

铜绿假单胞菌氨基糖苷类抗生素耐药基因检测

张凡^{1,2} 郭普² 张伦军² 郑晶² 郑照军² 徐元宏¹

摘要 目的 了解铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素耐药基因的分布情况。方法 收集临床分离的铜绿假单胞菌,采用仪器法和纸片扩散法(K-B法)进行药敏实验。筛选出对氨基糖苷类抗生素耐药的菌株,用PCR法检测16个氨基糖苷类修饰酶(AMEs)基因和5个16S rRNA甲基化酶基因的表达,进一步对阳性基因扩增产物进行测序验证。结果 54株菌中51株AMEs基因阳性,检出率为94.4%;28株甲基化酶基因阳性,检出率为51.9%。共检出5种AMEs基因:ant(3'')-I、aac(3)-IIc、ant(4')-Ia、aac(6')-Ib和ant(2'')-Ia,阳性率分别为66.7%、38.9%、31.5%、31.5%和16.6%;2种16S rRNA甲基化酶基因:rmtB和armA,阳性率分别为29.6%和29.6%,其余基因均未检出。测序结果与目的基因一致。结论 铜绿假单胞菌氨基糖苷类抗生素耐药的主要基因为ant(3'')-I、aac(3)-IIc、ant(4')-Ia、aac(6')-Ib和ant(2'')-Ia以及rmtB、armA。

关键词 铜绿假单胞菌;耐药基因;氨基糖苷类修饰酶;甲基化酶

中图分类号 R 378.99+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0928-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.021

铜绿假单胞菌是一种医院感染常见的条件致病菌。2015年全国细菌耐药监测网(china antimicrobial resistance surveillance system, CARSS)监测报告显示:临床分离菌中铜绿假单胞菌在革兰阴性杆菌排第三位,在非发酵菌中位居第一^[1]。氨基糖苷类抗生素常作为治疗革兰阴性杆菌及其耐药菌感染重要的治疗药物^[2]。但随着该类药物在临床的应用,铜绿假单胞菌对其耐药性有所上升^[3],其耐药机制中AMEs和16S rRNA甲基化酶是介导氨基糖苷类抗生素高度耐药的主要原因^[4]。为探讨铜绿假单胞菌氨基糖苷类抗生素耐药机制以及是否存在16S rRNA甲基化酶基因,该研究收集分离的对氨基糖

苷类抗生素耐药的菌株,检测分析5个16S rRNA甲基化酶基因和16个AMEs基因,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 受试菌株 收集2016年1~12月蚌埠医学院第一附属医院临床分离的铜绿假单胞菌248株,选取其中54株氨基糖苷类抗生素耐药菌株(剔除重复菌株)。

1.2 主要仪器及试剂 VITEK-2compact全自动细菌鉴定药敏仪及配套鉴定药敏卡(法国梅里埃公司);PCR扩增仪(法国BIOER公司);电泳仪及凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);药敏纸片及MH琼脂(英国OXOID公司)。

1.3 菌株鉴定和药敏试验 用VITEK 2 COMPECT全自动鉴定药敏分析仪及其配套的鉴定药敏卡对菌株进行鉴定和药敏实验,同时用K-B法复核药敏结果,根据2016版CLSI标准判读药敏结果。

1.4 耐药基因PCR扩增和序列分析

1.4.1 PCR引物 21种引物设计根据GenBank收录的AMEs基因和甲基化酶基因序列,参照文献^[5],由上海生物工程服务有限公司合成,见表1。

1.4.2 氨基糖苷类耐药基因的检测 PCR反应体系和扩增参数为:50 μl反应体系:上下游引物各1 μl, Ex Taq 酶0.5 μl, 10×Buffer 5 μl, dNTP 4 μl, 模板DNA 2 μl, dd H₂O 36.5 μl。PCR扩增参数为:95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 退火30 s(退火温度见表1), 72℃延伸40 s, 30~45个循环;72℃保温10 min。将所得PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析:Gelred染色剂,1%~1.5%琼脂糖凝胶,电压102 V,时间30~40 min。紫外凝胶成像系统观察结果。阴性对照为重蒸馏水,阳性对照菌株由安徽医科大学第一附属医院检验科惠赠。然后将阳性基因扩增产物送至上海生物工程服务有限公司测序,测序结果进行Blast比对。

