

· 论 著 ·

多药耐药鲍曼不动杆菌抗菌剂外排泵基因研究

张晓梅, 王苏建, 宋静玉, 鲁科峰, 王家平[△]

(南京医科大学附属常州第二人民医院检验科, 南京 213003)

摘要:目的 了解多药耐药鲍曼不动杆菌(MDR-ABA)抗菌剂外排泵基因存在状况与细菌耐药关系。方法 采用 PCR 方法检测 4 种抗菌剂外排泵基因(*adeB*、*mdfA*、*qacE*Δ1、*tehA*), PCR 阳性产物采用 PCR 直接全自动荧光法测序。结果 20 株 MDR-ABA 有 18 株检出同时携带 *adeB*、*mdfA*、*qacE*Δ1 基因, 阳性率为 95%, 且 *tehA* 均为阴性。结论 连续分离的多药耐药鲍曼不动杆菌抗菌剂外排泵基因检出率较高可能是 MDR-ABA 呈多重耐药的原因, 其具有流行病学意义。

关键词:多药耐药鲍氏不动杆菌; 抗药性, 多药; 外排泵; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)16-1811-03

Study on the genes of efflux pumps in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*

Zhang Xiaomei, Wang Sujian, Song Jingyu, Lu Kefeng, Wang Jiaping[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Changzhou of Nanjing Medical university, Jiangsu 213003, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between drug-resistance and the genes of efflux pumps in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*(MDR-ABA). **Methods** Four kinds of genes of efflux pumps (*adeB*、*mdfA*、*qacE*Δ1、*tehA*) were detected by PCR. **Results** Among 20 detected MDR-ABA strains, 95% (18/20) were with *adeB*、*mdfA* and *qacE*Δ1 genes of efflux pumps, but none of the 20 stain were with *tehA* gene. **Conclusion** Multiple-drug-resistance of MDR-ABA might be mainly caused by the highly positive rates of genes of efflux pumps and this mechanism might have epidemiology significance.

Key words: acinetobacter baumannii; drug resistance, multiple; gene; efflux pumps

多药耐药鲍曼不动杆菌(multidrug-resistant acinetobacter baumannii, MDR-ABA)的出现常常导致院内感染者不治而亡, 它所引起的感染已成为全球性难题^[1-3]。MDR-ABA 对包括黏菌素、替加环素在内的全部抗菌剂均耐药, 被称作极度耐药的鲍曼不动杆菌(extensively drug-resistant acinetobacter baumannii, XDR-ABA), 现已有报道^[4]。中国学者也从 MDR-ABA 中检出多种 β-内酰胺酶、16S rRNA 甲基化酶和氨基糖苷类修饰酶基因^[5-6], 但国内对 MDR-ABA 抗菌剂(包括抗菌药物、消毒剂)外排泵基因研究报道鲜见, 为了解本院 MDR-ABA 的抗菌剂外排泵基因存在状况, 笔者对 20 株 MDR-ABA 进行 4 种抗菌剂外排泵基因(*adeB*、*mdfA*、*qacE*Δ1、*tehA*)的检测, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 20 株 MDR-ABA 均分离自 2009 年 5 月至 2010 年 5 月本院住院患者临床标本。标本分布为:痰液 11 例, 血液 2 例, 伤口/创面分泌物 5 例, 尿液 2 例。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定和药敏试验 采用梅里埃公司 Vitek 32 微生物鉴定仪配套革兰阴性菌鉴定卡进行菌株鉴定。药敏试验采用纸片扩散法, 药敏纸片为 Oxia 公司产品, 培养基为柯玛嘉公司产品。作 β-内酰胺类(包括头孢菌素类、碳青霉稀类)、氨基糖苷类、喹诺酮类、氯霉素类和磺胺类抗菌剂药敏试验, 并根据美国 CLSI 2009 年版标准判断抗菌剂敏感性。20 株 MDR-ABA 抗菌剂的药敏率, 见表 1。

1.2.2 细菌处理 选取纯培养菌落置于 0.5 mL 离心管内

(内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 μL), 56 °C 水浴 2 h 后, 改 95 °C 水浴 10 min, 15 000 r/min 离心 30 s。上清液即为基因检测的模板液, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

表 1 20 株 MDR-ABA 抗菌剂的药敏率[n(%)]

