制性内切酶 *Spe* I 购自大连宝生物公司, 引物寡核苷酸合成及 PCR 产物序列测定亦由该公司提供; 抗生素: 哌拉西林 (PIP, 华北制药)、头孢他啶 (CAZ, 葛兰素史克苏州制药公司)、哌拉西林-三唑巴坦 (PIP-TZB, 美国惠氏公司)、亚胺培南 (IMP, 杭州默沙东制药) 均为商用抗生素; Muller-Hinton 琼脂购自 Oxoid 公司。多点接种仪为英国 AQS Manufacturing 公司; 细菌比浊仪为英国 Oxoid 公司; 脉冲场凝胶电泳仪 CHEF MAPPER XA 为 Bio-Rad 公司产品。

### 三、药物敏感试验

按照 2006 年 CLSI 推荐标准,采用琼脂平皿稀释法测定上述 4 种抗菌素对铜绿假单胞菌的 MIC 值。多点接种仪每点接种细菌量为  $10^4$  CFU,每次均设质控菌株。

### 四、PCR 及产物序列测定

采用煮沸法裂解细菌,离心后获得细菌总 DNA 为扩增模板。先后扩增 TEM、SHV、CTX-M、PER、VEB、GES 等 8 对通用引物以筛选各型产酶株;再继之以相应测序引物扩增阳性株(各自引物及扩增条件详细情况见表 1)。每次均设阴性对照及部分标准产酶株为阳性对照。所得 PCR 产物提交大连宝生物公司进行直接序列测定,结果在 GenBank 中经 Blastn 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)分析比对。

### 五、转移接合试验

参照 Poirel 等描述的方法<sup>[6]</sup>,将供体菌与受体菌利福平耐性的铜绿假单胞菌 PU21 在 37℃ 温箱中过夜孵育,在含有 50 mg/L 的头孢他啶和 150 mg/L 利福平的 M-H 培养基上筛选出接合子。

### 六、细菌间遗传相关性分析

采用 PFGE 方法,*Spe*I 消化胶块包埋受试菌总 DNA 后,将胶块放置于齿梳上,在 14℃,电泳 19 个小时,其电泳条件如下,起始脉冲时间:2.5 秒;最后脉冲时间:5.0 秒;电压梯度:6 V/cm。电泳结束后溴化乙啶染色,凝胶成像系统摄像并分析。

表 1 引物序列及退火条件

引物名称	序列	退火温度
TEMF	5'-ATAAAATTCCTGAAGAC-3'	58℃
TEMR	5'-TTACCAATGCTTAATCA-3'	
SHVF	5'-GGCTTATTCTTATTTGTCGC-3'	
SHVR	5'-TTAGCGTTGCCAGTCTC-3'	
CTX-M-1F	5'-ACAGCGATAACGTGGCGATG-3'	55℃
CTX-M-1R	5'-TCACCCAATGCTTTACCCAG-3'	
CTX-M-13F	5'-CTGCTTAATCAGCCTCTCCA-3'	60℃
CTX-M-13R	5'-TCACTGGGATCCAGACGAAA-3'	
CTX-M-2F	5'-TGAAGCCCTGGACAAAAGT-3'	62℃
CTX-M-2R	5'-CTTATCGCTCTCGCTCTGT-3'	
PER-F	5'-CCACTGTAGCGGTTC-3'	48℃
PER-R	5'-CCGAGCCCAGCTATT-3'	
VEBF	5'-CCCCCAAGACCTTT-3'	53℃
VEBR	5'-ACAGAATCAGTTCTCTCC-3'	
GESF	5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3'	50℃
GESR	5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'	
PER-1F	5'-ATGAATGTCATTATAAAAGC-3'	48℃
PER-1R	5'-AATTGCGCTTAGGGCAGAA-3'	

## 结 果

### 一、PCR 及产物测定

47 株铜绿假单胞菌中有 28 株呈现 PER 通用引物扩增阳性,这些阳性株以

PER-1 测序引物扩增亦全部呈阳性结果;其他各型 TEM、SHV、CTX-M、GES 及 VEB 均为阴性。随机自 28 株阳性结果中挑取 3 株送交测序,结果经 Blastn 示与 bla PER-1 基因 100% 吻合。

## 二、药敏结果

细菌的药物敏感试验结果与基因型高度一致,表现为 PER-1 阳性株对哌拉西林和头孢他啶高度耐药(阳性株对哌拉西林  $MIC_{90} \geq 512$  mg/L,头孢他啶  $MIC_{90}:256$  mg/L),全部临床分离菌株对亚胺培南的耐药率为 63.8% (结果未给出),而所有的 PER-1 阳性菌株均表现对亚胺培南的耐药(具体结果见表 2)。质量控制菌株结果符合 CLSI 判读结果<sup>[7]</sup>。

