云浮地区多重耐药铜绿假单胞菌相关耐药基因的研究*

叶伙梅, 谢荣章, 袁炜华, 苏俊梅, 吴飞燕 (广东省云浮市人民医院 527300)

【摘要】 目的 研究云浮地区临床分离的多重耐药铜绿假单胞菌相关耐药基因。方法 采用 K-B 法进行药敏实验, 聚合酶链反应 (PCR) 对多重耐药铜绿假单胞菌进行 β -内酰胺酶相关基因和氨基糖苷类修饰酶 (AMEs) 基因检测, 并进行测序。结果 25 株铜绿假单胞菌未发现对多黏菌素 B 耐药, 其余抗生素耐药率均大于 50%, 氨基糖苷类修饰酶基因 ant(2'')-I、ant(3'')-I、aac(6')-I、aac(6')-II 和 aac(3)-II 基因阳性率分别为 20%、32%、24%、28% 和 24%, 未检出 aac(3)-I 基因; β -内酰胺酶基因 OXA-10、TEM-1、SHV、DHA-1、PER 和 IMP-9 基因阳性率分别为 32%、12%、8%、12%、12% 和 12%, 未检出 CTX-M-9 基因和 VIM 基因; 另外 OprD₂ 基因缺失率达 60%。结论 本地区多重耐药的铜绿假单胞菌携带多种 β -内酰胺酶和氨基糖苷类修饰酶基因, 应引起高度重视。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 多重耐药; 耐药基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.08.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)08-0899-03

Study on related resistant genes of multi-resistant Pseudomonas aeruginosa from Yunfu area YE Huo-mei, XIE Rong-zhang, YUAN Wei-hua, SU Jun-mei, WU Fei-yan (Yunfu Municipal People's Hospital, Yunfu, Guangdong 527300, China)

【Abstract】 **Objective** To study the related resistant genes in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from Yunfu area. **Methods** The Kirby-Bauer tests were performed to detect the susceptibility of 18 kinds of antimicrobial agents against 38 strains of Pseudomonas aeruginosa. The β -lactamases gene and aminoglycosides modifying enzymes gene carried on multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa were detected by polymerase chain reaction method, and the resistant gene sequences were identified. **Results** The resistance rates of 25 Pseudomonas aeruginosa isolates to polymyxin B was 0%, the resistance rate of other antimicrobial agents was more than 50%. The positive rate of ant(2'')-I, ant(3'')-I, aac(6')-I, aac(6')-II and aac(3)-II among aminoglycosides-modifying enzymes genes in 25 multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa was 20%, 32%, 24%, 28% and 24%, respectively. aac(3)-I genes was not found. The positive rate of OXA-10, TEM-1, SHV, DHA-1, PER and IMP-9 among β -lactamases genes in 25 multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa was 32%, 12%, 8%, 12%, 12% and 12% respectively. CTX-M-9 and VIM genes was not found. The loss rate of OprD₂ genes was 60%. **Conclusion** The multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa carrying a variety of β -lactamases and aminoglycosides-modifying enzyme gene, which should be paid attention to.

【Key words】 pseudomonas aeruginosa; multidrug-resistant; resistant gene

铜绿假单胞菌是医院感染常见致病菌^[1]。近年来, 由于抗生素广泛应用, 该菌耐药率呈明显上升趋势, 已经出现一部分对三代头孢菌素和碳青霉烯类耐药的菌株, 给临床治疗带来了极大困难。研究发现铜绿假单胞菌可通过获得多种 β -内酰胺酶和氨基糖苷类修饰酶而导致耐药^[2]。为了解本地区临床分离的多重耐药铜绿假单胞菌对抗生素耐药机制, 指导临床合理用药, 本研究采用聚合酶链反应 (PCR) 对临床分离的 25 株多重耐药铜绿假单胞菌分别检测相关 β -内酰胺酶和氨基糖苷类修饰酶基因, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株的来源 2007 年 1 月至 2010 年 3 月本院住院患者临床标本中铜绿假单胞菌株中筛选出多重耐药菌株 25 株, 其中从痰液分离菌株 19 株、中段尿 3 株, 创伤和伤口分泌物 3 株。全部菌株采用美国德灵 Microscan A/S-4 半自动细菌鉴定仪进行细菌鉴定, 采用 K-B 纸片扩散法及微量肉汤稀释法进行药敏试验。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 35218 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853。药敏结果判断标准按美国临床实验

