

• 临床检验研究论著 •

多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类修饰酶基因分子流行病学研究*

杨燕¹, 邹玖明¹, 邓三季¹, 肖慈然², 李智山¹

(1. 湖北省襄阳市中心医院医学检验部 441021; 2. 四川省阆中市人民医院检验科 637400)

摘要:目的 研究临床分离的多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类修饰酶基因分子流行病学。方法 采用 PCR 方法对 22 株多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类耐药相关基因, 氨基糖苷类修饰酶基因 AAC(3)-Ia、AAC(3)-IIa、AAC(6)-Ih、AAC(6)-Ib 等耐药基因的进行检测分析。结果 22 株多药耐药鲍氏不动杆菌均携带 AAC(6)-Ib 型基因(100%), 有 19 株分离株携带了 AAC(3)-Ia 型基因(86.3%)。结论 研究表明, 携带氨基糖苷类修饰酶耐药基因是导致本组多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类抗生素耐药重要机制。

关键词: 不动杆菌属; 氨基糖苷类; 抗菌药; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)13-1647-02

Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance gene in multidrug-resistance *Acinetobacter baumannii*

Yang Yan¹, Zou Jiuming¹, Deng Sanji¹, Xiao Ciran², Li Zhishan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang, Hubei 441021, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Langzhong, Langzhong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To understand the molecular epidemiology of aminoglycoside resistance gene in multidrug-resistance *Acinetobacter baumannii*(MDRAB) in the hospital. **Methods** 22 MDRAB isolates were collected, and aminoglycoside resistance genes of these isolates including AAC(3)-Ia, AAC(3)-IIa, AAC(6)-Ih, and AAC(6)-Ib were detected by PCR. **Results** AAC(6)-Ib gene were positive in all MDRAB isolates(100%), and AAC(3)-Ia gene were positive in 19 MDRAB isolates(86.3%). **Conclusion** MDRAB highly resistance rate to aminoglycoside antibiotic is related to the AAC(6)-Ib and AAC(3)-Ia gene.

Key words: acinetobacter; aminoglycosides; anti-bacterial agents; genes

鲍氏不动杆菌为条件致病菌, 近年来已成为医院感染的重要致病菌^[1]。为了研究临床分离的多药耐药鲍氏不动杆菌(MDRAB)氨基糖苷类修饰酶基因分子流行病学。采用 PCR 方法对 2010 年 8 月至 2011 年 8 月临床分离的 22 株 MDRAB 氨基糖苷类修饰酶基因 AAC(3)-Ia、AAC(3)-IIa、AAC(6)-Ih、AAC(6)-Ib 等耐药基因的进行检测分析。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源及鉴定 收集 2010 年 8 月至 2011 年 7 月本院临床分离 MDRAB 22 菌株。应用法国 bioMérieux 公司 API20NE 试纸条和西门子公司的 WalkAway-40 进行细菌鉴定。同时用大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 作为室内质控的标准菌株。

1.2 药敏试验 药敏试验为肉汤稀释法。采用西门子公司的 WalkAway-40 测定 11 种抗菌药物的敏感性, 分别为头孢他啶(CAZ)、环丙沙星(CIP)、亚胺培南(IMP)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、头孢吡肟(FEP)、头孢噻肟(CTX)、头孢哌酮/舒巴坦(CSF)、复方新诺明(SXT)、美罗培南(MEM), 结果判读根据 CLSI 2011 年版标准进行判读。采用 WHONET 5.4 进行数据分析。

