

论著·基础研究

基于高通量测序技术的 102 株铜绿假单胞菌耐药基因研究*

方小龙,王莉平,资捷,朱国胜

(广东省深圳市福田区妇幼保健院检验科,广东深圳 518045)

摘要:目的 通过高通量测序技术结合生物信息学分析多重耐药铜绿假单胞菌的耐药基因型。方法 从 246 株铜绿假单胞菌中筛选出多重耐药株,采用碱裂解法提取目的菌的基因组和质粒 DNA 后进行高通量测序,应用生物信息学分析携带的耐药基因。结果 共检出 102 株多重耐药株,21 株广泛耐药株只对多黏菌素 B 敏感。102 株多重耐药铜绿假单胞菌样本经高通量测序产生 reads 32 088 766 条,长度 98 nt,总测序碱基数 3.1 Gb,发现了 8 种抗菌药物耐药类型,含有 21 种耐药基因型,共有 16 个基因存在 69 个核苷酸的多态位点,其中有 8 种基因型 17 个位点发生非同义突变,占总单核苷酸多态性(SNP)位点的 24.6%。结论 运用高通量混合基因组测序技术分析多重耐药病原菌耐药基因具有可行性。

关键词:铜绿假单胞菌; 多重耐药; 高通量测序; 混合基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.002

中图法分类号:R378/R446.5

文章编号:1673-4130(2018)07-0773-03

文献标识码:A

Study on drug resistance genes of 102 strains of *Pseudomonas aeruginosa* based on high throughput sequencing*

FANG Xiaolong, WANG Liping, ZI Jie, ZHU Guosheng

(Department of Clinical Laboratory, Futian District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518045, China)

Abstract: **Objective** To analyze the resistance genes of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by high throughput sequencing and bioinformatics. **Methods** Multiple drug-resistant strains were screened from 246 strains of *Pseudomonas aeruginosa*. The genome and plasmid DNA of target bacteria were extracted by alkaline lysis and sequenced by high throughput. The resistance genes were analyzed by bioinformatics. **Results** 102 strains of multidrug resistant strains were detected, 21 strains of extensively drug resistant strains of polymyxin B sensitive. 102 strains of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* samples by high-throughput sequencing generated reads 32 088 766, the total length of 98 nt, sequencing base 3.1 Gb, 8 types of antibiotic resistance were found, containing 21 kinds of resistant genotypes, a total of 16 polymorphic loci gene had 69 nucleotides, including 8 genotypes of 17 loci the occurrence of non-synonymous mutations, total 24.6% SNP loci. **Conclusion** Analysis of the use of multi drug resistant pathogen resistant bacteria has the feasibility of high-throughput gene sequencing technology hybrid genome.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; multidrug resistance; high throughput sequencing; mixed gene

铜绿假单胞菌属于非发酵革兰阴性杆菌,是医院感染的重要病原菌之一。近些年来,铜绿假单胞菌的耐药性呈现上升趋势,随着第二代高通量测序技术的突破,基因组学和比较基因组学等生物信息学分析方法为研究者深入了解铜绿假单胞菌这一重要病原菌引入了新的研究平台^[1]。本研究应用高通量测序技术对 102 株多重耐药铜绿假单胞菌基因组携带的耐药基因类型的分布情况进行了分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 246 株铜绿假单胞菌临床株来自深圳地区 3 家医院的微生物室,对所收集的菌株用生物梅里埃 VITEK-2 全自动微生物系统进行鉴定和药敏试验,药敏卡里没有的药物用标准纸片扩散(K-B)法进行检测,根据美国 CLSI 2016 年版^[2]要求进行抗菌药物敏感性判断,筛选出多重耐药菌 102 株。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

* 基金项目:深圳市科技研发资金资助项目(JCYJ20150402154553258);深圳市福田区卫生公益性科研项目(FTWS2014033)。

作者简介:方小龙,男,副主任技师,主要从事细菌耐药性检测研究。

本文引用格式:方小龙,王莉平,资捷,等.基于高通量测序技术的 102 株铜绿假单胞菌耐药基因研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(7):

1.2 DNA 的提取、高通量测序 将收集到的 102 株多重耐药铜绿假单胞菌分别接种到 LB 培养基,培养过夜,制成混合菌液。采用碱裂解法试剂盒提取铜绿假单胞菌临床分离株的基因组和质粒 DNA,纯化后送广州赛哲生物公司进行高通量测序。应用 SOAPdenovo 软件进行 Illumina 短序列 denovo 组装^[3]。

1.3 生物信息学分析 采用抗性基因数据库^[4](ARDB)中的 380 种耐药基因的其中一条核苷酸序列作为参考序列,使用 SOAP 系列软件(SOAPsnp),对比高通量测序获得的大量短序列与 380 条参考序列获取铜绿假单胞菌多重耐药株样本中的耐药基因类型。

