

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.18.005

# ICU 多重耐药铜绿假单胞菌产氨基糖苷类修饰酶基因的研究\*

彭咏麟, 刘立君

湖南省衡阳市中心医院检验科, 湖南衡阳 421001

**摘要:**目的 探讨重症监护室多重耐药铜绿假单胞菌产氨基糖苷类修饰酶基因的表达。方法 采用 PCR 检测 60 株多重耐药铜绿假单胞菌的 4 种氨基糖苷类修饰酶基因 ant(2'')-I、ant(3'')-I、anc(6')-I 和 anc(6')-II。结果 60 株多重耐药铜绿假单胞菌中检测到含有氨基糖苷类修饰酶基因的菌株共 16 株, 检出率为 26.67% (16/60); 8 株含 ant(2'')-I 基因, 检出率为 13.33% (8/60); 10 株含有 anc(6')-II 基因, 检出率为 16.67% (10/60); 其中两株同时含 ant(2'')-I 基因和 anc(6')-II 基因, 未检测出 ant(3'')-I 和 anc(6')-I 基因。结论 重症监护室多重耐药铜绿假单胞菌中氨基糖苷类修饰酶基因的表达率较高, 氨基糖苷类修饰酶介导的耐药在多重耐药铜绿假单胞菌的耐药机制中占有重要的地位。

**关键词:**铜绿假单胞菌; PCR; 氨基糖苷类修饰酶; 重症监护室

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)18-2607-03

## Study on the production of aminoglycoside-modifying enzyme gene from ICU multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*\*

PENG Yonglin, LIU Lijun

Department of Clinical Laboratory, Hengyang Central Hospital, Hengyang, Hunan 421001, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of aminoglycoside-modifying enzyme gene produced by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) in ICU. **Methods** Four aminoglycoside modifying enzyme genes [ant(2'')-I, ant(3'')-I, anc(6')-I and anc(6')-II] of 60 multidrug-resistant *P. aeruginosa* were detected by PCR. **Results** A total of 16 strains containing aminoglycoside modifying enzyme gene were detected in 60 multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains, and the rate was 26.67% (16/60). And 8 strains (13.33%) contained ant(2'')-I gene, 10 strains (16.67%) contained the anc(6')-II gene, 2 of which contained both the ant(2'')-I gene and the anc(6')-II gene, and ant(3'')-I and anc(6')-I gene were not detected. **Conclusion** The multidrug-resistant *P. aeruginosa* in the ICU of this region has a high expression rate of aminoglycoside-modifying enzyme gene, and drug resistance resulted by aminoglycoside-modifying enzyme plays an important role in the resistance mechanism of multidrug-resistant *P. aeruginosa*.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; PCR; aminoglycoside-modifying enzyme; intensive care unit

随着大量广谱抗菌药物的广泛和不合理应用, 铜绿假单胞菌对氨基糖苷类药物的耐药性日趋严重。而氨基糖苷类修饰酶介导耐药的多重耐药铜绿假单胞菌可引起呼吸道感染、泌尿道感染、菌血症、心内膜炎和囊性纤维变性等疾病, 往往会给重症监护室(ICU)合并感染的患者带来更为严重的后果和经济损失。本研究通过 PCR 检测 4 种氨基糖苷类修饰酶基因 ant(2'')-I、ant(3'')-I、anc(6')-I 和 anc(6')-II, 探讨其在 ICU 多重耐药铜绿假单胞菌中的表达情况, 分析多重耐药铜绿假单胞菌中氨基糖苷类修饰酶介导的耐药机制, 从而为 ICU 临床医师的合理用药提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 选择 2017 年 1 月至 2018 年 12 月本院 ICU 临床标本中分离的 60 株多重耐药铜绿假单胞菌株为研究对象, 所有试验菌株均经法国生物梅里埃公司 VITEK-2 型全自动细菌鉴定/药敏分析系统鉴定。质控菌株为 ATCC27853。

**1.2 试剂与仪器** Taq DNA 聚合酶、10×Taq 缓冲液、三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、100 bp 分子标记物、1 kb 分子标记物, 均购自天根生化科技有限公司; LB 肉汤培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司; 低温高速离心机和 PCR 扩增仪为 Eppendorf 公

