

## 泛耐药鲍氏不动杆菌获得性耐药相关基因与可移动遗传元件检测指标的聚类分析

王春新<sup>1</sup>, 耿先龙<sup>1\*</sup>, 许亚丰<sup>1</sup>, 陈国千<sup>1</sup>, 赵琪<sup>1</sup>, 周丽珍<sup>1</sup>, 糜祖煌<sup>2</sup>, 金辉<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属无锡人民医院医学检验科, 江苏 无锡 214023; <sup>2</sup>无锡市克隆遗传技术研究所, 江苏 无锡 214026; <sup>3</sup>东南大学公共卫生学院流行病学与卫生统计教研室, 江苏 南京 210096)

**[摘要]** 目的: 调查泛耐药鲍氏不动杆菌(*pandrug-resistant Acinetobacter baumannii*, PDR-ABA)中获得性耐药相关基因和可移动遗传元件遗传标记的存在状况, 以及两者的相关性。方法: 收集 2010 年 3 月到 2010 年 5 月临床标本中分离的 PDR-ABA 菌 20 株, 采用聚合酶链反应(PCR)的方法检测 37 种  $\beta$ -内酰胺类获得性耐药基因、15 种氨基糖苷类获得性耐药基因、5 种喹诺酮类获得性耐药基因和 8 种可移动遗传元件, 并用指标聚类分析(SPSS 法)分析获得性耐药相关基因和可移动遗传元件遗传标记的相关性。结果: 20 株 PDR-ABA 菌共检出 5 种  $\beta$ -内酰胺类获得性耐药基因、4 种氨基糖苷类获得性耐药基因、1 种喹诺酮类获得性耐药基因、5 种可移动遗传元件。指标聚类分析显示获得性耐药基因与多种可移动遗传元件相关联: TEM-1、ADC-like、OXA-23、aac(6')-Ib、ant(2'')-I、ant(3'')-I、aphA1、adeB 与 tnpU、ISCR1、IS26、ISaba1 高度关联, DHA-1、CARB 与 IS903 关联。结论: 本组 PDR-ABA 携带获得性耐药相关基因导致对相关药物耐药, 且获得性耐药相关基因和可移动遗传元件密切相关。

**[关键词]** 鲍氏不动杆菌; 获得性耐药基因; 可移动遗传元件; 指标聚类分析; 泛耐药

**[中图分类号]** R446.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)01-115-04

## Index cluster analysis of acquired resistance-related genes and mobile genetic elements in pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

WANG Chun-xin<sup>1</sup>, GENG Xian-long<sup>1\*</sup>, XU Ya-feng<sup>1</sup>, CHEN Guo-qian<sup>1</sup>, ZHAO Qi<sup>1</sup>, ZHOU Li-zhen<sup>1</sup>, MI Zu-huang<sup>2</sup>, JIN Hui<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Medical Laboratory, the Affiliated Wuxi People's Hospital of NJMU, Wuxi 214023; <sup>2</sup>Clonal Genetic Technology Research Institute, Wuxi 214026; <sup>3</sup>Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210096, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the distribution of acquired resistance-related genes and markers of mobile genetic elements, and their relationships in pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (PDR-ABA). **Methods:** From March 2010 to May 2010, 20 strains of PDR-ABA were collected from clinical specimen. Then, 57 kinds of acquired resistance-related genes against beta-lactams, aminoglycosides, quinolones, and 8 kinds of genetic markers of mobile genetic element were analyzed by PCR. The index cluster analysis was used to investigate their relationships. **Results:** In 20 strains of PDR-ABA, 5 kinds of acquired beta-lactam-resistance genes, 4 kinds of acquired aminoglycoside-resistance genes, 1 kinds of acquired quinolone-resistance genes, and 5 kinds of genetic markers of mobile genetic elements were detected. Index cluster analysis showed that acquired resistance-related genes were associated with mobile genetic elements. TEM-1, ADC-like, OXA-23, aac(6')-Ib, ant(2'')-I, ant(3'')-I, aphA1 and adeB had close relations with tnpU, ISCR1, IS26, ISaba1; DHA-1 and CARB also had relations with IS903. **Conclusion:** In this group of PDR-ABA, acquired resistance-related genes played an important role in resistant phenotypes of antimicrobial agents, and acquired resistance-related genes were associated with mobile genetic elements.

