

• 论 著 •

多重耐药鲍曼不动杆菌相关耐药基因的分析

高晶晶¹, 邢丽丹², 吴元健¹, 徐卫东¹, 钟 桥^{1△}, 王亚南¹, 李文静¹

(1. 南京医科大学附属苏州医院检验科, 江苏苏州 215002; 2. 江苏大学检验医学研究所, 江苏镇江 212013)

摘要:目的 研究多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)的耐药性,并分析其相关耐药基因 tetA, tetB, sul1, dfrA, mdfA。方法 2012年8月至2013年3月江苏省镇江市第一人民医院住院患者的痰液标本中分离得到的MDR-AB菌株50株。应用纸片扩散法检测对抗菌药物的敏感度。采用聚合酶链反应(PCR)检测耐药基因 tetA, tetB, sul1, dfrA1, mdfA。结果 50株MDR-AB对头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦、米诺环素、复方磺胺甲噁唑的耐药率分别为38%、64%、40%、50%,对其他参与试验的8种常见抗菌药物的耐药率均大于或等于94%。50株MDR-AB中检测到 tetB, sul1 和 mdfA 基因的表达,阳性率分别为70%、95%和45%。结论 该研究中MDR-AB多重耐药情况比较严重,MDR-AB对四环素、复方磺胺甲噁唑类抗菌药物耐药与 tetB, sul1 及广谱抗菌药物外排泵基因 mdfA 等的表达密切相关。

关键词:鲍曼不动杆菌; 多重耐药; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)02-0187-03

Analysis of resistant genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

Gao Jingjing¹, Xing Lidan², Wu Yuanjian¹, Xu Weidong¹, Zhong Qiao^{1△}, Wang Yanan¹, Li Wenjing¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu 215002, China; 2. Institute of Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: **Objective** To investigate drug resistant and resistant genes such as tetA, tetB, sul1, dfrA1 and mdfA in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDR-AB). **Methods** A total of fifty strains of MDR-AB were collected during August 2012 to March 2013 from patients in the First Hospital of Zhenjiang. Kirby Bauer diffusion method was used to detect the susceptibilities of the strains to antimicrobial agents. polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect resistant genes. **Results** The drug-resistance rates of 50 strains of MDR-AB to cefoperazone/sulbactam, ampicillin/sulbactam, minocycline sulfamethoxazole were 38%, 64%, 40%, 50% respectively, to other eight antibacterial agents were equal or greater than 95%. There were expression of tetB, sul1 and mdfA in MDR-AB with the positive rates which were 70%, 95% and 45% respectively. **Conclusion** The MDR-AB in this study has high drug-resistance to tetracycline and sulfamethoxazole, which is closely related to the expression of tetB, sul1, mdfA gene.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; multidrug-resistance; resistant genes

鲍曼不动杆菌是重要的条件致病菌,在医院内,尤其是重症监护病房(ICU)的感染率和耐药率日渐增加,临床治疗较困难。鲍曼不动杆菌在医院分布广泛且该菌对湿热紫外线及化学消毒剂有较强抵抗力,常规消毒不能将其杀灭,免疫功能低下患者易感染,可引发呼吸道、泌尿道、消化道等感染,且感染多以多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)为主。MDR-AB对5类抗菌药物中的3类及以上药物耐药,包括头孢菌素类、碳青霉烯类、β-内酰胺酶抑制剂、氨基糖苷类和氟喹诺酮类。因此,对鲍曼不动杆菌的耐药机制进行全面而深入的研究意义重大^[1]。本研究对MDR-AB的四环素耐药基因 tetA, tetB, 复方磺胺甲噁唑耐药基因 sul1, dfrA1, 以及广谱外排泵基因 mdfA 进行了检测,旨在对鲍曼不动杆菌的耐药机制进行更加全面而深入的了解。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 临床分离的50株鲍曼不动杆菌均来自2012年8月至2013年3月镇江市第一人民医院50例住院患者的痰液标本,同一患者同一部位重复分离的菌株不重复计入。

