

• 论 著 •

鲍曼不动杆菌 *adeB* 基因检测及外排泵抑制剂对其药物敏感性的影响^{*}

卢灵锋, 李光荣, 向成玉, 杨 葵, 刘靳波[△]

(泸州医学院附属医院检验科, 四川泸州 646000)

摘 要:目的 了解该院临床分离的鲍曼不动杆菌外排泵基因 *adeB* 表达情况。探讨外排泵抑制剂羰基氰化氯苯腙(CCCP)对鲍曼不动杆菌药物敏感性的影响。方法 收集、分离及鉴定鲍曼不动杆菌 68 株,应用聚合酶链反应方法对外排泵基因 *adeB* 进行检测,采用琼脂稀释法检测加入 CCCP 前后 *adeB* 阳性鲍曼不动杆菌对头孢曲松、环丙沙星、亚胺培南、阿米卡星和阿奇霉素敏感性的变化。结果 68 株鲍曼不动杆菌中,其中有 57 株 *adeB* 基因阳性,阳性率为 83.8%,且 *adeB* 阳性组的耐药率和 50%最低抑菌浓度均高于 *adeB* 阴性组。在 CCCP 干预实验中,利用上述 5 种抗菌药物为底物,57 株 *adeB* 阳性鲍曼不动杆菌中,分别有 31、34、38、35 和 30 株在 10 μg/mL CCCP 条件下最低抑菌浓度值降低 4 倍或 4 倍以上。结论 外排泵基因 *adeB* 广泛存在于临床分离鲍曼不动杆菌中,外排泵过度表达与细菌多重耐药机制关系密切,CCCP 干预能恢复细菌对抗菌药物的敏感性。

关键词:鲍曼不动杆菌; *adeB* 基因; 羰基氰化氯苯腙

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1520-03

Investigation on efflux pump gene *adeB* and effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on the drug sensitivity of *Acinetobacter baumannii*^{*}

Lu Lingfeng, Li Guangrong, Xiang Chengyu, Yang Kui, Liu Jinbo[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the efflux pump gene *adeB* of *Acinetobacter baumannii* in the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College. To explore the effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on the drug sensitivity of *Acinetobacter baumannii*. **Methods** A total of 68 strains *Acinetobacter baumannii* were collected, separated and identified. Polymerase chain reaction (PCR) technology was used to detect efflux pump gene *adeB*. The antibiotic activities of ceftriaxone, imipenem, ciprofloxacin, amikacin and azithromycin in *adeB* positive strains were detected by the agar dilution method with or without CCCP. **Results** There were 57 *adeB* positive strains in 68 *Acinetobacter baumannii* strains, positive detection rate was 83.8%, the resistant rate and 50% minimum inhibitory concentration of the *adeB* positive group was higher than that of *adeB* negative group. In the intervention experiment, of the 57 *adeB* positive strains, at least four fold decrease in minimum inhibitory concentration was observed in 31, 34, 38, 35 and 30 isolates to the five antibiotics with 10 μg/mL CCCP. **Conclusion** The *adeB* gene exists in *Acinetobacter baumannii* isolated in clinic widely, the over-expression of efflux pump is related to the multiple-antibiotic-resistant mechanisms, CCCP intervention could restore the sensitivity of bacteria to antimicrobial agents.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; *adeB* gene; carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

过去三十年,鲍曼不动杆菌已被全球公认为引起院内感染的重要致病菌^[1],随着抗菌药物的广泛使用,鲍曼不动杆菌耐药性由多重耐药发展到对临床常用抗菌药物的泛耐药或“全”耐药,耐药率在逐年增高^[2-3]。*adeABC* 是鲍曼不动杆菌中第一个被发现的最主要和特有的多重耐药外排泵,*adeB* 起主要介导作用,主要介导对氨基糖苷类、氟喹诺酮类、红霉素、氯霉素的耐药^[4]。羰基氰化氯苯腙(CCCP)已经成为了研究外排耐药系统必不可少的工具,CCCP 明显降低耐药菌的最低抑菌浓度(MIC),几乎成为判断主动外排系统存在的标志和最合适筛选鲍曼不动杆菌的外排泵抑制剂^[5]。本研究对临床分离的 68 株鲍曼不动杆菌筛查主动外排泵基因 *adeB*,同时进行 CCCP 的干预实验,揭示外排泵机制与鲍曼不动杆菌耐药的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集泸州医学院附属医院 2013 年 10 月至

