

• 基础实验研究论著 •

# 多重耐药铜绿假单胞菌氨基糖苷类修饰酶基因的检测及分析\*

王娟<sup>1</sup>, 王前<sup>2</sup>, 兰海丽<sup>1</sup>, 张秀明<sup>1△</sup>, 罗燕华<sup>1</sup>, 郭秋玲<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属中山市人民医院检验医学中心, 广东中山 528403;

2. 南方医科大学附属南方医院检验医学中心, 广东广州 510515)

**摘要:**目的 探讨多重耐药铜绿假单胞菌的氨基糖苷类药物的耐药机制。方法 分离出 50 株多重耐药铜绿假单胞菌, PCR 法检测 4 种氨基糖苷类修饰酶(AMEs)基因, 即 aac(6')-I、aac(6')-II、ant(3'')-I、ant(2'')-I 的表达情况。并用 MLVA 基因分型的方法对菌株进行聚类分析。结果 50 株铜绿假单胞菌中, 4 种 AMEs 基因的总检出率为 70%。aac(6')-I、aac(6')-II、ant(3'')-I、ant(2'')-I 的检出率分别为 60%、40%、24%、32%。MLVA 基因分析聚类结果显示, 没有多重耐药铜绿假单胞菌的暴发流行。结论 多重耐药铜绿假单胞菌的 AMEs 基因携带率较高, 没有发现其暴发流行。

**关键词:**假单胞菌, 铜绿; 多重耐药; 氨基糖苷类; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0266-03

## Study and analysis of the aminoglycosides genes of the multi-drug resistance *Pseudomonas aeruginosa*\*

Wang Juan<sup>1△</sup>, Wang Qian<sup>2</sup>, Lan Haili<sup>1</sup>, Zhang Xiuming<sup>1</sup>, Luo Yanhua<sup>1</sup>, Guo Qiuling<sup>1</sup>

(1. Department of Examination Medical Center, Zhongshan Affiliated Hospital of Sun

Yat-Sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China; 2. Laboratory Medicine Department, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

**Abstract:** Objective To explore the resistant mechanism to aminoglycosides among multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*(PA) strains. Methods Four kinds of aminoglycosides modification enzymes(AMEs) genes were detected by PCR method in 50 strains of multi-drug resistant PA. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA) method was used to analyze the relationship of the strains. Results AMEs genes could be detected in 35 of all 50 PA strains(70%). The detected rate of the four types of genes was ordered as aac(6')-I(60%), aac(6')-II(40%), ant(2'')-I(32%) and ant(3'')-II(24%). The result of the MLVA genotype indicated that there was not the fulminate epidemiological feature of multi-drug resistant PA. Conclusion The essential mechanisms of aminoglycoside-resistance in PA might be with the producing of AMEs. In addition, the fulminate infection was not found.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; multi-drug resistance; aminoglycosides; genotype

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)为条件致病菌, 近年来成为医院感染的重要病原菌之一<sup>[1]</sup>。随着临床的广泛和不科学使用, PA 对氨基糖苷类抗菌药物的耐药性逐年增高<sup>[2]</sup>。细菌对其耐药主要是由于细菌产生氨基糖苷类修饰酶(aminoglycosides-modifying enzymes, AMEs)对进入细胞内的药物分子进行修饰使之失去生物活性而耐药<sup>[3-4]</sup>。由于 AMEs 的基因型分布具有明显的地域性, 且不同基因型的流行特征也不同。因此, 了解不同地区 PA 的 AMEs 基因型有助于治疗和控制产 AMEs 菌的流行。本研究对分离于 2010 年 6~12 月期间的 50 株多重耐药 PA 菌株的 AMEs 基因型进行了分析研究。

### 1 材料与方法

**1.1 实验菌株** 50 株 PA 均分离于广东中山大学附属中山医院 2010 年 6~12 月住院患者的临床标本。标本类型分别为痰液 37 例、伤口分泌物 8 例、中段尿 5 例。阳性对照菌株为鲍曼不动杆菌, 为本实验室分离保存。

**1.2 菌种鉴定及药敏试验** 采用全自动细菌鉴定系统 VITEK 2 Compact 系统(梅里埃, 法国)进行鉴定及药敏测定。

**1.3 AMEs 基因检测** 采用煮沸的方法提取菌株 DNA<sup>[5]</sup>。

引物序列参照文献<sup>[6]</sup>, 由上海生工合成(见表 1)。实验采用 20 μL 的反应体系, 其中 TaqE、反应缓冲液、dNTP 混合液 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL, 标本 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL。反应条件: 预变性 94 ℃ 10 min, 94 ℃ 变性 1 min, 60 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 25 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 出现与阳性对照相对分子质量相当的片段判为阳性。