2 结 果

2.1 铜绿假单胞菌的耐药情况 246 株铜绿假单胞菌共检出 102 株多重耐药菌(含泛耐药菌),泛耐药菌 21 株,分别占 41.5%和 8.5%。铜绿假单胞菌对头孢替坦和呋喃妥因耐药率均为 98.8%;102 株多重耐药铜绿假单胞菌耐药率较高的有头孢替坦(100.0%)、呋喃妥因(100.0%)、头孢他啶(94.1%)、亚胺培南(85.3%)、哌拉西林(90.2%)、哌拉西林/他唑巴坦(88.2%)和头孢吡肟(88.2%);21 株泛耐药铜绿假单胞菌对多黏菌素 B 全部敏感,而对其他 14 种抗菌药物的耐药率为 100.0%。见表 1。

表 1 铜绿假单胞菌对 15 种抗菌药物的耐药率(%)			
抗菌药物	铜绿假单胞菌 (n=246)	多重耐药铜绿 假单胞菌 (n=102)	泛耐药铜绿 假单胞菌 (n=21)
氨曲南	50.4	84.3	100.0
阿米卡星	13.4	32.6	100.0
头孢替坦	98.8	100.0	100.0
环丙沙星	41.4	74.5	100.0
呋喃妥因	98.8	100.0	100.0
头孢吡肟	40.2	88.2	100.0
亚胺培南	45.1	85.3	100.0
头孢他啶	42.7	94.1	100.0
妥布霉素	28.0	52.9	100.0
多黏菌素 B	0.0	0.0	0.0
庆大霉素	28.0	52.9	100.0
左氧氟沙星	32.9	73.5	100.0
哌拉西林/他唑巴坦	40.2	88.2	100.0
哌拉西林	57.3	90.2	100.0
美罗培南	39.4	81.4	100.0

2.2 多重耐药铜绿假单胞菌的混和基因组高通量测序结果 102 株多重耐药铜绿假单胞菌样本经高通量测序产生 reads 32 088 766 条,长度 98 nt,总测序碱基数 3.1 Gb,含有耐药基因 21 种,比对到耐药基因数据库上的 reads 数约占总 reads 的 1.01%。

2.3 多重耐药铜绿假单胞菌的耐药基因型分布及多态性 在多重耐药铜绿假单胞菌的样本中,本研究发现了 8 种抗菌药物耐药类型,含有 21 种耐药基因型,其中氨基糖苷类耐药 4 种, β -内酰胺酶类耐药 4 种,磺胺类耐药 1 种,四环素类耐药 1 种,氯霉素类耐药 1 种,喹诺酮类耐药 2 种,碳青霉烯类耐药 3 种,多重耐药泵类 5 种。共有 16 个基因存在 69 个核苷酸的多态位点,其中有 8 种基因型发生非同义突变,共 17 个位点,占总 SNP 位点的 24.6%。见表 2。

表 2 102 株多重耐药铜绿假单胞菌的耐药基因型分布			
耐药类型	耐药基因	耐药类型	耐药基因
氨基糖苷类	Aac(3)-I	β -内酰胺酶类	OXA-10
	Aac(6')-II		CTX-M
	Aac(3)-II		SHV-2
	Aph(3')-I		PER-1
磺胺类	sulI	喹诺酮类	gyrA
四环素类	TetR		parC
氯霉素类	FloR	多重耐药泵类	MexA
碳青霉烯类	IPM-I		MexX
	IPM-II		MexE
	VIM-I		TetA
			Mex-C

3 讨 论

铜绿假单胞菌是引起医院获得性肺炎和呼吸机相关肺炎最多见的革兰阴性杆菌^[5-7]。随着 β -内酰胺类抗菌药物在临床上的广泛使用,在抗菌药物的选择压力下,铜绿假单胞菌耐药问题日趋严重,表现为多重耐药。CHINET 监测网报告 2016 年铜绿假单胞菌对各种抗菌药物的耐药率仍处于较高水平^[8]。泛耐药的铜绿假单胞菌感染是临床治疗面临的非常棘手的问题。铜绿假单胞菌的多重耐药性限制了许多药物在临床上的使用,本研究 246 株铜绿假单胞菌共检出 102 株多重耐药菌(含泛耐药菌),泛耐药菌 21 株,分别占 41.5%和 8.5%,尚未发现对多黏菌素 B 耐药的铜绿假单胞菌。多黏菌素是由多黏芽胞杆菌产生的一组多肽类抗菌药物,是一种治疗革兰阴性菌感染的有效抗菌药物,且很少产生耐药性,在多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识中,将其选为多重耐药铜绿假单胞菌的首选药物,推荐临床使用^[9]。

近年来,基因组学与蛋白质组学发展迅速,微生物基因组测序已经应用到细菌感染的流行病学和耐药性研究领域^[10-12]。自 2000 年完成了第 1 株铜绿假单胞菌的全基因组序列分析以来,截止 2014 年 1 月,已经完成测序的铜绿假单胞菌基因组共有 29 个^[13]。对于铜绿假单胞菌耐药问题的研究热点,开始由以往断续的基因片段转向完整的全基因组序列,从基因组