1.5 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自国家卫生和计划生育委员会临检中心。

2018-02-26 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号: KJ2015B044by)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

² 蚌埠医学院第一附属医院检验科,蚌埠 233004

作者简介:张凡,女,副主任技师;

徐元宏,男,教授,主任技师,责任作者, E-mail: xyhong1964@163.com

表1 各耐药基因 PCR 引物序列、产物长度和退火温度

基因名称	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)
氨基糖苷类修饰酶基因			
ant(2'') - I a	F: GCTCAGCAACTGCTCCAGA R: GGCACGCAAGACCTCAACCT	58	719
aac(3) - I	F: TTACGCAGCAGCAACGATGT R: GTTGGCCTCATGCTTGAGGA	58	402
aac(3) - II c	F: ACGCGGAAGGCAATAACGGA R: TAACCTGAAGGCTCGCAAGA	55	854
ant(3'') - I	F: TGATTTGCTGTTACGGTGAC R: CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	55	284
ant(3'') - I a	F: TCCAAGCAGCAAGCGGTGA R: CCGACTACCTTGGTGATCTC	58	887
ant(4') - I a	F: CTGCTAAATCGGTAGAAGC R: CAGACCAATCAACATGCGACC	55	172
aac(6') - II	F: TTCATGTCCGCGAGCACCCC R: GACTCTTCCGCCATCGCTCT	55	178
aac(6') - I b	F: CATGACCTTGGCATGCTCTA R: GCTCGAATGCTGGCGTCTT	58	490
aac(6') - I e/aph(2'') - I a	F: CCAAGAGCAATAAGGCCATACC R: CACACTATCATAACCATCACC	55	347
aph(2'') - I b	F: CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC R: GTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	55	867
aph(2'') - I c	F: CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC R: CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	55	444
aph(2'') - I d	F: GTGGTTTTACAGGAATGCCATC R: CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	55	641
aph(3') - I	F: ATGTGCCATATTCACGGGAAACG R: TCAGAAAACTCATCGAGCATCAA	55	816
aph(3') - II b	F: ATGCATGATGCCACCTCC R: CTAGAAGAACTCGTCCAATAGCCT	55	804
aph(3') - III a	F: GGCTAAAATGAGAATATCACCGG R: CTTTAAAAATCATACAGCTCGCG	55	278
aph(4) - I a	F: CTGAACTACCGCGAGCTCT R: TCCACTATCGGCGAGTACTT	58	977
16S rRNA 甲基化酶基因			
rmtA	F: ATGAACATCAACGATGCCT R: CCTTCTGATTGGCTTATCCA	55	635
rmtB	F: GCTTCTGCGGGCGATGTAA R: ATGCAATGCGGGCTCGTAT	55	173
rmtC	F: CGAAGAAGTAACAGCCAAAG R: ATCCCAACATCTCTCCACT	55	711
rmtD	F: TCATTTTCGTTTCAGCAC R: AAACATGAGCGAACTGAAGG	55	748
armA	F: ATTCTGCCTATCCTAATTGG R: ACCTATACTTTATCGTCGTC	55	315