室标准化协会标准。

1.2 模板的制备 采用煮沸法。先选取 25 株多重耐药的铜绿假单胞菌, 将菌株接种在 M-H 琼脂平皿上孵育 18~24 h 后选取数个菌落至 EP 管, 加入灭菌蒸馏水 150 μ L, 煮沸 10 min 后立即放冰上冷却, 于 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为 PCR 模板立即使用, 或置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 引物设计和 PCR 反应条件 各种靶基因引物序列参考文献[3-4], 由上海英俊生物技术有限公司合成。PCR 条件参照文献[3-4]和软件推荐数值进行。各引物序列及预期产物大小见表 1。各种靶基因 PCR 扩增体系均为: 总反应体积 20 μ L, 其中 P1、P2 引物各 1 μ L, Premix Taq DNA 聚合酶 10 μ L, 灭菌蒸馏水 7 μ L, 模板液 1 μ L。热循环参数根据目的产物大小有所不同, PCR 扩增产物大于 500 bp 的基因热循环参数为 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物小于 500 bp 的基因热循环参数为 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

* 基金项目: 广东省云浮市医药卫生科研基金资助(2010B013)。

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 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, Gold View 染液染色, 同时加核酸电泳分子量标准鉴定扩增 DNA 片段的大小, 用凝胶成像系统观察结果并照相。PCR 产物送上海英俊生物技术有限公司进行纯化并进行双向测序, 测序结果与 GenBank 中 Blast 进行比对。

表 1 PCR 扩增相关耐药基因所用引物及片段大小

基因型	引物	片段大小 (bp)
TEM-1	上游 5-ATAAAATCTCTGAAGAC-3'	1 075
	下游 5-TTaaCAATGCTTAATCA-3'	
SHV	上游 5-ATGCGTTATATTCGCTGTG-3'	826
	下游 5-GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG-3'	
CTX-M-9	上游 5-ACGCTGTTGTTAGGAAGTG-3'	759
	下游 5-TTGAGGCTGGGTGAAGT-3'	
DHA-1	上游 5-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3'	405
	下游 5-CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'	
VIM	上游 5-ATTCCGGTCCG(A/G)GAGGTCCG-3'	633
	下游 5-GAGCAAGTCTAGaacGCCG-3'	
PER	上游 5-AGTCAGCGCTTAGATA-3'	978
	下游 5-CGTATGAAAGACAATC-3'	
OXA-10	上游 5-GTCTTTCA/GAGTACGGCATT-3'	721
	下游 5-GATTTTCTTAGCGGCAACTTA-3'	
IMP-9	上游 5-AaacAGTTTTGCTTTACTAT-3'	587
	下游 5-CGGCCTCAGGAGCGTCTTT-3'	
OprD ₂	上游 5-GCGCATCTCCAAGaacATG-3'	193
	下游 5-GCCACGCGATTTACGGAG-3'	
aac(3)-I	上游 5-ACTGTGATGGGATACGCGTC-3'	169
	下游 5-CTCCGTCAGCGTTTCAGC-3'	
aac(3)-II	上游 5-ACTGTGATGGGATACGCGTC-3'	237
	下游 5-CTCCGTCAGCGTTTCAGC-3'	
aac(6')-I	上游 5-TATGAGTGCTAAATCGAT-3'	394
	下游 5-CCCCTTTCTCGTAGC-3'	
aac(6')-II	上游 5-TTCATGTCCGCGAGCaacCC-3'	178
	下游 5-GACTCTCCGCATCGCTCT-3'	
ant(2'')-I	上游 5-GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG-3'	320
	下游 5-CTGTTACAACGGACTGGCCG-3'	
ant(3'')-I	上游 5-TGATTTGCTGGTTACGGTGAC-3'	284
	下游 5-CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG-3'	

