

# 关于携带 3 种 $\beta$ 内酰胺酶基因的鲍氏不动杆菌质粒的研究

李蓉 李文林 石小玉 曾元临 徐小文 赵林



**【摘要】** 目的 了解携带 3 种  $\beta$  内酰胺酶基因的鲍氏不动杆菌质粒的可传递性。方法 选取从烧伤创面分离出的多重耐药鲍氏不动杆菌(供体菌), 将之与大肠埃希菌 ATCC 25922(受体菌)进行耐药质粒接合、药物敏感试验, 并采用 PCR 分析接合子及其子代的耐药基因型、传代稳定性。结果 鲍氏不动杆菌通过接合将其携带对磺胺甲恶唑、氨苄西林、头孢噻吩、头孢博肟、头孢呋辛、亚胺培南/西司他丁和氨苄西林/舒巴坦的耐药性质粒及 3 种耐药基因传递给受体菌(例如经接合, 使受体菌对磺胺甲恶唑的最低抑菌浓度  $> 2 \text{ mg/L}$ ), 且可稳定传代。结论 鲍氏不动杆菌质粒上携带可接合传递并稳定传代的  $\beta$  内酰胺酶基因( $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ 、 $\text{bla}_{\text{PER-1}}$ 、 $\text{bla}_{\text{OXA-23}}$ ), 是烧伤感染后其具有多重耐药性的分子生物学机制之一。

**【关键词】** 烧伤;  $\beta$  内酰胺类; 鲍氏不动杆菌; 质粒

Study on *Acinetobacter baumannii* plasmid with 3 types of beta-lactamase genes in a burn ward LI Rong, LI Wen-lin, SHI Xiao-yu, ZENG Yuan-lin, XU Xiao-wen, ZHAO Lin. Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences of Nanchang University, Nanchang 330006, P. R. China

**【Abstract】** Objective To study the transferrable character of *Acinetobacter baumannii* (AB) plasmids with 3 types of beta-lactamase gene. Methods The plasmid of multi-drug resistant AB(donor) isolated from burn wound were transferred to *E. coli* ATCC25922(receptor) through conjugation, and drug sensitivity was also observed. Drug-resistant gene and stability of filial generation and zygote were analyzed by PCR. Results The drug-resistance of donor plasmids to Sulfamethoxazole, Ampicillin, Cefalotin, Cefpodoxime, Cefuroxime, Imipenem/Cilastatin and Ampicillin/Sulbactam, and three types of beta-lactamase gene were transferred to the receptor, and were also stably transmitted for passages. The minimum inhibitor concentration of receptor to Sulfamethoxazole was  $> 2 \text{ mg/L}$  after conjugation with donor, and inhibitory character could be transferred to next generation. Conclusion  $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ ,  $\text{bla}_{\text{PER-1}}$  and  $\text{bla}_{\text{OXA-23}}$  genes carried in the plasmid of AB can be transferred through conjugation and stably transmitted for passages, and it is one of the molecular mechanisms for AB with multi-drug resistance after burn infections.

**【Key words】** Burns; Beta lactams; *Acinetobacter baumannii*; Plasmids

带耐药基因的质粒通过接合播散是医院感染中耐药传递的主要机制。笔者进行了接合试验, 观察并分析质粒上耐药基因的可传递性、传代稳定性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株及试剂来源

从烧伤创面分离出的多重耐药鲍氏不动杆菌(南昌大学第一附属医院烧伤中心, 供体菌)携带  $\beta$  内酰胺酶基因( $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ 、 $\text{bla}_{\text{PER-1}}$ 、 $\text{bla}_{\text{OXA-23}}$ ), 且对实验室所用抗生素全部耐药; 大肠埃希菌 ATCC 25922(北京协和医院王辉教授惠赠)为受体菌。质粒

DNA 小量纯化试剂盒、Ex Taq™ Hot Start Version 购自日本 TaKaRa 公司, 氨苄西林(Amp)购自上海生工生物工程有限公司, 麦康凯培养基为英国 OXOID 公司产品。