\* 基金项目: 湖南省卫生和计划生育委员会基金项目(湘卫计委 B2015-158)。

作者简介: 彭咏麟, 男, 副主任技师, 主要从事微生物耐药机制方面的研究。

公司产品;电泳仪为北京六一仪器厂产品;生物安全柜为 Thermo 公司产品;Genegenius 紫外凝胶成像分析系统为基因公司产品。PCR 引物为 rpsL 管家基因,参考 www.pseudomonas.com/(ID: PA4268) 上的 rpsL 基因序列自行设计,所有引物委托 Invitrogen 公司合成。见表 1。

表 1 待扩增基因引物序列

基因名称	5'→3'	长度(bp)
rpsL-F	ATACACCACCAGCCGAAA	226
rpsL-R	CTGCTTACGGTCTTTGACACC	
ant(2'')-I-F	GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG	320
ant(2'')-I-R	CTGTTACAACGGACTGGCCGC	
ant(3'')-I-F	TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	284
ant(3'')-I-R	CGTATGTTCTCTTGCTTTG	
anc(6')-I-F	TATGAGTGGCTAAACGA	394
anc(6')-I-R	CCCCTTTCTCGTAGCA	
anc(6')-II-F	TTCATGTCCGCGAGCACCCC	178
anc(6')-II-R	GACTCTTCCGCCATCGCTCT	

注:F 为正向引物序列;R 为反向引物序列

**1.3 方法** 采用 PCR 检测 4 种氨基糖苷类修饰酶基因 ant(2'')-I、ant(3'')-I、anc(6')-I 和 anc(6')-II。

**1.3.1 细菌 DNA 提取** 用接种环挑取纯菌落接种于 5 mL 的 LB 肉汤培养液,将装有 LB 肉汤培养液的试管置于震荡培养箱中,37 °C,200 r/min,18~20 h 培养至细菌生长对数期。然后取 3 mL 培养液,按照天根生化科技有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明进行操作,提取的 DNA 模板置于 -20 °C 保存备用。

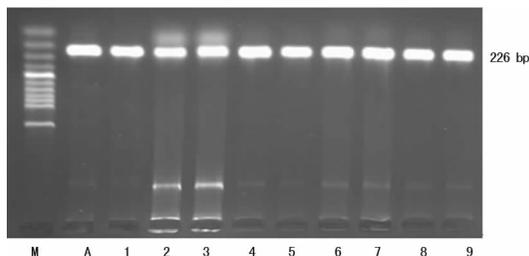
**1.3.2 PCR 检测修饰酶基因** PCR 反应体系设置参照天根公司 Taq DNA 聚合酶说明:模板 1.5 μL,正向引物(primer-F)0.5 μL,反向引物(primer-R)0.5 μL,10×Taq 缓冲液 2.5 μL,dNTP 混合物 2 μL,Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)补至 25 μL。PCR 反应循环:94 °C、4 min,94 °C、30 s,55 °C、30 s,72 °C、40 s (30 个循环);72 °C、4 min。PCR 产物电泳分析:取 5 μL 扩增产物与 1 μL 6×上样缓冲液混匀,点样于 1%琼脂糖凝胶,在 120 V 电压下电泳 30 min;出现条带后,用凝胶成像系统观察条带并照相。阳性产物送 Invitrogen 公司测序,所得测序结果在 GenBank 数据库进行同源性比对。

**1.4 统计学处理** 采用 Microsoft Excel2010 对数据进行整理。

**2 结 果**

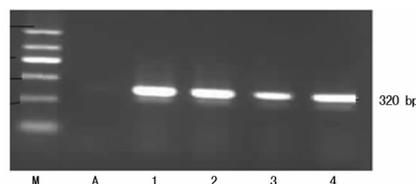
所有菌株均能扩增出 rpsL 基因条带,见图 1。60 株多重耐药铜绿假单胞菌中检测到含有氨基糖苷类修饰酶基因的菌株共 16 株,检出率为 26.67%(16/60)。8 株含 ant(2'')-I 基因,检出率为 13.33%(8/60),见图 2。10 株含有 anc(6')-II 基因,检出率为 16.67%(10/60),见图 3;其中两株同时含 ant(2'')-I

基因和 anc(6')-II 基因,未检测出 ant(3'')-I 和 anc(6')-I 基因。PCR 阳性产物随机各选取 1 例送 Invitrogen 公司测序,测序结果在 GenBank 进行同源性比对,比对结果显示,ant(2'')-I 基因和登录号为 CP033131.1 和 CP029090.1 的 ant(2'')-I 基因同源性为 100%,anc(6')-II 基因与登录号为 CP036294.1 的铜绿假单胞菌的 anc(6')-II 基因同源性为 100%。