表2 54株铜绿假单胞菌氨基糖苷类抗生素耐药基因阳性率

基因名称	阳性株数	阳性率(%)	基因名称	阳性株数	阳性率(%)
ant(3'') - I	36	66.7	ant(3'') - I + ant(2'') - I a + aac(6') - I b	2	3.7
aac(3) - II c	21	38.9	ant(3'') - I + ant(4') - I a + armA	2	3.7
ant(4') - I a	17	31.5	ant(3'') - I + rmtB + aac(6') - I b	2	3.7
aac(6') - I b	17	31.5	ant(3'') - I + ant(2'') - I a + armA	1	1.9
ant(2'') - I a	9	16.6	ant(3'') - I + ant(2'') - I a + aac(3) - II c	1	1.9
rmtB	16	29.6	ant(2'') - I a + aac(6') - I b + aac(3) - II c	1	1.9
armA	16	29.6	ant(3'') - I + ant(4') - I a + aac(3) - II c	1	1.9
ant(3'') - I + aac(3) - II c	4	7.4	ant(3'') - I + ant(4') - I a + rmtB + aac(3) - II c	3	5.6
ant(3'') - I + aac(6') - I b	3	5.6	ant(2'') - I a + rmtB + armA + aac(3) - II c	1	1.9%
ant(3'') - I + ant(2'') - I a	1	1.9	ant(3'') - I + rmtB + aac(6') - I b + aac(3) - II c	1	1.9
armA + aac(3) - II c	1	1.9	ant(3'') - I + rmtB + armA + aac(6') - I b	1	1.9
ant(3'') - I + armA	1	1.9	ant(3'') - I + ant(2'') - I a + armA + aac(6') - I b	1	1.9
ant(2'') - I a + armA	1	1.9	ant(3'') - I + ant(4') - I a + rmtB + armA + aac(3) - II c	1	1.9
ant(4') - I a + armA	1	1.9	ant(3'') - I + ant(2'') - I a + rmtB + armA + aac(3) - II c	1	1.9
ant(3'') - I + ant(4') - I a	1	1.9	ant(3'') - I + ant(2'') - I a + ant(4') - I a + rmtB + aac(3) - II c	1	1.9
ant(3'') - I + rmtB + aac(3) - II c	4	7.4	AMEs	51	94.4
ant(3'') - I + ant(4') - I a + aac(6') - I b	3	5.6	16S rRNA methylation	28	51.9

2 结果

2.1 氨基糖苷类抗生素耐药基因检测结果 54例耐药菌株共检出阳性耐药基因的有52例,检出率为96.3%(52/54),存在两种以上耐药基因的共45株,检出率为79.6%(43/54)。3种以上阳性的有27例,检出率为50.0%(27/54)。21个基因中,共有7种氨基糖苷类抗生素耐药基因检测阳性: ant(3'') - I、aac(3) - II c、ant(4') - I a、aac(6') - I

b和ant(2'') - I a、rmtB、armA。AMEs基因阳性的有51株,检出率为94.4%。包括5种AMEs基因,其检出率分别为 ant(3'') - I 36株(66.7%)、aac(3) - II c 21株(38.9%)、ant(4') - I a 17株(31.5%)、aac(6') - I b 17株(31.5%)、ant(2'') - I a 9株(16.6%);甲基化酶基因阳性的有28株,检出率为51.9%,包括 rmtB 16株(29.6%)和 armA 16株(29.6%)。其余基因均未检出。见表2。部分菌株PCR扩增结果见图1。

2.2 氨基糖苷类耐药基因序列分析结果 所得阳性扩增产物测序结果与目的基因一致,经 BLAST 比对分析,与目的基因相同。部分测序峰图见图 2~3。

3 讨论

铜绿假单胞菌是引起医院感染的重要病原菌之

一。国内外研究显示^[1,6-8]:该菌是引起医院感染的第三或四位病原菌,在非发酵菌中位居第一。氨基糖苷类抗菌药物(aminoglycosides)包括由链霉菌或小单胞菌天然产生的链霉素、新霉素、庆大霉素等和人工合成的阿米卡星、丁胺卡那霉素等。氨基糖苷类抗菌 30S 核糖体亚单位的 16S rRNA 解码区的 A 部位来抑制细菌蛋白质的合成。2015 版抗菌药