1.3 PCR 扩增模板制备 细菌处理 将分离菌株接种于 LB 液体培养基(beyotime, ST156), 并培养 24 h, 取 1.5 mL 培养过夜的菌液, 13 000 r/min 离心 30 s, 接着使用北京赛百盛的树脂型 TM 基因组 DNA 提纯试剂盒, 参照说明书提取分离株的 DNA, 最后将提取的 DNA 于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.4 基因检测均为 PCR 法 分别向 EQ2.2-25 PCR 反应体系管里面加入上游引物、下游引物各 1 μL(各种靶基因 AAC(3)-Ia、AAC(3)-IIa、AAC(6)-Ih、AAC(6)-Ib 基因的引物序列^[8]目的片段的长度见表 1), DNA 模板液 3 μL, ddH₂O 20 μL。PCR 循环条件: 95 °C 预变性 5 min, 变性 95 °C 20 s、退火 59 °C 40 s、延伸 72 °C 60s, 循环 35 个周期, 最后延伸 72 °C 5 min。PCR 产物分析, 运用 1.5% 的琼脂糖胶进行电泳, 电压为 80 V, 时间为 40 min, 使用凝胶成像系统观察凝胶, 并拍照记录结果。

表 1 氨基糖苷类修饰酶基因 PCR 引物系列

基因		引物序列	目的片段(bp)
AAC(3)-Ia	P1	GAC ATA AGC CTG TTC GGTT	372
	P2	CTC CGA ACT CAC GAC CGA	
AAC(3)-IIa	P1	ATG CAT ACG CGG AAG GC	822
	P2	TGC TGG CAC GAT CGG AG	
AAC(6)-Ih	P1	TGC CGA TAT CTG AAT C	407
	P2	ACA CCA CAC GTT CAG	
AAC(6)-Ib	P1	TAT GAG TGG CTA AAT CGA T	395
	P2	CCC GCT TTC TCG TAG CA	

2 结果

2.1 药敏试验结果 22 株鲍氏不动杆菌对常用抗菌素药物的药敏率见表 2。

* 基金项目: 襄阳市研究开发计划 襄科技[2011]5 号。 作者简介: 杨燕, 女, 主管检验技师, 主要从事微生物耐药机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: lizhishan55@163.com。

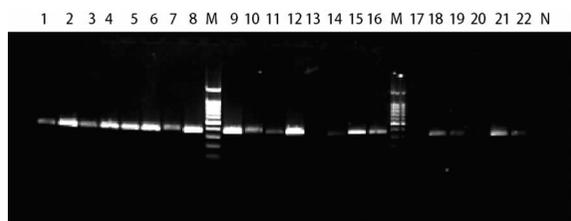
表 2 22 株鲍氏不动杆菌对常用抗菌素药物的药敏率

抗菌药物	耐药		中介		敏感	
	株数 (n)	耐药率 (%)	株数 (n)	中介率 (%)	株数 (n)	敏感率 (%)
头孢他啶	22	100.0	0	0.0	0	0.0
环丙沙星	22	100.0	0	0.0	0	0.0
亚胺培南	11	50.0	7	31.8	4	18.2
庆大霉素	22	100.0	0	0.0	0	0.0
阿米卡星	22	100.0	0	0.0	0	0.0
头孢吡肟	22	100.0	0	0.0	0	0.0
头孢噻肟	22	100.0	0	0.0	0	0.0
头孢哌酮/舒巴坦	12	54.6	7	31.8	3	13.5
磺胺甲唑/甲氧苄啶	22	100.0	0	0.0	0	0.0
美罗培南	9	40.9	8	40.9	5	22.7



M: 相对分子质量标志; 从上而下分别是 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp; N: 阴性对照; 数字: 分离株编号。

图 1 PDR-Ab 携带的 AAC(6)-Ib 基因的琼脂糖凝胶电泳图谱



M: 相对分子质量标志; 从上而下分别是 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp; N: 阴性对照; 数字: 分离株编号。

图 2 PDR-Ab 携带的 AAC(3)-Ia 基因的琼脂糖凝胶电泳图谱

2.2 MDRAB 氨基糖苷类修饰酶基因检测结果 22 株 MDRAB 均携带 AAC(6)-Ib 型基因(100%), 有 19 株分离株携带了 AAC(3)-Ia 型基因(86.3%)。AAC(3)-IIa、AAC(6)-Ib 等修饰酶基因均为阴性。见图 1、图 2。

