

· 论 著 ·

鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶和 RND 外排泵相关耐药基因的研究*

周亚玲¹, 阴 晴², 王中新^{1△}

1. 安徽医科大学第一附属医院检验科, 安徽合肥 230022; 2. 江苏大学附属医院检验科, 江苏镇江 212001

摘要:目的 分析鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶和 RND 外排泵基因的携带情况, 并进一步探讨外排泵过表达与菌株耐药性形成的关系。方法 采用 PCR 技术扩增分离鲍曼不动杆菌的 B 类金属酶(*bla*NDM-1、*bla*VIM、*bla*IMP)、D 类苯唑西林酶(*bla*OXA-23、*bla*OXA-24、*bla*OXA-51、*bla*OXA-58)以及 RND 外排泵基因(*ade*B、*ade*J、*ade*G), 再采用 qPCR 对 6 株多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)和 4 株非多重耐药鲍曼不动杆菌(NMDRAB)菌株的 *ade*B、*ade*J 和 *ade*G 水平进行检测。结果 71 株 MDRAB 中 *bla*NDM-1(26.8%, 19/71)、*bla*IMP(88.7%, 63/71)和 *bla*OXA-23(84.5%, 60/71)的检出率明显高于 30 株 NMDRAB 中 *bla*NDM-1(0.0%, 0/30)、*bla*IMP(0.0%, 0/30)和 *bla*OXA-23(10.0%, 3/30)的检出率, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。*bla*OXA-51 的检出率为 100.0%, 未检测到 *bla*VIM、*bla*OXA-24 和 *bla*OXA-58。71 株 MDRAB 中 *ade*B(98.6%, 70/71)和 *ade*G(100.0%, 71/71)的检出率显著高于 30 株 NMDRAB 中 *ade*B(20.0%, 6/30)和 *ade*G(90.0%, 27/30)的检出率, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); *ade*J 的检出率为 100.0%; 同时 MDRAB 菌株的 *ade*B 和 *ade*G 基因表达量明显高于 NMDRAB 菌株($P < 0.05$)。结论 碳青霉烯酶基因 NDM-1、IMP 和 OXA-23 和外排泵 *ade*ABC、*ade*FGH 的高表达与鲍曼不动杆菌多重耐药的形成关系密切。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯酶; RND 外排泵

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.21.018

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2021)21-2635-05

文献标志码: A

Study on carbapenemase and RND efflux pump related drug resistance genes in *Acinetobacter baumannii**

ZHOU Yaling¹, YIN Qing², WANG Zhongxin^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China

Abstract: **Objective** To analyze the carrying situation of carbapenemase and RND efflux pump genes in *Acinetobacter baumannii*, and to further explore the relationship between the efflux pump overexpression and drug resistance formation of strains. **Methods** PCR was adopted to amplify the class B metalloenzyme (*bla*NDM-1, *bla*VIM and *bla*IMP), class D oxacillinase (*bla*OXA-23, *bla*OXA-24, *bla*OXA-51 and *bla*OXA-58) and RND efflux pump genes (*ade*B, *ade*J and *ade*G) of the isolated strains. Then the expression level of *ade*B, *ade*J and *ade*G of 6 strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB) and 4 strains of non-multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (NMDRAB) were detected by qPCR. **Results** The detection rates of *bla*NDM-1 (26.8%, 19/71), *bla*IMP (88.7%, 63/71) and *bla*OXA-23 (84.5%, 60/71) in 71 strains of MDRAB were significantly higher than those of *bla*NDM-1 (0.0%, 0/30), *bla*IMP (0.0%, 0/30) and *bla*OXA-23 (10.0%, 3/30) in 30 strains of NMDRAB, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The detection rate of *bla*OXA-51 was 100.0%, *bla*VIM, *bla*OXA-24 and *bla*OXA-58 were not detected. The detection rate of *ade*B (98.6%, 70/71) and *ade*G (100.0%, 71/71) in 71 strains of MDRAB was significantly higher than those of *ade*B (20.0%, 6/30) and *ade*G (90.0%, 27/30) in 30 strains of NMDRAB, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The detection rate of *ade*J was 100.0%. At the same time, the gene

