

• 基础研究论著 •

鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药及其携带基因的探讨

汪鹏程, 蔡俊, 闫敏, 蔡心安
(解放军第一〇五医院检验科, 合肥 230031)

摘要:目的 探讨鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药情况和耐药表型及其携带基因的关系。方法 收集 48 株鲍曼不动杆菌, 用 K-B 法和琼脂稀释法检测其对阿米卡星的敏感性, PCR 法扩增 aac(6') I 基因以及 3 种 16S rRNA 甲基化酶基因(armA、rmtB 及 rmtC 基因)。结果 72.9%(35/48)菌株对阿米卡星表现为双圈耐药, 其中 100.0%菌株检出 armA 基因, 未检出 rmtB、rmtC 基因, 77.1%(27/35)菌株检出 aac(6') I 基因; 10.4%(5/48)菌株对阿米卡星普通耐药, 均未检出 16S rRNA 甲基化酶基因, 其中 80.0%(4/5)菌株检出 aac(6') I 基因; 16.7%(8/48)菌株对阿米卡星敏感, 未检出相关耐药基因。结论 鲍曼不动杆菌对阿米卡星的耐药情况非常严重; 双圈耐药现象与 armA 基因诱导型表达有关。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 抗药性; 细菌; tRNA 甲基转移酶类; 基因; 阿米卡星

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.002 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)10-1155-02

Analysis on aminoglycoside resistance of Acinetobacter baumannii and related genes

Wang Pengcheng, Cai Jun, Yan Min, Cai Xin'an
(The 105th Hospital of PLA, Hefei, Anhui 230031, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation between aminoglycoside resistant situation and phenotype of Acinetobacter baumannii(A. baumannii) and carried genes. **Methods** 48 strains of A. baumannii were collected and detected for drug susceptibility to Amikacin by disk diffusion method and Mueller-Hinton broth method, and for aac(6') I gene and three kinds of 16S rRNA methylase genes (armA, rmtB and rmtC) by polymerases chain reaction(PCR). **Results** Among 48 strains of A. baumannii, 72.9%(35/48) were double-circle resistant to Amikacin, in which the positive rates of armA, rmtB, rmtC and aac(6') I gene were 100.0%(35/35), 0.0%(0/35), 0/0%(0/35) and 77.1%(27/35), 10.4%(5/48) were generally resistant to Amikacin and negative with 16S rRNA methylase genes, in which the positive rate of aac(6') I gene was 80.0%(4/5), and 16.7%(8/48) were sensitive to Amikacin and negative with all detected genes related to drug resistance. **Conclusion** The drug resistance of A. baumannii to Amikacin might be serious. Double-circle resistance possibly be associated with the inducible expression of armA gene.

Key words: acinetobacter baumannii; drug resistance, bacterial; tRNA methyltransferases; genes; amikacin

鲍曼不动杆菌(acinetobacter baumannii, ABA)广泛分布于自然界,是条件致病菌,近年来临床分离率日趋增多,已成为医院内感染病原菌最常见菌种之一^[1]。ABA 用 K-B 法进行阿米卡星药敏试验会出现 3 种表型(图 1):敏感、普通耐药和双圈耐药(纸片周围出现双圈耐药现象,即在抑菌圈与纸片之间出现了一个生长圈)^[2]。本文分析各种耐药表型的比例及其携带基因的关系。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集 2010 年 4 月至 2010 年 10 月本科从各类临床标本中分离的 ABA 48 株。

1.2 药物敏感试验 用 K-B 法和琼脂稀释法进行阿米卡星药敏试验。稀释法药物浓度从 2 048 mg/L 倍比稀释至

1 mg/L。药敏纸片、M-H 琼脂均为 Oxoid 公司产品。用大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为质控菌株,判断标准按美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2011 年的标准执行。

1.3 基因扩增

1.3.1 模板 DNA 的提取 挑取血平板上生长的单个菌落接种于 LB 肉汤管中,37 ℃、280 r/min(离心半径 8.5 cm)振荡过夜培养,取 2 mL 菌液 4 000 r/min(离心半径 8.5 cm)离心 10 min 弃上清液,沉淀物加灭菌蒸馏水 200 μL,100 ℃水浴 15 min,10 000 r/min(离心半径 8.5 cm)离心 5 min,上清物即模板 DNA,分装-20 ℃保存。

