

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.24.002

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191025.1035.002.html>(2019-10-25)

主动外排系统 AcrAB 在碳青霉烯耐药大肠埃希菌中表达差异研究*

洪海¹,冯伟²,李燕¹,曲欣¹,孙凤军^{2△}

(1.北京卫戍区丰台第十五离职干部休养所门诊部,北京 100141;

2.陆军军医大学第一附属医院药剂科,重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨主动外排系统 AcrAB 在大肠埃希菌耐碳青霉烯类药物中的作用,为临床抗感染治疗提供理论参考。**方法** 采用琼脂平板倍比稀释法测定抗菌药物对 20 株碳青霉烯耐药大肠埃希菌的最低抑菌浓度(MIC),采用改良 Carb NP 法检测细菌产碳青霉烯酶类型,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测碳青霉烯酶阴性和阳性菌株 *acrAB* 基因表达的差异及亚-MIC 亚胺培南(IMP)对碳青霉烯酶阴性菌株 *acrAB* 基因表达的影响。**结果** 碳青霉烯耐药大肠埃希菌除对阿米卡星敏感率较高外,对其他抗菌药物均有较高的耐药性。产酶实验和 PCR 扩增结果显示,共有 8 株菌携带 NDM-1 基因,3 株携带 IMP-4 基因,1 株携带 KPC-2 基因,此外有 1 株菌产酶而 PCR 扩增阴性。RT-PCR 结果显示,碳青霉烯酶阴性菌株的 *acrAB* 基因表达水平明显高于阳性菌株,且亚-MIC IMP 能明显诱导碳青霉烯酶阴性菌株的 *acrAB* 基因表达($P < 0.05$)。**结论** 主动外排系统 AcrAB 是大肠埃希菌对碳青霉烯类药物耐药的重要影响因素。

[关键词] 大肠埃希菌;碳青霉烯酶;主动外排系统;AcrAB;耐药**[中图分类号]** R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)24-4147-04Study on the differential expression of active efflux system AcrAB in carbapenem-resistant *Escherichia coli**HONG Hai¹, FENG Wei², LI Yan¹, QU Xin¹, SUN Fengjun^{2△}

(1. Outpatient Department, the 15th Retired Cadre Recuperation of Beijing

Weishu District, Beijing 100141, China; 2. Department of Pharmacy, the First Hospital

Affiliated to AMU, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of active efflux system AcrAB in carbapenem-resistant *Escherichia coli*, and provide theoretical references for clinical anti-infective therapy. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterial drugs against 20 carbapenem-resistant *Escherichia coli* was determined by agar plate dilution method. The carbapenemase type was detected by modified Carb NP method. The differences of *acrAB* gene expression in carbapenemase-negative and -positive strains, and the effect of sub-MIC imipenem on *acrAB* gene expression of carbapenemase-negative strains were determined by Real-Time PCR (RT-PCR). **Results** Except for amikacin, carbapenem-resistant *Escherichia coli* had high resistance to other antibiotics tested. The results of carbapenemase screening and PCR amplification showed that eight strains carried the NDM-1 gene, three strains carried the IMP-4 gene, and one strain carried the KPC-2 gene. Moreover, there was one carbapenemase-producing strain which didn't carry resistance genes. The RT-PCR results showed that the expression of *acrAB* gene in carbapenemase-negative strains was higher than that of positive strains. Sub-MIC imipenem could significantly induced *acrAB* gene expression in carbapenemase-negative strains ($P < 0.05$). **Conclusion** The active efflux system AcrAB is an important factor in the resistance of *Escherichia coli* to carbapenems.