* 基金项目: 江苏省 2018 年度预防医学科研课题(Y2018108); 江苏省镇江市 2020 年度社会发展指导性科技计划项目(FZ2020037)。

作者简介: 周亚玲, 女, 技师, 主要从事临床微生物检验方向研究。△ 通信作者, E-mail: aywzhx87@163.com。

本文引用格式: 周亚玲, 阴晴, 王中新. 鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶和 RND 外排泵相关耐药基因的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(21): 2635-2639.

expression levels of *adeB* and *adeG* in MDRAB strains were significantly higher than those in NMDRAB strains($P<0.05$). **Conclusion** The high expressions of carbapenemase genes NDM-1,IMP and OXA-23 and the ef-
flux pump *adeABC* and *adeFGH* are closely related to the multidrug resistance formation in *Acinetobacter baumannii*.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; carbapenemase; RND efflux pump

近年来,随着广谱抗生素的广泛使用,多重耐药
鲍曼不动杆菌(MDRAB)分离率呈逐年上升趋势^[1],
而其耐药性的形成与碳青霉烯酶的产生和外排泵过
表达关系密切^[2-3]。碳青霉烯酶中苯唑西林酶是鲍曼
不动杆菌的主要碳青霉烯酶,特别是 OXA-23 在其中
发挥主导作用^[4-5]。B 类金属酶在各地区的检出率存
在明显的差异^[6-7],主要包括 *blaIMP*、*blaVIM*、
blaNDM 等基因型。外排泵中的耐药结节细胞分化
超家族(RND)^[8]与 MDRAB 形成关系密切,*Ade-*
ABC、*AdeIJK* 和 *AdeFGH* 是其主要类型,其中任何
一个外排泵的过度表达都会降低鲍曼不动杆菌对抗
菌药物的敏感性^[9]。本研究主要检测收集的鲍曼不
动杆菌碳青霉烯酶和 RND 外排基因的携带情况,再
应用实时荧光定量 PCR(qPCR)测 RND 外排泵阳性
菌株的 *adeB*、*adeJ* 和 *adeG* 表达水平,为及早识别耐
药菌以及加强耐药菌的监测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 所用菌株分离自江苏大学附属医院
2016 年 7 月至 2018 年 6 月微生物室保存的非重复性
鲍曼不动杆菌 101 株,其中 MDRAB71 株,非多重耐
药鲍曼不动杆菌(NMDRAB)30 株。参考菌株鲍曼
不动杆菌 ATCC19606 购于国家卫生健康委员会临床
检验中心。

1.2 主要仪器 Real-Time PCR 仪、普通 PCR 扩增
仪和凝胶电泳成像分析系统均购自美国 Bio-Rad 公
司;水平电泳套件购自上海天能生物公司;Nano-
Drop1000 分析仪为美国 Thermo 公司产品;恒温水浴
锅购自嘉兴俊思电子有限公司;气浴恒温振荡器购自
江苏科技仪器有限公司。

1.3 主要试剂 血琼脂平购自郑州安图生物公司;
小量质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒购自上海捷瑞生
物有限公司;2×qPCR SYBR Green Mix、2×PCR
Master Mix、QRT SuperMix for qPCR 购自南京
Vazyme 公司;细菌总 RNA 快速抽提试剂盒购自上
海生工生物公司;DNA Marker 购自大连宝生物公

司;PCR 引物由无锡天霖生物科技有限公司合成;琼
脂糖粉末购自西班牙 Biowest 公司。

1.4 方法

1.4.1 细菌 DNA 模板的制备 采用煮沸裂解法制
备细菌总 DNA,操作步骤为血平板复苏-80℃保存
的菌株,置 CO₂ 恒温培养箱过夜培养,次日用无菌接
种环挑取 3~5 个菌落接种于 300 μL 灭菌蒸馏水中
并振荡混匀,100℃煮沸 10 min 裂解细菌,12 000 r/
min 离心 10 min 后收集上清液即为 DNA 模板。