1.3.2 引物 见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)
armA	P1:ATGGATAAGAATGATGTTGTTAAG,P2:TTATTTCTGAAATCCACTAGTAATT	774
rmtB	P1:GCTTTCTGCGGGCGATGTAA,P2:ATGCAATGCCGCGCTCGTAT	173
rmtC	P1:CGAAGAAGTAACAGCCAAAG,P2:ATCCCAACATCTCTCCCACT	711
aac(6') I	P1: TA TGA GTGGCTAAATCGA,P2: CCCGCTTCTCGTA GCA	394

1.3.3 扩增条件 反应体系中含模板 DNA 6 μL,dNTPs 2 μL,10 ×buffer 缓冲液 2.5 μL,Mg²⁺ 1.5 μL,Taq 酶 2.5 U,上、下游引物各 1 μL,用灭菌重蒸馏水补足 25 μL。94 ℃预变性 5 min,然后按照 94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸

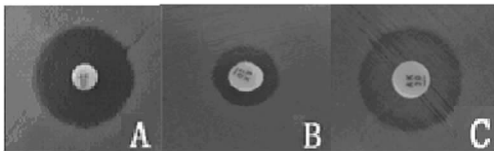
60 s,35 个循环后 72 ℃延伸 5 min。扩增产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后紫外线下观察结果。

2 结果

2.1 K-B 法 8 株细菌对阿米卡星敏感;5 株细菌普通耐药,

35 株细菌双圈耐药。

2.2 琼脂稀释法 8 株细菌对阿米卡星敏感;40 株细菌对阿米卡星耐药,其中 5 株细菌最低抑菌浓度(MIC)为 64~256 mg/L,另外 35 株细菌阿米卡星的 MIC 均大于 512 mg/L。K-B 法和琼脂稀释法测试结果一致。



A:敏感菌株;B:普通耐药菌株;C:双圈耐药菌株。

图 1 阿米卡星药敏试验结果

2.3 基因扩增 8 株对阿米卡星敏感的细菌均未检出相关耐药基因;5 株普通耐药细菌均未检出 armA、rmtB、rmtC 基因,80.0%(4/5)检出 aac(6') I 基因;35 株双圈耐药细菌均检出 armA 基因,未检出 rmtB、rmtC 基因,77.1%(27/35)检出 aac(6') I 基因。

3 讨论

氨基糖苷类抗生素通过与细菌 30S 核糖体亚单位的 16S rRNA 特异性位点不可逆结合,干扰蛋白质合成,从而阻止细菌生长。该类药物抗菌谱广、疗效卓越,在医学和畜牧兽医业得到广泛应用,但由于泛用和过度使用,氨基糖苷类药物耐药问题随之凸现。

本研究通过对基因扩增发现,敏感株均不携带耐药基因;普通耐药株均不携带 armA、rmtB、rmtC 基因,80.0%(4/5)携带 aac(6') I 基因;双圈耐药株均携带 armA 基因,不携带 rmtB、rmtC 基因,77.1%(27/35)携带 aac(6') I 基因。由此可以判断 armA 基因诱导型表达介导了双圈现象的产生。

细菌对氨基糖苷类药物的耐药机制:(1)细菌外膜蛋白的通透性改变或细胞内膜转运异常,使药物在菌体内的蓄积减

少而引起耐药;(2)产生氨基糖苷类修饰酶;(3)药物作用靶位改变^[3]。

armA 基因首先发现于分离自法国的 1 株肺炎克雷伯菌。Liou 等^[4]研究发现,armA 基因编码的 armA 蛋白使 16S rRNA N7-G1405 位点发生甲基化,阻碍其与 4,6-脱氧链霉胺的 3'氨基之间的氢键形成,并造成 G1405 与庆大霉素环之间产生空间位阻。这一甲基化将使 G1405 发生改变,导致氨基糖苷与译码位点不能结合,使氨基糖苷类抗生素高水平耐药, MIC 往往高达 512~1 024 μg/mL。由 armA 16S rRNA 甲基化酶基因介导的高水平氨基糖苷类抗生素耐药已非常普遍,因此,必须合理使用氨基糖苷类抗生素,避免加速该耐药基因的传播。因 ABA 普遍存在于环境中,而且耐受肥皂,是医务人员手上最常分离到的革兰阴性菌,如医院内感染各项控制措施执行不到位,ABA 可以在医院内流行性传播,因此,必须加强各项医院内感染控制措施的执行力度,避免这种现象的发生。

参考文献:

[1] Gombac F, Riccio ML, Rossolini GM, et al. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(11): 3665-3668.
[2] 韩丽娟,邵海枫,王卫萍,等. 鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物的耐药机制研究[J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(10): 1038-1041.
[3] 糜祖煌,钱小毛,秦玲. 鲍曼不动杆菌连续分离株耐药性与遗传学特征研究[J]. *现代实用医学*, 2007, 19(6): 427-431.
[4] Liou GF, Yoshizawa S, Courvalin P, et al. Aminoglycoside resistance by armA-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens[J]. *J Mol Bio*, 2006, 359(2): 358-364.