[Key words] *Escherichia coli*; carbapenemase; active efflux system; AcrAB; drug resistant

大肠埃希菌是临床最常见的致病菌之一,近年来伴随抗菌药物的广泛使用,其对抗菌药物的敏感性逐年降低,碳青霉烯耐药菌株检出率越来越高^[1]。而目前针对碳青霉烯耐药大肠埃希菌的感染尚无有效的治疗手段,主要采取多种药物联用的方式进行治疗,

但疗效有限,且使治疗的不良反应增加。碳青霉烯耐药大肠埃希菌的主要耐药机制为产碳青霉烯酶,而非产碳青霉烯酶菌株的耐药机制研究较少。因此,明确细菌的耐药机制将为碳青霉烯耐药大肠埃希菌感染治疗中抗菌药物的选用提供理论依据。

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373451)。 作者简介:洪海(1979—),主治医师,本科,主要从事呼吸道感染与防治研究。

△ 通信作者, E-mail: feng_sun@163.com。

AcrAB 是大肠埃希菌最常见的主动外排泵, AcrAB 的高表达与大肠埃希菌多种耐药相关^[2-3], AcrAB 抑制剂羧基氰氯苯胺可显著增加药物敏感性。AcrAB 在碳青霉烯耐药菌株中的作用尚少见报道, 本研究拟收集临床分离碳青霉烯耐药大肠埃希菌, 根据是否产碳青霉烯酶将其分为产酶组和非产酶组, 并用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 *acrAB* 基因表达的差异, 分析 *acrAB* 在大肠埃希菌耐碳青霉烯类抗菌药物中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 20 株碳青霉烯耐药大肠埃希菌来源于陆军军医大学第一附属医院和重庆医科大学附属第一医院, 将其分别命名为 SW1-SW10 和 CY1-CY10。

1.1.2 主要试剂及设备 氨苄西林、头孢他啶、头孢哌酮、亚胺培南 (imipenem, IMP)、美洛培南、氨曲南、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星和阿米卡星 (中国食品药品检定研究所), 他唑巴坦 (大连美仑生物技术有限公司), 哥伦比亚血琼脂平板 (重庆庞通医疗器械有限公司), MH 培养基 (北京陆桥技术股份有限公司), 2×Taq MasterMix (北京康为世纪生物科技有限公司), 细菌 DNA、RNA 提取纯化试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), cDNA 合成试剂盒、2×Realtime PCR Master Mix (上海东洋纺生物科技有限公司), Tris 和琼脂糖 (上海生工生物工程股份有限公司), 多点接种仪 (日本 Sakuma 公司), 超声破碎仪、NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司), PCR 仪、电泳仪和凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 最低抑菌浓度 (MIC) 测定 采用琼脂平板倍比稀释法检测抗菌药物对细菌的 MIC 值。细菌接种于哥伦比亚血琼脂平板, 37 °C 培养过夜。用无菌生理盐水将细菌比浊至 0.5 个麦氏单位。抗菌药物用生理盐水进行倍比稀释, 使其药物终浓度为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 μg/mL。采用多点接种仪将稀释菌液接种在含不同浓度抗菌药物的 MH 琼脂平板上, 37 °C 培养 18~20 h 进行结果判读。

1.2.2 改良 Carba NP 法检测碳青霉烯酶类型 参照文献^[4]方法, 将细菌接种于 3 mL 的 MH 肉汤中, 37 °C、200 r/min 条件下培养 12~18 h。然后 100 倍稀释转接于 3 mL 的 MH 肉汤中, 37 °C、200 r/min 培养至 600 nm 处吸光度值 (A_{600} 值) 为 1.0~1.4。取 1.5 mL 菌液在 4 °C、5 000×g 条件下离心 5 min, 弃上清液, 菌体用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 洗 2 次。菌体沉淀悬于 500 μL 的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 中, 在冰浴条件下超声裂解菌体, 然后在 4 °C 条件下以最大转速离心 5 min。取 50 μL 上清液分别与 50 μL 的底物 I、底物 II、底物 III、底物 IV、底