### 1.2 接合试验

将鲍氏不动杆菌与大肠埃希菌 ATCC 25922 进行耐药质粒接合, 再挑选单个菌落分别在 Amp<sup>-</sup> 和 Amp<sup>+</sup> 麦康凯培养基上传代 3 次。

### 1.3 药物敏感试验

大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853(江西省临床检验中心)为药敏质控菌; 大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 为 PCR 实验对照。采用 Microscan-autoscan- $\phi$  型自动微生物分析仪(美国 DADE 公司)测定抑制 50% 菌株生长的最低抗生素浓度(MIC<sub>50</sub>), 按照 2003 年版美国国家临床实验室标准化委员会标准判断结果。

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(200693)

作者单位: 330006 南昌大学基础医学院微生物学教研室(李蓉); 江西省医学微生物高技术重点实验室(李文林、石小玉、赵林); 南昌大学第一附属医院烧伤科(曾元临); 南昌市东湖区卫生监督所(徐小文)

### 1.4 PCR 分析供体菌和接合子的耐药基因型

参照文献[1]扩增引物 TEM-1、PER-1、OXA-23、OXA-24 等,由宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR 扩增供体菌、接合子耐药基因,按照试剂盒说明书操作,产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

## 2 结果

### 2.1 供体菌、受体菌和接合子的 MIC<sub>50</sub>

将供体菌对磺胺甲恶唑、Amp、头孢噻吩、头孢博肟、头孢吡肟、亚胺培南/西司他丁和 Amp/舒巴坦的耐药性通过质粒传给受体菌,使得接合子耐药或中度敏感。见表 1。

表 1 抑制供体菌、受体菌和接合子 50% 的菌株生长的最低抗生素浓度 (mg/L)

抗生素种类	鲍氏不动杆菌	大肠埃希菌 ATCC 25922	接合子
哌拉西林	>64 <sup>c</sup>	<8 <sup>b</sup>	<8 <sup>b</sup>
头孢曲松	>32 <sup>c</sup>	<4 <sup>b</sup>	<4 <sup>b</sup>
头孢他啶	>16 <sup>c</sup>	<8 <sup>b</sup>	<8 <sup>b</sup>
头孢吡肟	>16 <sup>c</sup>	<2 <sup>b</sup>	<2 <sup>b</sup>
头孢唑肟	>32 <sup>c</sup>	<4 <sup>b</sup>	<4 <sup>b</sup>
氨曲南	>16 <sup>c</sup>	<8 <sup>b</sup>	<8 <sup>b</sup>
庆大霉素	>8 <sup>c</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>
阿米卡星	>32 <sup>c</sup>	<2 <sup>b</sup>	<2 <sup>b</sup>
妥布霉素	>8 <sup>c</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>
哌拉西林/他巴唑	>64 <sup>c</sup>	<8 <sup>b</sup>	<8 <sup>b</sup>
环丙沙星	>2 <sup>c</sup>	<1 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>
亚胺培南/西司他丁	>8 <sup>c</sup>	<4 <sup>b</sup>	8 <sup>a</sup>
氨苄西林/舒巴坦	>16 <sup>c</sup>	<8 <sup>b</sup>	16 <sup>a</sup>
磺胺甲恶唑	>2 <sup>c</sup>	<2 <sup>b</sup>	>2 <sup>c</sup>
氨苄西林	>16 <sup>c</sup>	<4 <sup>b</sup>	>16 <sup>c</sup>
头孢噻吩	>16 <sup>c</sup>	<8 <sup>b</sup>	>16 <sup>c</sup>
头孢博肟	>1 <sup>c</sup>	<1 <sup>b</sup>	>1 <sup>c</sup>
头孢吡肟	>16 <sup>c</sup>	<4 <sup>b</sup>	>16 <sup>c</sup>