1.4.2 碳青霉烯酶基因的检测 参照文献[6,10]合
成检测引物,具体序列见表 1。PCR 反应体系为 25
μL,包括预混液 12.5 μL,上、下游引物各 0.5 μL,
DNA 模板 2 μL,ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应程序为
94℃4 min,94℃30 s,51~56℃退火 30 s,具体退
火温度见表 1,72℃延伸 1 min,35 个循环,72℃10
min。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4.3 RND 外排泵基因的检测 参照文献[9,11]
合成检测引物,具体序列见表 1。PCR 反应体系同
1.4.2。PCR 反应程序为 94℃4 min,94℃30 s,
53~55℃退火 30 s,具体退火温度见表 1,72℃
1 min,35 个循环,72℃10 min。1.2%琼脂糖凝胶检
测 PCR 产物。

**1.4.4 qPCR 检测外排泵基因 *adeB*、*adeJ* 和 *adeG* 的
表达水平** 在 *adeB*、*adeJ* 和 *adeG* 同时阳性的菌株中
随机选取 6 株 MDRAB 和 4 株 NMDRAB 进行 qPCR
检测,ATCC19606 作为参考菌株。血平板复苏实验
菌株,置 CO₂ 恒温培养箱过夜培养,次日挑单个菌落
于 3 mL 的 LB 液体培养基中,置恒温摇床上 37℃振
荡培养 8 h 后收集菌体,采用 RNA 快速抽提试剂盒
提取细菌总 RNA,RT SuperMix 反转录试剂盒合成
cDNA,用于后续 qPCR 检测,反应条件为 95℃预变
性 8 min、95℃变性 30 s、55℃退火 30 s,反应共 40
个循环,于退火阶段收集荧光信号,每个标本重复 3
次。计算平均 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt}法计算被测基因的相
对表达量。

表 1 碳青霉烯酶基因和 RND 外排泵基因引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	退火温度(℃)
<i>blaVIM</i>	F:GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	53
	R:AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>blaIMP</i>	F:CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	449	56
	R:ATAATTTTGGCGGACTTTGGC		
<i>blaNDM-1</i>	F:CTCGCACCGAATGTCTGG	316	51

续表 1 碳青霉烯酶基因和 RND 外排泵基因引物序列

目的基因	引物序列(5′-3′)	产物长度(bp)	退火温度(℃)
blaOXA-23	R:CATTGGCGGCGAAAGTCA	501	55
	F:GATCGGATTGGAGAACCAGA		
blaOXA-24	R:ATTTCTGACCGCATTTCCAT	246	52
	F:GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA		
blaOXA-51	R:AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	353	55
	F:TAATGCTTTGATCGGCCTGG		
blaOXA-58	R:TGGATTGCACTTCATCTTGG	599	52
	F:AAGTATTGGGGCTTGTGCTG		
adeB	R:CCCCTCTGCGCTCTACATAC	901	55
	F:TGGCGGAATGAAGTATGT		
adeJ	R:GCAGTGCGGCAGGTTAG	222	53
	F:GGTCATTAATATCTTTGGC		
adeG	R:GGTACGAATACCGCTGTCA	236	53
	F:CCGATCTTTGCTGGTGTGC		
qadeB	R:TTACCGTCGCTGTTTGCTT	—	55
	F:ACAAGACCGCGCTAACTTAGGT		
qadeJ	R:TGCCATTGCCATAAGTTCATCT	—	55
	F:AGCTGGTGCTATGGGCGTTA		
qadeG	R:GCCACCCCATGCAATACG	—	55
	F:CCGATCTTTGCTGGTGTGC		
	R:TTACCGTCGCTGTTTGCTT		

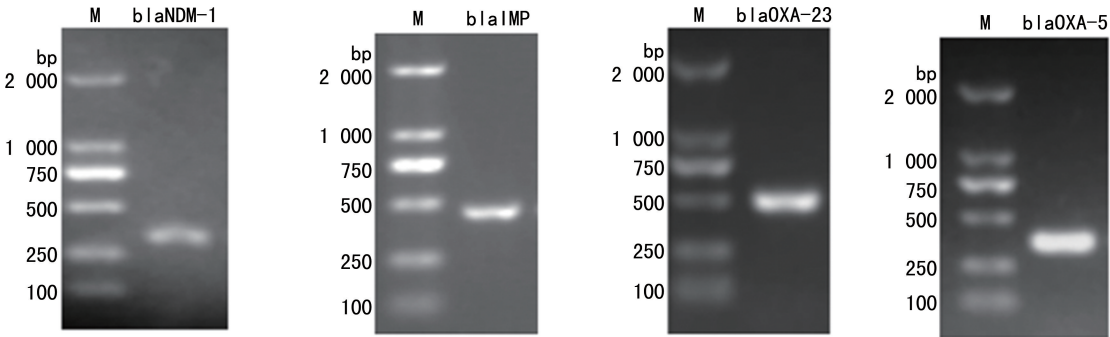
注：—表示无数据。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。对 MDRAW 与 NMDRAW 的 blaNDM-1、blaIMP、blaOXA-23、adeB、adeJ 和 adeG 基因携带率进行 χ^2 检验；对 MDRAW 与 NMDRAW 的 adeB、adeJ 和 adeG 基因的表达水平进行 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 碳青霉烯酶基因的 PCR 结果 71 株 MDRAW

