

· 实验室研究 ·

# 农村井水中耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌及耐药基因分子流行病学特征

王爽<sup>1</sup> 徐留臣<sup>1</sup> 裴耀文<sup>2</sup> 王梅<sup>1</sup> 毕振强<sup>2</sup> 张华宁<sup>1</sup> 刘璐<sup>1</sup> 房明<sup>1</sup> 寇增强<sup>1</sup><sup>1</sup>山东省疾病预防控制中心传染病防制所, 济南 250014; <sup>2</sup>山东省疾病预防控制中心办公室, 济南 250014

通信作者: 寇增强, Email: jack-cou@163.com

**【摘要】** 目的 分析农村井水中耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌(PA)及耐药基因的分子流行病学特征。方法 依据《饮用天然矿泉水检验方法》(GB 8538-2016)对山东省巨野县农村井水采集 112 份水样进行检测,并对检出的 PA 分别进行 PFGE 分型和药物敏感性试验。PCR 鉴定碳青霉烯类耐药基因后,采用 S1-PFGE 和 Southern 杂交确定耐药基因的位置,并用结合实验判断基因的可转移性。结果 农村井水中 PA 检出率为 54.46% (61/112)。61 株菌分为 56 个 PFGE 型,100.00% 一致带型最多的有 2 株菌,无明显的优势带型。药敏实验结果显示,多重耐药菌占 93.44% (57/61),2 株菌携带 *bla<sub>VIM-2</sub>* 耐药基因,均位于质粒上,且均可随质粒发生水平转移。结论 农村井水中检出耐碳青霉烯类 PA 及其耐药基因,此类耐药基因存在水平传播的可能性。

**【关键词】** 铜绿假单胞菌; 碳青霉烯类; 耐药基因; 分子流行病学

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10714002-003-004);山东省重点研发计划(2017GSF218062);山东省医药卫生科技发展计划(2017WS105)

## Molecular epidemiology of drug resistance genes and carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in rural well water

Wang Shuang<sup>1</sup>, Xu Liuchen<sup>1</sup>, Pei Yaowen<sup>2</sup>, Wang Mei<sup>1</sup>, Bi Zhenqiang<sup>2</sup>, Zhang Huaning<sup>1</sup>, Liu Lu<sup>1</sup>, Fang Ming<sup>1</sup>, Kou Zengqiang<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Infectious Disease Control and Prevention, Shandong Center for Disease Control and Prevention, Ji'nan 250014, China; <sup>2</sup>General Office, Shandong Center for Disease Control and Prevention, Ji'nan 250014, China

Corresponding author: Kou Zengqiang, Email: jack-cou@163.com

**【Abstract】 Objective** To analyze molecular epidemiological characteristics of drug resistance genes and carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in rural well water. **Methods** According to *Citation of Natural Mineral Water Inspection* (GB 8538-2016), a total of 112 well water samples were tested in Juye county of Shandong province, and PFGE and drug susceptibility test were conducted for the identified PA strains. After PCR identification of carbapenem resistance genes, S1-PFGE and Southern blotting were used to determine the location of drug resistance genes, and combined experiments were used to determine gene transferability. **Results** The detection rate of PA in rural well water samples in Juye county of Shandong province was 54.46% (61/112). The 61 strains could be divided into 56 PFGE types. There were 2 strains with 100.00% consistent band types, and there was no obvious predominant band type. The results of drug susceptibility experiments showed that 93.44% (57/61) were multi-drug resistant strains, and there were 2 strains carrying *bla<sub>VIM-2</sub>*, both of which were located on the plasmid, and both of them

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200904-01127

收稿日期 2020-09-04 本文编辑 斗智

引用本文:王爽,徐留臣,裴耀文,等.农村井水中耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌及耐药基因分子流行病学特征[J].中华流行病学杂志,2021,42(5):898-902. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20200904-01127.



were transferred horizontally with the plasmid. **Conclusion** PA carrying carbapenem resistance genes was detected in well water of rural communities in Juye country, and there is the possibility of horizontal transmission of such resistance genes.