**[Key words]** *Acinetobacter baumannii*; acquired resistance gene; mobile genetic elements; index cluster analysis; pandrug-resistant

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 115-118]

**[基金项目]** 无锡市医院管理中心科技发展基金项目(YGM1001)

\*通讯作者, E-mail: bacteria001@163.com

对于鲍氏不动杆菌来讲,抗菌药物获得性耐药机制较为常见。获得性耐药是指细菌借助于可移动遗传元件(mobile genetic elements,MGE)获得耐药基因,通过基因的水平转移(horizontal gene transfer,HGT)完成耐药基因的传播。获得性耐药基因编码抗菌药物水解酶、修饰酶,或编码抗菌药物作用靶位保护蛋白,或编码抗菌药物外排泵。为了解泛耐药鲍氏不动杆菌(pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*,PDR-ABA)的获得性耐药基因和 MGE 携带状况,我们检测了 20 株 PDR-ABA 菌的 37 种  $\beta$ -内酰胺类获得性耐药基因、15 种氨基糖苷类获得性耐药基因、5 种喹诺酮类获得性耐药基因和 8 种 MGE,并分析获得性耐药基因与 MGE 的相关性,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

20 株 PDR-ABA 菌均分离自 2010 年 3 月至 2010 年 5 月南京医科大学附属无锡人民医院住院患者临床标本,其中痰液 16 份,尿液 3 份,伤口分泌物 1 份。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853 和鲍曼不动杆菌 ATCC19606,均购自卫生部临床检验中心。

#### 1.1.2 试剂和仪器

PCR 扩增试剂盒、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,检测按说明书进行。所有测序委托上海博尚生物技术有限公司在美国 ABI 公司 3730 型毛细管全自动测序仪上进行。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细菌鉴定和药敏试验

所有菌株鉴定及药敏试验采用法国生物梅里埃公司的 VITEK-32 全自动微生物分析系统,根据美国临床实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI)2009 年版要求进行抗菌药物敏感性判断。

#### 1.2.2 基因检测

挑取培养菌落置入 0.5 ml 离心管内(内预置 200 ng/ml 蛋白酶 K 溶液 400  $\mu$ l),56 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,再加纯水 500  $\mu$ l,即为基因检测的模板液,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。全部基因检测均为 PCR 法,阳性产物测得序列采用 Chromas 软件读序并直接作 BLAST Search 比对。基因检测项目为:① $\beta$ -内

酰胺类药物获得性耐药基因:TEM、SHV、CTX-M-1 群、CTX-M-2 群、CTX-M-8 群、CTX-M-9 群、CTX-M-25 群、PER、VEB、GES、CARB、RTG、KPC、SCO、BEL、LAP、TLA、IMP、VIM、SIM、SPM、GIM、AIM、NDM、KHM、DIM、TMB、ADC、DHA、OXA-1 群、OXA-2 群、OXA-10 群、OXA-20 群、OXA-23 群、OXA-24 群、OXA-51 群、OXA-58 群;②氨基糖苷类获得性耐药基因:aac(3)-I、aac(3)-II、aac(6')-Iad、aac(6')-Ib、aac(6')-II、ant(2'')-I、ant(3'')-I、ant(4'')-I、aphA1、armA、rmtA、rmtB、rmtC、rmtD、npmA;③喹诺酮类药物获得性耐药基因:qnrA、qnrB、qnrS、qepA、adeB;④MGE:tnpU、ISCR1、IS26、IS903、ISEcp1、ISaba1、ISaba-4、ISaba9。

### 1.2.3 聚类分析

对  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类和喹诺酮类获得性耐药相关基因与 MGE 的遗传标记基因的检测结果作指标聚类分析,分析软件为 SPSS。

## 2 结果

20 株 ABA 对阿米卡星、氨苄西林、头孢唑啉、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、头孢噻肟、头孢西丁、头孢他啶、头孢呋辛钠、庆大霉素、亚胺培南、左旋氧氟沙星、美洛培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢呋辛酯 15 种抗菌药物均呈耐药<sup>[1]</sup>。20 株 PDR-ABA 菌 37 种  $\beta$ -内酰胺类获得性耐药基因、15 种氨基糖苷类获得性耐药基因、5 种喹诺酮类获得性耐药基因和 8 种可移动遗传元件检测结果见表 1,检测结

