

• 临床检验研究论著 •

鲍氏不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制及菌株同源性分析*

曾慧¹, 周万青², 张之峰^{2△}

(1. 南京市浦口医院检验科; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 江苏南京 210008)

摘要:目的 探讨鲍氏不动杆菌对喹诺酮类药物耐药机制及菌株同源性分析。方法 收集临床分离的喹诺酮类耐药鲍氏不动杆菌 25 株, 采用纸片扩散法(K-B)检测其对常规药物的敏感性; 采用聚合酶链反应(PCR)检测喹诺酮类耐药相关基因 *gyrA* 和 *parC* 基因, 并经限制性内切酶酶切及测序方法验证; 基因外重复回文序列(REP)-PCR 分析菌株同源性。结果 25 株鲍氏不动杆菌对 12 种抗菌药物呈现出多重耐药, 仅对米诺环素和阿米卡星敏感, 敏感率分别为 48.0% 和 32.0%, 对多黏菌素 B 全部敏感 [最低抑菌浓度(MIC)≤2 μg/mL]; 所有菌株检出 *gyrA* 和 *parC* 基因, 25 株菌株均存在 *gyrA* 基因第 83 位密码子 TCA→TTA 突变(Ser→Leu), 23 株菌株存在 *parC* 基因第 80 位密码子 TCG→TTG 突变(Ser→Leu), 2 株菌株存在 *parC* 基因第 84 位 GAA→GGA 突变(Glu→Gly); REP-PCR 显示, 所测菌株具有很高的同源性。结论 耐喹诺酮类鲍氏不动杆菌具有很高的同源性, 存在 *gyrA* 和 *parC* 基因突变位点。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 喹诺酮类; 抗药性, 细菌; 基因, *gyrA*; 基因, *parC*

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1261-03

Mechanisms of quinolones resistance in *Acinetobacter baumannii* and homology analysis among the strains*Zeng Hui¹, Zhou Wanqing², Zhang Zhi Feng^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Nanjing PuKou Hospital; 2. Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: Objective To explore the mechanisms of quinolones resistance in *Acinetobacter baumannii* and homology analysis among the strains. **Methods** 25 strains of quinolones-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated clinically were collected. Kirby-Bauer(K-B) detection was utilized to detect the sensitivity of conventional drugs, and polymerase chain reaction(PCR) was employed to detect quinolone resistance-related genes *gyrA* and *parC* which were verified by restriction enzyme digestion and sequencing, repetitive extragenic palindrome(REP)-PCR was adopted to analyze the strain homology. **Results** Multiple resistances to 12 kinds of antibacterial agents were found among the 25 strains of *Acinetobacter baumannii* which were sensitive only to minocycline and amikacin, with sensitive rates were 48.0% and 32.0%, respectively, and were all sensitive to polymyxin B[minimal inhibitory concentration(MIC)≤2 μg/mL]. *gyrA* and *parC* genes were found in the all strain. Mutation TCA→TTA(Ser→Leu) at coden 83 in *gyrA* gene existed in 25 strains, mutation TCG→TTG(Ser→Leu) at coden 80 in *parC* gene existed in 23 strains, mutation GAA→GGA(Glu→Gly) at coden 84 in *parC* gene existed in 2 strains. REP-PCR showed that the strains had high degree of homology.

Conclusion Quinolone-resistant *Acinetobacter baumannii* has high degree of homology, existing *gyrA* and *parC* gene mutations.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; quinolones; drug resistance, bacterial; genes, *gyrA*; genes, *parC*