**【Key words】** *Pseudomonas aeruginosa*; Carbapenem; Drug resistance genes; Molecular epidemiology

**Fund programs:** National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10714002-003-004); Shandong Key Research and Development Program (2017GSF218062); Medical and Health Technology Development Program of Shandong Province (2017WS105)

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是医院获得性感染的重要病原体,对抗生素具有广泛的耐药性<sup>[1-2]</sup>。PA是呼吸机相关性肺炎的第二大常见病因,也是引起该病最常见的多药耐药革兰阴性菌<sup>[3]</sup>。碳青霉烯类药物是治疗多重耐药PA的主要手段,因此,对碳青霉烯类抗生素的耐药性和耐药基因的可转移性,是治疗PA感染面临的重大挑战<sup>[4]</sup>。PA对碳青霉烯类耐药性的产生,主要是由于外膜孔蛋白的改变或丢失、外排泵表达的增加和金属 $\beta$ -内酰胺酶的产生<sup>[5]</sup>。维罗纳整合素编码的金属 $\beta$ -内酰胺酶-2(VIM-2)是PA最常见的金属 $\beta$ -内酰胺酶,1996年在法国马赛首次被发现,VIM-2阳性PA是多次感染暴发的来源<sup>[6]</sup>。本研究针对山东省巨野县农村井水中PA的污染情况,对分离的PA进行耐药性检测、PFGE分型、S1-PFGE和Southern杂交分析,探索VIM-2在其中的传播机制,为农村井水中多重耐药PA的污染溯源和预警提供参考支持。

## 材料与方 法

1. 材料:2018年10月在山东省菏泽市巨野县6个村的农户手压井,每口井随机采集1份水样,共112份。

2. 菌株的分离和鉴定:按《饮用天然矿泉水检验方法》(GB/T 8538-2016)进行PA鉴定,在CN琼脂培养基上生长的疑似菌落生化鉴定结果阳性,采用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪鉴定。

3. 药物敏感性试验:进行15种抗生素的敏感性试验(亚胺培南、头孢噻肟、头孢他啶、头孢西丁、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、甲氧苄氨嘧啶磺胺甲恶唑、四环素、氟苯尼考、多粘菌素、呋喃妥因和替加环素)。采用微量肉汤法检测多粘菌素和替加环素的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),其余抗生素的MIC值用琼脂稀释法检测。

以美国临床和实验室标准协会(CLSI, 2018)标准作为敏感性判读标准。质控菌株为PA的ATCC27853。

4. PFGE分型:PA基因组DNA以Spe I酶切,沙门菌标准菌株H9812以Xba I酶切。采用BioNumerics 6.6软件对PFGE指纹图谱进行图像处理和聚类分析,计算相似度。

5. 耐药基因检测<sup>[7]</sup>:采用煮沸法提取61株PA的DNA,采用多重PCR扩增碳青霉烯酶耐药基因(*bla*<sub>IMP</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub>、*bla*<sub>VIM</sub>、*bla*<sub>GES</sub>、*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>),采用GenBank序列和BLAST在线软件分析耐药基因亚型。

6. S1-PFGE和Southern杂交<sup>[8]</sup>:用S1-PFGE和Southern杂交验证*bla*<sub>VIM-2</sub>在质粒上的位置。将分离菌株包埋在10 g/L金胶中,采用S1核酸内切酶消化和PFGE。将DNA片段水平转移到尼龙膜上,并与PCR扩增获得地高辛标记的探针进行杂交。沙门菌H9812用Xba I酶切后用作分子量标准。

7. 结合试验:采用大肠埃希菌J53作为受体菌检测*bla*<sub>VIM-2</sub>耐药基因的菌株间水平转移性。将受体菌和目标菌的单菌落分别接种到2 ml LB液体培养基中,在37℃恒温摇床中持续摇动培养约6.5 h,达到对数生长期。将受体菌和供体菌的生长肉汤以1:2体积比混匀,并接种于2 ml LB液体培养基中,37℃培养12 h。第2天,取100  $\mu$ l培养液分别均匀涂布于含亚胺培南和利福平的耐叠氮钠的琼脂平板上,37℃培养18 h。挑选单个菌落并纯化过夜。采用PCR检测和药敏实验检测结合菌中耐药基因和耐药性。

