

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.25.025

文章编号: 1005-8982(2017)25-0119-04

某院 348 株铜绿假单胞菌耐药性分析及多重耐药铜绿假单胞菌耐药基因检测

王桂东¹, 王晓燕¹, 马璨璨¹, 高秀展¹, 孙学春²

(1. 山东省临沂市肿瘤医院 检验科, 山东 临沂 276001; 2. 山东省临沂市人民医院 检验科, 山东 临沂 276000)

摘要:目的 研究该院检出的 348 株铜绿假单胞菌(PAE)耐药性及多重耐药 PAE 耐药基因检测。**方法** 将血液科检出 348 例 PAE 菌株进行体外耐药监测,并对其中 36 株多重耐药 PAE 菌株进行耐药相关基因 *OprD2*、*VIM*、*GIM*、*SPM*、*IMP-1*、*TEM*、*VEB*、*PER*、*aac(3)-III*、*aac(6)'-Ib-Cr*、*qnrA*、*qnrS*、*qnrD* 检测。**结果** 多重耐药 PAE 对妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、美罗培南比较敏感,对其他临床常用抗生素均有明显的耐药性,PCR 基因分析结果显示,*OprD2* 和 *IMP-1* 基因阳性率分别为 97.22% 和 94.44%,*aac(3)-III* 和 *aac(6)'-Ib-Cr* 阳性率分别为 38.89% 和 27.78%,*TEM* 阳性率为 75.00%,*qnrA*、*qnrS* 和 *qnrD* 阳性率为 50.00%、61.11% 和 47.22%,其他基因低于 15.00%。**结论** PAE 耐药性较强,多重耐药 PAE 耐药基因主要为 *OprD2* 和 *IMP-1* 基因。

关键词: 铜绿假单胞菌;耐药基因;耐药机制;血液科

中图分类号: R446

文献标识码: A

Analysis of drug resistance of 348 strains of *Pseudomonas aeruginosa* in our hospital and detection of drug resistance genes of *Pseudomonas aeruginosa*

Gui-dong Wang¹, Xiao-yan Wang¹, Can-can Ma¹, Xiu-zhan Gao¹, Xue-chun Sun²

(1. Clinical Laboratory, Linyi Tumour Hospital, Linyi, Shandong 276001, China; 2. Clinical Laboratory, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistance of 348 strains of *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) and detection of drug resistance genes of multidrug-resistant PAE in our hospital. **Methods** *In vitro* resistance monitoring was performed in 348 strains of PAE isolated in the Department of Hematology. In the 36 multi-drug resistant strains of PAE, RT-PCR was used to determine drug resistance genes which included *OprD2*, *VIM*, *GIM*, *SPM*, *IMP-1*, *TEM*, *VEB*, *PER*, *aac(3)-III*, *aac(6)'-Ib-Cr*, *qnrA*, *qnrS* and *qnrD*. **Results** Multidrug-resistant PAE strains were highly sensitive to Tobramycin, Piperacillin/Tazobactam, and Meropenem, but were obviously resistant to other commonly-used antibiotics. PCR analysis showed that the positive rates of *OprD2*, *IMP-1*, *TEM*, *qnrS*, *qnrA*, *qnrD*, *aac(3)-III* and *aac(6)'-Ib-Cr* genes were 97.22%, 94.44%, 75.00%, 61.11%, 50.00%, 47.22%, 38.89% and 27.78% respectively, while the positive rates of others genes were less than 15.00%. **Conclusions** Drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* is strong, and the resistance genes of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* are mainly *OprD2* and *IMP-1* genes.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; resistance gene; resistance mechanism; Department of Hematology

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PAE)作为院内感染常见的条件致病菌之一,常导致免疫功能不全的患者和抵抗力明显低下患者发生明显菌血症,严重可致使患者死亡^[1-2]。多重耐药 PAE 菌株的研究发现^[3-4],其基因结构易发生变化,常携带一种或者几种抗药基因,因此,PAE 患者易发生耐药性,给抗感染治疗带来较大困难。血液科部分患者如白血病、多发性骨髓瘤和霍奇金病等抵抗力较为低下,PAE 作为条件致病菌易侵犯抵抗力低下和进行侵袭性操作患者,故血液科易并发 PAE 院内感染。目前,对 PAE 感染的耐药性基因型研究分析仍较少,因此,应充分了解 PAE 在血液科传播的流行特征和耐药性基因结构特点,以便采取更为有效的防治措施。本研究对血液科检出的 PAE 菌株进行体外药敏实验检测,并对其中的 15 例多重耐药菌株进行耐药基因的分型检测,以便从分子水平认识 PAE 多重耐药性的相关分子机制。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

