

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 01. 006

产吡哌金黄杆菌耐药性和耐药基因研究*

解春宝¹, 罗江蓉², 赵秋敏³, 喻 华¹, 传良敏^{1△}

(1. 四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 成都 610072; 2. 四川省医学科学院/四川省人民医院运营部, 成都 610072; 3. 川北医学院, 四川南充 637000)

摘要:目的 本研究拟了解临床分离产吡哌金黄杆菌的耐药特性, 检测其耐药基因分析耐药机制, 为临床合理使用抗菌药物提供科学依据。**方法** 收集四川省人民医院 2013 年 10 月至 2015 年 2 月临床分离的产吡哌金黄杆菌菌株, 分析其耐药谱。利用聚合酶链反应(PCR)技术筛查其耐药基因, 扩增阳性产物进行序列测定然后将其结果与 GenBank 数据库进行比对分析以确定其基因型。**结果** 共收集到 6 株产吡哌金黄杆菌, 6 株菌株对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类等抗菌药物表现为耐药。耐药基因检测结果: 5 株细菌携带 IND-2、IND-LIKE、CIA 耐药基因; 未检测到携带 IND-1、IND-3、IND-4 耐药基因的细菌。**结论** 该院临床分离的产吡哌金黄杆菌表现为多重耐药, 其耐药基因型以 IND-2 和 CIA 为常见。

关键词:产吡哌金黄杆菌; 耐药谱; 基因型

中图分类号: R378. 99

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)01-0020-04

The study on drug resistance and resistant genotype of *Chryseobacterium indologenes**

XIE Chunbao¹, LUO Jiangrong², ZHAO Qiumin³, YU Hua¹, CHUAN Liangmin^{1△}

(Clinical Laboratory Department, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistance and resistant genotype of *Chryseobacterium indologenes* isolated from clinical, and to provide scientific basis for clinical rational use of antibiotics. **Methods** *Chryseobacterium indologenes* strains were collected from a hospital in Sichuan Province from October 2010 to February 2015, and its drug resistance spectrum was analyzed. The drug resistance gene was screened by polymerase chain reaction (PCR). The positive amplification products were sequenced and then compared with GenBank database to determine the drug resistance genotype. **Results** Six strains of *Chryseobacterium indologenes* were collected and six strains were resistant to antimicrobial agents such as penicillins, cephalosporins and carbapenems. The results showed that IND-2, IND-LIKE and CIA resistant genotypes were positive in 5 strains. IND-1, IND-3 and IND-4 resistant genotype were negative in all the 6 strains. **Conclusion** At present, the *Chryseobacterium indologenes* isolated from the hospital shows multiple drug resistance, and their resistance genotype are common in IND-2 and CIA.

Key words: *Chryseobacterium indologenes*; resistant spectrum; genotype

产吡哌金黄杆菌为非发酵革兰阴性杆菌, 属条件致病菌, 可引起尿路感染、腹腔内感染、肺部感染、菌血症、脑膜炎等多种疾病。近年来, 产吡哌金黄杆菌引起的院内感染性疾病不断增加, 常表现多重耐药, 但对该菌耐药机制的研究较少。本研究拟检测产吡哌金黄杆菌金属 β-内酰胺酶(MBL)的耐药基因型, 分析其耐药特性, 为临床治疗产吡哌金黄杆菌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集四川省人民医院 2013 年 10 月

至 2015 年 2 月住院患者分离的 6 株产吡哌金黄杆菌(7001, 7002, 7003, 7004, 7005, 7006)。所有菌株均用法国生物梅里埃公司的全自动微生物分析仪 VITEK-2 鉴定到种。

1.2 仪器与试剂 全自动微生物分析仪 VITEK-2 及其配套药敏试验复合板购自法国生物梅里埃公司; 离心机 Microfuge 18 centrifuge 购自美国贝克曼库尔特; Nanodrop 分光光度计购自赛默飞科技有限公司; PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad

* 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ470); 四川省医学科学院/四川省人民医院青年基金(2015QN03); 四川省医学科学院/四川省人民医院苗圃科研课题(重点项目 30305030884)。