中 blaNDM-1(26.8%，19/71)、blaIMP(88.7%，63/71)和 blaOXA-23(84.5%，60/71)的检出率明显高于 30 株 NMDRAW 中 blaNDM-1(0.0%，0/30)、blaIMP(0.0%，0/30)和 blaOXA-23(10.0%，3/30)的检出率，差异均有统计学意义($P<0.05$)。blaOXA-51 的检出率均为 100.0%，未检测到 blaVIM、blaOXA-24 和 blaOXA-58，具体电泳结果见图 1。



注：M 为 DL2000marker，blaNDM-1 为 316 bp，blaIMP 为 449 bp，blaOXA-23 为 501 bp，blaOXA-51 为 352 bp。

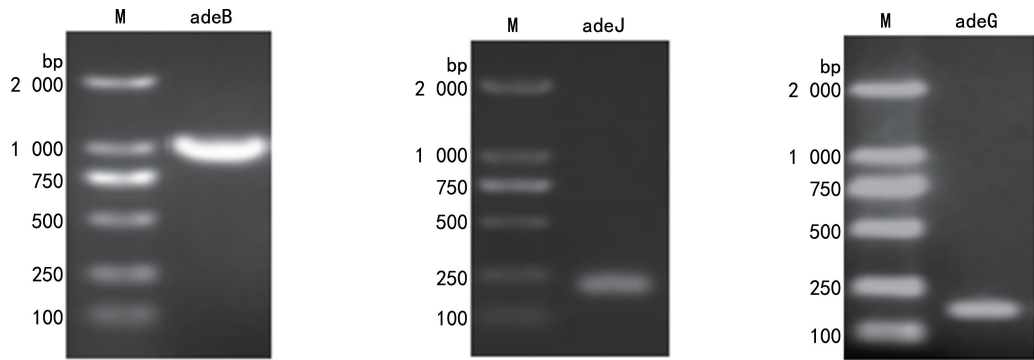
图 1 碳青霉烯酶基因 PCR 检测结果

2.2 RND 外排泵基因的 PCR 检测结果 71 株 MDRAW 中 adeB(98.6%，70/71)和 adeG(100.0%，71/71)的检出率明显高于 30 株 NMDRAW 中 adeB

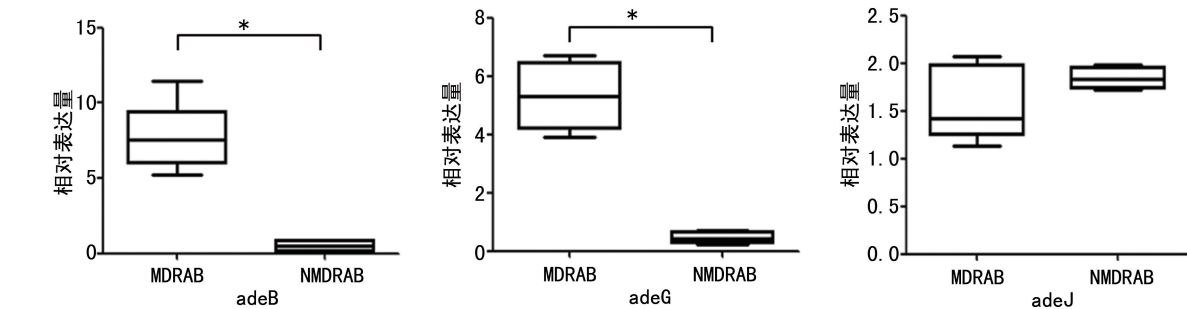
(20.0%，6/30)和 adeG(90.0%，27/30)的检出率，差异均有统计学意义($P<0.05$)；adeJ 的检出率均为 100.0%。具体电泳结果见图 2。