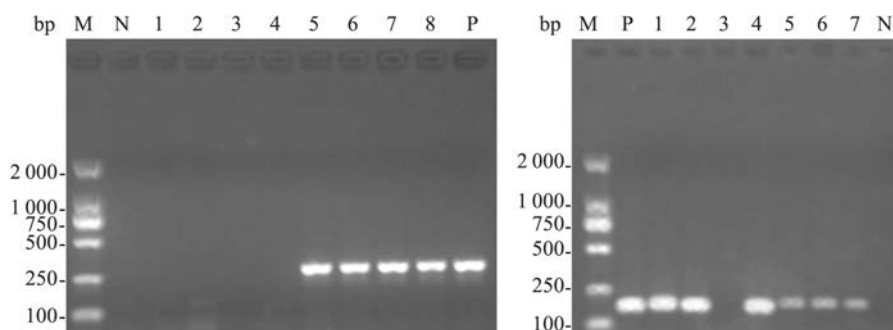


图1 armA (A) 和 rmtB (B) 基因型 PCR 扩增结果

A: armA 基因型; B: rmtB 基因型; M: Marker; N: 阴性对照菌株; P: 阳性对照菌株; 1~8: 临床分离的菌株

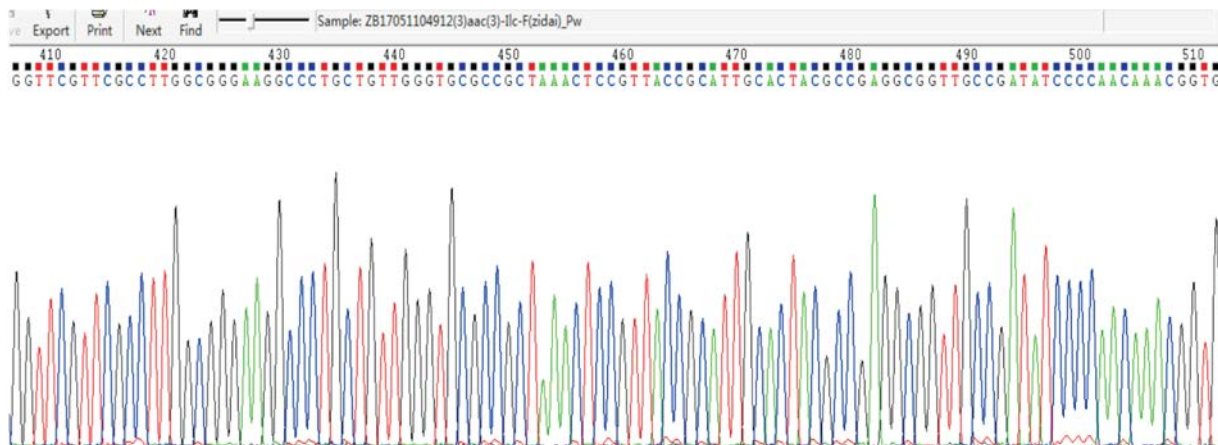


图2 rmtB 部分测序峰图

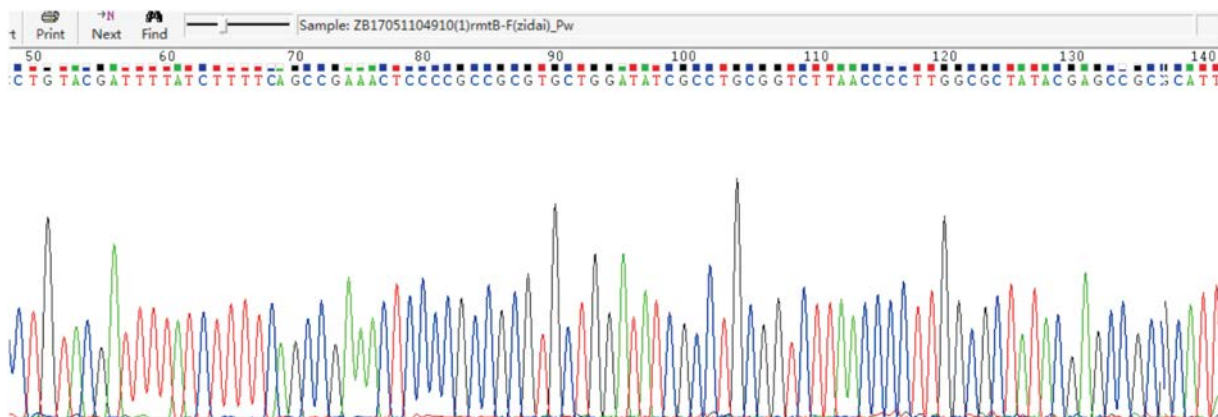


图3 aac(3)-IIc 部分测序峰图

物临床应用指导原则^[2]指出,氨基糖苷类药物对于肠杆菌细菌和铜绿假单胞菌等革兰阴性杆菌具有强大的抗菌活性。氨基糖苷类药物作为一线和联合用药被广泛用于败血症、肺炎和脑膜炎等由耐药菌所致的严重感染的治疗^[9]。然而近年来,氨基糖苷类抗生素对铜绿假单胞菌耐药率也有所上升^[10]。产生多重耐药菌株甚至泛耐药铜绿假单胞菌,导致临床用药及抗感染治疗非常困难。

铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药机制^[11-13]有氨基糖苷修饰酶钝化作用、外膜通透降低、外排泵高表达、靶位突变或甲基化修饰和核开关调控等,其中最主要的是钝化作用。本研究共检出7种氨基糖苷类抗生素耐药基因: *ant(3'')-I*、*aac(3)-IIc*、*ant(4')-Ia*、*aac(6')-Ib*和*ant(2'')-Ia*、*rmtB*、*armA*。包括5种AMEs基因和2种16S rRNA甲基化酶基因。AMEs基因阳性的有51株,检出率为94.4%。5种AMEs基因,其检出率分别为*ant(3'')-I* 36株(66.7%),*aac(3)-IIc* 21株(38.9%),*ant(4')-Ia* 17株(31.5%),*aac(6')-Ib* 17株(31.5%),*ant(2'')-Ia* 9株16.6%。明德松等^[14]对我国铜绿假单胞菌耐氨基糖苷类基因分布的文献研究显示我国不同地域AMEs基因有差别。淮河以北地区AMEs基因*aac(3')-I*、*aac(3')-II*、*aac(6')-I*、*ant(2'')-I*的检出率普遍高于淮河以南地区。AMEs基因淮河以北主要为*ant(2'')-I*、*aac(3')-II*、*aac(6')-II*,淮河以南主要是*aac(6')-II*、*ant(2'')-I*、*aac(3')-I*。本次研究显示的阳性基因与上文研究结果不完全相同,我院地处江淮之间,出现未提及基因*ant(4')-Ia*,检出17株,检出率31.5%,进一步证实了铜绿假单胞菌多为多重耐药菌株且易变异的特点。这可能由于不同地区不同抗生素的运用而导致细菌产生不同的耐药性。本次研究AMEs阳性基因检出率高达94.4%,并大量出现一株细菌产生多种耐药基因的情况,说明氨基糖苷类抗生素的大量应用使铜绿假单胞菌产生的多种钝化酶,其多重耐药性与之有密切关系。

近年来研究^[4,15]表明由质粒介导的16S rRNA甲基化酶基因,能产生对多种氨基糖苷类抗生素高水平耐药菌株。2003年日本学者首次报道:细菌一旦获得16S rRNA甲基化酶基因,将对所有氨基糖苷类抗生素的耐药^[4]。该基因的出现对氨基糖苷类抗生素的应用产生了严重的影响^[16]。本研究中

54株铜绿假单胞菌中甲基化酶基因阳性的有28株,51.9%,包括*rmtB* 16株(29.6%)和*armA* 16株(29.6%)。说明我院编码16S rRNA甲基化酶的基因主要是*rmtB*、*armA*,与我国报道的甲基化酶主要基因相同^[14,17-18]。本次16S rRNA甲基化酶高阳性检出率显示:该基因是引起本地铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物耐药的重要原因之一,该耐药基因的出现说明合理使用氨基糖苷类抗生素亟待重视。另外54株耐药菌株中还有4株检测到同时携带*rmtB*和*armA*基因,27株检测到除携带16S rRNA甲基化酶基因还携带AMEs基因,检出率为50.0%,提示铜绿假单胞菌可能携带多种耐药基因,共同导致我院铜绿假单胞菌氨基糖苷类抗生素耐药。

此外,54株耐药菌株中还有2株菌未检出常见的21种耐药基因,可能还存在其他的耐药机制,有待于进一步研究。

综上所述,我院临床分离的铜绿假单胞菌携带多种16S rRNA甲基化酶基因和AMEs基因,应密切监控其对氨基糖苷类抗生素的耐药性及其耐药机制,防止耐药株流行和播散,为临床合理选择抗菌药物提供可靠的实验室依据。