## 结 果

1. 菌株的检出情况和耐药性:农村井水中PA检出率为54.46%(61/112)。61株PA对四环素、氟苯尼考、头孢西丁、呋喃妥因、头孢噻肟和复方新诺明的耐药率较高,分别为98.36%(60/61)、98.36%(60/61)、98.36%(60/61)、96.72%(59/61)、95.08%

(58/61)和93.44%(57/61);对哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林/克拉维酸、头孢他啶、多粘菌素、阿米卡星和环丙沙星的耐药率较低,均低于5.00%。多重耐药菌占93.44%(57/61)。见表1。

表1 铜绿假单胞菌对各种抗菌药物的药敏情况

抗菌药物	耐药 (n=432)	中介 (n=70)	敏感 (n=413)
阿米卡星	1(1.64)	0(0.00)	60(98.36)
庆大霉素	14(22.95)	38(62.30)	9(14.75)
四环素	60(98.36)	0(0.00)	1(1.64)
头孢噻肟	58(95.08)	1(1.64)	2(3.28)
亚胺培南	5(8.20)	0(0.00)	56(91.80)
头孢西丁	60(98.36)	0(0.00)	1(1.64)
替加环素	54(88.52)	1(1.64)	6(9.84)
环丙沙星	2(3.28)	28(45.90)	31(50.82)
头孢他啶	1(1.64)	0(0.00)	60(98.36)
呋喃妥因	59(96.72)	0(0.00)	2(3.28)
氟苯尼考	60(98.36)	0(0.00)	1(1.64)
多粘菌素	1(1.64)	0(0.00)	60(98.36)
哌拉西林/他唑巴坦	0(0.00)	2(3.28)	59(96.72)
复方新诺明	57(93.44)	0(0.00)	4(6.56)
阿莫西林/克拉维酸	0(0.00)	0(0.00)	61(100.00)

注:括号外数据为菌株数,括号内数据为率(%)

2. PFGE 分型结果: 61 株菌的图谱相似性为 12.65%~100.00%, 分为 56 个 PFGE 带型, 出现 8 簇 100.00% 一致的 PFGE 带型。100.00% 一致带型均只有 2 株菌, 无明显的优势带型。提示该县农村井水中 PA 基因型呈多样性, 没有优势的流行基因型。

见图 1。

3. 菌株耐药基因检测: PCR 和序列分析结果显示, 有 2 株亚胺培南耐药的 PA 携带 *bla*<sub>VIM-2</sub> 耐药基因。未检出其他类型碳青霉烯类耐药基因。5 株亚胺培南耐药的 PA 来自 2 个村, 携带 *bla*<sub>VIM-2</sub> 耐药基因的 PA 来自同一个村。见图 1。

4. *bla*<sub>VIM-2</sub> 基因定位和水平传递: S1-PFGE 结果显示, 2 株菌分别有 3 个和 1 个质粒, Southern 杂交结果显示, 2 株菌的 *bla*<sub>VIM-2</sub> 耐药基因均定位在质粒上。根据 Marker(H9812)进行质粒大小判断, 携带 *bla*<sub>VIM-2</sub> 耐药基因的 2 株菌质粒大小不一, 大小分别约为 78.2 kb 和 104.5 kb。见图 2。

5. 结合子的药物敏感性试验: 15 种抗菌药物的 MIC 测定发现, 相比于受体菌 J53, 亚胺培南的 MIC 值增加了 32 倍, 四环素、头孢噻肟、头孢他啶、头孢西丁、替加环素和氟苯尼考的 MIC 值至少增加了 32 倍。而阿米卡星、庆大霉素、多粘菌素、环丙沙星和阿莫西林/克拉维酸的 MIC 值与 J53 相比无明显升高。见表 2。

### 讨 论

PA 对碳青霉烯类药物的耐药率正在增加, 这与该类药物在治疗超广谱 β-内酰胺酶耐药菌引起的感染过度使用有关<sup>[3]</sup>。耐碳青霉烯类 PA 可产生多种金属 β-内酰胺酶, 酶编码基因位于质粒等携带多种耐药基因的遗传元件上, 从而赋予 PA 多重耐