2.3 adeB、adeJ 和 adeG 的表达水平 qPCR 结果显示:MDRAB 菌株 adeB、adeG 和 adeJ 的平均相对表达量分别为 7.78 ± 2.19 、 5.31 ± 1.13 和 1.55 ± 0.38 ; NMDRAB 菌株的 adeB、adeG 和 adeJ 的平均相对表达量分别为 0.52 ± 0.41 、 0.46 ± 0.23 、 1.84 ± 0.13 ; MDRAB 菌株的 adeB、adeG 和 adeJ 的相对表达量分

别是 NMDRAB 菌株的 14.91 倍、11.61、0.84 倍,可见 MDRAB 菌株的 adeB、adeG 的相对表达量明显高于 NMDRAB 菌株,差异均有统计学意义($P < 0.05$); adeJ 的相对表达量在 MDRAB 和 NMDRAB 菌株之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。



注:M 为 DL2000marker,adeB 为 901 bp,adeJ 为 222 bp,adeG 为 236 bp。
图 2 RND 外排泵基因 PCR 检测结果



注: * $P < 0.05$ 。
图 3 adeB、adeJ 和 adeG 的 qPCR 结果

3 讨 论

MDRAB 感染具有高发病率和高致死率,一直广受国内外学者的关注,而碳青霉烯酶基因和外排泵高表达是 MDRAB 形成的主要机制。本次收集的所有菌株均检测到 blaOXA-51。早在 2005 年,HERITIER 等^[12]发现 blaOXA-51 位于鲍曼不动杆菌染色体上。STRATEVA 等^[13]也发现收集的 226 株鲍曼不动杆菌均携带 blaOXA-51,证实了上述结果。blaOXA-23 在本次收集的 MDRAB 中携带率高达 84.5%,其余苯唑西林酶未被检测到,表明 blaOXA-23 是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要水解酶,这一结果与国内外研究结果相符^[5-6]。本研究发现有 3 株对碳青霉烯类药物敏感的 NMDRAB 却检测到 blaOXA-23 基因,考虑到这 3 株 NDMRAB 携带的 blaOXA-23 基因上游可能缺乏插入序列 ISAbal 或者插入序列发生突变,ISAbal 的出现可以上调 blaOXA 基因的表达,从而有效增强抗菌药物的水解作用,导致耐药的出现^[14]。对金属酶的检测发现,blaNDM-1 和 blaIMP 基因均存在于 MDRAB 中,blaNDM-1 的检出率(26.8%,19/71)与陈娇等^[15]

报道的结果相符(26.56%,17/64),低于闫玲等^[16]报道的 33.33%(14/42),但是高于 TADA 等^[17]报道的 18.52%。blaIMP 的检出率与江苏徐州地区报道的 86.88% 相符^[6],明显高于皖北地区报道的 14.3%^[18]。在所收集的菌株中未检测到 blaVIM 基因,表明 blaVIM 不是江苏大学附属医院 MDRAB 形成的主要水解酶。本次研究的金属酶阳性率总体处于偏高的水平,应引起高度重视。MDRAB 的另一个重要耐药机制是外排基因的过度表达,外排泵具有广泛的底物特异性,可以将多种抗菌药物排出体外,降低药物抑菌或杀菌作用。RND 外排泵在鲍曼不动杆菌的耐药中扮演着至关重要的角色,在其赋予菌株耐药表型的同时,也增强菌株获得其他耐药机制,比如抗菌药物作用靶点的突变、水解酶的产生等^[5]。目前 RND 家族主要包括 adeABC、adeIJK、adeFGH、adeDE、adeXYZ,后两种研究较少。本研究通过 PCR 检测 adeB、adeG、adeJ 基因来分析外排泵基因 adeABC、adeIJK、adeFGH 在鲍曼不动杆菌中的分布情况,发现外排泵基因 adeB 主要分布在 MDRAB 中,而外排泵基因 adeJ、adeG 不仅

