

• 基础实验研究论著 •

adeABC 基因对鲍氏不动杆菌耐药性的影响王玮玮, 王厚照[△], 张 玲

(安徽医科大学一七四临床学院临床诊断学实验室, 福建厦门 361003)

摘 要:目的 探讨临床分离鲍氏不动杆菌 *adeABC* 基因的表达及其对鲍氏不动杆菌耐药性的作用。方法 采用 E-test 法对临床分离的鲍氏不动杆菌进行耐药性检测, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 *adeABC* 基因的表达。结果 鲍氏不动杆菌对不同抗菌药物的耐药率如下: 哌拉西林 97.6%, 头孢吡肟 60.8%, 头孢噻肟 75.2%, 头孢他啶 75.2%, 环丙沙星 80.0%, 左氧氟沙星 79.2%, 阿米卡星 60.8%, 庆大霉素 50.4%, 亚胺培南 35.2%, 多黏菌素 B 0.0%, 哌拉西林/他唑巴坦 48.8%。多重耐药鲍氏不动杆菌的 *adeB* 基因携带率为 95.0%, 调控基因 *adeR*、*adeS* 携带率分别为 90%、90%; 敏感株的 *adeB* 基因携带率为 58.1%, 调控基因 *adeR*、*adeS* 携带率分别为 49.5%、50.4%。结论 *adeABC* 基因表达增强是鲍氏不动杆菌产生耐药性的重要机制。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 抗药性; 细菌; 基因表达; *adeABC* 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1069-02

Effects of *adeABC* gene expression on drug resistance of *Acinetobacter baumannii*Wang Weiwei, Wang Houzhao[△], Zhang Ling(Clinical Laboratory of Diagnostics, the 174th Clinic College of Anhui Medical University, Xiamen, Fujian 361003, China)

Abstract: **Objective** To discuss *adeABC* gene expression in clinically separated *Acinetobacter baumannii* and its effects on drug resistance of *Acinetobacter baumannii*. **Methods** E-test method was adopted to clinically separate *Acinetobacter baumannii* which was subjected to drug resistance testing. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect expression of *adeABC* gene. **Results** Drug resistance rates of *Acinetobacter baumannii* against different antibacterial agents were as follow: piperacillin 97.6%, cefepime 60.8%, cefotaxime 75.2%, ceftazidime 75.2%, ciprofloxacin 80.0%, levofloxacin 79.2%, amikacin 60.8%, gentamicin 50.4%, imipenem 35.2%, polymyxin B 0.0%, piperacillin/tazobactam 48.8%. Carrier rate of *adeABC* gene in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* was 95.0% while those of regulatory gene *adeR* and *adeS* were 90%, 90%, respectively. Carrier rate of *adeB* gene in sensitive strains was 58.1% while those of regulatory gene *adeR* and *adeS* were 49.5%, 50.4%, respectively. **Conclusion** Enhancement of *adeABC* gene expression is an important mechanism of drug resistance of *Acinetobacter baumannii*.

Key words: *acinetobacter baumannii*; drug resistance, bacterial; gene expression; *adeABC* gene

鲍氏不动杆菌是一种革兰阴性杆菌, 在重症监护病房和获得性感染疾病患者中都有检出^[1-2], 是重症患者重要的医院感染病原菌, 尤其见于呼吸机相关性肺炎、血液感染、创面感染和医院获得性脑膜炎等患者^[3]。该菌可存在于患者体表、排泄物、水及蔬菜中。调查发现, 鲍氏不动杆菌在重症监护病房检出的病原菌中所占百分比排行第 5, 其在临床感染病因中所占百分比有逐年升高趋势。鲍氏不动杆菌广泛分布的原因主要包括: (1) 鲍氏不动杆菌具有很强的获得不同耐药机制的能力以及介导耐药的基因元(如质粒、整合子、转座子或耐药岛等), 能介导多重耐药甚至泛耐药; (2) 鲍氏不动杆菌可长时间存在于环境中, 且具有耐干燥和消毒剂的特性, 很难被完全消灭。此外, 鲍氏不动杆菌产生的生物膜也是其可持续存在且耐药的重要原因。外排机制是将抗菌药及其复合物由生物膜内排至体外环境, 其中起外排作用的蛋白称外排蛋白。外排系统可排出多种抗菌药物, 其在细菌耐药, 尤其是多重耐药中发挥重要作用。按氨基酸序列相似性、能量来源、组成数量、跨膜域及基质类型可将外排蛋白分为 5 类: (1) ATP 依赖型超家族; (2) 多药及毒物外排复合物; (3) 小耐药结节家族; (4) 主要异化因子超家族; (5) 耐药结节细胞分化(resistance-nodulation-cell division, RND)超家族。RND 家族在革兰阴性菌中引起的耐药并非仅限于鲍氏不动杆菌^[4], 其组成包括内膜转运蛋白、外膜蛋