表2 耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌及其结合子的最小抑菌浓度(μg/ml)

抗菌药物	18HZF015	18HZF020	18HZF015-J53	18HZF020-J53	J53
阿米卡星	8.000	8.000	4.000	8.000	4.000
庆大霉素	8.000	4.000	4.000	4.000	1.000
四环素	32.000 <sup>a</sup>	>128.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	128.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>
头孢噻肟	32.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	1.000
亚胺培南	16.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	1.000
头孢西丁	>128.000 <sup>a</sup>	>128.000 <sup>a</sup>	>128.000 <sup>a</sup>	>128.000 <sup>a</sup>	4.000
替加环素	16.000 <sup>a</sup>	32.000 <sup>a</sup>	8.000 <sup>a</sup>	16.000 <sup>a</sup>	0.250
环丙沙星	0.500	0.500	0.250	0.500	0.125
头孢他啶	4.000	4.000	2.000	4.000	0.125
呋喃妥因	4.000	>128.000 <sup>a</sup>	4.000	64.000	4.000
氟苯尼考	>128.000 <sup>a</sup>	>128.000 <sup>a</sup>	128.000 <sup>a</sup>	128.000 <sup>a</sup>	8.000
多粘菌素	0.250	1.000	1.000	0.500	1.000
哌拉西林/他唑巴坦	4.000	8.000	4.000	2.000	1.000
复方新诺明	8.000 <sup>a</sup>	>8.000 <sup>a</sup>	4.000	4.000	0.125
阿莫西林/克拉维酸	2.000	2.000	2.000	2.000	4.000

注:<sup>a</sup>菌株对相应抗生素耐药



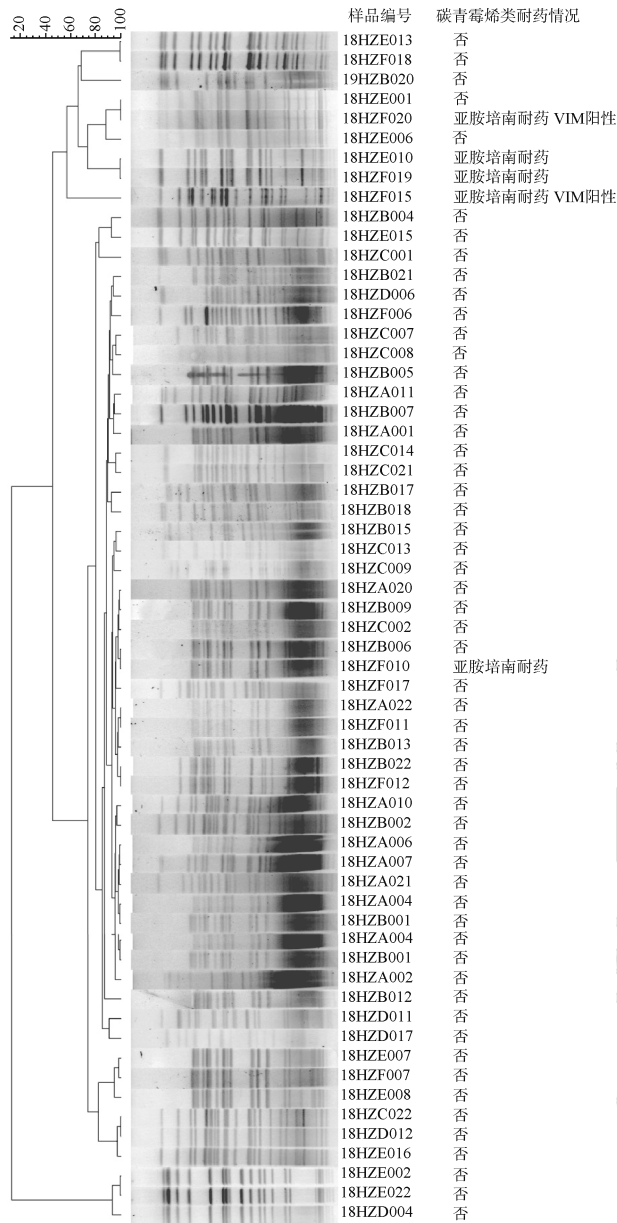
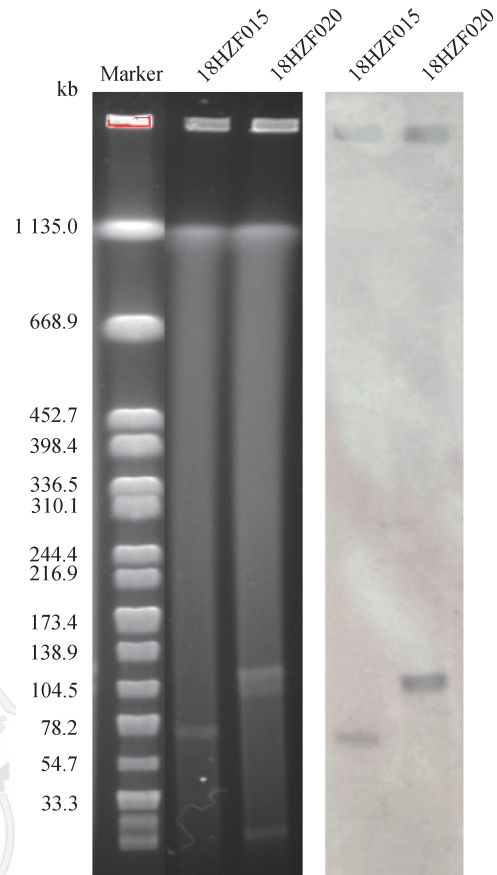