注: a 为中度敏感, b 为敏感, c 为耐药; 鲍氏不动杆菌为供体菌, 大肠埃希菌 ATCC 25922 为受体菌

### 2.2 供体菌和接合子的耐药基因型及传代稳定性

接合子与供体菌带有相同的基因: bla<sub>TEM-1</sub>、bla<sub>PER-1</sub> 和 bla<sub>OXA-23</sub> (图 1), 且在 Amp<sup>-</sup> 和 Amp<sup>+</sup> 麦康凯培养基中能稳定传代。

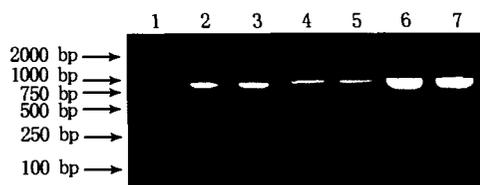


图 1 供体菌鲍氏不动杆菌和接合子的耐药基因分型电泳图谱。 1. DL2000 DNA marker; 2, 4, 6. 供体菌 TEM-1、PER-1 和 OXA-23 引物 PCR 产物; 3, 5, 7. 接合子 TEM-1、PER-1 和 OXA-23 引物 PCR 产物

## 3 讨论

超广谱 β 内酰胺酶 (ESBLs) 最早被报道存在于肺炎克雷伯菌中, 可由质粒介导传递给其他种属, 包括大肠埃希菌和其他肠道杆菌。随着抗生素的大量、广泛使用, 产 ESBLs 菌的种类和数量越来越多, 导致细菌耐药率逐年上升。

在烧伤病房, 产 ESBLs 革兰阴性杆菌定植或感染的危险因素包括住院时间长、血管内插管、长期使用大量抗生素、经历长期护理、严重的烧伤感染和辅助通气等等。鲍氏不动杆菌广泛分布于自然界, 是院内感染中重要且常见的机会致病菌<sup>[2,3]</sup>, 多见于免疫功能低下患者, 可引起菌血症、肺炎、烧伤创面感染、尿路感染、脑膜炎和外伤性感染<sup>[3,4]</sup>。

鲍氏不动杆菌通常为多重耐药株<sup>[5]</sup>, 甚至对碳青霉烯类抗生素耐药<sup>[6]</sup>。接合是不同种属细菌间 DNA 自然传递的最常见方式。Takahashi 等<sup>[7]</sup>证明鲍氏不动杆菌可通过接合, 传递对亚胺培南、头孢他啶、头孢吡肟、Amp 和哌拉西林的耐药性。Joshi 等<sup>[8]</sup>从鲍氏不动杆菌上分离到 66.1 kb 的接合性耐药质粒。本研究结果证明, 鲍氏不动杆菌携带的多重耐药质粒及其所带的产 ESBLs 耐药基因和耐药性可在不同种属间进行传递, 且可稳定传代, 这对预测耐药菌在感染暴发中的作用具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 李蓉, 李文林, 石小玉, 等. 产 ESBLs 鲍曼不动杆菌的耐药特性及其耐药基因分型. 中国抗生素杂志, 2006, 31(4): 219-222.
- [2] 张艳红, 邓诗琳, 刘金伟, 等. 烧伤病房铜绿假单胞菌体外药物敏感性分析. 中华烧伤杂志, 2005, 21(2): 104-106.
- [3] Nemeč A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJ, et al. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 2): 147-153.
- [4] Starakis I, Blikas A, Siagris D, et al. Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter lwoffii*: a case report and review. Cardiol Rev, 2006, 14(1): 45-49.
- [5] Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. Curr Opin Infect Dis, 2005, 18(4): 306-313.
- [6] Hodle AE, Richter KP, Thompson RM. Infection control practices in U. S. burn units. J Burn Care Res, 2006, 27(2): 142-151.
- [7] Takahashi A, Yomoda S, Kobayashi I, et al. Detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in a hospital. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 526-529.
- [8] Joshi SG, Liakle G, Ghole VS, et al. Plasmid-borne extended-spectrum [beta]-lactamase in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. J Med Microbiol, 2003, 52(12): 1125-1127.

(收稿日期: 2007-05-15)

(本文编辑: 莫愚)