1.2 药敏试验 采用纸片扩散(K-B)法测定MDR-AB对抗菌药物的敏感度, MH琼脂和药敏纸片分别为博赛生物技术有限公司和OXOID公司提供。以标准菌株大肠埃希菌

ATCC25922和铜绿假单胞菌ATCC27853作为质控菌株,并根据2010版美国临床实验室标准化研究所(CLSI)文件的标准进行抗菌药物敏感度判断。

1.3 细菌处理 挑选纯培养菌落置入0.5 mL离心管内,内置50 μL裂解液和蛋白酶K的混合物。聚合酶链反应(PCR)仪上55 ℃消化细菌菌体1 h后,95 ℃破坏裂解液内的蛋白酶K 10 min,然后每管补充200 μL纯水,即为DNA模板液,置于-20 ℃冰箱保存备用。

1.4 基因检测 PCR法检测氨基糖苷类耐药基因,靶基因引物序列见表1。PCR试剂购于日本Takara公司,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。各PCR反应体系均严格按照说明书进行。PCR扩增热循环参数为93 ℃预变性5 min,然后按93 ℃ 60 s, 55 ℃ 60 s, 72 ℃ 60 s循环35个周期,最后一个周期时72 ℃条件下延长7 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳后,在紫外凝胶电泳成像仪下观察,并记录结果。

1.5 基因测序 PCR扩增产物采用美国应用生物系统公司提供的ABI3730型毛细管全自动测序仪进行测序,委托上海翰宇生物技术有限公司完成。

1.6 序列比对分析 应用Chromas读序工具软件,测序结果用Chromas直接作局部序列比对基本检索工具(BLAST)

比对。

表 1 靶基因 PCR 引物序列及终产物长度

| 靶基因 | 引物序列 | 引物大小 (bp) |
|-------|------------------------------------|-----------|
| tetA | 上游:CTG ATC GTA ATT CTG AGC ACT G | 420 |
| | 下游:CGC GAC CAT CCC GAA CCC GAA | |
| tetB | 上游:CTT ATC ATG CCA GTC TTG CC | 202 |
| | 下游:CAA TAA GTA ATC CAG CGA TGC | |
| sul1 | 上游:TAG CGA GGG CTT TAC TAA GC | 300 |
| | 下游:ATT CAG AAT GCC GAA CAC CG | |
| dfrA1 | 上游:TTG TGA AAC TAT CAC TAA TGG TAG | 480 |
| | 下游:CTT GTT AAC CCT TTT GCC AGA | |
| mdfA | 上游:ACG ACA GCG TTG AAC CGT AC | 365 |
| | 下游:TCA GCA GTG GGA TAT GCC GC | |

2 结果

2.1 50 株 MDR-AB 药敏试验 50 株 MDR-AB 对头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦、米诺环素、磺胺甲恶唑的耐药率分别为 38%、64%、40%、50%，对其他参与试验的 8 种抗菌药物的耐药率均大于或等于 94%。见表 2。

表 2 50 株 MDR-AB 对 12 种抗菌药物的药敏试验 [n (%), n=50]

| 抗菌药物 | 耐药 | 敏感 | 抗菌药物 | 耐药 | 敏感 |
|-----------|---------|--------|----------|---------|--------|
| 亚胺培南 | 50(100) | 0(0) | 氨苄西林/舒巴坦 | 32(64) | 36(18) |
| 头孢吡肟 | 47(94) | 6(3) | 阿米卡星 | 47(94) | 6(3) |
| 头孢他啶 | 50(100) | 0(0) | 庆大霉素 | 50(100) | 0(0) |
| 头孢曲松 | 49(98) | 2(1) | 环丙沙星 | 50(100) | 0(0) |
| 头孢哌酮/舒巴坦 | 19(38) | 26(13) | 米诺环素 | 20(40) | 36(18) |
| 哌拉西林/他唑巴坦 | 48(96) | 4(2) | 磺胺甲恶唑 | 25(50) | 34(17) |