3 讨论

氨基糖苷类药物因抗菌谱广、疗效显著, 在临床医学和畜牧兽医业得到广泛应用, 因此研究氨基糖苷类修饰酶基因是否是本院鲍氏不动杆菌对氨基糖苷类的耐药主要机制, 对了解鲍氏不动杆菌的耐药现象具有一定的可行性。22 株 MDRAB 对阿米卡星、庆大霉素等氨基糖苷类药物不敏感, 不敏感率达到 100%。研究表明, 携带氨基糖苷类修饰酶耐药基因是导致本组多药耐药鲍氏不动杆菌是氨基糖苷类抗生素耐药重要机制。氨基糖苷类修饰酶按功能可分成乙酰转移酶、磷酸转移酶、核苷转移酶 3 大类, 其中前者最常见^[2]。实验结果显示, AAC(6)-Ib、AAC(3)-Ia 氨基糖苷类修饰酶编码基因携带率分别为 100%、86.3%, 且 22 株 MDRAB 却对两类氨基糖苷类药物全部耐药, 这说明本组 MDRAB 对氨基糖苷类药物的全耐药与携带 AAC(3)-Ia、AAC(6)-Ib 修饰酶基因相关。其中 AAC(3)-Ia、AAC(6)-Ib 两种基因已在本组 MDRAB 中流行^[3]。

参考文献

[1] 肖慈然, 邹玖明, 杨燕, 等. OXA-23 酶基因在多药耐药鲍氏不动杆菌的流行研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(4): 671-672.
 [2] 刘丁, 陈萍, 等. 多重 PCR 检测鲍曼不动杆菌氨基糖苷乙酰转移酶相关基因[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2320-2322.
 [3] 张强, 陆炜方, 朱晓珏. 多药耐药鲍氏不动杆菌中氨基糖苷类修饰酶基因的分析研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(22): 4655-4656.

(收稿日期: 2013-01-25)

(上接第 1646 页)

中一条杂合序列与最相近 HLA-B* 2733 亚型存在 2 个碱基差异, 但具体的杂合型别还有待进一步研究。

总之, 应用 PCR-SSP 法进行 HLA-B27 检测, 虽然面对新增加的 HLA-B27 基因具有一定的局限性, 但较其他 HLA-B27 检测方法, 具有样本要求低、检测效率等优点, 故可适用于 HLA-B27 的临床检测需要。

参考文献

[1] Liu Y, Li J, Chen B, et al. Familial aggregation of ankylosing spondylitis in Southern China[J]. J Rheumatol, 2001, 28(3): 550-553.
 [2] Dominguez O, Coto E, Martinez-Naves E, et al. Molecular typing of HLA-B27 alleles[J]. Immunogenetics, 1992, 36(5): 277-282.
 [3] Voorter CE, van der Vlies SA, van den Berg-Loonen EM. Se-

quence-based typing of HLA-B; the B7 cross-reacting group[J]. Tissue Antigens, 2000, 56(4): 356-362.
 [4] Lucotte G, Burckel A. DNA typing of HLA-B27 by polymerase chain reaction[J]. Mol Cell Probes, 1997, 11(4): 313-315.
 [5] Robinson J, Mistry K, McWilliam H, et al. The IMGT/HLA database[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Database issue): D1171-1176.
 [6] Voorter CE, Swelsen WT, van den Berg-Loonen EM. B* 27 in molecular diagnostics: impact of new alleles and polymorphism outside exons 2 and 3[J]. Tissue Antigens, 2002, 60(1): 25-35.
 [7] 曾洋, 谭诗梦, 冯斌, 等. PCR-SSP 法检测 29 种 HLA-B27 基因亚型[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(5): 303-305.

(收稿日期: 2012-11-24)