白通道及连接二者的膜融合蛋白。在鲍氏不动杆菌中最先发现的 RND 泵为 *adeABC*, *adeB* 为药物转运蛋白, *adeC* 为外膜孔蛋白组成成分, *adeA* 为周质连接蛋白^[5]。本实验旨在研究本院分离的鲍氏不动杆菌 *adeABC* 基因的表达情况及其耐药性现状。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 本实验所用菌株来自 2009 年 1 月至 2011 年 7 月本院住院及门诊患者的痰液、尿液、分泌物等标本, 共分离 125 株不重复菌株, 其中, 痰液 72 株, 尿液 28 株, 分泌物 20 株, 其他 5 株。微生物敏感性试验的质控菌株铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自卫生部临床检验中心。

1.2 主要仪器和试剂 鉴定仪为 SIEMENS WalkAway 96SI 全自动细菌鉴定系统。E-test 药敏纸条包括哌拉西林、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢他啶、环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、亚胺培南、多黏菌素 B 及哌拉西林/他唑巴坦。DNA 提取试剂盒、Taq 酶、dNTP Mixture、Loading Buffer 及 Maker 为天根生化科技(北京)有限公司产品。

1.3 体外微生物敏感性试验及外排表型检测 用 E-test 法检测待测菌株对本实验所用抗菌药物的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值, 对 3 种或以上抗菌药耐药者为多重耐药菌。再用同样方法检测待测菌株在含羧基氰化物

间氯苯胍(carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone, CCCP)的 Mueller-Hinton 琼脂中的 MIC 值,该 MIC 值降低至不含 CCCP 的 Mueller-Hinton 琼脂中的 MIC 值的 1/4 或更低者视为外排表型阳性。按此方法将收集菌株分为敏感组和耐药组。

1.4 DNA 及 RNA 的提取 分别采用煮沸法及酶裂解法提取基因组 RNA 及 DNA,具体操作参照试剂使用说明。检测总 RNA 的光密度(optical density,OD)值,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值为 1.6~1.8;DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.8~2.0,表明提取的 RNA 及 DNA 纯度较高。

1.5 基因扩增及凝胶成像分析 *adeB*、*adeR* 及 *adeS* 扩增引物序列见表 1。每一反应体系包括: *Taq* 酶复合物 25 μL,模板 1 μL,上、下游引物各 2 μL 及灭菌 ddH₂O 20 μL。聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)参数:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。将扩增产物在含 0.5 μg/mL 溴化乙锭(ethidium bromide,EB)的 2% 琼脂糖凝胶中电泳 30 min,用凝胶成像系统观察并摄像保存。PCR 扩增产物经纯化后送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.6 逆转录 PCR(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR) 参照 AccessQuick RT-PCR 系统操作说明进行 RT-PCR 扩增目的基因。*recA* 为内参基因。反应参数:95 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。

表 1 PCR 所用引物			
基因片段	引物	引物序列	长度(bp)
<i>adeB</i>	B1	5'-AAA GAC TTC AAA GAG CGG A-3'	675
	B2	5'-TGA CGC ATT GCT TCA CCC-3'	
<i>adeR</i>	R1	5'-ATT TAG CGT ATG ATC ACT TGA AG-3'	851
	R2	5'-TTC CTT ACT AAT TCC TAA CTT AC-3'	
<i>adeS</i>	S1	5'-GCT AGG GAA TAT TTT ATG A-3'	1 102
	S2	5'-ATT ACC CTA TTT CTT CAT G-3'	
<i>recA</i>	A1	5'-TTT GAC AAC CCG ACA ATG-3'	176
	A2	5'-TGC CTG GCT CAT AAG ACG-3'	

2 结 果

本实验鲍氏不动杆菌对不同抗菌药物耐药率如下:哌拉西林 97.6%,头孢吡肟 60.8%,头孢噻肟 75.2%,头孢他啶 75.2%,环丙沙星 80.0%,左氧氟沙星 79.2%,阿米卡星 60.8%,庆大霉素 50.4%,亚胺培南 35.2%,多黏菌素 B 0.0%,哌拉西林/他唑巴坦 48.8%。多重耐药鲍氏不动杆菌 *adeB* 基因携带率为 95.0%,调控基因 *adeR*、*adeS* 携带率分别为 90%、90%;敏感株 *adeB* 基因携带率为 58.1%,调控基因 *adeR*、*adeS* 携带率分别为 49.5%、50.4%。