药物分类	药物名称	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
β-内酰胺类	氨苄西林	20(100)	0(0)	0(0)
	氨苄西林/舒巴坦	20(100)	0(0)	0(0)
	哌拉西林/他唑巴坦	12(60)	4(20)	4(20)
	头孢唑啉	20(100)	0(0)	0(0)
	头孢西丁	20(100)	0(0)	0(0)
	头孢曲松	20(100)	0(0)	0(0)
	头孢他啶	17(85)	2(10)	1(5)
	头孢唑肟	20(100)	0(0)	0(0)
	头孢哌酮	20(100)	0(0)	0(0)
	头孢哌酮/舒巴坦	0(0)	0(0)	20(100)
	头孢吡肟	18(90)	1(5)	1(5)
	头孢匹罗	20(100)	0(0)	0(0)
氨基糖苷类	氨基糖苷	19(95)	0(0)	1(5)
	亚胺培南	8(40)	0(0)	12(60)
	美洛培南	8(40)	0(0)	12(60)
	庆大霉素	20(100)	0(0)	0(0)
	妥布霉素	20(100)	0(0)	0(0)
阿米卡星	17(85)	0(0)	3(15)	

[△] 通讯作者, E-mail: wjp680526@sohu.com。

续表 1 20 株 MDR-ABA 抗菌剂的药敏率[n(%)]

药物分类	药物名称	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
喹诺酮类	环丙沙星	19(95)	0(0)	1(5)
	左氧氟沙星	19(95)	0(0)	1(5)
氯霉素类	氯霉素	20(100)	0(0)	0(0)
磺胺类	复方新诺明	20(100)	0(0)	0(0)

1.2.3 基因检测 4 种抗菌剂外排泵基因 (*adeB*、*mdfA*、*qacEΔ1*、*tehA*) 检测均为 PCR 法。靶基因引物识别序列和目的产物长度见表 2。各种靶基因 PCR 扩增体系均为：每反应体系 P1 引物 1 μL (1.0 μmol/L)、P2 引物 1 μL (1.0 μmol/L)、dNTPs 2 μL (2 mmol/L)、10 倍缓冲液 2 μL (KCl 10 mmol/L、(NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L、MgCl₂ 2 mmol/L、Tris-HCl (pH 值为 9.0) 10 mmol/L、NP40 0.5%，小牛血清 (BSA) 0.02% (wt/vol)，*Taq* DNA pol 1 U (不计体积)，超纯水 9 μL，模板液 5 μL，总反应体积 20 μL。PCR 扩增热循环参数均为：93 °C 预变性 2 min，然后 93 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 60 s，循环 35 周期，最后一个 72 °C 延长至 5 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，出现与阳性对照分子相当的目的条带为阳性。耐药基因检测试剂盒、靶基因 PCR 引物序列和阳性对照 DNA 由无锡市克隆遗传技术研究所提供。

表 2 靶基因引物识别序列和目的产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度
<i>adeB</i>	P1: TACCGGTATTACCTTTGCCGGA	250 bp
	P2: GTCTTTAAGTGTGCGTAAAAGCCAC	
<i>mdfA</i>	P1: ACGACAGCGTTGAACCGTAC	365 bp
	P2: TCAGCAGTGGGATATGCCGC	
<i>qacEΔ1</i>	P1: TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	300 bp
	P2: ATTCAGAATGCCGAACACCG	
<i>tehA</i>	P1: ATGCAGAGCGATAAAGTGCTC	436 bp
	P2: TGGACTGTATCTGCCGACAG	

1.2.4 阳性基因测序 PCR 阳性产物为 PCR 直接全自动荧光法测序，委托上海博尚生物技术有限公司完成，测序在美国 ABI 公司 3730 型毛细管全自动测序仪上进行。

1.2.5 测得序列比对 读序工具软件为 Chromas，测序结果用 Chromas 直接作 Blast Search 比对。

2 结 果

20 株 MDR-ABA 4 种抗菌剂外排泵基因中，除 3 号菌 *qacEΔ1* 为阴性，5 号菌 *adeB*、*mdfA* 为阴性外，其他菌株 *adeB*、*mdfA*、*qacEΔ1* 均为阳性，阳性率达 95%，而 *tehA* 均为阴性。1 号株的 *adeB*、*mdfA*、*qacEΔ1* 3 种 PCR 阳性产物测得序列经 BLAST 比对与已在 GenBank 登录的均相同，见图 1~3。