PAE 菌株全部分离自 2013 年 1 月 -2015 年 12 月临沂市肿瘤医院血液科患者的痰、中段尿、血液、骨髓、腹水等标本,所有菌株采用法国生物梅里埃 VITEK2-compact 鉴定。质控菌株购自卫生计生委临床检验中心的 PAE ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 等。

1.2 药物敏感实验

采用 K-B 法进行药物敏感实验, MH 平板购自法国生物梅里埃公司,药物敏感纸片和抗生素均购自英国 Oxoid 公司。主要检测抗生素有庆大霉素、阿米卡星、四环素、妥布霉素、替卡西林、替卡西林/克拉维酸、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、环丙沙星、左氧氟沙星、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、氨基糖苷、亚胺培南、美罗培南。

1.3 仪器与试剂

实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)扩增仪采用 ROCHE LC480,凝胶成像系统采用 BIO,电泳为 Biorad mini-4 电泳仪,琼脂糖和部分其他试剂均购自美国 Sigma 公司。PCR 引物和 DNA marker 由上海生物生工有限公司合成提供(见表 1)。PCR 试剂盒由凯杰生物工程(深圳)有限公司提供。

表 1 耐药基因 PCR 引物序列及目的产物长度

基因类型	引物序列	片段长度 /bp
膜孔蛋白		
<i>OprD2 F</i>	GCGCATCTCCAAGACCATG	193
<i>OprD2 R</i>	GCCACGCGATTTGACGGAG	
金属酶		
<i>VIM F</i>	ATTCCGGTCGGGAGGTCCG	633
<i>VIM R</i>	GAGCAAGTCTAGATTCAACA	
<i>GIM F</i>	CTTGATAGCGTTGCCAGCTTTA	562
<i>GIM R</i>	CAGCCCAAGAGCTAATTGAGG	
<i>SPM F</i>	CTGCTTGATTTCATGGGCGCG	784
<i>SPM R</i>	CCTTTTCCCGACCTTGCTCG	
<i>IMP-1 F</i>	CTACCCGACGAGAGTCTTTG	587
<i>IMP-1 R</i>	AACCAGTTTTGCTTACCAT	
β-内酰胺酶		
<i>TEM F</i>	AGGAAGAGTATGATTCAACA	535
<i>TEM R</i>	CTCGTCGTTTGGTATGGC	
<i>VEB F</i>	GCGGTAATTTAACCAGA	961
<i>VEB R</i>	GCCTATGAGCCAGTGTT	
<i>PER F</i>	AGTCAGCGCTTAGATA	978
<i>PER R</i>	CGTATGAAAAGACAATC	
氨基糖苷类修饰酶		
<i>aac(3)-III F</i>	TTCATGTCCGCGAGCACCCC	185
<i>aac(3)-III R</i>	GACTCTTCCGCCATCGCTCT	
<i>aac(6')-Ib-Cr F</i>	TATGAGTGGCTAAATGGA	519
<i>aac(6')-Ib-Cr R</i>	CCCCTTTCTCGTAGCA	
喹诺酮类		
<i>qnrA F</i>	GCCGATGGATATTATTGA	657
<i>qnrA R</i>	CTAATCCGCGCAGCACTAT	
<i>qnrS F</i>	ATGGAACCTACAATCATAAC	681
<i>qnrS R</i>	AAAGCCACCTCGACCTTAAGT	
<i>qnrD F</i>	ACTAACTCGCGTTTAAACAT	645
<i>qnrS R</i>	TACCACATTGGACATTAGG	

1.4 细菌基因组 DNA 模板的制备及细菌 DNA 的提取

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℃,200 r/min,18~20h 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书进行操作,提取的 DNA 模板于 -20℃保存备用。

1.5 耐药基因的检测

各种靶基因 PCR 扩增体系均为:总反应体积 20 μl,其中 P1、P2 引物各 1 μl, Premix Taq DNA 聚合酶 10 μl,灭菌蒸馏水 7 μl,模板液 1 μl。热循环参数为:90℃预变性 4 min,93℃变性 50 s,55℃退火

