

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 04. 002

鲍曼不动杆菌主动外排系统 adeR 基因分布及耐药性分析*

蔡 燕^{1,3,4}, 曾丽红³, 潘 雪³, 梁 奕³, 彭乙华², 青 鑫^{1,3}, 何 城^{1,3}, 张 婷^{1,3}, 黄义山^{1,3△}

(川北医学院附属医院:1. 检验科;2. 内分泌科,四川南充 637000;

川北医学院:3. 医学检验系;4. 转化医学研究中心,四川南充 637007)

摘 要:目的 通过检测外排泵基因 adeR 在鲍曼不动杆菌中的分布及对临床常用抗菌药物的药敏情况,初步探讨外排泵对鲍曼不动杆菌耐药性的影响。**方法** 采用聚合酶链反应(PCR)检测 84 株鲍曼不动杆菌外排泵基因 adeR 的分布情况,并根据 PCR 结果将菌株分为 adeR 基因阳性组和 adeR 基因阴性组,比较两组鲍曼不动杆菌对阿米卡星、头孢吡肟、左氧氟沙星和亚胺培南的耐药率。**结果** PCR 结果显示,收集的鲍曼不动杆菌 adeR 基因阳性率为 70.24%(59/84);adeR 基因阳性组对阿米卡星、头孢吡肟、左氧氟沙星和亚胺培南的耐药率分别为 83.93%、90.74%、84.75%和 67.80%;adeR 基因阴性组对各抗菌药物的耐药率分别为 58.33%、73.91%、56.00%和 44.00%;两组间耐药率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 外排泵基因 adeR 在该地区鲍曼不动杆菌中的检出率较高,与临床常用抗菌药物耐药情况高度相关,提示外排系统是该地区鲍曼不动杆菌多重耐药的重要原因之一。

关键词:鲍曼不动杆菌; 耐药; 外排泵; adeR 基因

中图法分类号:R446.5 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2019)04-0438-03

Active efflux system gene adeR distribution of Acinetobacter baumannii and drug resistance analysis*

CAI Yan^{1,3,4}, ZENG Lihong³, PAN Xue³, LIANG Yi³, PENG Yihua²,
QING Xin^{1,3}, HE Cheng^{1,3}, ZHANG Ting^{1,3}, HUANG Yishan^{1,3△}

(1. Department of Clinical Laboratory;2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;3. Faculty of Medical Laboratory; 4. Translational Medicine Research Center, North Sichuan Medical College, Nanchong, China 637007)

Abstract: **Objective** To preliminarily investigate the effect of efflux pumps on the drug resistance of Acinetobacter baumannii by detecting the distribution of the efflux pump gene adeR in Acinetobacter baumannii and its susceptibility situation to clinically commonly used antibacterial drugs. **Methods** PCR was used to detect the distribution of adeR gene in 84 strains of Acinetobacter baumannii, the strains were divided into the adeR gene positive group and adeR gene negative group according to the PCR detection results. The resistance rates to amikacin, cefepime, levofloxacin and imipenem were compared between the two groups of Acinetobacter baumannii. **Results** The PCR results showed that the adeR gene positive rate in collected Acinetobacter baumannii was 70.24% (59/84). The resistance rates of the adeR gene positive group to amikacin, cefepime, levofloxacin and imipenem were 83.93%, 90.74%, 84.75% and 67.80% respectively, while which of the adeR gene negative group were 58.33%, 73.91%, 56.00% and 44.00% respectively, the differences between the two groups were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The detection rate of efflux pump gene adeR in Acinetobacter baumannii is higher and highly correlated to the commonly used antibacterial drugs in clinic, which suggests that the efflux system is one of the important reasons for multi-drug resistance of Acinetobacter baumannii in local region.

Key words: Acinetobacter baumannii; multidrug resistance; efflux pump; adeR gene

根据全国细菌耐药监测网数据分析,2014—2015 年鲍曼不动杆菌在革兰阴性菌的临床分离率分别为 10.7%、10.8%,位居革兰阴性菌中临床分离率的第 4 位,临床科室分布以重症监护病房(ICU)和呼吸内科为主^[1-2]。提示目前我国对鲍曼不动杆菌的控制取得一定成效,但作为最重要的“超级细菌”,鲍曼不动杆

* 基金项目:四川省教育厅课题(10ZB069)。
作者简介:蔡燕,女,副主任技师,主要从事细菌耐药机制研究。 △ 通信作者,E-mail:13890731234@163.com。

