

耐碳青霉烯铜绿假单胞菌耐药机制和传播机制研究^{*}

郑 芬, 芮勇宇[△] (南方医科大学南方医院检验医学科, 广州 510515)

【摘要】 目的 阐明南方医科大学南方医院耐碳青霉烯铜绿假单胞菌的耐药机制和传播机制。**方法** 采用聚合酶链反应(PCR)-限制性核酸片段长度多态性分析分型和测序技术对临床分离的 59 株耐碳青霉烯铜绿假单胞菌进行整合子 I、插入序列共同区(ISCR1)和常见碳青霉烯酶基因研究, 采用肠杆菌科间重复一致性序列(ERIC)-PCR 技术研究传播机制。**结果** 59 株菌株中 20 株(34%)整合子 I 阳性, 17 株(29%)整合子 I 可变区阳性; 9 株(15%)ISCR1 阳性, 5 株(8%)ISCR1 可变区阳性且均携带 qnrA1 和 ampR 耐药基因盒。1 株检出复杂性整合子 I, 3 株检出 VIM-2 基因, 2 株检出 IMP-1 基因。ERIC-PCR 聚类分析在 80% 相似水平上聚为 52 个类群。**结论** 整合子 I、ISCR1 和碳青霉烯酶在铜绿假单胞菌介导多重耐药方面有重要作用, ERIC-PCR 是进行铜绿假单胞菌同源性分析的有效方法。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 整合子; 插入序列共同区; 碳青霉烯酶; 肠杆菌科间重复一致性序列-聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.10.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)10-1201-02

Study on mechanism of drug resistance and transmission in carbapenems-resistant pseudomonas aeruginosa isolates^{*}

ZHENG Fen, RUI Yong-yu[△] (Department of Laboratory Medicine, NanFang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of drug resistance and transmission in carbapenems-resistant pseudomonas aeruginosa isolates. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism-PCR (RFLP-PCR) and sequencing were used to detect class I integron, ISCR1, and carbapenemases genes in 59 carbapenems-resistant pseudomonas aeruginosa isolates. ERIC-PCR was determined for genotype of isolates. **Results** Among 59 bacterial isolates, 20 class I integrase, 17 class I integrons, 5 ISCR1 carrying qnrA1 and ampR resistance genes were detected and 3 harboured VIM-2, 2 harboured IMP-1 genes, but none other carbapenemases genes was found. All bacterial isolates contained 52 genotypes at similarity level of 80%. **Conclusion** Class I integron, ISCR1 and carbapenemases might play an important role in mediating multidrug resistance in pseudomonas aeruginosa. ERIC-PCR could be a convenient and effective method for genotyping clinical pseudomonas aeruginosa isolates.

【Key words】 pseudomonas aeruginosa; integron; ISCR1; carbapenemases; ERIC-PCR

随着抗生素的大量使用, 临床耐碳青霉烯铜绿假单胞菌日渐增多, 给临床抗感染治疗带来严峻挑战^[1]。铜绿假单胞菌耐药机制复杂, 本研究主要探讨碳青霉烯酶、可移动耐药元件整合子 I 和插入序列共同区(ISCR1)与耐药性的关系, 并采用肠杆菌科间重复一致性序列(ERIC)-聚合酶链反应(PCR)对临床分离的 59 株耐碳青霉烯铜绿假单胞菌进行同源性传播机制研究, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定 收集南方医科大学南方医院 2011 年 1~12 月临床分离的碳青霉烯耐药的铜绿假单胞菌(排除重复菌株)共 59 株, 其中 25 株来自于呼吸科, 18 株来自于外科重症监护病房, 16 株来自于神经内科, 这些菌株均分离于下呼吸道感染患者的痰液。所有分离的菌株采用 BD Phoenix100 仪器进行鉴定和药敏试验, 头孢哌酮/舒巴坦和米诺环素药敏试验采用 K-B 法, 药敏纸片购自英国 Oxoid 公司。用 WHO-NET5.6 分析菌株药敏情况。质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。

1.2 仪器与试剂 德国 Eppendorf 公司的 PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司的凝胶成像仪。TaqDNA 聚合酶、dNTPs、蛋白酶 K、