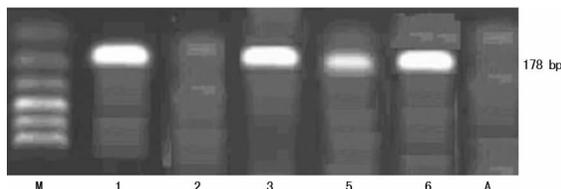
注:M 为标记物;A 为 ATCC27853;1~9 为多重耐药铜绿假单胞菌菌株

图 1 rpsL 基因 PCR 产物电泳图



注:M 为标记物;A 为 ATCC27853;1~4 为多重耐药铜绿假单胞菌菌株

图 2 ant(2'')-I 基因扩增产物



注:M 为标记物;A 为 ATCC27853;1、2、3、5、6 为多重耐药铜绿假单胞菌菌株

图 3 anc(6')-II 基因扩增产物

**3 讨 论**

近年来,氨基糖苷类药物的广泛使用导致细菌对其耐药的现象越来越严重,这种现象在 ICU 中表现得尤为突出<sup>[1-2]</sup>。细菌对氨基糖苷类药物的耐药性主要取决于氨基糖苷类药物修饰酶,氨基糖苷类药物修饰酶主要有 N-乙酰转移酶(AAC)、O-核昔转移酶(ANT)等,它主要通过共价修饰的方式使氨基糖苷类药物与核糖体的结合减少,促进药物摄取能量依赖期阶段二(EDP-II)也被阻断,从而导致耐药<sup>[3-6]</sup>。AAC 可以催化氨基糖苷类抗菌药物 1、3、6' 和 2' 位点氨基的乙酰化反应,其中 anc(6')-I 主要与阿米卡星的耐药相关,anc(6')-II 与庆大霉素和妥布霉素的耐药相关<sup>[7]</sup>。ANT 的作用主要是使氨基糖苷类抗菌药物腺昔化而失活,其中 ant(2'')-I 可使庆大霉素和妥布霉素失活,但对奈替米星无修饰作用;ant(3'')-I 与链霉素的耐药有关<sup>[8-9]</sup>。

由于缺乏相应氨基糖苷类修饰酶基因的阳性标本做阳性对照,本研究将铜绿假单胞菌的管家基因 rpsL 作为相对的阳性对照基因进行测试,所有试验菌株均能扩增出 rpsL 基因条带。铜绿假单胞菌质控菌株 ATCC27853 为本研究的阴性对照。

本研究中 60 株分离于 ICU 的多重耐药铜绿假单胞菌中检测到含有氨基糖苷类修饰酶基因的菌株共 16 株,检出率为 26.67%,说明氨基糖苷类修饰酶介导的耐药在 ICU 多重耐药铜绿假单胞菌的耐药机制中占有重要的地位。但本研究氨基糖苷类修饰酶基因 26.67% 的检出率与据秦淑国<sup>[10]</sup>报告的氨基糖苷类修饰酶基因高达 60% 差异较大,可能与菌株的来源科室不同有关,也可能与地区差异性 or 菌株异质性有关。本研究 60 株分离于 ICU 的多重耐药铜绿假单胞菌中有 10 株含有  $\text{anc}(6')\text{-II}$  基因,检出率为 16.67%; 8 株含  $\text{ant}(2'')\text{-I}$  基因,检出率为 13.33%,说明了 ICU 多重耐药铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶基因导致的耐药机制中以  $\text{anc}(6')\text{-II}$  基因表达的 AAC 为主,  $\text{ant}(2'')\text{-I}$  基因表达的 ANT 次之。本研究未检测出  $\text{ant}(3'')\text{-I}$  和  $\text{anc}(6')\text{-I}$  基因,说明 ICU 多重耐药铜绿假单胞菌可能对阿米卡星和链霉素敏感。因此从本研究中可以看出,ICU 临床医师需要加强对氨基糖苷类药物的合理使用,在治疗 ICU 多重耐药铜绿假单胞菌感染的患者过程中使用的一线药物中尽量避免使用庆大霉素,而可以使用阿米卡星。彭敬红等<sup>[11]</sup>报道指出,其研究的 6 种氨基糖苷类修饰酶基因检出率与其他人的研究差异较大,本研究也有相似结果。同时,王娜等<sup>[12]</sup>、YOON 等<sup>[13]</sup>、SHEIKHALIZADEH 等<sup>[14]</sup>和 MOKHTARI 等<sup>[15]</sup>研究分别表明,肺炎克雷伯菌和多重耐药鲍曼不动杆菌存在多种氨基糖苷类修饰酶基因和 16S rRNA 甲基化酶基因,这可能是由于一种氨基糖苷类药物可以被多种氨基糖苷类修饰酶修饰,或多种氨基糖苷类药物被一种氨基糖苷类修饰酶修饰,从而导致不同氨基糖苷类药物之间存在不完全的交叉耐药现象,也可能存在可移动元件(转座子和质粒)或整合子携带氨基糖苷类修饰酶基因播散所致。本研究中两株同时检测出  $\text{ant}(2'')\text{-I}$  基因和  $\text{anc}(6')\text{-II}$  基因,这种现象提示医院感染控制部门既需要采取适当的措施控制这些耐药基因的产生,又需要合理的手段来防止这些耐药基因的播散。

