

• 论 著 •

鲍曼不动杆菌耐药性监测与外排泵 *adeB* 基因表达水平检测

宋晓萍¹, 刘萍萍², 孙明娥¹, 孙 滨¹

(1. 山东省青岛市海慈医疗集团检验科 266033; 2. 山东省青岛市第六人民医院检验科 266033)

摘 要:目的 探讨鲍曼不动杆菌临床分离株的耐药性以及外排泵 *adeB* 基因的表达情况。方法 琼脂稀释法检测最低抑菌浓度(MIC)、聚合酶链反应(PCR)扩增 *adeB* 基因, 逆转录 PCR(rt-PCR)检测 *adeB* 基因的 mRNA 表达水平。结果 药敏试验结果显示, 60 株鲍曼不动杆菌对哌拉西林耐药率最高(92.3%), 对亚胺培南耐药率最低(30.0%); 43%(26/60)为多药耐药菌株; 多药耐药菌株与相对敏感菌株均为 *adeB* 基因阳性; 多药耐药组 *adeB* 基因 mRNA 水平高于相对敏感组($P < 0.01$)。结论 鲍曼不动杆菌临床分离株耐药率高且多药耐药严重, 与其主动外排系统 *adeB* 基因表达增强密切相关。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 抗药性, 多药; 主动外排系统; *adeB* 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)12-1297-02

Investigation of *Acinetobacter baumannii* drug resistance and the expression of efflux pump *adeB* gene

Song Xiaoping¹, Liu Pingping², Sun Ming'e¹, Sun Bin¹

(1. Department of Laboratory Medicine, Qingdao Hiser Medical Group, Qingdao Shandong 266033, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Qingdao Sixth People's Hospital, Qingdao Shandong 266033, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the expression of efflux pump *adeB* gene. Methods Agar dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentrations(MIC) of *Acinetobacter baumannii*, polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify the *adeB* gene and reverse transcription(rt-PCR) was used to detect the mRNA level of *adeB* gene. Results Of the 60 clinical isolates, the resistant rate to piperacillin was the highest(92.3%) and to imipenem was the lowest(30.0%). The incidence of multidrug resistance was 43%(26/60). Both multi-resistant group(26 strains) and relatively sensitive group(4 strains) were positive with *adeB* gene. The mRNA level of *adeB* gene in multidrug resistant group was significantly higher than the relatively sensitive group($P < 0.01$). Conclusion The drug and multidrug resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates could be serious, which might be closely correlated with the enhancement of the expression of efflux pump *adeB* gene.

Key words: *acinetobacter baumannii*; drug resistance, multiple; active efflux systems; *AdeB* gene

随着各种广谱抗菌剂的大量使用, 多药耐药鲍曼不动杆菌(multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDR-Ab)的分离率逐年攀升, 给临床抗感染治疗带来极大的挑战。主动外排系统由细菌胞膜上介导抗菌剂外排的蛋白组成, 是导致细菌多药耐药(multidrug resistance, MDR)的重要原因^[1-2]。鲍曼不动杆菌耐药机制相当复杂, 近年来对修饰酶、作用靶位的改变、降解酶等方面耐药机制的研究已较多, 而对主动外排系统在鲍曼不动杆菌耐药机制中的作用研究甚少。本研究旨在对鲍曼不动杆菌的耐药性及 MDR-Ab 外排泵 *adeB* 基因的表达水平进行研究, 为临床防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 (1)临床菌株: 2009 年 6 月至 2010 年 6 月青岛市海慈医疗集团检验科从临床送检的痰液、血液、尿液、分泌物等标本中所分离的鲍曼不动杆菌 60 株(同一患者来源的重复菌株记为 1 株)。所有菌株均由 VITEK2-compact 微生物鉴定系统 GNI 卡鉴定。(2)质控菌株: 铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 由海慈医疗集团检验科保存。