鲍氏不动杆菌是一种引起院内感染的常见条件致病菌。该菌可导致广泛的临床感染, 如败血症、泌尿系统感染、伤口感染、脑膜炎等, 特别是院内机械通气相关性肺炎^[1]。喹诺酮类药物是临幊上治疗鲍氏不动杆菌感染常用的抗菌药之一, 具有抗菌谱广、抗菌活性强、体内分布广等优点, 但随着喹诺酮类药物的广泛应用, 其耐药性越来越严重, 给临幊治疗带来严峻挑战。为了解本院多重耐药鲍氏不动杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制, 笔者对相关基因进行了检测, 旨在为临床抗菌药的合理使用和耐药菌株的防控提供参考。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集 2011 年 10 月至 2012 年 3 月分离自南京大学医学院附属鼓楼医院住院患者的喹诺酮类耐药鲍氏不动杆菌 25 株, 其中, 分离于痰液 15 株, 血液 3 株, 腹水和引流液各 2 株, 脑脊液、尿液和胆汁各 1 株。所有菌株经 ATB 细菌鉴定试条(法国 BioMerienx 公司)鉴定。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂: *Taq* DNA 聚合酶、10×buffer(含 Mg^{2+})、dNTPs 购自日本 TaKaRa 公司, DNA Marker 为北京全式金生物技术有限公司产品, *Hinf* I 限制性内切酶为加拿大 Fermentas 公司产品, 药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品, 多黏菌素 B 为美国辉瑞公司产品; 主要仪器: 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪为美国 PE 公司产品, 生物电泳图像分析系统及 Smart View 分析软件为上海复日科技有限公司产品。

1.3 微生物敏感性试验 采用纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)检测受试菌对阿米卡星、头孢吡肟、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/克拉维酸、环丙沙星、复方磺胺甲基异噁唑、左氧氟沙星、米诺环素的耐药性; 采用琼脂稀释法测定其对多黏菌素 B 的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。按照美国临幊实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Insti-

* 基金项目: 南京市卫生局课题资助项目(YKK10061)。作者简介: 曾慧, 女, 学士, 检验师, 主要从事微生物培养及鉴定的工作。△ 通讯作者, E-mail: njzhangzf@hotmail.com。

ture, CLSI)2010 版微生物敏感性试验的执行标准判断,以大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 作为质控菌株。

1.4 细菌 DNA 的提取 以加热煮沸法提取细菌总 DNA。挑取纯培养菌落置于 0.5 mL 离心管内(内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 L), 56 °C 水浴 2 h, 改 95 °C 水浴 10 min, 13 000 g 离心 30 s, 上清液即为基因检测的模板液, 置 -20 °C 冰箱备用。

1.5 耐药基因检测 参照文献[2-3]合成喹诺酮类耐药基因 DNA 旋转酶 A 亚单位(DNA gyrase A subunit, *gyrA*)基因和拓扑异构酶IV C 亚单位(topoisomerase IV C subunit, *parC*)基因, 引物由上海英俊生物技术有限公司合成, *gyrA* 引物(1 067 bp), P1: 5'-GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG-3', P2: 5'-TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG-3'; *parC* 引物(995 bp), P1: 5'-GTA CTA ATC AAA GTT GTG AA-3', P2: 5'-TTC CCC TAA CAT GAA TTT GT-3'。总反应体系为 50 μL, 其中 10×buffer(含 Mg²⁺)5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)各 4 μL, DNA 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, *Taq* DNA 酶 0.3 μL, ddH₂O 34.7 μL。循环参数: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 补充延伸 7 min。PCR 产物经 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析及序列测定 采用限制性内切酶 *Hinf* I 对基因扩增产物进行酶切, 总体系为 20 μL, 其中, 10×buffer 2 μL, PCR 产物 5 μL, 灭菌 ddH₂O 12 μL, *Taq* DNA 酶 1 μL。37 °C 水浴 3 h, 酶切产物与 PCR 产物同时经 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳观察。另选取 PCR 扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司进行双向测序, 测序结果在 GenBank 进行比对。

1.7 基因外重复回文序列(repetitive extragenic palindrome, REP)-PCR 分析菌株同源性^[4-5] REP 引物上海英俊生物技术有限公司合成, P1: 5'-III GCG CCG ICA TCA GGC-3'; P2: 5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC-3'。总反应体系为 50 L, 其中, 10×buffer(含 Mg²⁺)5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)各 4 μL, DNA 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 5 μL, *Taq* DNA 酶 0.3 μL, ddH₂O 28.7 μL。反应条件: 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 1 min, 40 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 补充延伸 16 min。扩增产物经 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳观察。如果主条带位置完全相同, 则为同一分型; 若主条带位置相同, 而副条带有 1~2 个条带不同, 则为不同亚型; 不满足上述条件者, 为不同分型^[6]。