## 参考文献

- [1] 杨艳,王厚照,张玲. 多重耐药鲍曼不动杆菌氨基糖苷类修饰酶与 16S rRNA 甲基化酶基因的研究[J]. 微生物学杂志,2017,379(4):28-33.
- [2] 陈璐,查筑红,冷应蓉,等. 铜绿假单胞菌的耐药性及耐药

基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(8):1837-1839.

- [3] 刘晓丹,刘宝,胡智成,等. 阴沟肠杆菌质粒介导氨基糖苷类耐药基因检测及同源性分析[J]. 中国抗生素杂志,2018,43(5):525-529.
- [4] 柳晓蕾,郭文臣,杨宝宏,等. 多重耐药鲍氏不动杆菌耐药性及部分耐药基因检测[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28(15):13-16.
- [5] 黄彬,陈茶,汤晓丽,等. 肺炎克雷伯菌对喹诺酮类及氨基糖苷类耐药基因检测及耐药机制分析[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(1):5-7.
- [6] PERUMAL N, MURUGESAN S, KRISHNAN P. Distribution of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci[J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34(3): 350-352.
- [7] 汪宏良,邹义春,柯俊,等. 多药耐药铜绿假单胞菌 16S rRNA 甲基化酶、氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(11):1505-1508.
- [8] 范友芬,崔胜勇,张淳,等. 烧伤患者铜绿假单胞菌获得性耐药基因和菌株亲缘性研究[J]. 中华烧伤杂志,2018,34(2):83-87.
- [9] GHOTASLOU R, YEGANEH SEFIDAN F, AKHI M T, et al. Dissemination of Genes Encoding Aminoglycoside-modifying Enzymes and armA Among Enterobacteriaceae Isolates in Northwest Iran[J]. Microb Drug Resist, 2017, 23(7): 826-832.
- [10] 秦淑国. 多重耐药铜绿假单胞菌耐药基因检测及耐药特性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(13):2240-2241.
- [11] 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类修饰酶基因的研究[J]. 检验医学,2015,30(6):613-616.
- [12] 王娜,韩博,郝玲,等. 呼吸道感染肺炎克雷伯菌氨基糖苷类修饰酶基因分布及耐药性检测[J]. 中国病原生物学杂志,2015,10(4):359-362.
- [13] YOON E J, GOUSSARD S, NEMEC A, et al. Origin in Acinetobacter gyllenbergii and dissemination of aminoglycoside-modifying enzyme AAC(6')-Ih[J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(3): 601-606.
- [14] SHEIKHALIZADEH V, HASANI A, REZAAE M A, et al. Comprehensive study to investigate the role of various aminoglycoside resistance mechanisms in clinical isolates of Acinetobacter baumannii [J]. J Infect Chemother, 2017, 23(2): 74-79.
- [15] MOKHTARI H, ESLAMI G, ZANDI H, et al. Evaluating the Frequency of  $\text{aac}(6')\text{-IIa}$ ,  $\text{ant}(2'')\text{-I}$ ,  $\text{intI1}$ , and  $\text{intI2}$  Genes in Aminoglycosides Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates Obtained from Hospitalized Patients in Yazd, Iran[J]. Avicenna J Med Biotechno, 2018, 10(2): 115-119.