50 s, 72℃延伸 60 s, 40 个循环后 72℃延伸 6 min; 用双蒸灭菌水作模板设阴性对照。反应结束后取 5 μl PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 核酸染液染色, 同时加核酸电泳相对分子质量标准鉴定扩增 DNA 片段的大小。用凝胶成像系统观察结果并照相分析。

1.6 统计学方法

对 348 例患者进行回顾性调查分析, 计数资料用率(%)来表示。

2 结果

2.1 药物敏感实验结果

PAE 对抗生素的药物敏感实验结果显示, 多重耐 PAE 对氨基糖苷类的阿米卡星与喹诺酮类的左氧氟沙星耐药率相对较低, 分别为 19.83% 和 20.98%, β-内酰胺酶类、头孢菌素类、碳青霉烯类、β-内酰胺酶与酶抑制剂复合物等抗菌药物的耐药率均 >70%, 提示实验菌株包含不同种类的耐药基因。见表 2。

2.2 耐药基因分析结果

36 例多重耐药菌株 real-time PCR 定量分析显示, *OprD2* 和 *IMP-1* 基因阳性率分别为 97.22% 和 94.44%, *aac(3)-III* 和 *aac(6')-Ib-Cr* 阳性率分别为 38.89% 和 27.78%, *TEM* 阳性率为 75.00%, *qnrA*、*qnrS* 和 *qnrD* 阳性率为 50.00%、61.11% 和 47.22%, 其他基因低于 15.00%。见表 3。

表 2 348 株 PAE 对 17 种抗生素的耐药性

抗生素	耐药株数	耐药率 /%
庆大霉素	157	45.11
阿米卡星	69	19.83
四环素	348	100.00
妥布霉素	44	12.64
替卡西林	211	60.64
替卡西林 / 克拉维酸	119	34.20
克拉维酸	75	21.55
哌拉西林	126	36.21
哌拉西林 / 他唑巴坦	18	5.18
环丙沙星	143	41.09
左氧氟沙星	73	20.98
头孢曲松	219	62.93
头孢吡肟	143	41.09
头孢他啶	115	33.05
氨曲南	205	58.91
亚胺培南	98	28.16
美罗培南	65	18.68

表 3 36 例多耐药的 PAE 耐药基因检测阳性率

目的基因	例数	阳性率 /%
<i>OprD2</i>	35	97.22
<i>VIM</i>	2	5.56
<i>GIM</i>	3	8.33
<i>SPM</i>	5	13.89
<i>IMP-1</i>	34	94.44
<i>TEM</i>	27	75.00
<i>VEB</i>	4	11.11
<i>PER</i>	1	2.78
<i>aac(3)-III</i>	33	91.67
<i>aac(6')-Ib-Cr</i>	34	94.44
<i>qnrA</i>	18	50.00
<i>qnrS</i>	22	61.11
<i>qnrD</i>	17	47.22

3 讨论

随着人类对抗生素新药物的不断研发以及抗生素滥用, 条件致病菌 PAE 在院内感染的检出率越来越多。血液科患者常抵抗力低下、部分患者进行大剂量放化疗或者激素应用使得机体免疫力降低, 并且常有部分侵袭性操作如骨髓穿刺等, 综合这些因素易导致血液科发生 PAE 感染, 病情复杂而难控制^[5-6]。通过对本院血液科患者标本的分析显示, PAE 对各种抗生素(除亚胺培南和美罗培南)的耐药率为 30% 左右, 其他药物耐药率均达到 60% 以上, 部分抗生素耐药率达到 95% 以上。为此, 亟需对血液科 PAE 的耐药基因型进行分析, 以便更好地进行检测和应用抗生素进行早期的控制。

相关研究发现^[9], PAE 通过产酶、膜孔蛋白缺失、泵出机制、生物膜形成、青霉素结合蛋白结构改造等机制使其自身获得耐药性。本研究发现, *OprD2* 基因型的阳性率为 97.22%, 且 PAE 对亚胺培南的耐药率达到 90% 以上, 可见, 在该院血液科 PAE 对亚胺培南的耐药的机制与 *OprD2* 的缺失存在相关性, 主要是因为 *OprD2* 作为膜上的一种孔道蛋白具有配体特异性, 可以特异性结合亚胺培南, 从而有助于发挥抗菌药性^[7-8]。由于这种特异性结合的存在, β-内酰胺类抗菌药物很难通过, 故其与碳青霉烯类抗菌药物常无明显的交叉耐药性。此外, 本研究检测 4 种金属酶基因发现仅有 *IMP-1* 的阳性率为 94.4%, 其余 *VIM*、*GIM*、*SPM* 的阳性率较低, 可见 PAE 对碳青霉烯类耐药的机制可能与金属酶存在