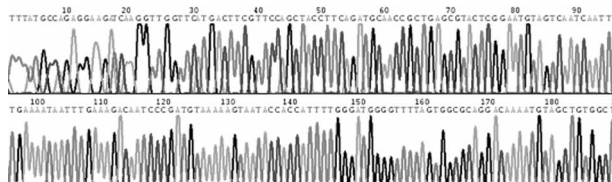


图 1 *adeB* 基因测序图(部分)

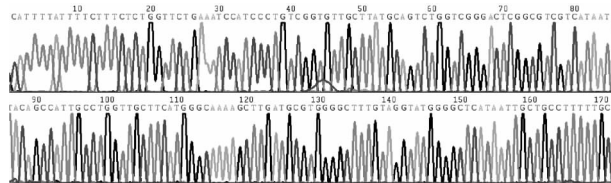


图 2 *qacEΔ1* 基因测序图(部分)

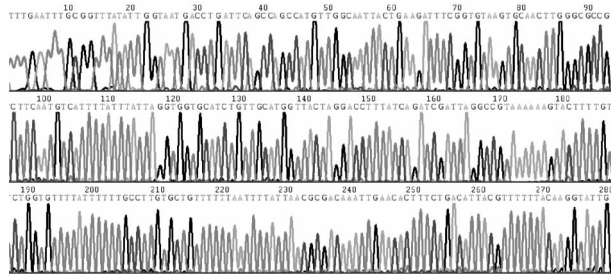


图 3 *mdfA* 基因测序图(部分)

3 讨 论

本组 MDR-ABA 抗菌剂药敏结果显示，β-内酰胺类药物中头孢菌素类耐药率极高(其中一些高达 100%)，亚胺培南、美洛培南等碳青霉稀类药物耐药率也达 40%；氨基糖苷类药物耐药率达 85%~100%，喹诺酮类药物耐药率达 95%，故多药耐药的特征明显。

细菌的外排泵系统可分五大类：耐受-生节-分裂家族(the resistance-nodulation-division family, RND)、多药物与毒物外排家族(the multidrug and toxic compound extrusion family, MATE)、药物与代谢物转运体超家族(the much larger drug/metabolite transporter superfamily, DMT)及与之相关的小多药外排家族(the small multidrug resistance family, SMR)、主要易化因子超家族(the major facilitator superfamily, MFS)、ATP 结合盒转运体家族(ATP-binding cassette family, ABC)。除 ABC 为能量泵外，其余均为质子泵^[5-7]。

本文检测的 *adeB* 属于 RND，*mdfA* 属于 MFS，*qacEΔ1*、*tehA* 属于 SMR，均为质子泵。*adeABC* 是重要的鲍曼不动杆菌外排泵系统，调控基因为 *adeR*、*adeS*。比较基因组学研究发现，表现为多药耐药的 AYE 株存在 *adeABC* 外排泵系统，而敏感株(SDF 株)则无该外排泵系统^[8-10]。因此，*adeB* 基因可作为 *adeABC* 外排泵标志。*adeABC* 外排泵系统外排 β-内酰胺类药物、氨基糖苷类药物、红霉素、氯霉素、四环素^[11]，并且外排四环素类新药——替加环素^[12]。*mdfA* 编码多种药物外排泵基因，被其外排药物种类繁多，最主要为外排氯霉素。也能外排喹诺酮类药物，氨基糖苷类药物以及利福平、四环素、红霉素、磺胺等广谱抗菌剂和溴乙锭、结晶紫、普鲁黄、罗丹明等抗菌染料^[13]。*qacEΔ1* 基因表达细菌多种化合物外排泵。能外排季胺类(苯扎溴铵、苯扎氯铵、度米芬)、双胍类(氯己定)、碱性染料(孔雀石绿)等消毒剂、防腐剂、抗菌染料^[9]。

本组 20 株 MDR-ABA 菌株 *adeB*、*mdfA*、*qacEΔ1* 基因均有检出，且阳性率极高(95%)。除 3、5 号株外，其余 18 株菌株都同时携带了 *adeB*、*mdfA*、*qacEΔ1* 等 3 种外排泵基因，*adeB*、*mdfA*、*qacEΔ1* 等 3 种基因均编码宽范围抗菌剂(包括抗菌药物、消毒剂)外排泵。极高的阳性率也解释了这些菌株高耐药部分原因。

(志谢:PCR 引物由无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌老师根据 2010 年 10 月 1 日之前已在 PUBMED 登录的各种序列的保守区域完成设计,并获授权使用,在此表示感谢!)