## 三、转移接合试验

28 株 PER-1 阳性菌与 PU21 行转移结合试验,经 3 次重复试验未能筛选出接合子。

表 2 28 株铜绿假单胞菌对 4 种抗菌素 MIC 值及各自来源和 PFGE 分型

菌株	PFGE 型别	标本来源	MIC 值 (mg/L)			
			PIP	CAZ	PIP-TZB	IMP
97-3	A	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	32
97-4	A	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	$\geq 128$	16
97-5	A1	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	32
97-7	A2	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	32
97-8	A2	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	16
97-24	A	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	16
97-61	B	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	16
97-62	B	口腔分泌物	$\geq 512$	$\geq 512$	64	32
97-63	A2	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	16
97-64	A2	尿	$\geq 512$	$\geq 512$	$\geq 128$	16
97-71	A	尿	$\geq 512$	256	$\geq 128$	16
98-12	A2	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	16
98-31	A	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	$\geq 128$	16
98-50	A2	痰	$\geq 512$	256	64	16
98-55	A	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	$\geq 128$	16
98-71	B	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	16
98-72	B1	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	$\geq 128$	32
99-1	A	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	32	16
99-62	A3	痰	$\geq 512$	256	64	16
00-25	A3	导管	$\geq 512$	256	64	16
00-36	A2	痰	$\geq 512$	256	64	16
00-52	A3	痰	$\geq 512$	256	64	16
00-54	A	气管套管	$\geq 512$	256	64	16
00-64	B	痰	$\geq 512$	256	64	16
01-23	A1	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	32
01-31	A2	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	32
01-40	B	痰	$\geq 512$	256	64	16
01-66	B2	痰	$\geq 512$	$\geq 512$	64	16

## 四、PFGE 分型

按照 Tenover 的评判标准,28 株 PER-1 阳性菌可以分为两个相关性较近的克

隆,我们分别命名为 A(20 株)和 B 型(8 株),其中 A 型又分为 3 个亚型,B 型又分为 2 个亚型(图 1)。各个亚型与其来源株间的 PFGE 带型相差在 3 条之内,即 Tenover 评判标准中的紧密相关(closely related),提示这些菌株在流行病学上很有可能相关,可以视为同一基因型;A 型与 B 型之间相差均在 6 条带以内,即 Tenover 评判标准中的可能相关(possibly related),提示这些菌株在流行病学上联系不甚紧密。

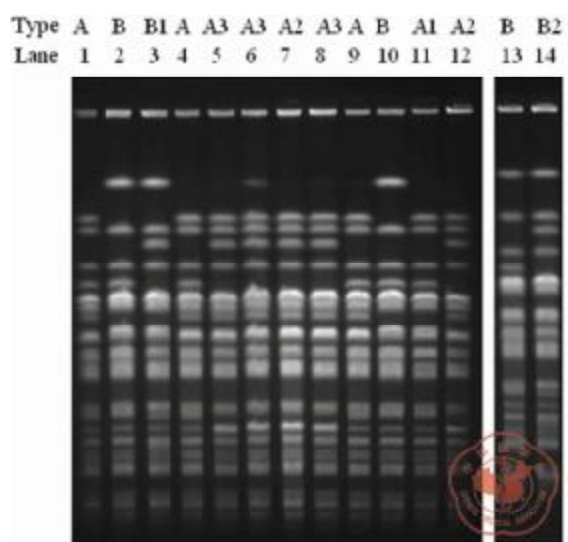


图 1 PFGE 结果(1~14 代表 PER-1 阳性野生菌株,上面相对应位置为其亚型)

## 讨 论

PER-1 型 ESBLs 首次由法国人 Nordmann 在铜绿假单胞菌中发现并进行序列分析,其氨基酸序列与 TEM 的同源性仅 27%,但是因为其具有 Class A 类酶的特征性水解结构,所以它仍归类于该类酶<sup>[8]</sup>。在南美洲尚发现 PER-2 的流行<sup>[9]</sup>,与 PER-1 相比,两者间的氨基酸同源性为 86%,都表现为超广谱的水解特性,对头孢他啶等三代头孢类抗生素亦具有高度水解作用。该型酶在欧洲和韩国等地区都有描述<sup>[10,11]</sup>,特别在土耳其更是数次描述其流行<sup>[5,12]</sup>。我国最早于 2002 年由蒋晓飞等在上海从鲍曼不动杆菌中发现<sup>[13]</sup>。此外,还有文献报道在肠杆菌科<sup>[14]</sup>,如肺炎克雷伯杆菌、阴沟肠杆菌、伤寒沙门菌等多种属中发现。对该基因的定位多有论述,有认为在染色体上,有定位在质粒上,近期有文献采用 TAIL-PCR 及序列测定的方法对多种属细菌携带的 PER-1 进行了定位,发现铜绿假单胞菌中 PER-1 位于染色体上,且跟 Tn1213 关系密切<sup>[15]</sup>。