2 结 果

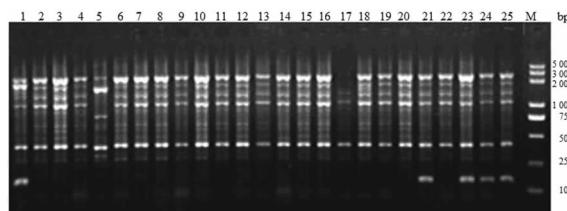
2.1 微生物敏感性试验结果 25 株鲍氏不动杆菌对 12 种抗菌药物呈多重耐药, 仅对米诺环素和阿米卡星敏感, 敏感率分别为 48.0%、32.0%, 对其他 10 种检测药物的耐药率均为 100%, 对多黏菌素 B 全部敏感(MIC≤2 μg/mL), 其中 18 株的 MIC 为 0.5 μg/mL, 5 株 MIC 为 1 μg/mL, 2 株 MIC 为 2 μg/mL。

2.2 基因检测及 RFLP 分析 25 株耐喹诺酮类鲍氏不动杆菌经 PCR 扩增, 均检出 *gyrA*、*parC* 基因。经 *Hinf* I 酶切, 25 株 *gyrA* 基因扩增产物均被酶切; *parC* 基因扩增产物中, 有 23 株未被酶切, 有 2 株菌被酶切。

2.3 序列测定结果 经序列测定发现, 25 株菌株都存在 *gyrA* 基因第 83 位密码子 TCA→TTA 有义突变(Ser→Leu);

23 株菌株的 *parC* 基因第 80 位密码子出现 TCG→TTG 有义突变(Ser→Leu), 并同时存在 2 株 *parC* 基因第 84 位 GAA→GGA 突变(Glu→Gly)。

2.4 REP-PCR 结果 25 株喹诺酮类耐药鲍氏不动杆菌具有相似的分型条带, 为同一克隆株的播散, 其中泳道 5 和泳道 17 稍有差别, 为亚型。



1~25: 菌株; M: DNA Marker。

图 2 25 株鲍氏不动杆菌菌株的 REP-PCR 结果

3 讨 论

鲍氏不动杆菌为非发酵革兰阴性菌, 广泛存在于自然界、医院环境、人的体表及上呼吸道, 属于条件致病菌。近年来, 它已经成为医院感染中重要的病原菌。在抗菌药物的过度使用下, 饱满不动杆菌的耐药菌株随之产生, 并且临床分离的多重耐药菌株越来越多。给临床治疗带来了严峻挑战, 也对院内感染的防控提出了更高的要求。

喹诺酮类药物是一类人工合成的化合物, 最早问世于 50 多年前^[7], 如今全球约 20 个化学类似物进入临床应用。该类药物作为治疗不动杆菌感染的抗菌药之一, 主要作用于细菌拓扑异构酶 II (DNA 旋转酶) 或拓扑异构酶 IV, 使细菌 DNA 无法复制而起抑菌作用。然而, 随着喹诺酮类药物的广泛应用, 鲍氏不动杆菌对其耐药性日益升高, 这可能是由于多种耐药机制参与的结果, 其中靶位旁路或变更、膜通透性降低以及主动外排作用等起主要作用^[8-9]。