作者简介: 解春宝, 男, 主管技师, 主要从事细菌耐药机制研究。 △ 通信作者, E-mail: 875813182@qq.com。

公司;GoldView™核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司;琼脂糖粉购自上海基因技术有限公司;2×Taq PCR MasterMix 及 DNA Marker(100 bp Ladder)购自北京康为世纪生物科技有限公司;引物由上海英骏公司合成。

1.3 抗菌药物及药敏试验 氨苄西林、氨曲南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、头孢曲松、头孢他啶、头孢唑林、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左旋氧氟沙星、亚胺培南、呋喃妥因、复方磺胺甲噁唑等 15 种抗菌药物均为 VITEK-2 Compact 配套药敏试验复合板,购自法国生物梅里埃公司。

1.4 细菌 DNA 提取 煮沸法提取所有细菌 DNA:将所有试验菌株复苏后接种于血平板,35 ℃,6.5% CO₂ 培养 48 h。挑取菌落悬浊于 200 μL 纯水中,100 ℃金属浴 10 min,然后 10 000 r/min 离心 5 min,上清液即为细菌 DNA,使用 Nanodrop 分光光度计检测所提取细菌 DNA 的浓度及纯度^[1]。吸取上清液 100 μL 于 EP 管储存于 -80 ℃ 备用,余下者保存于 2~8 ℃。

1.5 耐药基因的检测 各耐药基因(IND-1、IND-2、IND-3、IND-4、CIA、IND-LIKE)检测均采用 PCR 法,其基因引物序列参照文献[2-3]合成。PCR 反应的体系(20 μL):2×Taq PCR MasterMix 加 10 μL,耐药基因的正反向引物各 1 μL(10 μmol/L),细菌 DNA 模板 2 μL,RNase-free water 加 6 μL。PCR 反应的条件:94 ℃ 条件下 DNA 预变性 5 min,94 ℃ 条件下 DNA 变性 1 min,T_m 72 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 条件下延伸 1 min,25 个循环周期,最后在 72 ℃ 条件下延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳约 40 min,然后用 Bio-Rad 凝胶成像仪照相。引物信息见表 1。

表 1 引物序列及目的产物信息

耐药基因	引物序列(5'~3')	产物长度 (bp)	退火温度 (°C)
IND-LIKE	F:GCCAGGTAAAGATTTTGTAAAT	580	58
	R:CATGGCCACCGCTTTCCATTC		
IND-1	F:ATGAAAAAAGCATCCG	720	55
	R:CTATTTTTTATTCAGAAGTTC		
IND-2	F:ATGAAAAAAGTATTCAGCTTTTG	732	58
	R:TTATTCGGCTTTTATTCCTTAIC		
IND-3	F:ATGAAAAAAGAATTCAGTTC	720	58
	R:TTATTTTTTGTAAAGAAGTTC		
IND-4	F:ATGAGGAAAAATGTTAGGA	720	58
	R:CTACTGTTTTTGTGTGATCTAA		
CIA	F:GCGAGAATAAACTCAGAGTACAT	959	58
	R:AGCATGAAGCTCCATAAGAGATC		

1.6 序列测定 耐药基因扩增出阳性后送其产物至成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序,所有的测序结果将与 GenBank 数据库上已知的序列进行比对分析。

2 结 果

2.1 药敏结果 本试验中 6 株产吡喹酮金黄色杆菌均呈现多重耐药性。6 株菌株对头孢菌素类及碳青霉烯类抗菌药物的耐药率达 100.0%;对青霉素类与 β-内酰胺类的联合制剂部分敏感;对喹诺酮类抗菌药物耐药率达 66.7%。目前,产吡喹酮金黄色杆菌的体外药敏试验仅对磺胺类药物敏感。见表 2。

表 2 6 株产吡喹酮金黄色杆菌对抗菌药物的药敏率(%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
氨苄西林	100.0	0.0	0.0
氨曲南	100.0	0.0	0.0
哌拉西林/他唑巴坦	83.3	16.7	0.0
头孢吡肟	100.0	0.0	0.0
头孢曲松	100.0	0.0	0.0
头孢他啶	100.0	0.0	0.0
头孢唑林	100.0	0.0	0.0
阿米卡星	100.0	0.0	0.0
庆大霉素	100.0	0.0	0.0
妥布霉素	100.0	0.0	0.0
左旋氧氟沙星	66.7	0.0	33.3
环丙沙星	66.7	0.0	33.3
亚胺培南	100.0	0.0	0.0
复方磺胺甲噁唑	0.0	0.0	100.0
呋喃妥因	100.0	0.0	0.0