参考文献

[1] Munoz-Price LS, Weinstein RA. Acinetobacter infection[J]. N Engl J Med, 2008, 358(12):1271-1281.
 [2] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii; Emergence of a successful pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3):538-582.
 [3] Mugnier PD, Prirel L, Naas T, et al. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of acinetobacter baumannii [J]. Emerging Infectious Diseases, 2010, 16(1):35-40.
 [4] Doi Y, Husain S, Potoski BA, et al. Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(6):980-982.
 [5] 糜祖煌, 秦玲. 多药耐药鲍氏不动杆菌对 5 类抗菌药物耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(7):901-904.
 [6] 黄支密, 糜祖煌, 储秋菊, 等. 鲍曼不动杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(8):727-728.
 [7] Poole K. Efflux-mediated antimicrob resistance[J]. J Antimicrobi-

al Chemother, 2005, 56(1):20-51.
 [8] Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multi-drug resistance efflux pumps in bacteria[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2):382-402.
 [9] 翁幸璧, 糜祖煌. 大肠埃希菌尿液分离株 7 种抗菌制剂外排泵基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(6):759-762.
 [10] Fourmier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in acinetobacter baumannii[J]. PLoS Genet, 2006, 2(1):e7.
 [11] 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.
 [12] Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5):1001-1004.
 [13] Edgar R, Bibi E. MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition[J]. J Bacteriol, 1997, 179(7):2274-2280.

(收稿日期:2011-05-09)

(上接第 1810 页)

panel reactive antibody against cross reactive group antigens as a contraindication to renal allotransplantation [J]. Exp Mol Pathol, 2001, 71(1):73-78.
 [4] Singh D, Kiberd BA, West KA. Importance of peak PRA in predicting the kidney transplant survival in highly sensitized patients [J]. Transplant Proc, 2003, 35(7):2395-2397.
 [5] 罗敏, 肖露露. 群体反应性抗体与器官移植[J]. 免疫学杂志, 2010, 2(2):167-170.
 [6] 于立新, 叶俊生, 邓文峰, 等. 高度致敏受者肾移植的临床处理 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2008, 29(3):185-187.
 [7] Mizutani K. HLA mismatches and PRA in kidney retransplants [J]. Clin Transpl, 2007:19-27.
 [8] 袁小鹏, 王长希, 陈立中, 等. 肾移植术后急性体液性排斥反应的治疗[J]. 中华器官移植杂志, 2009, 30(5):268-270.
 [9] 贾保祥, 孙立宁, 武俊杰, 等. 肾移植患者术前输血与再次移植致抗体生成的比较[J]. 国际外科学杂志, 2009, 36(10):668-671.
 [10] Meier-Kriesche HU, Scornik JC, Susskind B, et al. A lifetime versus a graft life approach redefines the importance of HLA matching in kidney transplant patients[J]. Transplantation, 2009, 88

(1):23-29.
 [11] 张明, 顾勇, 陆福明, 等. 肾移植术后 HLA 抗体对移植肾预后的影响[J]. 中国临床医学, 2009, 4(2):235-238.
 [12] Arnol M, Prather JC, Mittalhenkle A, et al. Long-term kidney re-graft survival from deceased donors: risk factors and outcomes in a single center[J]. Transplantation, 2008, 86(8):1084-1089.
 [13] Premasathian N, Panorchan K, Vongwiwatana A, et al. The effect of peak and current serum panel-reactive antibody on graft survival[J]. Transplant Proc, 2008, 40(7):2200-2201.
 [14] van den Berg-Loonen EM, Billen EV, Voorter CE, et al. Clinical relevance of pretransplant donor-directed antibodies detected by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients [J]. Transplantation, 2008, 85(8):1086-1090.
 [15] Vasilescu ER, Ho EK, Colovai AI, et al. Alloantibodies and the outcome of cadaver kidney allografts[J]. Hum Immunol, 2006, 67(8):597-604.
 [16] 贾保祥, 孙立宁, 田野. 亲属肾移植患者术后群体反应性抗体与肾功能的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7):675-676.

(收稿日期:2011-05-09)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。