2.2 耐药基因检测 四环素耐药相关基因 tetA、tetB 中检测到 tetB 表达,阳性率为 70%，复方磺胺甲恶唑相关耐药基因 sul1 和 dfrA1 中检测到 sul1 表达,阳性率为 95%，广谱抗菌药物外排泵基因 mdfA 表达阳性率为 45%。对三种阳性基因的 PCR 扩增产物进行 DNA 测序,并进行 BLAST 比对分析,与基因组中已注册的序列一致。

3 讨论

随着抗菌药物的广泛使用,感染患者对细菌的耐药率逐渐上升,尤其是鲍曼不动杆菌在近几十年耐药率急剧增加。多重耐药甚至泛耐药菌株的出现提示菌株耐药机制的多样性和复杂性,加上耐药速度发展迅速,更加引起了学者的研究兴趣。目前已知的耐药机制主要包括 β-内酰胺酶、氨基糖苷类修饰酶等各种酶的降解,如膜孔蛋白的突变等靶蛋白的修饰,膜渗透性的改变以及外排泵的作用加强等^[2]。其中,研究最多的是 β-内酰胺酶^[3-4],本实验室之前检测的 β-内酰胺酶类耐药基因 TEM、AmpC、OXA-23 和 OXA-51 四种基因,阳性率非常高,氨基糖苷类修饰酶基因 aac(3)-I、aac(6′)-Ib、aph(3′)-I 以及 16S rRNA 甲基化酶基因 armA 耐药率非常高,有的甚至在 90% 以上^[5-6]。此外,这些菌株还对四环素,复方磺胺甲恶唑等

抗菌药物表现出不同程度的耐药性,所以本研究检测了 tetA、tetB、sul1、dfrA1 和 mdfA 等基因。菌株的药敏试验结果表明本研究所用菌株的多重耐药现象比较严重,且对不同类型的药物表现出不同程度的耐药,一定程度上反映了本地区鲍曼不动杆菌多重耐药的复杂性。

细菌对四环素耐药的机制是由不同的四环素 tet 耐药基因决定的,包括核糖体保护机制、药物排出泵机制和酶钝化机制等。如由 tetA 和 tetB 转座子介导的外排泵,tetA 仅作用于四环素,而 tetB 可作用于四环素和米诺环素^[7];由 tetM 和 tetO 基因介导,保护核糖体免受四环素、多西环素和米诺环素的作用。本研究中,四环素耐药基因只检测到了 tetB 基因,PCR 条带呈现不同程度的阳性,阳性率高达 70%,但没有检测到 tetA 基因,进一步说明了鲍曼不动杆菌对米诺环素的耐药与 tetB 基因相关。

磺胺类药物主要是通过作用于二氢叶酸,影响细菌核酸的代谢来发挥其杀菌作用的,而细菌对磺胺类药物耐药的主要机制是通过获得 sul1 基因编码二氢叶酸合成酶,竞争拮抗磺胺类药物,抑制磺胺类药物的作用而导致耐药的产生。另外,细菌还可以通过获得 dfr 基因产生二氢叶酸还原酶,拮抗甲氧苄胺嘧啶而耐药^[8]。本研究中未检测到 dfrA1 的表达,而 sul1 的阳性率则达 95%。

另外,外排泵的外排作用加强也是鲍曼不动杆菌的重要耐药机制之一。在鲍曼不动杆菌,外排泵系统主要包括耐药小结节分裂(RND)家族,主要超化因子(MFS)家族,多药及毒物外排(MATE)家族等。mdfA 质子泵属于 MFS 家族,在大肠埃希菌、肺炎克雷伯杆菌等中也有发现^[9],本研究中 mdfA 检出率为 45%。因此,本研究中的多重耐药菌株除了与 tetB、sul1 基因相关外,与携带 mdfA 基因也有密切的联系。