2 结 果

2.1 25 株铜绿假单胞菌药敏情况 除对多黏菌素 B 无出现耐药外, 其余各样抗生素耐药率都在 50% 以上, 见表 2。

表 2 25 株铜绿假单胞菌药敏情况 (%)

抗生素	耐药	中介	敏感
哌拉西林	92.0	0.0	8.0
头孢他啶	92.0	4.0	4.0
氨基南	80.0	12.0	8.0
头孢吡肟	84.0	4.0	12.0
亚胺培南	96.0	0.0	4.0
美罗培南	88.0	8.0	4.0
哌拉西林/三唑巴坦	84.0	0.0	16.0
多黏菌素 B	0.0	0.0	100.0
环丙沙星	84.0	4.0	12.0
庆大霉素	68.0	4.0	28.0
阿米卡星	56.0	8.0	36.0
奈替米星	60.0	0.0	40.0
妥布霉素	60.0	4.0	36.0

2.2 基因 PCR 检测 25 株多重耐药铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶基因以 ant(3'')-I 基因(32%)多见, β-内酰胺酶基因以 OXA-10(32%)和 IMP-9 基因(12%)多见, OprD₂ 基因缺失率达 60%, 见表 3。

表 3 25 株铜绿假单胞菌基因分型

基因型	阳性株数	阳性率 (%)	基因型	阳性株数	阳性率 (%)
OXA-10	8	32	aac(3)-I	0	0
IMP-9	3	12	aac(3)-II	6	24
TEM-1	3	12	aac(6')-I	6	24
SHV	2	8	aac(6')-II	7	28
PER	3	12	ant(3'')-I	8	32
DHA-1	3	12	ant(2'')-I	5	20
CTX-M-9	0	0	VIM	0	0

3 讨 论

随着广谱抗生素的广泛应用, 铜绿假单胞菌出现了大量的多重耐药菌株, 使临床面临的挑战更加严峻^[5]。因此, 调查其耐药情况, 一方面可全面认识其耐药机制, 有助于感染控制, 另一方面铜绿假单胞菌有可能是多种耐药基因的传染源, 这一工作将有助于了解和控制医院内耐药基因的播散和流行。本地区 25 株多重耐药铜绿假单胞菌除对多黏菌素 B 耐药率为 0% 外, 对其余的各种抗生素耐药率都较高, 耐药率均大于 50%, 因此应重视和加强细菌耐药监测, 根据药敏结果合理选用耐药率低的抗生素, 可避免多重耐药菌株引起的医院感染发生。另外, 本次调查中未发现多黏菌素 B 耐药菌株, 因此临床医生对这类菌株引起的感染可根据患者具体情况考虑选用多黏菌素 B。

近年来, 不断有学者发现铜绿假单胞菌可以获得 OXA-10 型、AmpC、TEM、SHV、PER 等多种广谱酶或超广谱 β-内酰胺酶基因, 其表达产物能水解青霉素、第一、二、三代头孢菌素等 β-内酰胺类药物, 使得铜绿假单胞菌对多种药物同时耐药, 对亚胺培南耐药的主要原因是产 IMP、VIM、SPM 等型金属酶, OprD₂ 是以亚胺培南为代表的碳青霉烯类抗生素(美罗培南除外)进入菌体的特殊性通道, 其他的 β-内酰胺类抗生素如头孢菌素类、青霉素类不能通过 OprD₂, 所以碳青霉烯类与其他的 β-内酰胺类抗生素之间无交叉耐药性。以往研究认为, 对碳青霉烯类耐药主要是由于 OprD₂ 含量减少甚至缺失, 引起外膜通透性下降所致, 但高浓度耐药是以产金属酶为主。