2014 年 9 月临床分离的鲍曼不动杆菌 68 株(非重复菌株),标本类型包括痰液、分泌物、尿液、血液等,来自于 ICU、呼吸内科、血液内科、烧伤科等科室。

1.2 仪器与试剂 西门子 MicroScan WalkAway 96 Plus 细菌鉴定仪由北京泰林东方商贸有限公司提供;C1000 Thermal Cycle 聚合酶链反应(PCR)扩增仪和 Gel Doc XR+凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;PCR 引物采用 Primer5.0 进行设计,由上海生物工程有限公司合成;PCR 反应体系和 DNA 标记物 DL1000 分别购自上海生物工程和大连宝生物工程有限公司;头孢曲松(CRO)、环丙沙星(CIP)、亚胺培南(IMP)、阿米卡星(AMK)和阿奇霉素(AZM)标准品购自北京天坛生物有限公司;CCCP 标准品购自 Sigma 公司。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 及鲍曼不动杆菌 ATCC19606。

1.3 方法

^{*} 基金项目:四川大学与泸州市人民政府战略合作项目(2013CDLZ-S15)。 作者简介:卢灵锋,男,主管检验师,主要从事临床微生物研究。

[△] 通讯作者,E-mail:liujb7203@163.com。

1.3.1 细菌鉴定 68 株鲍曼不动杆菌根据菌落形态和革兰染色结果,经 MicroScan WalkAway 96 Plus 微生物分析仪进行细菌鉴定确认。

1.3.2 PCR 检测 *adeB* 基因 从血平板挑取适量菌落悬浊于 300 μ L 蒸馏水中,100 $^{\circ}$ C 干浴 10 min,然后 13 000 r/min 离心 10 min,上清液即为 DNA 模板。*adeB* 引物序列:上游引物:5'-TTA ACG ATA GCG TTG TAA CC-3',下游引物:5'-TGA GCA GAC AAT GGA ATA GT-3';产物大小 541 bp。PCR 总反应体系为 25 μ L,其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L)2.0 μ L,dNTPs(25 mmol/L))0.4 μ L,DNA 模板 3.0 μ L,上、下游引物(5 μ mol/L)各 2.0 μ L,Taq 酶 0.2 μ L,蒸馏水加至 25 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。将扩增好的 PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶分析,在凝胶成像仪下成像。

1.3.3 MIC 测定 采用琼脂稀释法检测^[6],制备多个抗菌药物浓度梯度水解酪蛋白(MH)琼脂平板,浓度范围为 0.25~512.00 mg/L,取 2 μ L0.5 麦氏浊度菌液接种于 MH 琼脂平板相应位置,每个接种点菌数约为 10⁴ CFU,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h,药敏结果依照 2013 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)年执行标准判读。

1.3.4 泵抑制剂干预实验 在含上述抗菌药物的 MH 平板中加入 10 μ g/mL CCCP,测定在 CCCP 存在情况下 *adeB* 阳性鲍曼不动杆菌的 MIC 值,同时接种只含 10% CCCP 的 MH 琼脂作为生长对照,筛选出加入 CCCP 前后对抗菌药物 MIC 值降低 4 倍或以上的菌株。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行数据处理及统计学分析,*t* 检验分析 *adeB* 阳性菌株对各种抗菌药物 MIC 的变化,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 68 株鲍曼不动杆菌中 *adeB* 基因检测结果 使用 *adeB* 特异性引物进行 PCR 反应,PCR 进行凝胶电泳得到的产物片段与预期结果相符。部分 PCR 产物凝胶电泳见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”),从临床分离 68 株鲍曼不动杆菌有 57 株 *adeB* 基因阳性,其阳性检出率为 83.8%。

2.2 MIC 测定结果 68 株鲍曼不动杆菌对 CRO、CIP、IMP、AMK 和 AZM 耐药情况十分严重,其中 *adeB* 阳性组对上述 5 种抗菌药物的 50% 最低抑菌浓度(MIC₅₀)和耐药率均高于 *adeB* 阴性组。见表 1。

抗菌药物	表 1 鲍曼不动杆菌对 5 种抗菌药物的耐药情况			
	<i>adeB</i> 阴性组(<i>n</i> =11)		<i>adeB</i> 阳性组(<i>n</i> =57)	
	MIC ₅₀ (<i>n</i>)	耐药[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	MIC ₅₀ (<i>n</i>)	耐药[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]
CRO	16	72.7(8/11)	32	94.7(54/57)
CIP	64	63.6(7/11)	128	92.9(53/57)
IMP	8	45.5(5/11)	32	70.2(40/57)
AMK	8	36.4(4/11)	64	77.2(44/57)
AZM	16	36.4(4/11)	128	78.9(45/57)