1.2 主要仪器及试剂 VITEK2-compact 全自动微生物鉴定仪(生物梅里埃, 法国), 凝胶成像分析系统, PTC-200 型扩增仪(伯乐, 美国)、Tanon EPS-100 型电泳仪(原平皓, 北京)、MIT-P 型多点接种仪(Sakuma, 日本)。左氧氟沙星、环丙沙星、加替沙星、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、头孢他啶及头孢曲松购自中国药品生物制品检定所; 阿米卡星、庆大霉素、氨基糖苷、亚胺培南及美罗培南购自杭州默沙东公司。Trizol RNA 抽提试剂盒为美国 Molecular Re-

search Center 公司产品, 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)及 AccessQuick 逆转录 PCR(reverse transcription PCR, rt-PCR)试剂盒为美国 Promega 公司产品; 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 方法 (1)抗菌药物敏感试验: 采用琼脂稀释法检测菌株对 14 种抗菌剂的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 试验方法及结果判断标准参照美国临床与实验室标准协会 2008 年颁布的相关标准, 根据试验结果将临床菌株分为 MDR 组和相对敏感组。(2)*adeB* 基因检测: 煮沸法提取细菌 DNA。*adeB* 基因扩增引物序列参考文献[3], P1: 5'-AAA GAC TTC AAA GAG CGG ACT A-3'; P2: 5'-TCA CGC ATT GCT TCA CCC-3', 目的片段大小为 675 bp。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 紫外灯下观察结果, 并用凝胶成像分析系统照相并保存结果。Sanger 双脱氧链终止法对 PCR 产物进行测序, 由上海英骏生物技术有限公司以 ABI 377 全自动 DNA 测序仪完成检测; GenBank 中对序列进行比对分析。(3)*adeB* 基因表达水平检测总 RNA 提取按试剂盒操作说明进行, 260、280 nm 条件下检测吸光度并计算 RNA 浓度和纯度。rt-PCR 扩增引物为 P1 和 P2, 内参基因 *recA* 扩增引物序列为 5'-TTT CAC AAC CCG ACA ATG-3' 和 5'-TGC CTG GCT CAT AAG ACG-3', 目的片段大小为 176 bp。操作方法参照实际说明书(一步法 rt-PCR), 反应条件: 45 °C 45 min; 95 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像分析系统进行电泳条带灰度扫描, 以强度和面积之

积表示各条带的灰度值。

1.4 统计学处理 用 WHONET5.4 和 SPSS13.0 软件进行数据统计学分析;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示两组比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结 果

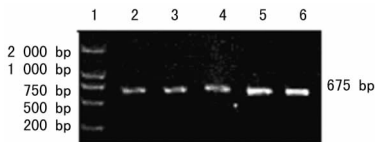
2.1 药敏试验结果 根据 60 株鲍曼不动杆菌对 14 种抗菌剂的药敏检测结果见表 1。以对 3 种及其以上抗菌剂耐药者作为 MDR-Ab, 确定 MDR-Ab 26 株, 占 43%(26/60), 以其作为 MDR 组;以对氨基糖苷类、喹诺酮类和 β -内酰胺类抗菌剂均敏感的 4 株鲍曼不动杆菌作为相对敏感组。

2.2 adeB 基因检测结果 MDR 组及相对敏感组菌株基因组 DNA 中 adeB 基因 PCR 产物电泳图, 见图 1。随机选取 2 个阳性 PCR 产物经测序后, 在 GenBank 基因库中比对分析, 结果与登陆号为 AF370885 的鲍曼不动杆菌 adeB 基因同源性的 100%。

2.3 adeB 基因表达水平检测结果 以 recA 基因作为内参基因, 以 adeB 和 recA 电泳条带灰度值的比值(adeB/recA)表示 adeB 相对表达水平, MDR 组和相对敏感组菌株 adeB/recA 计算结果分别为(3.41 ± 0.84)和(0.82 ± 0.08), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 60 株鲍曼不动杆菌对 14 种抗菌剂药敏检测结果(%)

抗菌剂	耐药	中介	敏感
哌拉西林	92.0	2.5	5.5
哌拉西林/他唑巴坦	55.4	22.4	22.2
头孢曲松	88.6	9.5	1.9
头孢他啶	86.3	2.1	11.6
头孢吡肟	80.3	11.0	8.7
亚胺培南	30.0	7.0	63.0
美罗培南	35.0	9.0	56.0
庆大霉素	76.6	1.2	22.2
阿米卡星	79.6	3.5	16.9
环丙沙星	75.1	3.0	21.9
左氧氟沙星	87.1	5.1	7.8
加替沙星	48.3	26.0	25.7
头孢哌酮/舒巴坦	42.0	23.8	34.2
氨曲南	79.6	0.5	19.9