物 V 混合, 37 °C 下孵育 1~2 h 后根据最后显色结果判断菌株产碳青霉烯酶的类型。

1.2.3 碳青霉烯酶耐药基因检测 采用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA。参照文献^[5]设计合成碳青霉烯酶耐药基因引物序列。PCR 反应体系 (20 μL): 2×Taq MasterMix 10 μL, 正向和反向引物各 0.3 μL, DNA 模板 0.4 μL, 双蒸水 (ddH₂O) 9.0 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 52~56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 次循环; 末次循环后 72 °C 延伸 10 min, 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果, 并将阳性产物送 Invitrogen 公司进行测序。测序结果在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 上进行 Blast 比对。

1.2.4 RT-PCR 检测碳青霉烯酶阴性和阳性菌株 *acrAB* 基因表达的差异 采用细菌 RNA 基因组提取试剂盒分别对碳青霉烯酶阴性和阳性菌株的总 RNA 进行提取纯化, 然后用超微量分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 浓度和纯度进行定量和定性分析。采用 First Strand cDNA Synthesis Kit 将 RNA 反转录为 cDNA, 反转录反应条件: 42 °C 10 min, 30 °C 20 min, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min。反应完毕, cDNA 产物中加入 60 μL RNase Free H₂O, 混匀, -20 °C 保存备用。*acrB* 引物序列: 正向引物 TGA TGG TTG TCG GCG TTA, 反向引物 AGT TCT CAC CAC CCA GCT。RT-PCR 反应体系 (20 μL): 2×Realtime PCR Master Mix 10 μL, 正向和反向引物各 0.3 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。RT-PCR 反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。以 16S rRNA 作为内参基因进行分析。

1.2.5 亚-MIC IMP 对碳青霉烯酶阴性菌株 *acrAB* 基因表达的影响 碳青霉烯酶阴性菌株接种于血琼脂平板上进行过夜培养。挑取细菌单菌落接种于 10 mL LB 肉汤中震荡培养过夜。药物处理组: 取 100 μL 过夜培养物加入 9.9 mL 含 IMP 的 LB 肉汤中, 使其药物终浓度为 1/4 MIC。空白对照组: 100 μL 过夜培养物加入 9.9 mL 的 LB 肉汤中。37 °C、180 r/min 震荡培养过夜后进行 RNA 提取。然后采用 RT-PCR 方法检测亚-MIC IMP 对 *acrB* 基因表达的影响。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 亚-MIC IMP 处理对 *acrAB* 基因表达的影响采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIC 测定结果 碳青霉烯耐药大肠埃希菌对临床常见抗菌药物的耐药性见表 1。细菌对 β-内酰胺类抗菌药物具有较高的耐药性, 而对阿米卡星的敏感率最高。

2.2 碳青霉烯酶检测结果 采用 CarbaNP 法检测 20 株碳青霉烯耐药大肠埃希菌的碳青霉烯酶类型 (图

1),结果显示,有 12 株细菌的 II 孔和 III 孔由红色变成黄色,提示产 B 酶;有 1 株细菌的 II 孔和 IV 孔变色,提示产 A 酶;而有 7 株菌的 I ~ V 孔均没变色,不产酶。

表 1 碳青霉烯耐药大肠埃希菌对临床常见抗菌药物的耐药性 (n=20)

抗菌药物	耐药(n)	中介耐药(n)	敏感(n)	耐药率(%)
氨苄西林	20	0	0	100.00
头孢他啶	19	0	1	95.00
头孢哌酮	18	1	1	90.00
氨曲南	15	1	4	75.00
IMP	20	0	0	100.00
美洛培南	19	0	1	95.00
庆大霉素	14	1	5	70.00
妥布霉素	12	2	6	60.00
阿米卡星	7	3	10	35.00
环丙沙星	15	0	5	75.00
左氧氟沙星	14	1	5	70.00