2.2 DNA 浓度及纯度检测结果 提取出 6 株细菌 DNA 的样品浓度较高,DNA 的样品纯度 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 为 1.70~1.87 提示纯度较高。见表 3。

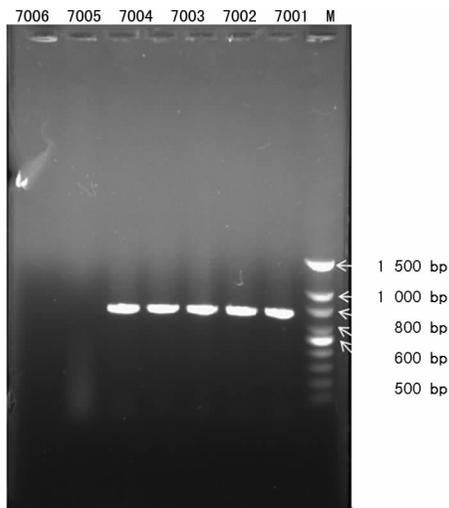
表 3 DNA 浓度及纯度结果

项目	7001	7002	7003	7004	7005	7006
DNA 浓度(ng/μL)	407.20	414.50	794.50	628.60	749.80	853.80
OD _{260 nm} /OD _{280 nm}	1.85	1.80	1.70	1.84	1.87	1.76

2.3 耐药基因检测结果 在 6 株多重耐药产吡喹酮金黄色杆菌中,检测出 5 株细菌(7001、7002、7003、7004、7005)均带有耐药基因 IND-2、IND-LIKE、CIA。部分耐药基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1、2。

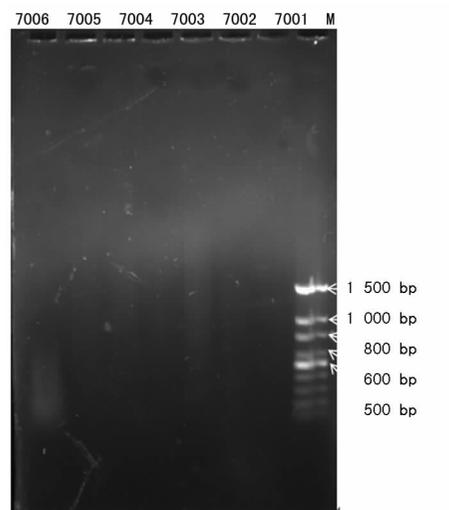
2.4 序列分析结果 本试验中 PCR 扩增耐药基因阳性结果的菌株耐药基因序列分析检出率均为 100.0%。在 GenBank 数据库经 BLAST 程序进行比对分析,对 IND-2、IND-LIKE、CIA 基因扩增产物比

对分析后证实为 IND-2、IND-LIKE、CIA。



注: M 为 DNA 标记物; 7001~7005 结果为阳性, 7006 结果为阴性

图 1 IND-2 琼脂糖凝胶电泳



注: M 为 DNA 标记物; 7001~7006 结果为阴性

图 2 IND-1 琼脂糖凝胶电泳

3 讨 论

产吡啶金黄杆菌是属于非发酵革兰阴性杆菌, 氧化酶试验阴性, 在生长过程中产生黄色色素, 广泛存在于水、土壤、空气等自然环境, 非人体正常菌群。据文献[4-5]报道, 该菌在临床分离菌株中所占的比例较少。但近年来, 随着广谱抗菌药物、免疫抑制剂及介入性操作的广泛使用, 该菌的分离率有所增高, 并且存在严重的多药耐药现象^[6-7]。该菌一旦引起感染, 可导致感染部位出现严重的炎性反应, 如重症肺炎、重症脑膜炎等, 甚至引起全身性菌血症或败血症, 临床治疗可选药物极为有限^[8-12]。目前仅磺胺类药物对该菌感染者的疗效尚佳, 青霉素类与β-内酰胺类联合制剂的大剂量运用也有一定效果, 故以复方磺胺甲噁唑为代表的磺胺类药物, 可作为治疗该菌感染的首选药。