2.3 CCCP 干预试验结果 在 10 μ g /mL CCCP 条件下,57 株 *adeB* 阳性的鲍曼不动杆菌均生长良好,以 CRO、CIP、IMP、AMK 和 AZM 为底物,分别有 31、34、38、35 和 30 株 *adeB* 阳性菌株在 10 μ g /mL CCCP 条件下 MIC 值降低 4 倍或 4 倍以上。加入 CCCP 后,*adeB* 阳性的鲍曼不动杆菌对 5 种药物的耐药率均有所下降,下降率分别为 21.0%、25.5%、28.1%、29.8%和 29.9%,经 *t* 检验,比较 CCCP 使用前后 5 种抗菌药物 MIC 值变化差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 应用 CCCP 前后 5 种抗菌药物对 <i>adeB</i> 阳性鲍曼不动杆菌的 MIC					
抗菌药物	耐药[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	MIC 范围(mg/L)	几何平均数(mg/L)	<i>t</i>	<i>P</i>
CRO	94.7(54/57)	0.250~512.000	28.4	4.89	<0.05
CRO+CCCP	73.7(42/57)	0.125~256.000	12.5		
CIP	92.9(53/57)	8.000~512.000	89.7	6.35	<0.05
CIP+CCCP	67.4(39/57)	2.000~128.000	40.4		
IMP	70.2(40/57)	0.250~256.000	8.8	5.58	<0.05
IMP+CCCP	42.1(24/57)	0.125~128.000	3.6		
AMK	78.9(45/57)	2.000~512.000	85.6	6.31	<0.05
AMK+CCCP	49.1(28/57)	2.000~128.000	20.8		
AZM	77.2(44/57)	4.000~512.000	84.8	5.12	<0.05
AZM+CCCP	47.3(27/57)	1.000~256.000	48.7		

3 讨 论

鲍曼不动杆菌耐药机制主要包括产生灭活酶和修饰酶、细胞外膜通透性的改变、抗菌药物作用靶位改变和生物被膜的形成,而主动外排泵在鲍曼不动杆菌获得性耐药中扮演重要角色,已引起国内外学者的高度关注^[7]。*adeABC* 泵由三部分构成的三聚体复合体,*adeA* 是膜融合蛋白,*adeB* 是转运蛋白,*adeC* 是外膜通道蛋白,其中央有一个贯穿内外膜的通道,成为

排出药物的直接途径^[8]。在外排过程中,*adeB* 从细胞质或细胞内膜中摄取底物,通过 *adeC* 和 *adeA* 协调作用将底物转运到细胞外。鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类、氟喹诺酮类、红霉素、氯霉素耐药与 *adeABC* 泵密切相关,是鲍曼不动杆菌产生多重耐药的重要原因之一,*adeB* 起主要介导作用^[9],本实验结果显示,鲍曼不动杆菌中 *adeB* 阳性菌株为 57 株,达到 83.3%,说明 *adeB* 基因在鲍曼不动杆菌中分布广泛,另外其阳性检测率

与王同慧等^[10]报道鲍曼不动杆菌的阳性检出结果较一致。

本研究采用琼脂稀释法测定结果显示,68 株鲍曼不动杆菌中,adeB 阳性组的 MIC₅₀ 都高于阴性组,adeB 阳性组对 CRO、CIP、IMP、AMK 和 AZM 的耐药率较阴性组分别高出 22.0%、29.3%、24.7%、24.4% 和 31.7%,表明鲍曼不动杆菌 adeB 基因高表达在抗菌药物产生耐药性中作用较大,主动外排泵与鲍曼不动杆菌多重耐药存在密切关系。

外排泵抑制剂 CCCP 是一种非特异性抑制剂,属强解偶联剂,在分子解离的状态下,负电荷分布于分子中的多个原子,分子周围的电场弱,可以在磷脂膜两旁进行扩散,通过质子传递跨膜的电化学梯度,从而破坏泵的能量来源抑制底物外排^[11]。增加药物在细菌体内的累积量,从而恢复细菌对药物的敏感性。本实验中鲍曼不动杆菌对 CRO、CIP、IMP、AMK 和 AZM 具有较强的耐药性,且为 adeABC 外排泵的作用底物^[12],外排泵基因 adeB 作为 adeABC 外排泵标志,所以选用外排泵抑制剂 CCCP 对 adeB 阳性鲍曼不动杆菌的药物敏感性变化进行研究。结果表明,经 CCCP 处理后,细菌对 CRO、CIP、IMP、AMK 和 AZM 的 MIC 有不同程度的改变,分别有 31、34、38、35 和 30 株 adeB 阳性鲍曼不动杆菌在 10 μg/mL CCCP 条件下 MIC 值降低 4 倍或 4 倍以上,与孙静娜等^[13]报道 CCCP 逆转鲍曼不动杆菌耐药性的结论较一致。说明破坏外排泵能量作用后,可使鲍曼不动杆菌恢复对部分抗菌药物的敏感性。同时有 8 株 adeB 阳性菌株 MIC 未发生改变,究其原因可能与泵能量来源有关,除了质子动力势能外还存在其他能量来源,如 ATP 能量、钠离子梯度等,其发生改变的机制还有待进一步研究。