本次调查云浮地区多重耐药铜绿假单胞菌 OprD₂ 基因缺失严重, 达 60%, 与王伟等^[6]报道相似。而本研究发现 25 株多重耐药铜绿假单胞菌对亚胺培南的 MIC ≥ 32 μg/mL 达 96%, 导致此种现象可能因为 OprD₂ 缺失是铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药的主要机制, 但不是唯一的, 单纯 OprD₂ 基因缺失仅表现为对亚胺培南低水平耐药, 而高水平耐药 (MIC ≥ 32 μg/mL) 尚不常见。本研究有 12% 实验菌株携带 IMP-9 基因, 其他 β-内酰胺酶编码基因 OXA-10、TEM-1、SHV 和 PER 的阳性率分别是 32%、12%、8% 和 12%。研究发现同一菌株同时携带 2 种或以上 β-内酰胺酶基因有 8 株(32%), OprD₂ 基因缺失同时携带 OXA-10、TEM-1、SHV、DHA-1 和 IMP-9 基因的菌株分别有 8 株(32%)、4 株(16%)、3 株(12%)、2 株(8%) 和 7 株(28%), 提示携带多种 β-内酰胺酶基因合并外膜通道蛋白

OprD₂ 基因缺失是本研究铜绿假单胞菌对 β-内酰胺类抗生素耐药的主要原因。

铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素耐药现象非常严重,而铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物耐药的重要原因之一是产氨基糖苷类修饰酶(AMEs),对抗生素分子中某些保护抗菌活性所必需的基因进行修饰,使其与作用靶位核糖体的亲和力大为降低^[7-8]。常见的 AMEs 可分为 3 类,即乙酰转移酶(aac 基因编码),磷酸转移酶(aph 基因编码)和核苷转移酶(ant 基因编码)^[7]。据报道,对氨基糖苷类抗生素耐药可携带 1 种或数种 AMEs 基因。本研究中只检测 6 种 AMEs 基因,分别为 ant(2'')-I、ant(3'')-I、aac(6')-I、aac(6')-II、aac(3)-II 和 aac(3)-I。30 株实验菌株中可以检出 ant(3'')-I 基因阳性株 8 株(32%),其他 AMEs 基因 ant(2'')-I、aac(6')-I、aac(6')-II 和 aac(3)-II 基因阳性率分别为 20%、24%、28% 和 24%,未检出 aac(3)-I 基因,本研究同一菌株同时携带 2 种以上 AMEs 基因有 10 株(40.0%),可以看出本地区 AMEs 基因对铜绿假单胞菌的耐药性起到重要作用。本研究发现没携带 AMEs 基因的铜绿假单胞菌对氨基糖苷类抗生素也高度的耐药,可能是由其他耐药机制引起,有待研究。

本研究菌株中有些菌所检测基因全部阴性或有些只携带一种耐药基因,但也表现出高度的耐药性,提示可能是其他耐药机制导致铜绿假单胞菌的高度耐药性,如外膜的药物主动外排系统、生物膜等,或者染色体基因发生其他位置突变的可能,有待进一步研究。

参考文献

[1] Murthy SK, Balch AL, Smith RP, et al. Oropharyngeal

and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients[J]. *J Clin Microbiol*, 1989, 27(1): 35-40.