菌对抗菌药物的耐药率呈逐年上升趋势,多重耐药菌株的临床分离率也逐渐增加。加强对鲍曼不动杆菌感染,尤其是多重耐药菌的防治仍是目前临床上的重中之重。研究表明,细菌主动外排泵的存在与鲍曼不动杆菌的耐药相关^[3],而 AdeABC-AdeRS 外排系统与多重耐药关系尤为密切^[4],但目前该系统在川北医学院附属医院鲍曼不动杆菌中的分布情况及其与临床常用抗菌药物耐药性之间的关系尚不明确,故本研究将通过聚合酶链反应(PCR)检测外排泵基因 *adeR* 的分布情况,并分析其与临床上常用抗菌药物耐药性之间的关系,探讨外排系统对本地区鲍曼不动杆菌耐药性的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集川北医学院附属医院检验科微生物室近期分离的鲍曼不动杆菌共 84 株,主要来源于 ICU (29.76%)、脑外科 (19.05%)、烧伤科 (13.10%)、呼吸内科 (10.71%),少数标本来自胸外科、骨科、儿科、耳鼻喉科、普外科、神内科、消化科和肿瘤科(分别占1.19%~5.95%);标本类型主要为痰液(78.57%),其次为脓液(16.67%),另有少数分泌物(2.38%)、血液(1.19%)和穿刺液(1.19%);其中来源于男性 67 株(79.76%),女性 17 株(20.24%)。

1.2 仪器与试剂 VITEK-32 全自动细菌鉴定仪、NC21 鉴定药敏板及配套试剂、美国恒温细菌培养箱、Bio-Rad PCR 仪、电泳仪及凝胶成像仪。

1.3 方法 将菌株接种于水解酪蛋白培养基(MH)平板和血平板后放恒温培养箱中进行培养,待菌落形成后采用 VITEK-32 全自动细菌鉴定仪和美国德灵公司生产的 NC21 鉴定药敏板及配套试剂进行菌株鉴定和药敏测定。

1.3.1 MH 平板制备 用去离子水溶解 MH,高压灭菌,待冷却至 60℃左右取 10 mL 至 6 cm 无菌平皿中制备 MH 平板,凝固后密闭包装保存于 4℃冰箱备用。

1.3.2 药敏试验 收集各菌株的实验室细菌鉴定及药敏试验报告,选取临床上常用抗菌药物阿米卡星、头孢吡肟、左氧氟沙星和亚胺培南的药敏试验结果进行后续分析。

1.3.3 PCR 扩增外排泵基因 *adeR*

1.3.3.1 引物设计 根据 Gene bank 中的 *adeR* 基因编码序列(序列号 AY426969),由上海生工生物技术有限公司设计并合成 *adeR* 基因引物序列:产物 734 bp,上游引物:5'-ATG TTT GAT CAT TCT TTT TC-3';下游引物:5'-TTA GGC ATC ATC TTT TAT AG-3'。用去离子水溶解引物至 100 μmol/L 作为储存浓度,另稀释浓度为 10 μmol/L 的工作液 100 μL,皆保存于-20℃备用。

1.3.3.2 细菌基因组 DNA 提取 将鲍曼不动杆菌接种在 MH 平板上,37℃培养 18~24 h,挑取 1~2 个菌落加入 150 μL 去离子水中,混匀,100℃煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为 PCR 反应模板,于-20℃保存备用。

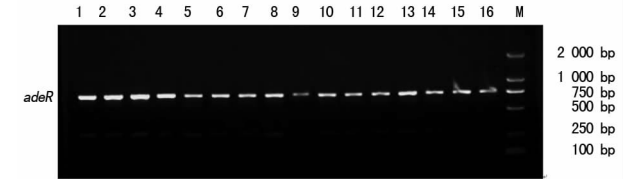
1.3.3.3 PCR 扩增 反应体系:2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,模板 1.0 μL,去离子水 10.5 μL,共 25.0 μL。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,共 35 个循环;72℃延伸 10 min。

1.3.3.4 琼脂糖凝胶电泳 配制 1.2% 的琼脂糖凝胶,取 10 μL PCR 产物进行电泳,以 DNA 标记物 DL2000 作为相对分子质量标准,150 V 电泳 40 min, Bio-Rad 凝胶成像系统成像并保存图片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 结果 电泳结果显示,*adeR* 基因得到良好扩增,根据 DNA 标记物显示可见,750 bp 附近有单一扩增片段,与预期结果(734 bp)一致;收集的 84 株鲍曼不动杆菌,共有 59 株检测到 *adeR* 基因,阳性率为 70.24%(59/84),并根据此结果,将鲍曼不动杆菌菌株分为 *adeR* 基因阳性组(59 株)和 *adeR* 基因阴性组(25 株)。见图 1。



注:M 为 DL2000;1~16 为鲍曼不动杆菌编号

图 1 *adeR* 基因扩增结果

2.2 药敏试验结果分析 收集的鲍曼不动杆菌对临床上常用的 4 种抗菌药物均有不同程度的耐药,对阿米卡星、头孢吡肟、亚胺培南和左氧氟沙星的耐药率分别为 76.25%、85.71%、60.71% 和 76.19%;多重耐药率为 71.43%(60/84),多重耐药菌株中 *adeR* 基因检出率为 76.67%(46/60);*adeR* 基因阳性组对 4 种抗菌药物耐药率明显高于 *adeR* 基因阴性组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组对不同抗菌药物的耐药率分析(%)