表 1 氨基糖苷类修饰酶基因的引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)
aac(6')-I	P1:TATGAGTGGCTAAATCGAT	394
	P2:CCCGCTTCTCGTAGCA	
aac(6')-II	P1:TTCATGTCCGCGAGCACCCC	178
	P2:GACTCTCCGCCATCGCTCT	
ant(3'')-I	P1:TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	284
	P2:CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	
ant(2'')-I	P1:GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG	320
	P2:CTGTTACAACGGACTGGCCCG	

**1.4 MLVA**(multiple-locus variable-number tandem repeat a-

\* 基金项目: 中山市科技计划项目(20122A033)。 作者简介: 王娟, 女, 博士, 主要从事结核分枝杆菌的耐药和其他病原菌耐药方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: zxm0760@163.com。

nalys)基因分型 分析 50 株菌株的 7 个 VNTR(variable-number tandem repeat analysis)位点的多态性,引物序列见表 2<sup>[7]</sup>。PCR 的反应体系及反应条件同上。采用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,100 bp DNA Marker(宝生物,大连)作为标准

来确定位点分子量的大小,以标准菌株 PAO1 作为对照。使用 Image Lab 软件(伯乐,美国)来计算每个位点的重复个数。使用 R 2.14.1 软件对菌株的基因型进行聚类分析<sup>[8]</sup>。

表 2 7 个位点的引物序列

位点名称	引物名称	引物序列(5'-3')	重复单位大小(bp)	PAO1 的大小(重复个数)
ms142	ms142-L	AGCAGTGCCAGTTGATGTTG	115	890(7)
	ms142-R	GTGGGGCGAAGGAGTGAG		
ms211	ms211-L	ACAAGCGCCAGCCGAACCTGT	101	663(5)
	ms211-R	CTTCGAACAGGTGCTGACCGC		
ms212	ms212-L	TGCTGGTTCGACTACTTCGGCAA	40	522(9)
	ms212-R	ACTACGAGAACGACCCGGTGT		
ms213	ms213-L	CTGGGCAAGTGTGGTGGATC	103	640(5)
	ms213-R	TGGCGTACTCCGAGCTGATG		
ms215	ms215-L	GACGAAACCCGTCGCGAACA	129	765(4)
	ms215-R	CTGTACAACGCCGAGCCGTA		
ms217	ms217-L	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT	109	606(2)
	ms217-R	GAACAGCGTCTTTTCCTCGC		
ms222	ms222-L	AGAGGTGCTTAACGACGGAT	101	390(2)
	ms222-R	TGCAGTTCTGCGAGGAAGGCG		

2 结 果

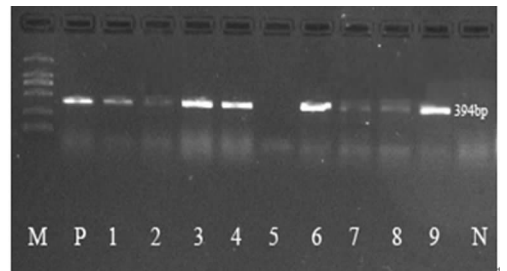
2.1 耐药表型结果 50 株 PA 对阿米卡星、庆大霉素 2 种氨基糖苷类药物的不敏感率为 100%。其他 11 种药物的敏感性见表 3。