参考文献

- [1] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,全国细菌耐药监测网. 2015年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国执业药师, 2016, 13(3): 3-8.
- [2] 孟现民,董平,张永信. 认真落实《抗菌药物临床应用指导原则》(2015年版)[J]. 上海医药, 2016, 37(5): 3-6, 10.
- [3] 李婷婷,韩冠英. 某院铜绿假单胞菌耐药性与抗菌药物使用量的相关性分析[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(19): 1689-93.
- [4] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1888-93.
- [5] Nie L, Lv Y, Yuan M, et al. Genetic basis of high level aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* from Beijing, China [J]. Acta Pharm Sin B, 2014, 4(4): 295-300.
- [6] 卞婷婷,刘艳艳,叶英,等. 安徽地区铜绿假单胞菌耐药性分析及泛耐药菌株体外联合药敏试验的研究. [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(10): 1536-9.
- [7] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2016年中国CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-91.
- [8] Hu F P, Guo Y, Zhu D M, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance 2005-2014 [J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22 Suppl 1: S9-14.

- [9] 王明贵, Guan X, He L, 等. 广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制: 中国专家共识 [J]. 中国感染与化疗杂志 2017, 17(1): 82–92.
- [10] Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18(3): 268–81.
- [11] Zavascki A P, Carvalhaes C G, Picao R C, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010, 8(1): 71–93.
- [12] Alvarez-ortega C, Wiegand I, Olivares J, et al. The intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactams [J]. *Virulence*, 2011, 2(2): 144–6.
- [13] Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(2): 479–87.
- [14] 明德松, 邓勇. 我国铜绿假单胞菌耐氨基糖苷类基因分布的文献研究 [J]. 中国循证医学杂志 2014, 14(7): 874–7.
- [15] Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 491–6.
- [16] Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, et al. Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(6): 2069–74.
- [17] 彭敬红, 侯彦强, 谢多双, 等. 铜绿假单胞菌 16S rRNA 甲基化酶基因和氨基糖苷修饰酶基因的研究 [J]. 检验医学 2015, 30(6): 613–6.
- [18] 吴琼, 韩立中, 孙景勇, 等. 氨基糖苷类耐药的肠杆菌科细菌 16S rRNA 甲基化酶基因研究 [J]. 检验医学 2014, 29(5): 528–34.

Detection of aminoglycoside antibiotic resistance genes of *Pseudomonas aeruginosa*

Zhang Fan^{1,2}, Guo Pu², Zhang Lunjun², et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004)

Abstract Objective To investigate the aminoglycoside antibiotic resistance gene distribution of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** *Pseudomonas aeruginosa* was isolated and collected in clinic. Drug susceptibility test was performed by instrumental method and disk diffusion method (K-B method). Aminoglycoside antibiotic-resistant strains were screened, and the expression of 16 aminoglycoside modified enzyme (AMEs) genes and 5 16S rRNA methylase genes were detected by PCR, the positive gene amplification products were further verified by gene sequencing. **Results** Among the 54 strains, 51 were positive for AMEs gene, with the detection rate of 94.4%; 28 strains were positive for methylase gene, with the detection rate of 51.9%. Five kinds of AMEs gene were detected, including ant(3'')-I, aac(3)-IIc, ant(4')-Ia, aac(6')-Ib and ant(2'')-Ia, with the positive rate of 66.7%, 38.9%, 31.5%, 31.5% and 16.6% respectively; Two kinds of 16S rRNA methylase gene were detected, including *rmtB* and *armA*, with the positive rate of 29.6% and 29.6%, respectively, no other gene was detected. The gene sequencing result was consistent with the target gene sequence. **Conclusion** The aminoglycoside resistance gene of *Pseudomonas aeruginosa* was detected with the 5 types of ant(3'')-I, aac(3)-IIc, ant(4')-Ia, aac(6')-Ib, ant(2'')-Ia, *rmtB* and *armA*, respectively.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*; drug-resistant gene; aminoglycoside modifying enzyme; methylase