图1 61株铜绿假单胞菌的脉冲场凝胶电泳聚类分析图

此外,耐药基因在菌间可发生水平转移,使细菌耐药率增加,导致感染患者的治疗复杂化<sup>[9]</sup>。VIM-2是除NDM外最普遍的金属β-内酰胺酶,其编码基因可随质粒发生水平传播,这是此种耐药基因的主要传播机制<sup>[10-11]</sup>。本研究验证了 $bla_{VIM-2}$ 耐药基因的水平转移性,对进一步揭示该地区PA耐药性的传播机制具有重要意义。

药物敏感性结果显示,本地区井水中的PA对四环素、氟苯尼考、头孢西丁、呋喃妥因、头孢噻肟等具有较高的耐药性,且多重耐药情况非常严重。提示该社区应重视对井水的合理利用,以降低人或动物感染耐药菌的风险。2株VIM-2阳性PA均为多重耐药菌,除呋喃妥因外对其他抗菌药均表现出



注:VIM-2:维罗纳整合素编码的金属β-内酰胺酶-2

图2 VIM-2阳性的S1-PFGE和Southern杂交

一致的耐药性,对亚胺培南等7种抗生素耐药,但对阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、头孢他啶、多粘菌素和阿莫西林/克拉维酸敏感。此外,2株VIM-2阳性结合子均表现出与供体菌相似的耐药表型,说明多种耐药基因随质粒发生了水平转移。

我国农村欠发达地区,井水与人类的日常生活(如刷牙、洗澡、蔬果清洗等)和养殖动物的饮水等活动密切相关。农村井水已经有毒性很强的耐碳青霉烯类解鸟氨酸拉乌尔菌被检出<sup>[12]</sup>,这类耐药菌对食物链的污染成为潜在的公共健康危害,这可能是我国农村地区环境管理和公共卫生面临的新挑战。

综上所述,山东省巨野县农村井水中检出耐碳青霉烯类PA及其耐药基因,此类耐药基因存在水平传播的可能性。研究农村地区环境中耐碳青霉烯类PA的分子流行病学特征和耐药传播机制,对于预防和控制耐碳青霉烯类PA引起的感染至关重要。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas*

*aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7:39. DOI:10.3389/fcimb.2017.00039.

[2] Hong DJ, Bae IK, Jang IH, et al. Epidemiology and characteristics of Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Infect Chemother*, 2015, 47(2):81-97. DOI:10.3947/ic.2015.47.2.81.