表 3 50 株多重耐药铜绿假单胞菌对 13 种抗菌药物的敏感性

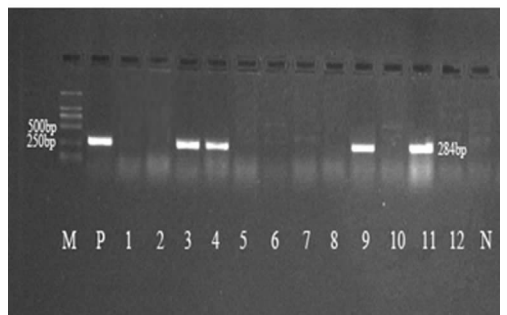
抗菌药物	敏感		中介		耐药	
	菌株数	百分比%	菌株数	百分比%	菌株数	百分比%
庆大霉素	0	0	1	2	49	98
阿米卡星	0	0	4	8	46	92
妥布霉素	2	4	4	8	44	88
环丙沙星	3	6	3	6	44	88
左氧氟沙星	2	4	0	0	48	96
氨曲南	27	54	3	6	20	40
亚胺培南	34	68	1	2	15	30
美罗培南	34	68	5	10	11	22
哌拉西林	2	4	0	0	48	96
派拉西林/他唑巴坦	20	40	0	0	30	60
头孢他啶	15	30	2	4	33	66
头孢吡肟	10	20	2	4	38	76
头孢曲松	4	8	16	32	30	60

别为 40%(20/50)、24%(12/50)、32%(16/50)。AMEs 基因总检出率为 70%(35/50)。其中有 15 株未检出 AMEs 基因,其中 10 株检出一种 AMEs 基因,10 株检出 2 种 AMEs 基因,5 株检出 3 种 AMEs 基因,2 株同时检出 4 种 AMEs 基因。

2.2 AMEs 基因检测的结果 图 1 为 ant(3'')-I 和 aac(6')-I PCR 扩增结果。50 株多重耐药 PA 对 4 种 AMEs 基因的检测结果中,aac(6')-I 的检出率最高,为 60%(30/50)。其余 3 个基因的检出率结果,aac(6')-II、ant(3'')-I、ant(2'')-I 的检出率分



1 (a)



1 (b)

1(a)为 aac(6')-I 的 PCR 扩增电泳图;1(b)为 ant(3'')-I 的 PCR 扩增电泳图;M:DL200 DNA 标志物;P:阳性对照;N:阴性对照;1~12 为临床菌株。

图 1 ant(3'')-I 和 aac(6')-I PCR 扩增结果

**2.3 MLVA 基因分型结果** 本研究中,使用 MLVA 基因分型方法对 50 株多重耐药 PA 进行基因分析,聚类分析(图 2)。从图中可以看出,4 个菌株成 2 簇,分为 1 和 3 为一簇,17 和 26 为一簇。菌株 1,3 为痰标本分离,但分别位于 ICU 和呼吸内科,菌株 17 和 26 分别分离于尿标本和痰标本,来自于肾内科和 ICU。在 AMEs 的扩增结果中,菌株 1 是 *aac(6')*-I 和 *ant(2'')*-I 为阳性,菌株 3 是 *ant(3'')*-I 和 *aac(6')*-I 为阳性。菌株 17 为 *aac(6')*-I、*ant(2'')*-I 和 *ant(3'')*-I 为阳性,菌株 26 只有 *aac(6')*-II 基因为阳性。

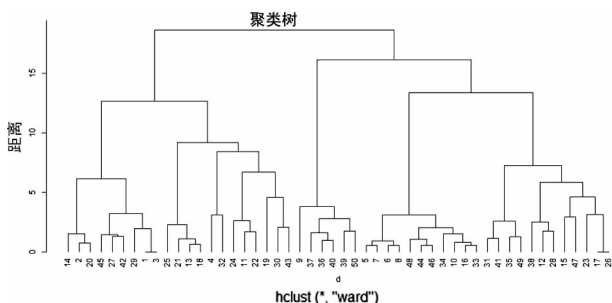


图 2 50 株多重耐药菌株的 MLVA 基因聚类图

**3 讨论**

氨基糖苷类药物通过与细菌 30S 核糖体亚基高度保守的 A 位点不可逆地结合抑制细菌蛋白质的合成从而导致细菌死亡。细菌产生的 AMEs 能够对氨基糖苷类药物分子中特定的氨基和羟基进行共价修饰使得药物与细菌核糖体的结合能力大大降低,从而导致耐药<sup>[9]</sup>。AMEs 灭活氨基糖苷类药物的机制非常复杂。截止目前,已发现超过 50 种 AMEs,其中在 PA 中存在的有 10 多种。最常见的是 *aac(6')*-II 和 *ant(2'')*-I<sup>[10]</sup>。本研究中,多重耐药 PA 菌株中 AMEs 基因的总检出率为 70%,其中,*aac(6')*-I 的检出率最高(60%),其次为 *aac(6')*-II、*ant(2'')*-I、*ant(3'')*-I。与国内文献报道的流行基因型有一定差别。史伟峰等<sup>[11]</sup>的研究显示,AMEs 基因的检出中,*aac(6')*-II 和 *ant(2'')*-I 的检出率最高,分别为 60% 和 65%,未发现 *ant(3'')*-I 基因的存在。糜祖煌和秦玲<sup>[12]</sup>的研究结果中,*ant(2'')*-I 基因检出的阳性率最高,为 63.6%,*ant(3'')*-I 的阳性率为 48.5%。可能与各地区常用的氨基糖苷类药物不同有关,表明了地域性。其中 AMEs 基因的菌株比例有 34%(17/50),说明多重耐药机制有共存现象。