本研究选用的 25 株对喹诺酮类耐药的鲍氏不动杆菌同时呈现多重耐药性, 这可能是由于多种耐药机制参与的结果。而染色体介导的喹诺酮类耐药性基因突变, 即编码 DNA 旋转酶的 *gyrA* 或编码拓扑异构酶 IV 的 *parC* 基因发生点突变被普遍认为是细菌对喹诺酮类耐药的主要原因。本研究中, 25 株菌经 PCR 扩增均检出 *gyrA* 基因和 *parC* 基因, 而 REP-PCR 结果显示所测菌株具有很高的同源性, 证实了 *gyrA* 和 *parC* 基因是细菌对喹诺酮类耐药的主要突变基因。本研究中, 25 株菌的 *gyrA* 基因均未被 *Hinf* I 酶切, 表明 25 株菌株均存在第 83 位密码子 TCA→TTA 的有义突变(Ser→Leu); 23 株菌的 *parC* 基因未被 *Hinf* I 酶切, 证明在第 80 位密码子出现 TCG→TTG 有义突变(Ser→Leu), 另外 2 株菌可被酶切, 经测序证实这 2 株菌并无第 80 位的突变, 而存在 *parC* 基因第 84 位密码子 GAA→GGA 突变(Glu→Gly), 证明了 *gyrA* 基因的第 83 位和 *parC* 的第 80 位密码子突变是鲍氏不动杆菌对喹诺酮类药物耐药的主要机制。从分子进化分析可确认, 本研究 *parC* 第 84 位密码子 GAA→GGA 的突变为新的变异型。袁星等^[10]研究亦发现, *gyrA* 基因存在第 121 位 TGT→CGT 的突变, 但笔者检测该基因并没有发现除了第 83 位之外的其他突变位点。另外, 分析发现 *parC* 基因第 144 位密码子 AGC→AAC 突变^[10], 第 80 位密码子 TCG→TTG 突变^[11], 第 40 位密码子 CCC→CCT 突变^[11], 第 41 位密码子 GTA→GTT 突变^[11], 第 44 位密码子 CGT→CGC 突变^[11], 说明喹诺酮类耐药机制具有多样性。多黏菌素 B 和替加环素被(下转第 1265 页)

实相关的疫苗政策,降低儿童的乙肝疫苗无应答率,以提高对HBV的免疫力。

研究还发现,总体全阴性模式和总体 HBsAg 阳性模式出现相互对应的随年龄增大而变化的趋势,总体 HBsAg 阳性率在出生后逐渐上升,>35~40 岁时达高峰,随后随年龄增大缓慢下降;而总体全阴性率随年龄增大而逐渐下降,>25~30 岁组为低点,然后缓慢上升。

此外,本研究中,HBsAg+HBeAg 模式为罕见模式,推测是前 C 区突变后,HBeAg 检测系统不能检出 HBeAb,或由于宿主选择性免疫缺陷,缺乏 HBcAg 特异性 T 淋巴细胞,对 HBcAg 没有淋巴细胞增殖反应^[9]。HBsAg 是 HBV 感染的特异性指标,HBsAb 一般于 HBsAg 消失数周后在血液中出现,是 HBsAg 刺激机体产生的特异保护性抗体,也是 HBV 感染终止及人体获得免疫力的标志。一般情况下,血清中 HBsAg 与 HBsAb 不可能同时存在,但可出现在下列情况:HBsAg 模式人群接种乙肝疫苗后,有正常的 HBeAb 应答,但仍能感染 a 决定簇变异的免疫逃避病毒株,从而与 HBsAb 并存;HBeAg 阳性者接种疫苗后产生 HBsAb,由于 S 基因的变异,其编码的 HBsAg 抗原性改变,原型 HBsAb 与 HBsAg 构成免疫复合物,因此,少数慢性乙肝患者,可出现 HBsAb 与 HBsAg 同时阳性的情况^[10]。HBsAg+HBeAg+HBeAb+HBcAb 的模式中,HBeAg 阳性一般反映 HBV 复制活跃,传染性较强,HBeAb 一般在 HBeAg 转阴后产生,表明部分病毒被清除,传染性较低,在抗 HBV 的药物治疗过程中,会发生 HBeAg 向 HBeAb 的转换,此外,可伴有前 C 区的变异,出现 HBeAg 和 HBeAb 同时阳性^[11]。

综上所述,通过掌握人群的 HBV 免疫情况,可进一步提

(上接第 1262 页)