3 讨 论

有实验对不动杆菌属的几种细菌从动物体内增殖能力、溶血或溶细胞能力及对抗菌药物敏感性等方面进行比较,结果发现鲍氏不动杆菌细胞毒性最强,所有菌株均表达毒力因子相关的外膜蛋白 A(outer membrane protein A,ompA)、胞外聚合物 A(extracellular polymeric substances,epsA),能使 95% 细胞发生生物还原。此外,鲍氏不动杆菌也是其中耐药性最强的菌种,这可能与其有较强的毒力及能抵抗机体的清除力相关^[6]。鲍氏不动杆菌的外膜囊泡中含大量的毒力相关因子^[7],其中

ompA 在其致病机制中发挥重要作用,纯化的 ompA 定位于人喉部上皮细胞的线粒体中,可引起细胞凋亡后细胞色素 C 的释放,同时引起凋亡诱导因子进入细胞内,产生半胱-天冬氨酸蛋白酶 3(cysteinyI aspartate specific protease 3,Caspase-3)及 DNA 碎片。

adeABC 基因表达产物 *adeABC* 与 *adeDE*、*adeXYZ*、*adeIJK* 均属 RND 超家族^[8],其中 *AdeABC* 是最主要的外排系统,有研究表明 *adeABC* 型主动外排泵也见于非鲍氏不动杆菌菌株,它在鲍氏不动杆菌耐药中起着重要作用,使用泵抑制剂后鲍氏不动杆菌的耐药性降低,4 种外排泵可同时共存。用逐步基因分析法研究 *adeB* 基因,发现其包含 7 780 个碱基对序列,负责编码膜融合蛋白、内膜外排蛋白、外膜蛋白通道。*adeB* 不是鲍氏不动杆菌的固有基因,但其在该菌中分布广泛,不排除鲍氏不动杆菌中已发生该基因变异的可能。*adeRS* 是一个双组分调控系统,由位于 *adeABC* 基因上游的调控基因 *adeR* 和 *adeS* 分别编码应答激酶 *adeS* 和反应调节蛋白 *adeR* 组成^[4]。有研究发现在体外采用基因工程技术去除多重耐药株的 *adeRS* 基因,得到的突变株可恢复对外排底物的敏感性,这一结果证实了 *adeRS* 在外排泵基因表达调控中的作用。

研究发现,在耐药菌株中 *adeABC* 与 1 类整合子基因具有协同作用,而在高度敏感菌株中没有发现该协同作用,由此进一步证实该外排系统与鲍氏不动杆菌耐药性相关。而另一 RND 外排系统——*adeIJK* 的高表达则与菌株毒性相关^[9]。

鲍氏不动杆菌高耐药性的形成主要源于临床抗菌药物的滥用^[10],耐药性的获得与可移动耐药因子(如质粒、整合子、转座子等)有关^[11-12]。为避免更严重的耐药现象,多黏菌素的应用仅限于临床紧急情况,使用时还应注意避免严重的神经及肾脏毒性作用。为避免耐药性进一步扩散,国外学者建议定期进行地区间抗菌药物敏感性监控,实时调整预防方案。鲍氏不动杆菌引起的感染不仅限于临床患者^[13],在经历战争或自然灾害的人群以及社区居民中也有发生^[14],因此,全球携手共同防治鲍氏不动杆菌播散及其耐药性扩散迫在眉睫^[15]。

参考文献

[1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2008,21(3):538-582.

[2] Kempf M, Rolain JM. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012,39(2):105-114.

[3] Kim BN, Peleg AY, Lodise TP, et al. Management of meningitis due to antibiotic-resistant *Acinetobacter* species[J]. Lancet Infect Dis, 2009,9(4):245-255.

[4] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update[J]. Drugs, 2009,69(12):1555-1623.

[5] Endo S, Yano H, Hirakata Y, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in Japan[J]. J Antimicrob Chemother, 2012,67(7):1623-1626.

[6] Tayabali AF, Nguyen KC, Shwed PS, et al. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources[J]. PLoS One, 2012,7(5):e37024.

[7] Snellman EA, Sullivan ER, Colwell RR. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1[J]. Eur J Biochem, 2002,269(23):5771-5779.