抗菌药物	adeR 基因阳性组	adeR 基因阴性组	χ^2	P
	(n=59)	(n=25)		
阿米卡星	83.93	58.33	6.077	0.014
头孢吡肟	90.74	73.91	9.205	0.002
左氧氟沙星	84.75	56.00	7.999	0.005
亚胺培南	67.80	44.00	4.169	0.041

3 讨 论

作为医院内的条件致病菌,鲍曼不动杆菌目前已成为临床最主要的致病菌之一,主要引起医院获得性肺炎、血液感染、腹腔感染、中枢神经系统感染、泌尿系统感染和皮肤软组织感染等^[5],并且可引起医院内暴发流行^[6],而且随着多重耐药菌的增加和泛耐药菌株出现,鲍曼不动杆菌感染的防控已成为临床上非常棘手的问题。故探讨鲍曼不动杆菌的耐药机制可能为该菌的预防和控制提供实验室依据。

早在 2001 年,法国的 MAGNET 等^[7]发现,AdeABC 外排系统是造成鲍曼不动杆菌多重耐药的原因之一,可介导氨基糖苷类、 β -内酰胺酶类、氯霉素、乙琥红霉素和四环素等药物耐药。MARCHAND 等^[4]发现,AdeABC 基因成簇排列,分别编码膜融合蛋白、外排泵蛋白和外膜蛋白,组成三联复合体,受 AdeRS 双组分系统的精确调节,adeR 基因使 adeA、adeB 和 adeC 的表达增强,特别是 adeB 的表达增加,外排作用增强,从而发生细菌耐药。adeR 基因插入失活可恢复耐药株对氨基糖苷类药物和其他外排泵作用底物的敏感性,提示 adeR 基因是该系统的核心部分。本研究 PCR 结果显示,adeR 基因在本地区分离的鲍曼不动杆菌中得到良好扩增,阳性率为 70.24%,略低于 10 年前林丽等^[8]的检测结果(75.9%);多重耐药菌株中 adeR 基因的检出率为 76.67%,低于川南地区刘恋等^[9]的检出水平(96.8%),但远远高于孙静娜等^[10]检测的河北地区多重耐药鲍曼不动杆菌 adeR 基因的携带结果(34.38%),说明 AdeABC 外排系统的分布存在明显的地域差异,但同一地区的分布尚趋稳定。

临床药敏试验结果显示,大部分菌株对这 4 种常用的抗菌药物耐药,对亚胺培南的耐药率为 60.71%,与全国平均水平基本一致(59.0%^[2]),但远远高于 10 年前林丽等^[8]检测的鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率(分别为 0.9%和 1.8%),提示川北医学院附属医院分离的鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率上升较快,形势日趋严重,应引起大家高度重视。adeR 基因阳性组中对 4 种抗菌药物耐药率均明显高于 adeR 基因阴性组($P < 0.05$),adeR 基因阳性组对头孢吡肟的耐药率最高,达 90.74%,adeR 基因阴性组对亚胺培南的耐药率最低,为 44.00%。说明 AdeABC 外排系统的存在是鲍曼不动杆菌耐药尤其是多重耐药的重要原因。而 ad-

eR 阴性组对各抗菌药物的耐药率仍较高,提示本地区存在的鲍曼不动杆菌还存在其他耐药机制,应待进一步研究。

综上所述,外排泵基因 adeR 在川北医学院附属医院分离的鲍曼不动杆菌中的检出率较高,是引起抗菌药物多重耐药的重要原因,除加强对鲍曼不动杆菌的临床控制外,可将外排泵作为潜在的治疗靶点进行新型药物的研发。

参考文献

- [1] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 全国细菌耐药监测网. 2014 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国职业药师, 2016, 13(2): 3-8.
- [2] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 全国细菌耐药监测网. 2015 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国执业药师, 2016, 13(3): 3-8.
- [3] 李卓成, 张彦鹏, 吴伟清, 等. 鲍曼不动杆菌临床分离株外排泵分别水平与碳青霉烯类抗生素耐药研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(22): 3057-3059.
- [4] 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]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 9(48): 3298-3304.
- [5] 周华, 周建英, 俞云松. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识解读[J]. 中国循证医学杂志, 2016, 16(1): 26-29.
- [6] 彭香, 徐明, 董桂英, 等. 鲍曼不动杆菌医院感染暴发因素分析与防控策略[J]. 重庆医学, 2016, 45(31): 4449-4452.
- [7] MAGNET S, COURVALIN P, LAMBERT T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3375-3380.
- [8] 林丽, 周岐新, 凌保东. 鲍曼不动杆菌主动外排系统 AdeABC, AdeIJK 与多重耐药相关性[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2): 100-103.
- [9] 刘恋, 丁银环, 向成玉, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因检测及同源性分析[J]. 山东医药, 2018, 58(1): 69-71.
- [10] 孙静娜, 刘泽世, 王国欣, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌的临床分布及其外排基因型分析[J]. 山东医药, 2014, 54(1): 22-24.

(收稿日期: 2018-06-02 修回日期: 2018-09-16)