表 1 20 株 PDR-ABA 菌 65 种基因检测结果

Table 1 65 kinds of genes detected in 20 strains of PDR-ABA [n(%)]

基因类型	基因名称	阳性数
$\beta$ -内酰胺类获得性耐药基因	TEM-1	20(100.0)
	CARB-2	1(5.0)
	ADC-like	20(100.0)
	DHA-1	1(5.0)
	OXA-23	20(100.0)
氨基糖苷类获得性耐药基因	aac(6')-I b	20(100.0)
	ant(2'')-I	20(100.0)
	ant(3'')-I	20(100.0)
	aphA1	20(100.0)
喹诺酮类获得性耐药基因	adeB	20(100.0)
	可移动遗传元件	20(100.0)
可移动遗传元件	tnpU	20(100.0)
	ISCR1	20(100.0)
	IS26	20(100.0)
	IS903	1(5.0)
	ISaba1	20(100.0)

PCR 阳性产物均经测序比对证实,检测为阴性的基因项目未列出。

果的指标聚类分析见图 1。图 2 为部分耐药基因测序图。

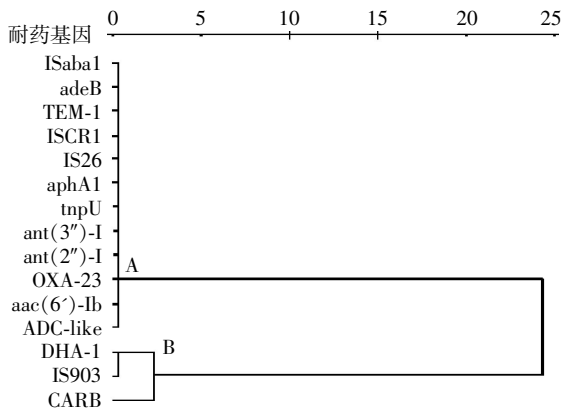


图 1 获得性耐药相关基因与可移动遗传元件检测结果的指标聚类分析

Figure 1 Index cluster analysis of acquired resistance-related genes and MGE in PDR-ABA

### 3 讨论

细菌的质粒、转座子、插入序列和整合子都是 MGE。MGE 将自身的基因序列以及所携带的基因在同种细菌菌株之间甚至不同种细菌菌株之间传递,从而使其所携带的耐药基因快速传播。转座子(transposons, Tn)是指能将自身基因插入基因组中任何一个序列上的一组 DNA 序列,分为复合转座子和复杂转座子(如:TnA 类转座子)。插入序列(insertion sequence, IS)一般在 600 个至 2 000 碱基对大小,由一段编码转座酶的 DNA 序列构成。插入序列只编码转座酶,可将插入序列视作为最简单的转座子,位于两个插入序列之间基因序列也可随插入序列转移。细菌转座子、插入序列可携带  $\beta$ -内酰胺酶基因、氨基糖苷类修饰酶基因、16SrRNA 甲基化酶基因、喹诺酮作用靶位保护蛋白基因、外排泵基因。处于转座子、插入序列下游的耐药基因可出