本文中采用的细菌为收集自我院临床科室 1997~2003 间的标本,最终在 47 株铜绿假单胞菌中检出 28 株 PER-1 阳性,且无其他 ESBLs 携带。从耐药表型上来看,与基因型高度一致,所有 PER-1 阳性株表现对哌拉西林和头孢他啶高度耐药,且对其他药物也有明显的耐药性;阴性菌株对各抗菌素很少出现耐药。因此,



我们推测除了产酶(主要是 PER-1)机制外,还有其他机制参与这些细菌的耐药。从亚胺培南的耐药性上看,耐药多为在折点水平的低中度耐药,推断亚胺培南特异性的通道蛋白 OprD2 的缺失或异常可能参与其中。另外,三次转移接合试验未能筛选出结合子,提示 PER-1 基因不位于可转移性质粒上,与国外的多家研究机构报道一致。

本研究中 28 株 PER-1 阳性株虽然可以分为 A、B 两个型别,但是它们的 PF-GE 图谱经同源性分析可见条带数目、位置基本一致;经临床资料回顾性调查发现,包括 20 株 A 型菌株在内的 28 株 PER-1 阳性株来源于我院不同科室,且多为患者入院后 10 天以上而分离得到,同时 28 株细菌的耐药谱也大致相同,由此提示我院可能存在以克隆株形式播散的铜绿假单胞菌耐药株的流行。

综上所述,本文描述了南京医科大学第一附属医院临床分离铜绿假单胞菌产 ESBLs 酶情况,与其他地方文献报道不同,PER-1 呈现流行极为单一的产 ESBLs 酶型。同时,从流行病学观点来看,耐药流行株在空间、时间分布上的集中性要求我们加强院内感染耐药菌的流行病学监测和控制,阻止耐药菌株在院内的传播流行。

志谢:本实验在安徽医科大学第一附属医院,安徽省细菌耐药监控中心完成,感谢李家斌教授的慷慨赠与及提供实验便利条件。感谢江苏省疾病预防控制中心朱凤才教授提供脉冲场凝胶电泳仪。

## 参 考 文 献

- 1 Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis*, 2005,18:306-313.
- 2 Quale J, Bratu S, Gupta J, et al. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006,50:1633-1641.
- 3 常东, 蒋伟, 魏华, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌产超广谱  $\beta$  内酰胺酶基因研究. *中华医院感染学杂志*, 2006,16:961-964.
- 4 侯天文, 尹晓琳, 王永祥, 等. 同时产 PER-1 型和 TEM-1 型  $\beta$  内酰胺酶铜绿假单胞菌的检出. *中国人兽共患病杂志*, 2004,20:295-298.
- 5 Aktas Z, Poirel L, Salecloglu M, et al. PER-1- and OXA-10-like  $\beta$ -lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect*, 2005,11:193-199.
- 6 Poirel L, Naas T, Guibert M, et al. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999,43:573-581.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document. M100-S16, Wayne, Pa.
- 8 Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, et al. Spread of bla CTX-M-type and bla PER-2  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother*, 2006,57:975-978.
- 9 Pagani L, Mantengoli E, Migliavacca R, et al. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol*, 2004,42:2523-2529.
- 10 Yong D, Shin JH, Kim S, et al. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003,47:1749-1751.
- 11 Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al. Widespread detection of PRT-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997,41:2265-2269.
- 12 蒋晓飞, 乐军, 洪秀华, 等. 一株同时产 OXA-23 型碳青霉烯水解酶和 PER-1 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶的鲍曼不动杆菌. *上海医学检验杂志*, 2002,17:263-267.

- 13 余方友, 李美兰, 胡龙华, 等. 产 PER-1 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶革兰阴性杆菌的研究. 中华医院感染学杂志, 2006, 16: 973-976.
- 14 Poirel L, Cabanne L, Vahaboglu H, et al. Genetic environment and expression of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase blaPER-1 gene in Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 1708-1713.

(收稿时间: 2008-11-06)

(本文编辑: 温少芳)

李慧, 李军, 金柯, 等. PER-1 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶在铜绿假单胞菌中的流行分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(3): 252-258.