[3] Pacheco T, Bustos-Cruz RH, Abril D, et al. *Pseudomonas aeruginosa* coharboring *Bla<sub>KPC-2</sub>* and *Bla<sub>VIM-2</sub>* carbapenemase genes[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2019, 8(3):98. DOI:10.3390/antibiotics8030098.

[4] Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, et al. VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a tertiary hospital in Istanbul, Turkey[J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(3):328-334. DOI:10.1089/mdr.2016.0012.

[5] Dagher TN, Al-Bayssari C, Diene SM, et al. Emergence of plasmid-encoded VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples in Lebanon[J]. *New Microbes New Infect*, 2019, 29: 100521. DOI:10.1016/j.nmni.2019.100521.

[6] Poirel L, Naas T, Nicolas D, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(4):891-897. DOI:10.1128/aac.44.4.891-897.2000.

[7] Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(4): 906-909. DOI: 10.1093/jac/dkr563.

[8] Wang S, Xu LC, Chi XH, et al. Emergence of NDM-1- and CTX-M-3-producing *Raoultella ornithinolytica* in human gut Microbiota[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 2678. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02678.

[9] Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(7):1211-1220. DOI:10.1007/s10096-018-3244-4.

[10] Paul D, Dhar D, Maurya AP, et al. Occurrence of co-existing *bla<sub>VIM-2</sub>* and *bla<sub>NDM-1</sub>* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2016, 15:13. DOI:10.1186/s12941-016-0146-0.

[11] Yu YS, Qu TT, Zhou JY, et al. Integrons containing the VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from different Chinese hospitals[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(11):4242-4245. DOI:10.1128/JCM.01558-06.

[12] Zou HY, Berglund B, Xu H, et al. Genetic characterization and virulence of a carbapenem-resistant *Raoultella ornithinolytica* isolated from well water carrying a novel megaplasmid containing *bla<sub>NDM-1</sub>*[J]. *Environ Pollut*, 2020, 260:114041. DOI:10.1016/j.envpol.2020.114041.

## 中华流行病学杂志第八届编辑委员会组成人员名单

(按姓氏汉语拼音排序)

顾问	高福	顾东风	贺雄	姜庆五	陆林	乔友林
	饶克勤	汪华	徐建国			
名誉总编辑	郑锡文					
总编辑	李立明					
副总编辑	邓瑛	冯子健	何纳	何耀	卢金星	沈洪兵
	谭红专	吴尊友	杨维中	詹思延		

### 编辑委员(含总编辑、副总编辑)

安志杰	白亚娜	毕振强	曹广文	曹卫华	曹务春	陈坤	陈可欣
陈万青	陈维清	代敏	戴江红	党少农	邓瑛	丁淑军	段广才
段蕾蕾	方利文	方向华	冯子健	龚向东	何纳	何耀	何剑峰
胡东生	胡永华	胡志斌	贾崇奇	江宇	阚飙	阚海东	李琦
李群	李敬云	李立明	李秀央	李亚斐	李中杰	林鹏	刘静
刘民	刘玮	刘殿武	卢金星	栾荣生	罗会明	吕繁	吕筠
吕嘉春	马军	马伟	马家奇	马文军	毛琛	孟蕾	米杰
缪小平	潘凯枫	潘晓红	彭晓霞	邱洪斌	任涛	单广良	邵中军
邵祝军	沈洪兵	施小明	时景璞	宋志忠	苏虹	孙业桓	谭红专
唐金陵	陶芳标	汪宁	王蓓	王岚	王丽	王璐	王金桃
王丽敏	王全意	王素萍	王伟炳	王增武	王长军	王子军	魏文强
吴凡	吴静	吴涛	吴先萍	吴尊友	武鸣	项永兵	徐飏
徐爱强	许汴利	许国章	闫永平	杨维中	么鸿雁	叶冬青	于普林
余宏杰	俞敏	詹思延	张建中	张顺祥	张卫东	张作风	赵方辉
赵根明	赵文华	赵亚双	周脉耕	朱凤才	庄贵华		