虽然该菌致病性强治疗难度大, 但是据文献报道对该菌耐药机制的研究较少。本研究中分析产吡啶

金黄杆菌的耐药谱, 并检测其耐药基因, 为临床治疗该菌的感染提供充分可靠的科学依据。6 株菌株对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类等抗菌药物表现为耐药, 总体呈现多重耐药。IND 是产吡啶金黄杆菌至今为止发现的主要 MBL, 可灭活青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类抗菌药物, 甚至能灭活酶抑制剂, 所以很可能是高产率的 MBL 导致相关菌株表现出多药耐药性^[13-15]。CIA 在相关研究中也有报道, 其产物对氨基和羧基青霉素、窄谱头孢菌素、头孢噻肟、头孢哌酮、碳青霉烯、氨曲南等抗菌药物具有耐药性。有研究者对临床分离出的多重耐药产吡啶金黄杆菌进行基因序列分析, 为该菌的耐药机制和临床治疗提供依据^[16]。本研究 6 株多重耐药产吡啶金黄杆菌检测出 5 株均带有耐药基因 IND-2、IND-LIKE、CIA, 提示本院产吡啶金黄杆菌耐药基因型以 IND-2 和 CIA 为常见。试验菌株 7006 表现为多药耐药, 但未检测到其耐药基因, 因此是否存在其他耐药基因, 有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 陈丽丽, 张鹏, 黄新, 等. 玉米基因组 DNA 提取及浓度测定方法评价[J]. 生物技术通报, 2011, 12(12): 70-75.
- [2] LIN X H, XU Y H, CHENG J, et al. Heterogeneity of bla (IND) metallo-beta-lactamase-producing *Chryseobacterium indologenes* isolates detected in Hefei, China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(5): 398-400.
- [3] MATSUMOTO T, NAGATA M, ISHIMINE N, et al. Characterization of CIA-1, an amblar class a extended-spectrum β-lactamase from *chryseobacterium indologenes* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(1): 588-590.
- [4] 姜伟, 解春宝, 罗江蓉, 等. 2012—2014 年产吡啶金黄杆菌的临床分离情况及耐药性变迁[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(8): 921-923.
- [5] 解春宝, 罗天华, 罗江蓉, 等. 临床分离的产吡啶金黄杆菌耐药谱分析[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(10): 1725-1727.
- [6] 陈开森, 廖晚珍, 彭卫华, 等. 产金属酶金黄杆菌对药敏谱的影响[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(6): 463-464.
- [7] YAO X J. Analyze the clinical distribution and drug-resistant spectrum of 56 *Chryseobacterium indologene* strains[J]. Chinese Journal of Misdiagnotics, 2010, 10(30): 7554-7555.
- [8] BHUYAR G, JAIN S, SHAH H, et al. Urinary tract infection by *Chryseobacterium indologenes*[J]. Indian J Med Microbiol, 2012, 30(3): 370-372.
- [9] SUDHARANI V, ASIYA, SAXENA N K. *Chryseobacterium indologenes* bacteraemia in a preterm baby[J]. Indian J Med Microbiol, 2011, 29(2): 196-198. (下转第 26 页)

血管内皮功能较健康者差,高血压合并高脂血症者较单纯高血压及单纯高脂血症者血管内皮功能损伤更加严重。

PWV 是指脉搏波在动脉两点之间的传播速度,其受血管壁的厚度、弹性、血液黏滞性的影响,同时与动脉的僵硬程度密切相关,因此 PWV 可反映动脉僵硬程度,被称为评估动脉硬化程度的“金标准”。王焱等^[11]研究认为 PWV 与冠心病的病变程度相关。胡琛亮等^[12]通过研究发现冠心病/高血压病患者的 PWV 水平明显高于健康者,冠心病合并高血压患者的 PWV 升高更为显著,提示后者的动脉硬化程度更为严重。且该研究显示糖尿病患者血脂异常与 ba-PWV 升高相关,尤其是 TG 升高与 ba-PWV 升高独立相关。本研究结果表明,高血压及高脂血症者 PWV 水平明显升高,高血压合并高脂血症者 PWV 较单纯高血压及单纯高脂血症者更加明显,提示高血压合并高脂血症患者动脉硬化程度更加明显。