分布在 MDRAB 中,在 NMDRAB 中也广泛分布。因此笔者进一步应用 qPCR 检测 adeB、adeG、adeJ 的表达,结果显示 MDRAB 的 adeB、adeG 表达水平明显高于 NMDRAB,表明 adeABC、adeFGH 的高表达是江苏大学附属医院 MDRAB 形成的一个重要机制。另外,本次研究发现,所有菌株均携带 adeJ。早在 2008 年 DAMIER-PIOLLE 等^[19]报道 60 株鲍曼不动杆菌均检测到 adeIJK 基因,并且证实 adeIJK 复合体是鲍曼不动杆菌固有基因,而不是获得性的。本研究结果与该研究一致。

综上所述,碳青霉烯酶的产生以及 RND 外排泵基因的高表达在江苏大学附属医院 MDRAB 耐药机制中起到至关重要的作用,通过对耐药机制的深入研究有助于及早识别耐药菌以及为控制多重耐药菌株的形成和医院内播散提供理论依据。

参考文献

- [1] JAMAL S, AL ATROUNI A, RAFEI R, et al. Molecular mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*, with a special focus on its epidemiology in Lebanon[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2018, 15: 154-163.
- [2] RANJBAR R, FARAHANI A. Study of genetic diversity, biofilm formation, and detection of Carbapenemase, MBL, ESBL, and tetracycline resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wound infections in Iran[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2019, 8: 172-177.
- [3] 刘秋萍, 徐凌. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(10): 1179-1187.
- [4] ALAMRI A M, ALQURAYAN A M, SEBASTIANET T, et al. Molecular surveillance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Current Microbiol, 2019, 77(3): 335-342.
- [5] BORAL B, UNALDI Ö, ERGIN A, et al. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2019, 18(1): 19-21.
- [6] 丁梦珊, 蔡蕊, 花璇, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因及整合子检测与分析[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(10): 795-797.
- [7] ANANE Y A, APALATA T, VASAIKAR S, et al. Prevalence and molecular analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the extra-hospital environment in Mthatha, South Africa[J]. Braz J Infect Dis, 2019, 23(6):

- 371-380.
- [8] LEUS I V, WEEKS J W, BONIFAY V, et al. Substrate specificities and efflux efficiencies of RND efflux pumps of *Acinetobacter baumannii* [J]. J Bacteriol, 2018, 200(13): e00049-18.
- [9] HOU P F, CHEN X Y, YAN G F, et al. Study of the correlation of imipenem resistance with efflux pumps AdeABC, AdeIJK, AdeDE and AbeM in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Chemotherapy, 2012, 58(2): 152-158.
- [10] 陈娇, 刘康, 李剑平, 等. 鲍曼不动杆菌 RND 主动外排泵的表达与耐药性的关系[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(11): 951-957.
- [11] CHEN Y, ZHOU Z, JIANG Y, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6): 1255-1259.
- [12] HERITIER C, POIREL L, FOURNIER P E, et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(10): 4174-4179.
- [13] STRATEVA T, SIRAKOV I, STOIEVA T, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014—2016) [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 16: 266-273.
- [14] AGOBA E E, GOVINDEN U, PEER A K C, et al. ISAba1 regulated OXA-23 carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* strains in Durban, South Africa[J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(9): 1289-1295.
- [15] 陈娇, 吴秀珍, 刘康, 等. 江西地区鲍曼不动杆菌 NDM-1 及其他碳青霉烯酶基因检测研究[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(2): 109-114.
- [16] 闫玲, 顾兵, 张丽, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药机制[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(15): 2594-2599.
- [17] TADA T, SEKIGUCHI J I, WATANABE S, et al. Assessment of a newly developed immunochromatographic assay for NDM-type metallo- β -lactamase producing Gram-negative pathogens in Myanmar[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 565-570.
- [18] 王丽娟, 王盼, 张永, 等. 皖北地区耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌产金属 β -内酰胺酶检测[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(5): 575-577.
- [19] DAMIER-PIOLLE L, MAGNET S, BREMONT S, et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2): 557-562.

(收稿日期: 2021-01-14 修回日期: 2021-07-10)