(收稿日期:2011-10-08)

(上接第 1154 页)

损伤^[3]。而 ConA 致肝纤维化的启动因素是激活 T 细胞使肝细胞受损。本研究结果显示,ConA 剂量越大,转氨酶上升越快、越高,对小鼠肝损伤更急、更重,提示 ConA 引起小鼠急性肝损伤具有剂量依赖性,易于建立稳定肝纤维化模型^[4]。

3.3 肝纤维化为慢性肝病发展为肝硬化的共同病理过程,确诊肝纤维化的“金标准”是病理学检查。但其具有创伤性,且费用昂贵而难以被患者接受,血清酶检测是目前倍受关注的研究方法^[5]。肝脏是体内含酶最丰富器官,测定血清酶活性变化可以判断肝脏功能、了解肝细胞破坏程度、肝细胞膜通透性变化及胆道系统阻塞情况等^[6]。TBA 是惟一可以同时反映分泌、生成摄取、肝损伤 3 个方面的血清学指标^[7]。肝硬化过程中先发生纤维增生,肝脏体积和质量增加,然后纤维收缩,肝细胞减少,体积缩小。在肝纤维化阶段,肝脏是肿大的。一旦肝细胞有病变,很容易引起血清中 TBA 升高。肝脏对胆汁酸的摄取功能下降,同时由于门静脉旁路、胆汁酸不再限于肠肝循环中,导致血清中 TBA 水平升高^[8]。因此,血清 TBA 测定是肝纤维化、肝硬化的敏感指标之一,还能反映病情的发展和评估预后。HA 主要由肝脏星状细胞产生,肝窦内皮细胞通过膜受体摄取和降解。在肝纤维化时肝窦内皮细胞表型发生,血清 HA 不同程度升高,血清 HA 水平与肝纤维化程度的符合率^[9]。本实验通过联合检测血清 ALT、HA、TBA,并结合病理检查,反复注射 ConA 可适时观察小鼠肝纤维化进程,可获取最佳小鼠肝纤维化模型。本研究建立了在病理、生理机制上更接近人

体肝炎的免疫性肝损伤动物模型,为进一步探讨中药复方护肝汤抗肝损伤的临床应用提供了实验依据。

参考文献:

[1] 李鸿立,田聆,魏于全. 刀豆蛋白 A 诱导小鼠肝纤维化动物模型的建立[J]. *免疫学杂志*, 2004, 20(5): 390-393.
[2] 曲建慧,张修礼. 小鼠 ConA 性肝损伤模型[J]. *世界华人消化杂志*, 2001, 9(5): 571-574.
[3] 张炜,陈明,傅涓涓. 不同剂量刀豆蛋白 A 诱导 B 小鼠肝纤维化的量效关系[J]. *徐州医学院学报*, 2007, 27(6): 375-378.
[4] Cantner F, Leist M, Lohse AW, et al. Concanavalin A induced T-cell-mediated hepatic injury in mice; the role of tumormector[J]. *Hepatology*, 1995, 21(1): 190-198.
[5] 李石好,叶晓光,徐建英. 病毒性肝炎患者血清中肝纤维化标志物的检测及分析[J]. *热带医学杂志*, 2008, 8(5): 469-470.
[6] 刘金涛. 谷氨酸脱氢酶活力变化在肝损伤中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(2): 270-271.
[7] 费德红,何凤琼,颜永乾. 血清总胆汁酸在新生儿溶血患者肝损害中的临床观察[J]. *国际检验医学杂志*, 2009, 30(1): 26-27.
[8] 吕英,王国英. 血清总胆汁酸测定在肝硬化患者中的应用[J]. *中国热带医学*, 2006, 6(1): 85.
[9] 蔡卫民,陶君,翁红雷. 血清纤维化指标的影响因素分析[J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(1): 23-25.

(收稿日期:2011-10-08)