相关性。既往研究发现^[10-12],PAE 对碳青霉烯类等多种抗生素产生多重耐药的重要机制就是 PAE 分泌金属酶。金属酶为异基因家族构成,其酶蛋白的一级结构的相似性较低,而三级和四级的空间结构存在高度的一致性,且金属酶依赖于锌离子可以降解碳青霉烯类抗生素,对单环列抗生素和螯合剂敏感等特点。

PAE 对氨基糖苷类抗菌药物的耐药率均在 90%以上,进一步分析发现氨基糖苷类修饰酶基因 *aac(3)-III*、*aac(6)'-Ib-Cr* 的阳性率均达到 90%以上,二者均可以通过对氨基糖苷类抗菌药物的修饰产生抗药性,并且 *aac(6)'-Ib-Cr* 对喹诺酮类抗菌药物也存在修饰作用,从而产生多重耐药性^[13-15]。

本研究中对质粒介导的 *qnr* 基因诱导产生氟喹诺酮类耐药的阳性检出率达到 50%以上,主要以 *qnrS* 型基因为主,为此本研究中同样检测到 PAE 对氨基糖苷类药物的耐药性。此外 PAE 具有广谱的 β -内酰胺类抗生素耐药性,耐药率均达到 90%,且检测 *TEM*、*VEB*、*PER* 等基因型,但具体的机制有待进一步研究。

综上所述,PAE 耐药性较强,多重耐药 PAE 耐药机制复杂,耐药基因最常见为 *OprD2* 和 *IMP-1* 基因。

参 考 文 献:

- [1] 孙静静,吴奎海,芮勇宇,等.铜绿假单胞菌整合子 I 和 ISCR1 分布及 ERIC-PCR 分型[J].中国实验诊断学,2012,16(4):640-643.
- [2] 胡卓越,黄伟,李颖,等.泛耐药铜绿假单胞菌耐药谱及其分子特征研究[J].广东药学院学报,2013,29(2):210-213.
- [3] BARBIER F, WOLFF M. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end [J]. *Med Sci (Paris)*, 2010, 26(11): 960.
- [4] 胡琴,聂署萍,吴润香,等.耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药表型及基因型分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(11):1305-1307.
- [5] 张卫英,余道军,吴盛海,等.铜绿假单胞菌耐药表型与基因型相关性研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(6):1114-1117.
- [6] 张世阳,连羨玉,金继红,等.运用 Cox-Stuart 趋势检验分析医院感染铜绿假单胞菌耐药趋势[J].中华医院感染学杂志,2011(20):4364-4367.
- [7] 吴俊,赵子文,陈惠玲,等.大型质粒介导泛耐药铜绿假单胞菌耐药机制及防治对策 [J].中华医院感染学杂志,2013,23(7):1487-1489.
- [8] 何露,曾凡胜,范珍明,等.多重 PCR 检测铜绿假单胞菌耐药基因[J].实用预防医学,2011,18(1):12-14.
- [9] 王婷,刘晓民,刘腾,等.铜绿假单胞菌所致感染的临床分析[J].哈尔滨医科大学学报,2012,46(3):277-280.
- [10] 赵祝香,陈惠玲,魏树全,等.多药耐药铜绿假单胞菌耐药性及相关耐药基因分析[J].中国实验诊断学,2011,15(7):1159-1162.
- [11] 赵津彩,张跃栋.520 株铜绿假单胞菌临床分布和耐药性分析[J].检验医学,2013,28(8):734-736.
- [12] RADJI M, AGUSTAMA R, ELYA B, et al. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2013, 3(8): 663-667.
- [13] GILL M, RAO J, KALEEM F, et al. In vitro efficacy of Colistin against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* by minimum inhibitory concentration[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2013, 26(1): 7-10.
- [14] 齐志丽,段美丽,李昂,等.铜绿假单胞菌耐药机制研究现状[J].山东医药,2014,54(4):83-86.
- [15] 丁艳苓,陈亚红,姚婉贞,等.多重耐药铜绿假单胞菌的耐药性分析[J].中国抗生素杂志,2012,37(1):63-67.

(张蕾 编辑)