MLVA 基因分型结果中,有 2 个簇菌株存在,但从患者的资料中看来,簇菌株不存在流行病学上的联系,没有暴发流行的存在。

AMEs 基因流行特点的研究,对于合理应用氨基糖苷类抗菌素,延缓耐药的产生具有重要意义。PCR 方法具有灵敏度高、特异性好的特点,且适于大规模的流行病学调查,该方法的使用有利于耐药菌株的监控。

**参考文献**

- [1] 徐延模,杨薇,赵和平. 6 543 例住院患者医院感染的临床调查分析[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(1):27-28.
- [2] Paterson DL. The epidemiological profit of infections with multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species [J]. Clin Infect Dis,2006,43(Suppl 2):43-48.
- [3] 蔡培泉,赵琪,王春新,等. 临床分离革兰阴性杆菌氨基糖苷类修饰酶基因的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2004,14(12):1332-1335.
- [4] Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation; emerging resistance mechanism against aminoglycosides[J]. Clin Infect Dis, 2007,45(1):88-94.
- [5] Tanaka M, Takahashi K, Matsumoto T, et al. Development of fluoroquinolone resistance and mutations involving GyrA and ParC proteins among *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Japan [J]. J Urol,1998,159(8):2215-2219.
- [6] 糜祖煌,陆亚华. 氨基糖苷类修饰酶及其基因检测[J]. 现代实用医学,2004,16(1):13-16.
- [7] Vu-Thien H, Corbinea G, Hormigos K, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients[J]. J Clin Microbiol,2007,45(10):3175-3183.
- [8] Wang J, Liu Y, Zhang CL, et al. Genotypes and characteristics of clustering and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Heilongjiang Province, China[J]. J Clin Microbiol,2011,49(4):1354-1362.
- [9] 郑卫. 氨基糖苷类抗生素研究的新进展[J]. 国外医药:抗生素分册,2005,26(3):101-110.
- [10] Poole K. Aminoglycoside resistance in *pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother,2005,49(2):479-487.
- [11] 史伟峰,王玉月,何彩珍,等. 铜绿假单胞菌氨基糖苷类药物修饰酶基因研究[J]. 检验医学,2007,22(1):67-70.
- [12] 糜祖煌,秦玲. 泛耐药铜绿假单胞菌 16S rRNA 甲基化酶、氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中环医院感染学杂志,2008,18(12):1656-1658.

(收稿日期:2012-09-12)

(上接第 265 页)

profiling of [14C]hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine(RDX) in Yucatan miniature pigs[J]. J Toxicol Environ Health A,2007,70(14):1191-1202.

- [5] Reddy G, Erexson GL, Cifone MA, et al. Genotoxicity assessment of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine(RDX)[J]. Int J Toxicol,2005,24(6):427-434.
- [6] Meyer SA, Marchand AJ, Hight JL, et al. Up-and-down procedure (UDP) determinations of acute oral toxicity of nitroso degradation products of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine(RDX)[J]. J Appl Toxicol,2005,25(5):427-434.
- [7] Crouse LC, Michie MW, Major MA, et al. Oral bioavailability of

cyclotrimethylenetrinitramine(RDX) from contaminated site soils in rats[J]. Int J Toxicol,2008,27(4):317-322.

- [8] Krishnan K, Crouse LC, Bazar MA, et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of cyclotrimethylenetrinitramine in male rats[J]. J Appl Toxicol,2009,29(7):629-637.
- [9] Cameron BD. HMX: toxicokinetics of carbon-14-HMX following oral administration to the rat and mouse and intravenous administration to the rat[R]. Edinburgh: Inveresk Res Int Ltd,1986.
- [10] Liu J. Maternal transfer and tissue distribution of HMX in Quail eggs[D]. Texas: Texas Tech University,2007.

(收稿日期:2012-09-09)