MDR-AB 感染患者常患有基础疾病,免疫力低下,其医院感染率日渐增加,不仅对目前常用的抗菌药物产生耐药,而且还容易在院内尤其是 ICU 中造成广泛的交叉感染^[10]。自 1991 年纽约首次爆发 MDR-AB 感染以来,MDR-AB 感染已经在全球范围内流行,很多国家均有报道,甚至在不同国家间广泛传播^[11-15]。本研究除了折射出本地区鲍曼不动杆菌耐药情况比较严重外,同时也反映了其耐药机制的多样性,制定合理的方案应对 MDR-AB 是控制耐药鲍曼不动杆菌感染的重要方法和手段。

参考文献

- [1] Doi Y, Husain S, Potoski B, et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(6): 980-982.
- [2] Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update[J]. *Drugs*, 2009, 69(12): 1555-1623.
- [3] Leonard DA, Bonomo RA, Powers RA. Class D beta-Lactamases: a reappraisal after five decades[J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46(11): 2407-2415.
- [4] Krizova L, Poirel L, Nordmann P, et al. TEM-1 β-lactamase as a source of resistance to sulbactam in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(12): 2786-2791.
- [5] 邢丽丹, 糜祖煌, 徐鑫鑫, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌中 β 内酰胺酶基因的检测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2014, 14(1): 47-54.
- [6] 邢丽丹, 糜祖煌, 徐鑫鑫, 等. 36 株多重耐药鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物耐药基因的流行病学研究[J]. *中国感(下转第 190 页)*

2 结 果

2.1 UF-500i 法和干化学法检测符合率比较 500 份尿样中, 细菌培养出 180 例阳性。UF-500i 法检测与细菌培养结果符合率为 98.33% (177/180), 干化学法检测与之符合率为 91.67% (165/180), 两种方法符合率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.204, P < 0.05$)。

2.2 UF-500i 法和干化学法检测敏感度和特异度比较 UF-500i 法检测敏感度为 98.33% (177/180), 特异度为 99.06% (320/323); 干化学法检测敏感度为 91.67% (165/180), 特异度为 95.31% (320/335), 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

UTI 病原菌主要通过外尿道口进入膀胱和肾而引起 UTI。随着抗菌药物、免疫抑制剂、激素的应用及介入诊断的增多, UTI 发生率也逐渐升高, 如果不能合理或未彻底治疗, 将增加细菌的耐药性, 特别是多重耐药菌株的产生, 给后续治疗造成困扰^[3-4]。UTI 诊断应根据患者的临床表现及实验室数据来综合确诊, 实验室数据主要以尿液沉渣 WBC 计数、细菌计数、WBC 酯酶和亚硝酸盐反应以及中段尿细菌培养法等来确定^[5]。

尿沉渣检查是在显微镜下对尿中的沉淀物进行定量分析, 通过定量数据来判断尿液状况。正常尿液中 95% 为水, 其余 5% 为无机物质和有机物质组成的固体物^[6]。通过对尿液固体物中的有机和无机成分的定性鉴别、定量计数等, 可间接诊断泌尿系统存在的疾病^[7]。细菌培养作为 UTI 的诊断金标准, 临床效能虽然好, 但是耗时太长, 从采集标本到出报告一般需要 2~3 d, 不能及时为患者提供可靠的诊断结果, 易延误治疗^[8-9]。UF-500i 尿沉渣分析仪具有使用便捷、快速、灵敏度高、重复性好等优点, 且很好地解决了尿沉渣检测的自动化问题^[10]。本研究采用日本 Sysmex 公司生产的 UF-500i 全自动尿液分析仪检测尿液, 并与细菌培养结果及干化学法检测结果进行比较。结果显示, UF-500i 法检测符合率为 98.33% (177/180); 干化学法检测符合率为 91.67% (165/180), 两种方法符合率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.204, P < 0.05$)。UF-500i