证实对多重耐药鲍氏不动杆菌具有很好的抗菌活性^[12]。本研究显示,所测菌株对多黏菌素 B 均敏感。

了解喹诺酮类药物的耐药机制,对合理应用喹诺酮类抗菌药,减少耐药株的产生具有重要意义。本研究的 25 株菌具有高度的同源性,系克隆株,说明本院耐喹诺酮类鲍氏不动杆菌流行的主要传播形式为克隆株的存在和传播。因此,加强院内感染防控力度至关重要,简单、有效的方法就是医护人员做好无菌操作、及时发现和隔离受感染的患者等。

参考文献

- [1] Mak JK, Kim MJ, Pham J, et al. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(1): 47-54.
- [2] Vila J, Ruiz J, Goni P, et al. Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(5): 1201-1203.
- [3] Vila J, Ruiz J, Goni P, et al. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1997, 39(6): 757-762.
- [4] 周万青,张之峰,胡晓菡,等.多重耐药鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药机制分析[J].临检检验杂志,2012,30(8):577-579.
- [5] Bou G, Cervero G, Domínguez MA, et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem-

高乙肝防护意识,为采取切实可行的防护措施提供可靠依据。

参考文献

- [1] 陈静静,冯伟,徐永范.奉化市人群乙肝病毒感染血清流行病学调查[J].浙江预防医学,2008,20(5):20-21.
- [2] 张文守.乙型肝炎病毒感染 163 例流行病学调查[J].上海预防医学杂志,2009,21(4):160-161.
- [3] 倪语星,尚红.临床微生物学与检验[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2007.
- [4] 陈瑜.基于医院人群的乙型肝炎病毒血清学标志物阳性率调查的重要性[J].中华检验医学杂志,2011,34(3):193-195.
- [5] 江美琴,曹云生,李寿俊,等.1 303 例乙型肝炎分布特征[J].浙江预防医学,2010,22(12):42-43.
- [6] 朱科伦,朱郁惆,曾文铤,等.乙型肝炎流行病学的研究新进展[J].广州医药,2010,41(4):1-2.
- [7] 余庆福,马仙葵,杨玉仙,等.2009 年玉溪市人群乙肝疫苗免疫状况基线调查[J].预防医学情报杂志,2010,26(11):915-917.
- [8] 陈敏,陈清,陈思东,等.乙肝疫苗免疫后无(弱)应答影响因素的分析[J].广东药学院学报,2003,19(2):173-175.
- [9] Lee JH, Paglieroni TG, Holland PV, et al. Chronic hepatitis B virus infection in an anti-HBc-nonreactive blood donor: variant virus or defective immune response? [J]. *Hepatology*, 1992, 16(1): 24-30.
- [10] 郎江明.临床免疫诊断学[M].广州:广东科技出版社,2003.
- [11] 王永忠,周国平,赵红霞,等. HBeAg、HBeAb 双阳性患者血清中病毒前 C 区基因序列分析[J].中国煤炭工业医学杂志,2002,1(5):56-59.

(收稿日期:2014-01-12)

- [1] and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2000, 6(12): 635-643.
- [6] 周万青,沈瀚,秦芳,等.多重耐药鲍曼不动杆菌整合子及菌株同源性分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(24):2953-2955.
- [7] Lesher GY, Froelich EJ, Gruett MD, et al. 1,8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents [J]. *J Med Pharm Chem*, 1962, 91: 1063-1065.
- [8] 张永,唐英春,陆坚,等.鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药分子机制的研究[J].中国抗生素杂志,2005,30(4):217-221,240.
- [9] Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59(6): 1210-1215.
- [10] 袁星,沈继录,徐元宏,等.120 株临床分离鲍曼不动杆菌对喹诺酮类耐药表型及其机制[J].安徽医科大学学报,2011,46(2): 154-157.
- [11] 褚少朋,汪桂华,景蓉蓉,等.一组泛耐药鲍曼不动杆菌中发现拓扑异构酶IV 编码基因新的变异型[J].中华微生物和免疫学杂志,2012,32(2):157-160.
- [12] Tatman-Otkun M, Gürcan S, Ozer B, et al. Annual trends in antibiotic resistance of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains and the effect of synergistic antibiotic combinations [J]. *New Microbiol*, 2004, 27(1): 21-28.

(收稿日期:2014-01-23)