Hinf I 均为 TaKaRa 公司产品。Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、10%十二烷基磺酸钠(SDS)购自北京鼎国生物技术有限公司。所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 细菌 DNA 模板制备 将菌株接种 5 mL LB 肉汤, 35 ℃ 培养 18 h。取菌液 1 000 μL, 12 000 r/min 离心 5 min, 细胞沉淀物以无菌磷酸盐缓冲液洗涤, SDS-蛋白酶 K 裂解后, 利用酚-氯仿进行抽提, 乙醇洗涤后用 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris, 1 mmol/L 乙二胺四乙酸)溶解 DNA 沉淀, 于 -20 ℃ 保存。

1.4 I 类整合子结构研究 先采用 PCR 对 59 株铜绿假单胞菌进行整合酶 I 基因扩增, 阳性菌株进一步对其可变区即整合子 I 进行 PCR 扩增。所用引物和反应体系均参照文献[2]。可变区阳性的 PCR 产物进行限制性核酸片段长度多态性分析(RFLP), 所用反应体系均为 20 μL, 含 10×H Buffer 2 μL, Hinf I 5 U, 5 μL 阳性 PCR 产物模板, 加入灭菌去离子水至 20 μL。37 ℃ 酶切消化 1 h 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并挑选不同谱型的 PCR 产物送深圳华大基因公司测序。

1.5 ISCR1 结构研究 先采用 PCR 对 59 株菌进行 ISCR1 基因扩增, 阳性菌株进一步扩增 ISCR1 可变区基因, 所用引物均参照文献[3]。

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金(S2012010009153), 南方医院新业务新技术课题(院医字[2012]4 号 201116)。 [△] 通讯作者, E-mail: yongyurui@yahoo.com.cn。

1.6 复杂性整合子结构研究 对于整合子 I 和 ISCR1 可变区均阳性的菌株,先针对整合子 I 的 3' 保守区和 ISCR1 的 5' 保守区设计共同区引物,引物 1 为 5'-GTA TTG CGC CGC TCT TAG AC-3',引物 2 为 5'-AAA CCA GCA TGG TTG GCT AC-3'。若扩增阳性,再针对整合子 I 和 ISCR1 可变区设计引物,引物 3 为 5'-TCC CGA GGT CAC CAA GAT-3',引物 4 为 5'-TTA CTC CCA AGG GTT CCA G-3',扩增从整合子 I 可变区到 ISCR1 可变区之间的片段。

1.7 常见碳青霉烯酶基因检测 PCR 检测碳青霉烯酶基因 KPC、NDM、IMP、VIM 和 SPM。所用引物均参照文献[1,4],各基因的阳性对照株均为本课题组 PCR 检测后经测序验证过的临床分离株。各基因阳性的 PCR 产物送深圳华大基因测序验证。

1.8 ERIC-PCR 基因分型 ERIC-PCR 引物序列 ERIC-2: AAG TAA GTA ACT GGG GTG AGC G,反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,26 ℃ 退火 2 min,72 ℃ 延伸 1 min,4 个循环;94 ℃ 变性 1 min,40 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

2 结果

2.1 I 类整合子结构 59 株碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌中,20 株(34%)整合酶 I 阳性,17 株(29%)整合子 I 可变区扩增阳性,RFLP 分型显示,50 株整合子 I 阳性菌株共分为 3 个谱型分别测序。测序比对结果显示,7 株为 A 类型,携带氨基糖苷类耐药(aacA4);6 株为 B 类型,携带氨基糖苷类耐药(aadA7);4 株为 C 类型,携带氯霉素类和氨基糖苷类耐药(catB3+aacA4)基因盒。

2.2 ISCR1 结构 59 株碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌中,9 株(15%)ISCR1 阳性,5 株(8%)检测到可变区阳性。RFLP 分型显示,5 株为同一谱型,测序结果表明可变区携带基因盒喹诺酮耐药(qnrA1)和 β-内酰胺类耐药(ampR)。

2.3 复杂性整合子结构 复杂性整合子验证结果显示,1 株整合子 I 和 ISCR1 可变区均阳性的菌株共同区扩增阳性,进一步针对整合子 I 和 ISCR1 可变区设计引物进行扩增也为阳性,提示这株菌均携带一种复杂性 I 类整合子,基因盒排列为 catB3+aacA4+ISCR1+qnrA1+ampR。