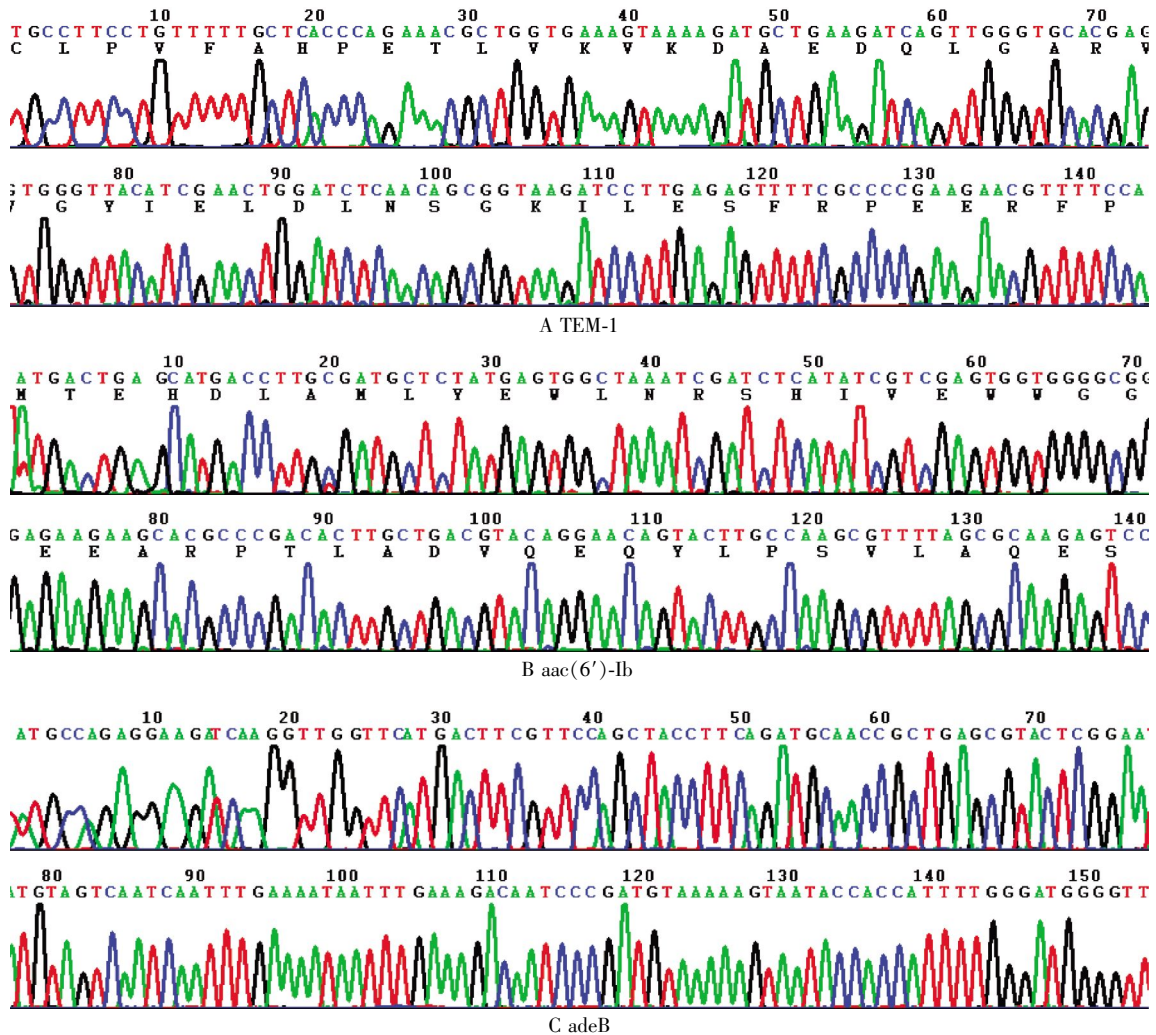


图 2 部分耐药基因测序图(部分)

Figure 2 Sequencing of resistance-related genes (part)

现高表达现象,原因为转座子、插入序列自带启动子导致下游基因高表达<sup>[1]</sup>。因此,转座子、插入序列不仅是耐药基因的载体,并与耐药程度相关。

β-内酰胺类获得性耐药基因主要为 β-内酰胺酶基因<sup>[2-6]</sup>,国内外学者从鲍氏不动杆菌中检出的 A 类 β-内酰胺酶基因有 TEM、SHV、PER、KPC、GES、CARB、RTG;B 类 β-内酰胺酶基因有 IMP、SIM、NDM;C 类 β-内酰胺酶基因有 ADC、DHA;D 类 β-内酰胺酶基因有 OXA-20、OXA-23 群、OXA-24 群、OXA-51 群、OXA-58 群等。本组 PDR-ABA 菌 A 类 β-内酰胺酶基因检出 TEM-1 和 CARB-2,C 类 β-内酰胺酶基因检出 ADC-like 和 DHA-1,D 类 β-内酰胺酶基因检出 OXA-23。

氨基糖苷类获得性耐药基因主要为氨基糖苷类修饰酶基因、16SrRNA 甲基化酶基因<sup>[7-11]</sup>。本组 PDR-ABA 菌检出 aac(6′)-Ib、ant(2″)-I、ant(3″)-I、aphA1 等 4 种氨基糖苷类修饰酶基因,16SrRNA 甲基化酶基因没有检出。