- [2] 周贵平, 阴晴. 多重耐药铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物耐药研究[J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(4): 405-406.
- [3] Ciofu O, Giwercman B, Pedersen SS, et al. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF Center[J]. *APMIS* 1994, 102(9): 674-680.
- [4] Giwercman B, Meyer C, Lambert PA, et al. High-level β-lactamase activity in sputum from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36(1): 71-76.
- [5] 赵延坤, 周岐新. 多重耐药铜绿假单胞菌的耐药性及耐药基因检测[J]. *中国药房*, 2008, 19(10): 745-747.
- [6] 王伟, 毛剑锋, 陈英, 等. 铜绿假单胞菌 β-内酰胺类药物耐药相关基因研究(12 种)[J]. *中国微生物学杂志*, 2006, 18(4): 285-287.
- [7] 毛剑锋, 王伟, 李彩霞, 等. 铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶基因探讨[J]. *中国微生物学杂志*, 2007, 19(2): 92-93.
- [8] 王继东, 王晓岚, 周丽珍, 等. 医院感染铜绿假单胞菌对抗菌药物多重耐药基因的研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2007, 6(2): 77-82.

(收稿日期: 2011-09-18)

(上接 898 页)

2.8 家属督促患者遵医行为的执行情况前后比较 管理前家属经常督促患者遵医行为的有 98 例(86.7%), 偶尔督促的有 15 例(13.3%); 管理后家属经常督促患者遵医行为的有 110 例(97.3%), 偶尔督促的有 3 例(2.7%), 前后比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

我国原发性高血压流行病学调查表明原发性高血压人群存在着“三高”——高患病率、高病死率、高残疾率和“三低”——低知晓率、低治疗率、低控制率的现象, 成为世界上原发性高血压危害最严重的国家之一^[1-2]。原发性高血压的“三高”和“三低”现象与原发性高血压的发病原因、不规范治疗和不良生活行为方式有密切关系, 这与患者和家属缺乏原发性高血压疾病的基本知识、预防和保健知识以及患者遵医行为有很大关系, 与家属督促、指导患者改变不良生活方式和遵医行为的执行力度关系甚大。因此改变患者不良生活方式, 提高患者和家属的遵医行为, 增强原发性高血压疾病相关知识, 对降低原发性高血压患病率、残疾率、病死率有重要作用。高血压“三套马车”(即健康教育、不良生活方式的调整、药物治疗)的综合治疗方案是治疗原发性高血压的基本方法, 已被欧美国家证明为行之有效的手段, 这对于国内重药物治疗, 轻视生活方式和健康教育的观念是一个很好的提示和矫正^[3]。有研究结果显示, 健康教育能提高患者服药的依从性, 但介入家庭干预后效果会更好^[4-7]。本研究结果表明, 除对原发性高血压患者建立健康档案和动态监测分级管理外, 同时对家属也进行健康

教育、家庭护理指导等综合性的健康管理, 可进一步提高患者原发性高血压知识的知晓率、规范管理率和控制率, 减少患者现存危险因素, 减少并发症, 降低住院费用, 同时可提高家属对原发性高血压相关知识的知晓率和督促患者遵医行为的执行力, 势必对预防家属这一高危人群在原发性高血压的发生、发展上有很好的作用, 值得推广。

参考文献

- [1] 叶任高, 陆再英. 内科学. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 247.
- [2] 李莉. 高血压治疗: 从临床指南到临床实践[J]. *中国临床医生*, 2007, 35(3): 67-71.
- [3] 中国医师协会高血压专家委员会, 中国高血压联盟. 中国高血压自我管理标准手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008: 51.
- [4] 武青, 邱林蔚. 高血压患者 88 例家庭护理干预[J]. *齐鲁护理杂志*, 2007, 13(23): 97.
- [5] 曾金凤, 王晓华. 家庭护理干预对原发性高血压患者遵医行为的影响[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(7): 243-245.
- [6] 周胜兰. 以家庭为单位的护理干预对社区高血压前期患者的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2011, 15(16): 86-88.
- [7] 关桂荣. 家庭护理干预在高血压患者中的应用探讨[J]. *亚太传统医药*, 2009, 5(12): 177-178.

(收稿日期: 2011-11-22)