2.4 常见碳青霉烯酶基因 59 株碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌中 3 株检出 VIM-2 基因,2 株检出 IMP-1 基因,未检出其他碳青霉烯酶基因。

2.5 ERIC-PCR 基因分型结果 59 株菌株 ERIC-PCR 图谱显示电泳条带集中分布在 200~5 000 bp,每株菌株都扩出至少 4 个条带。采用 Quantity One 软件进行聚类分析,相似性聚类分析结果表明,59 株菌株在 80% 的相似水平上被聚为 52 个类群。

3 讨论

铜绿假单胞菌是医院感染的重要条件致病菌,随着能够水解碳青霉烯类抗菌药物金属 β-内酰胺酶的产生,对碳青霉烯类抗菌药物及第 3 代头孢菌素耐药铜绿假单胞菌的分离率日渐增多,给临床抗感染治疗带来极大的困难^[5]。对碳青霉烯类耐药主要与其产生 β-内酰胺酶(如金属酶)有关,而且这些耐药基因常位于整合子和 ISCR 等耐药元件的可变区基因盒中。整合子是一种运动性的 DNA 分子,具有捕获外源游离基因片段的功能,是细菌遗传和变异的天然克隆和表达系统,临床以 I 类常见^[6]。ISCR1 也是一种强大的耐药基因捕获元件,属于 IS1-like 家族,通过滚环复制的方式转作邻近的耐药基因,常位于普通整合子 I 的 3' 末端^[7]。

本院分离的 59 株碳青霉烯铜绿假单胞菌均为多重耐药,

研究发现整合子 I 主要携带 aacA4、aadA7 和 catB3,ISCR1 主要携带 qnrA1 和 ampR,复杂性整合子更是同时携带 aacA4、catB3、qnrA1 和 ampR,提示整合子 I 和 ISCR1 在铜绿假单胞菌介导多重耐药方面有重要作用。59 株菌株中 5 株携带金属酶基因,携带率为 8%,表明除了金属酶的水解作用可以使铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物产生抵抗之外,还有其他机制参与,如膜孔蛋白的缺失、外排泵的过度表达等^[8];同时也提示本院铜绿假单胞菌已有金属酶产生,这和碳青霉烯类抗菌药物在本院广泛应用密切相关,应引起临床和控制感染部门的高度关注,应杜绝不合理使用碳青霉烯类抗菌药物的现象。

铜绿假单胞菌是医院内感染的重要致病菌,医院内感染的原因主要是:(1)外源性交叉感染;(2)受自身免疫功能低下所致的内源性感染。ERIC-PCR 操作简单、分型效率高、价格低廉,非常适合于研究医院内感染传播机制^[9]。本院临床分离的 59 株菌株均能扩增出条带,分辨率高,图谱聚类分析显示 80% 的相似水平上被聚为 52 个类群,基因型分散,未显示亲密的亲缘关系,不存在克隆传播现象,由此表明 59 例耐碳青霉烯铜绿假单胞菌感染患者均为散发,不存在暴发或流行。

参考文献

- [1] Stokes HW, Martinez E, Roy Chowdhury P, et al. Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(7): 1799-1800.
- [2] Wu K, Wang F, Sun J, et al. Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(3): 264-267.
- [3] Wang F, Wu K, Sun J, et al. Novel ISCR1-linked resistance genes found in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(5): 404-408.
- [4] Wang J, Zhou JY, Qu TT, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35(5): 486-491.
- [5] 马永岚, 杨飞兰, 王颖, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌耐药状况分析 [J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(3): 257-258.
- [6] Taherikalani M, Maleki A, Sadeghifard N, et al. Dissemination of class 1, 2 and 3 integrons among different multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran hospitals, Iran [J]. *Pol J Microbiol*, 2011, 60(2): 169-174.
- [7] Yong D, Toleman MA, Bell J, et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-β-lactamase gene, bla_{AIM-1}, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(12): 6154-6159.
- [8] 杨菁菁, 艾效曼, 胡云健, 等. 泛耐药铜绿假单胞菌及子 β-内酰胺类抗生素的耐药机制研究 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2013, 13(1): 14-18.
- [9] Ye Y, Jiang Y, Fan T, et al. Resistance characterization, virulence factors, and ERIC-PCR fingerprinting of *Aeromonas veronii* strains isolated from diseased *Trionyx sinensis* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2012, 9(11): 1053-1055.