喹诺酮类获得性耐药基因主要为喹诺酮作用靶位保护蛋白基因 qnr 家族、对喹诺酮药物特异外排泵 qepA、adeB 基因<sup>[12-14]</sup>,本组 PDR-ABA 菌仅检出 adeB 基因。本组菌株耐喹诺酮类药物主要与喹诺酮耐药决定区突变相关(为染色体介导,另文发表)。

20 株 PDR-ABA 菌的 37 种 β-内酰胺类获得性耐药基因、15 种氨基糖苷类获得性耐药基因、5 种喹诺酮类获得性耐药基因和 8 种可移动遗传元件检测结果指标聚类分析显示,获得性耐药基因与各种可移动遗传元件相关联(图 1):如 A 簇中 TEM-1、ADC-like、OXA-23、aac(6′)-Ib、ant(2″)-I、ant(3″)-I、aphA1、adeB 与 tnpU、ISCR1、IS26、ISaba1 高度关联,B 簇中 DHA-1、CARB 与 IS903 关联。

国内获得性耐药基因与 MGE 检测结果指标聚类分析报告鲜见<sup>[15]</sup>,本研究中 20 株 PDR-ABA 菌疑为医院内感染,在 A 簇中 β-内酰胺类和氨基糖苷类获得性耐药基因与转座子和插入序列高度关联,也提示极易水平传播导致医院内感染。

致谢:PCR 引物由无锡市克隆遗传技术研究所糜祖煌设计,生物信息学数据处理由无锡新区虎马生物信息工作室完成,并获授权使用。

[参考文献]

[1] 许亚丰,王春新,陈国千,等. 泛耐药鲍氏不动杆菌携带多种转座子与插入序列 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011,21(13):2651-2654

[2] Munoz-Price LS,Wei nstein RA. Acinetobacter Infection [J]. N Engl J Med,2008,358(12):1271-1281  
[3] Mugnier PD,Prirel L,Naas T,et al. Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of Acinetobacter baumannii [J]. Emerg Infect Dis,2010,16(1): 35-40  
[4] Lee K,Yum JH,Yong D,et al. Novel acquired Metallo-β-Lactamase Gene,blaSIM-1,in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea [J]. Antimicrob Agents Chemother,2005,49(11):4485-4491  
[5] Potron,Poirel L,Croize L,et al. Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-Typeβ-Lactamase,RTG-4,from Acinetobacter baumannii [J]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53(7):3010-3116  
[6] Rodriguez-Martinz JM,Nordmann P,Ronco E,et al. Extended-spectrum cephalosporinase in Acinetobacter baumannii [J]. Antimicrob Agents Chemother,2010,54(8): 3484-3488  
[7] 糜祖煌,秦玲. 泛耐药铜绿假单胞菌 16SrRNA 甲基化酶基因、氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(12):1656-1658  
[8] Doi Y,Wachino J,Yamane K,et al. Spread of novel aminoglycoside resistance gene aac(6′)-Iad among Acinetobacter clinical isolates in Japan [J]. Antimicrob Agents Chemother,2004,48(6):2075-2080  
[9] Doi Y,Adams JM,Yamane K,et al. Identification of 16S rRNA methylase-producing Acinetobacter baumannii clinical strains in North America [J]. Antimicrob Agents Chemother,2007,51(11):4209-4210  
[10] 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  
[11] 翁幸璧,糜祖煌. 从尿液中分离出 aac(6′)-Ib 基因新亚型的大肠埃希菌 [J]. 中华检验医学杂志,2010,33(2): 149-151  
[12] 糜家睿,黄支密,糜祖煌. 多耐药肺炎克雷伯菌喹诺酮类耐药相关基因研究 [J]. 中华医院感染学杂志. 2009,19(24):3301-3304  
[13] Yamane K,Wachino JI,Suzuki S,et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump,QepA,found in an Escherichia coli clinical isolate [J]. Antimicrob Agents Chemother,2007,51(9):3354-3360  
[14] Vila J,Martí S,Sánchez-Céspedes J. Porins,efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii [J]. J Antimicrobial Chemother,2007,59:1210-1215  
[15] 翁幸璧,糜祖煌. 多耐药大肠埃希菌获得性耐药基因检测及指标聚类分析 [J]. 中华临床感染病杂志,2011,4(3):154-158