法检测敏感度为 98.33%, 特异度为 99.06%; 干化学法检测敏感度为 91.67%, 特异度为 95.31%, 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 UF-500i 全自动尿液分析仪具有较高的特异度及敏感度, 能很好地地区分 UTI 及非 UTI, 为临床快速、准确诊断打下了坚实基础。

综上所述, UF-500i 全自动尿液分析仪在一定条件和范围内对尿液细菌培养结果有预见作用, 且能对尿液标本进行快速有效的筛查, 大部分阴性结果可根据检测结果排除 UTI。对于 UF-500i 全自动尿液分析仪阳性的患者应进一步做细菌培养^[9-10], 根据培养及药敏结果, 及时对症治疗调整用药。

参考文献

- [1] 曾成林, 杨湛斐. UTI 患者尿培养及药敏分析[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(7): 503-504.
- [2] 张东霞. 全自动尿沉渣分析仪在尿样检查中的应用[J]. 中国临床实用医学, 2010, 4(6): 220-221.
- [3] 吴新忠, 庞鑫, 姚妍妍. UF-500 尿液分析仪细菌计数对尿道感染的诊断性能评价[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(16): 2764-2766.
- [4] 郑慧娟, 鲍玉洲. 尿沉渣分析仪与尿培养联合检测对于尿路感染的检验意义[J]. 医药前沿, 2013, 10(28): 142-143.
- [5] 王学涵, 吴丽萍. 尿沉渣分析仪对尿液中细菌测定性能及对尿路感染的筛查价值[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(10): 1223-1224.
- [6] 陈浩, 白文丽, 张涛. 尿液有形成分检查方法现状[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(3): 539-540.
- [7] 于辉, 任新艳. 全自动尿有形成分分析仪原理及临床应用[J]. 中国医疗设备, 2010, 25(8): 46-47.
- [8] 范冰, 王瑞玲, 刘兰兰, 等. 尿沉渣与干化学分析筛检尿路感染的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 136-138.
- [9] 贺霄羽, 龙爱玲, 林玲, 等. 尿沉渣分析仪结果在筛检尿路感染诊断中的应用[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(1): 83-84.
- [10] 满思金, 孔德玲. 尿干化学分析仪与 UF-500 尿沉渣分析仪联合运用在尿路感染诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 788-789.

(收稿日期: 2014-10-15)

(上接第 188 页)

- 染与化疗杂志, 2013, 13, (6): 442-445.
- [7] Huys G, Cnockaert M, Vanechoutte M, et al. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals[J]. Res Microbiol, 2005, 156(3): 348-355.
- [8] 叶金艳, 祝建军, 杜玉海, 等. 志贺菌属对复方磺胺甲噁唑耐药相关基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(2): 142-144.
- [9] 文怡, 糜祖煌, 刘根焰, 等. 发现大肠埃希菌喹诺酮耐药株 *gyrA* 基因新亚型和 *aac(6')-I b-Cr, mdfA* 基因[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(1): 53-54.
- [10] Perez F, Endimiani A, Bonomo RA. Why are we afraid of *Acinetobacter baumannii*[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008, 6(3): 269-271.
- [11] Yasuhara T, Kugawa S, Tateishi Y, et al. MLST analysis of multiple antimicrobial resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Rinsho

- Byori, 2013, 61(6): 488-492.
- [12] Gao J, Zhao X, Bao Y, et al. Antibiotic resistance and OXA-type carbapenemases-encoding genes in airborne *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wards[J]. Burns, 2013, 40(2): 295-299.
- [13] Niranjana DK, Singh NP, Manchanda V, et al. Multiple carbapenem hydrolyzing genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Indian J Med Microbiol, 2013, 31(3): 237-241.
- [14] Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, et al. Genome sequences of Multi-drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* strains from nosocomial outbreaks in Japan[J]. Genome Announc, 2013, 1(4): 1128.
- [15] Bonnin RA, Cuzon G, Poirel L, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone, France[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(5): 822-823.

(收稿日期: 2014-11-20)