由于抗菌药物滥用等原因导致临床出现了严重的细菌耐药,甚至细菌多重耐药,迫切需要研究细菌耐药的发生机制和寻找针对性的治疗措施。外排泵抑制剂作为前景较为广泛的治疗策略,可在体内增加抗菌药物的敏感性,减少耐药菌株的产生,外排泵抑制剂和抗菌药物合并使用时,可减少抗菌药物的剂量并益于发挥抗菌治疗作用,因此,找到更安全、特异、稳定和高效的外排泵抑制剂具有重要的临床应用价值。

参考文献

[1] Park S, Lee KM, Yoo YS, et al. Alterations of gyrA, gyrB, and parC and activity of efflux pump in fluoroquinolone-resistant acinetobacter baumannii [J]. Osong Public Health Res Perspect, 2011, 2(3):164-170.

[2] Soroush S, Haghi-Ashtiani MT, Taheri-Kalani M, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial strain of Acinetobacter baumannii

in Children's Medical Center of Tehran; a 6-year prospective study [J]. Acta Med Iran, 2010, 48(3):178-184.

[3] Mostofi S, Mirnejad R, Masjedian F. Multi-drug resistance in Acinetobacter baumannii strains isolated from clinical specimens from three hospitals in Tehran-Iran [J]. Afr J Microbiol Res, 2011(21):3579-3582.

[4] Opazo AC, Mella SM, Dominguez MY, et al. Multi-drug efflux pumps and antibiotic resistance in Acinetobacter baumannii [J]. Rev Chilena Infectol, 2009, 26(6):499-503.

[5] Zhang JP, Zhu W, Tian SF, et al. Molecular characteristics and resistant mechanisms of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates in Shenyang, China [J]. J Microbiol, 2010, 48(5):689-694.

[6] Ardebili A, Talebi M, Azimi L, et al. Effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-Chlorophenylhydrazone on the minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin in acinetobacter baumannii clinical isolates [J]. Jund J Microb, 2014, 7(1):8691.

[7] Lee Y, Yum JH, Kim CK, et al. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an Acinetobacter baumannii strain carrying the blaOXA-66 gene [J]. Ann Clin Lab Sci, 2010, 40(1):43-48.

[8] Wiczorek P, Sacha P, Czaban S, et al. Distribution of AdeABC efflux system genes in genotypically diverse strains of clinical Acinetobacter baumannii [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(2):106-109.

[9] 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]. Antim Agents Chem, 2004, 48(9):3298-3304.

[10] 王同慧, 凌保东. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌 adeB 外排泵基因表达与多重耐药相关的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(11):859-862.

[11] 刘忆霜, 肖春玲. 细菌多重耐药外排泵抑制剂研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(4):211-216.

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

[13] 孙静娜, 董威, 赵帅, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌外排泵表型和基因型的研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(10):763-766.

(收稿日期:2015-01-16)



(上接第 1519 页)

[2] Rey-Ares L, Ciapponi A, Pichon-Riviere A. Efficacy and safety of human papilloma virus vaccine in cervical cancer prevention: systematic review and meta-analysis [J]. Arch Argent Pediatr, 2012, 110(6):483-489.

[3] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. J Pathol, 1999, 189(1):12-19.

[4] 张志珊, 庄建良, 李爱禄, 等. 泉州地区女性人乳头状瘤病毒感染与宫颈病变的相关性探讨 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21

(7):1367-1370.

[5] 赵颖, 林敏, 潘美晨, 等. HPV 分型及高危八型定量检测在宫颈病变中的意义 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(2):102-106.

[6] 张东红, 林美珊. 人乳头瘤病毒在国人宫颈病变中感染及型别分布特征的 Meta 分析 [J]. 中国全科医学, 2010, 13(12):1287-1290.

[7] 金善, 崔满华, 李冬, 等. TCT 及 HPV 检查对宫颈疾病筛查价值的 Meta 分析研究 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(3):203-207.

(收稿日期:2015-01-28)