1: DNA 分子标记; 2~3: 相对敏感组菌株; 4~6: MDR 组菌株。

图 1 adeB 基因 PCR 产物电泳结果

3 讨 论

随着各种新型广谱抗菌剂的广泛使用, 鲍曼不动杆菌的检出率及耐药率逐年攀升, 其中第三代头孢菌素和 β -内酰胺类等药物的广泛应用, 诱导产生了大量的耐药株, 并呈现从单一耐药到 MDR 发展的趋势^[4-6]。本研究显示, 青岛市海慈医院检验科从临床标本中分离的鲍曼不动杆菌具有较强耐药性, 药敏试验结果与 2008 年中国细菌耐药性监测协作组监测结果基本一致^[7], 也与其他学者的报道基本一致^[8-9], 且存在一定比例的 MDR-Ab[43%(26/60)]。

细菌的主动外排系统与 MDR 的产生密切相关。主动外排系统根据氨基酸同源性可分为 5 个家族: ATP 结合盒超家族(ATP-binding cassette, ABC)、耐药节结分化家族(resistance nodulation division, RND)、多药及毒性化合物外排家族(multidrug and toxic compound extrusion family, MATE)、主

要易化子超家族(major facilitator superfamily, MFS)和小多重耐药性家族(small multidrug resistance, SMR)^[10]。鲍曼不动杆菌中已发现的主动外排系统主要有 AdeABC、AdeIJK、Ade-XYZ、AdeDE、AbeM 等。其中, AdeB 属于 RND 家族, 底物广泛, 包括乙酰红霉素、氨基糖苷类、氯霉素、氟喹诺酮类、四环素类等多种抗菌剂及多种染料^[11]。adeABC 基因位于鲍曼不动杆菌染色体基因组中, MDR-Ab 及相对敏感鲍曼不动杆菌中均普遍存在。GenBank 比对分析显示, 本研究 2 株 adeB 基因阳性菌株 adeB 基因 PCR 产物序列与登陆号为 AF370885 的鲍曼不动杆菌 adeB 基因同源性的 100%; rt-PCR 显示, MDR 组 adeB 基因的 mRNA 表达量(3.41 ± 0.84)高于相对敏感组(0.82 ± 0.08), $P < 0.05$, 提示外排泵编码基因 adeB 的高水平表达可能导致了鲍曼不动杆菌的 MDR。Marchand 等^[12]的研究发现, AdeABC 外排系统受其上游的 AdeRS 双重系统调节, adeS 基因编码感应激酶 AdeS 而 adeR 编码反应调节蛋白 AdeR, adeR 和 adeS 共同组成调控系统, AdeS 感应环境条件, 进而活化或钝化 AdeR, 由此对外排泵的表达进行控制。

参考文献

[1] Viveiros M, Martins M, Couto I, et al. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps[J]. Curr Drug Targets, 2008, 9(9): 760-778.

[2] Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(1): 20-51.

[3] 王悦, 宋诗铎, 王玉宝. 22 株多重耐药鲍曼不动杆菌临床株的外排泵 AdeABC 和 AdeIJK 的表达研究[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(5): 304-308.

[4] 施蔚, 王琴, 孟曙芳, 等. 鲍曼不动杆菌 3 年耐药性监测结果分析[J]. 现代实用医学, 2009, 21(1): 41-42.

[5] Perez F, Hujer A, Hujer K, et al. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471-3484.

[6] 史俊艳, 张小江, 徐英春, 等. 2007 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(3): 196-200.

[7] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5): 321-330.

[8] Zhou H, Yang Q, Yu YS, et al. Clonal spread of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii among different cities of China[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 4054-4057.

[9] Ying CM, Ling TK, Lee CC, et al. Characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Shanghai and Hong Kong[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(6): 799-802.

[10] Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in Mycobacterium smegmatis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2415-2423.

[11] Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3375-3380.

[12] Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, et al. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in Acinetobacter baumannii is regulated by the AdeRS two-component system[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3298-3304.