综上所述,本研究结果显示,高血压及高脂血症患者炎性反应及血管内皮功能损伤明显,且动脉僵硬度增加;高血压合并高脂血症患者的改变更加明显。因此可以认为高血压合并高脂血症患者发生心脑血管疾病的风险更大,需引起临床更多关注。

参考文献

[1] CORRETTI M C, ANDERSON T J, BENJAMIN E F, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(2): 257-265.

[2] 杨光, 吴云涛, 阮晓兰, 等. 糖尿病、高血压人群心脑血管事件的发生情况及影响因素[J]. 中华高血压杂志, 2014, 22(12): 1132-1138.

[3] 刘晓玲. 高脂血症合并高尿酸血症与冠心病的相关性研究[J]. 河北医药, 2016, 38(22): 3437-3439.

[4] 刘悦, 毕齐, 刘向荣. 高血压、糖尿病、高脂血症对老年脑梗死患者颈动脉粥样硬化的作用[J]. 实用老年医学, 2016, 30(1): 58-60.

[5] 胡良煜, 上官改珍. 超敏 C 反应蛋白在动脉硬化性疾病诊疗中的作用[J]. 西北国防医学杂志, 2013, 34(1): 60-62.

[6] 肖体梅. 超敏 C 反应蛋白与高血压相关性分析[J]. 中国实用医药, 2015, 10(18): 109-110.

[7] 宋艳, 王振涛. 不稳定型心绞痛血清高敏 C 反应蛋白与不同类型血脂异常临床研究[J]. 医药论坛杂志, 2010, 23(2): 145-146.

[8] STEED M M, TYAGI S C. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(7): 1927-1943.

[9] CHIHA J, MITCHELL P, GOPINATH B, et al. Prediction of coronary artery disease extent and severity using pulse wave velocity[J]. PLoS One, 2016, 22(11): 12-14.

[10] 王燕, 李琳, 丛伟红, 等. 原发性高血压与血管内皮功能的相关性分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(3): 395-399.

[11] 王焱, 赵存瑞, 徐鲲. 高血压病和冠心病患者脉搏波传导速度分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(10): 1026-1030.

[12] 胡琛亮, 李勉, 毕宇芳, 等. 糖尿病脂代谢异常与脉搏波传导速度相关性分析[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(5): 394-395.

(收稿日期: 2018-07-01 修回日期: 2018-09-18)

(上接第 22 页)

[10] HENDAUS M A, ZAHRAALDIN K. Chryseobacterium indologenes meningitis in a healthy newborn: a case report [J]. Oman Med J, 2013, 28(2): 133-134.

[11] MUKEERJI R, KAKARALA R, SMITH S J, et al. Chryseobacterium indologenes: an emerging infection in the USA[J]. BMJ Case Rep, 2016, 83(19): 1-4.

[12] RADERA S, TRIPATHI S, AGARWAL J, et al. Chryseobacterium indologenes-associated pneumonia in 2 neonates[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(3): 337-339.

[13] LI J H, SHI D Y, LI Y J, et al. Detection of metallo-β-lactamase produced by chryseobacterium indologenes and their MBL-INDuniv genotypes[J]. Journal of Hebei Medical University, 2011, 32(1): 62-65.

[14] LIN X H, LI T, ZHU M, et al. Detection of metallo-β-lactamase produced by chryseobacterium indologenes and their genotypes[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2008, 18(1): 17-21.

[15] WANG T, JIANG X, FENG C, et al. Whole genome sequencing uncovers a novel IND-16 metallo-β-lactamase from an extensively drug-resistant Chryseobacterium indologenes strain J31[J]. Gut Pathog, 2016, 47(8): 1-8.

[16] YU C Y, ANG G Y, CHENG H J, et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant Chryseobacterium indologenes isolate from Malaysia[J]. Genom Data, 2016, 34(7): 185-186.

(收稿日期: 2018-06-27 修回日期: 2018-09-14)