[8] Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1(下转第 1073 页)

者在完全缓解率、无病生存率、无事件生存率和无复发生存率方面优于 *NPM1* 阴性患者。因而, *NPM1* 被认为是预后良好的独立因素^[4]。 *FLT3* 基因是 1991 年发现的早期造血生长因子受体基因, 其编码的蛋白属于 III 型酪氨酸激酶受体家族, 对造血细胞起调节生长和分化功能^[16]。近年来研究发现, *FLT3* 基因突变及其过度表达与 AML 的预后负相关。 *FLT3*-ITD 阳性患者的无病生存期和总存活率均明显低于 *FLT3*-ITD 阴性的患者^[5]。 *NPM1* 和 *FLT3* 基因突变相伴发生的概率较高, 约占 40%^[6], 但对其预后的报道不一。

本研究共纳入 4 个随机对照研究, 4 个研究的样本量都比较少, 均小于 60 例; 循证医学认为, 小样本随机对照试验, 结果偏离真值, 结论不明确, 犯第一类错误或第二类错误概率较小。其次, 随机分配是减少某些外部因素对结果的影响, 随机化分组是实现组间均衡性的重要手段。本研究中纳入研究的 4 篇文献均未对随机方法进行描述, 因此, 难以判定是否采用随机方法, 从而影响结果的可靠程度。再次, 有 3 篇文献未描述随访情况和失访情况, 因此, 存在失访偏倚的可能。总的来说, 本研究中纳入研究的 4 篇文献质量不高, 均为 B 级和 C 级文献, 可信度不高。

本研究 Meta 分析结果显示, *NPM1*⁺/*FLT3*-ITD⁺ AML 患者的完全缓解率与 *NPM1*⁻/*FLT3*-ITD⁻ AML 患者的差异无统计学意义, 提示 *NPM1* 和 *FLT3* 基因突变相伴发生对 AML 患者的预后没有影响。此外, 由于纳入研究文献质量和数量的限制, 未能就 *NPM1*⁺/*FLT3*-ITD⁺ 与 *NPM1*⁻/*FLT3*-ITD⁻ 对 AML 的预后影响进行敏感性分析和发表偏倚分析。

由于现在可纳入的原始研究数量较少, 研究质量不高, 故现有证据不足以说明 *NPM1* 和 *FLT3* 基因突变对 AML 预后的影响。由于本系统评价可能存在的局限性, 有必要进一步开展大样本、高质量的随机对照试验, 为明确 *NPM1* 和 *FLT3* 基因突变对 AML 预后的影响提供可靠证据。

参考文献

- [1] Löwenberg B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008, 1-11.
- [2] de Nully Brown P, Jurlander J, Pedersen-Bjergaard J, et al. The prognostic significance of chromosomal analysis and immunophenotyping in 117 patients with de novo acute myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 1997, 21(10): 985-995.
- [9] Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. PLoS Genet, 2006, 2(1): e7.
- [10] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global Challenge of Multi-drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471-3484.
- [11] Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acineto-*

- [3] Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002, 3: 179-198.
- [4] Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, et al. *NPM1* but not *FLT3*-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS)[J]. Blood, 2009, 113(21): 5250-5253.
- [5] Stirewalt DL, Radich JP. The role of *FLT3* in haematopoietic malignancies[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(9): 650-665.
- [6] Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with *NPM1* mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2008, 111(5): 2776-2784.
- [7] 吴德沛, 颜灵芝, 杨莉, 等. 急性髓细胞白血病患者 *NPM1* 与 *FLT3* 基因突变的研究[J]. 中华内科杂志, 2007, 11: 211-214.
- [8] 孙超, 夏珺, 沈云峰, 等. 正常核型急性髓系白血病患者 *NPM1* 基因突变的临床研究[J]. 山东医药, 2011, 51(12): 17-20.
- [9] 马亮. 急性髓系白血病患者 *FLT3* 与 *NPM1* 基因突变检测及其临床意义[D]. 北京: 北京协和医学院基础医学院, 2011.
- [10] 陈建兰. 急性髓细胞白血病患者 *NPM1* 及 *FLT3*-ITD 基因突变的检测及临床意义[D]. 广州: 广州医学院, 2011.
- [11] Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)[J]. Blood, 2002, 100(13): 4325-4336.
- [12] Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2008, 358(18): 1909-1918.
- [13] Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome[J]. Nature, 2008, 456(7218): 66-72.
- [14] Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al. Nucleophosmin and Cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(7): 493-505.
- [15] Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(11): 1687-1692.
- [16] Gilliland DG, Griffin JD. The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia[J]. Blood, 2002, 100(5): 1532-1542.

(收稿日期: 2012-12-24)

(上接第 1070 页)

integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33(1): 27-32.

- [9] Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. PLoS Genet, 2006, 2(1): e7.
- [10] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global Challenge of Multi-drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471-3484.
- [11] Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acineto-*

bacter[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(11): 868-873.

- [12] Orsi GB, Falcone M, Venditti M. Surveillance and management of multidrug-resistant microorganisms[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(8): 653-679.
- [13] Mammina C, Bonura C, Aleo A, et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* from intensive care units and home care patients in Palermo, Italy[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(11): E12-15.
- [14] Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli[J]. Clin Infect Dis, 2005, 41(6): 848-854.

(收稿日期: 2012-11-23)