水平着手,探讨多重耐药与耐药播散机制。SNYDER 等^[14]对 6 年内的铜绿假单胞菌全基因组测序,在 *lasR*、*nrdG*、*tadZ* 和 *algB* 基因上发现了单核苷酸多态性,揭示了该菌的进化过程。XIONG 等^[15]报道了 96 株铜绿假单胞菌的 POZ176 质粒基因组上有 2 个 1 型整合子及数个插入序列(Tn6016 和 Tn62170, Tn6016 包含 *blaIMP-9*、*aacA4*、*tnpMRA*、*tni* 操纵子及 *mer* 模块, Tn6217 由 *aacA4*、*catB8a*、*blaOXA-10*、*tnpRA* 和含 3'-CS 的 *sul* 组成),该菌进一步验证耐药质粒与铜绿假单胞菌耐药性的获得密切相关。本研究对 102 株多重耐药铜绿假单胞菌的混合基因组测序,发现了 8 种抗菌药物耐药类型,含有 21 种耐药基因型,与该菌的多重耐药表型相符,其中 IPM-I、IPM-II 和 VIM-I 编码的内酰胺酶对碳青霉烯类药物超强的水解活性和可移动元件介导的播散能力,成为铜绿假单胞菌获得性耐药的主要原因;由于编码两类拓扑异构酶的基因 *gyrA* 和 *parC* 发生突变,其中 *gyrA* 基因变异主要集中在 Ala-67 和 Gln-106 碱基间,导致酶结构的改变,使药物不能与酶-DNA 复合物稳定结合引起该菌对喹诺酮类药物耐药; *MexA*、*MexE*、*MexC* 等基因编码的外排泵对抗菌药物有最广泛的底物,能够外排羧基青霉素类、氨基糖苷、广谱头孢菌素、碳青霉烯类、氟喹诺酮类、氯霉素和甲氧苄啶等抗菌药物,表明产超广谱 β -内酰胺酶类(特别是金属 β -内酰胺酶)、药物作用靶位的改变和主动外排系统主导了铜绿假单胞菌的耐药机制。而其出现的大量 SNP 位点的非同义突变,占总 SNP 位点的 24.6%。提示铜绿假单胞菌在抗菌药物选择压力下不断发生改变,新的耐药基因及亚型不断出现,带来抗菌药物耐药率的上升。

混合基因组测序与通过 PCR 扩增目的基因后测序的传统方法相比,具有高效率、高通量、所需样本少、自动化程度高和功能强大的优势。研究表明运用高通量混合基因组测序技术分析多重耐药病原菌耐药基因分布及其多态性具有可行性,新一代测序技术可以检出病原菌混合基因组中所有存在的 SNP 位点,可以跟踪病原菌的耐药性变迁,指导临床合理用药;也可为后续的新耐药基因实验验证提供依据。

参考文献

- [1] MULLANY P. Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance[J]. *Virulence*, 2014, 5(3): 443-447.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S26[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2016.
- [3] LI R, ZHU H, RUAN J, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequen-

- cing[J]. *Genome Res*, 2010, 20(2): 265-272.
- [4] BO L, MIHAI P. ARDB-Antibiotic Resistance Genes Database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): 443-447.
- [5] 李春辉. MDR、XDR、PDR 多重耐药菌暂行标准定义——国际专家建议[J]. *中国感染控制杂志*, 2014, 13(1): 62-64.
- [6] JONES R N. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 51(Suppl 1): S81-87.
- [7] DING C, YANG Z, WANG J, et al. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Infect Dis*, 2016, 49: 119-128.
- [8] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(5): 481-491.
- [9] 黄勋, 邓子德, 倪语星, 等. 多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J]. *中国感染控制杂志*, 2015, 14(1): 1-9.
- [10] KHONG W X, MARIMUTHU K, TEO J, et al. Tracking inter-institutional spread of NDM and identification of a novel NDM-positive plasmid, pSg1-NDM, using next-generation sequencing approaches [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(11): 3081-3089.
- [11] BOWEN A C, HARRIS T, HOLT D C, et al. Whole genome sequencing reveals extensive community-level transmission of group A *Streptococcus* in remote communities [J]. *Epidemiol Infect*, 2016, 144(9): 1991-1998.
- [12] LI A D, MA L, JIANG X T, et al. Cultivation-dependent and high-throughput sequencing approaches studying the co-occurrence of antibiotic resistance genes in municipal sewage system[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(22): 8197-8207.
- [13] HAMPEL K J, LABAUVE A E, MEADOWS J A, et al. Characterization of the GbdR regulon in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Bacteriol*, 2014, 196(1): 7-15.
- [14] SNYDER L A, LOMAN N J, FARAJ L A, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing[J]. *Euro Surveill*, 2013, 18(42): 17-25.
- [15] XIONG J, ALEXABDER D C, MA J H, et al. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *pseudomonas aeruginosa* 96[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(8): 3775-3782.