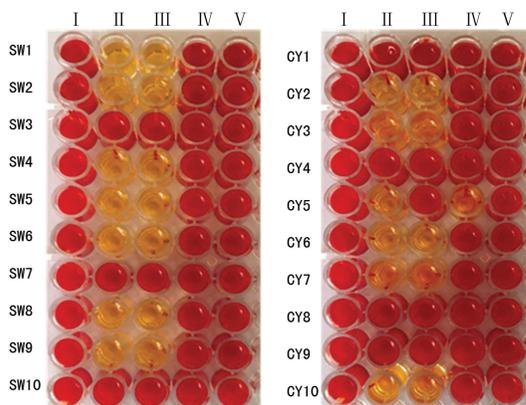


图 1 CarbNP 法检测菌株产碳青霉烯酶类型结果

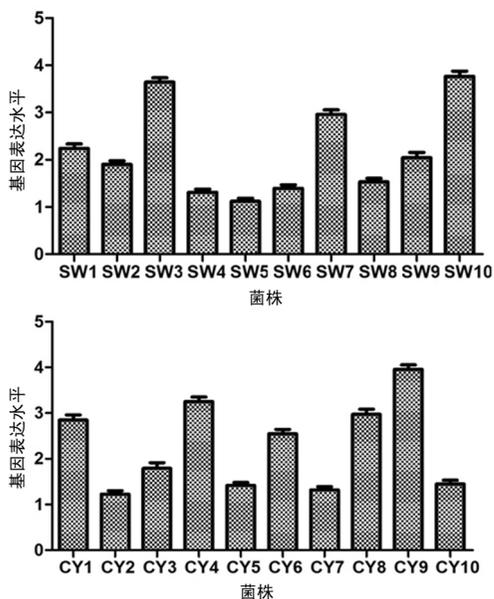
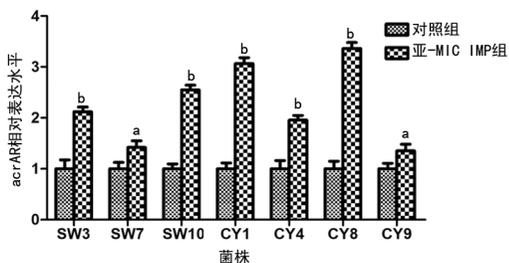


图 2 碳青霉烯耐药大肠埃希菌 acrAB 基因表达结果

2.3 碳青霉烯酶耐药基因扩增结果 PCR 扩增和测序结果显示,8 株菌携带 NDM-1 基因,3 株菌携带 IMP-4 基因,有 1 株携带 KPC-2 基因,其他 8 株菌不携带碳青霉烯酶基因。其中菌株 CY6 产酶实验筛选时为阳性,而 PCR 扩增结果为阴性,即 CarbNP 试验

结果与耐药基因 PCR 检测的相符度为 95%(19/20)。
2.4 acrAB 基因表达差异分析 20 株碳青霉烯耐药大肠埃希菌 acrAB 基因表达结果见图 2。其中,7 株碳青霉烯酶阴性菌株具有较高的 acrAB 基因表达水平,而产碳青霉烯酶菌株 acrAB 基因表达水平相对较低。

2.5 亚-MIC IMP 对碳青霉烯酶阴性菌株 acrAB 基因表达的影响 亚-MIC IMP 对碳青霉烯酶阴性菌株 acrAB 基因表达的影响结果见图 3。1/4 MIC IMP 均能诱导菌株的基因表达(P<0.05)。



a: P<0.05, b: P<0.01, 与对照组比较

图 3 亚-MIC IMP 对碳青霉烯酶阴性大肠埃希菌 acrAB 基因表达的影响

3 讨论

碳青霉烯类抗菌药物具有抗菌谱广、抗菌活性能力强、不良反应少、对超广谱 β-内酰胺酶和头孢菌素酶稳定性好等特点,因此是临床治疗 β-内酰胺类耐药细菌感染的首选药物。随着细菌耐药的增高,导致碳青霉烯类抗菌药物的广泛和不合理使用,使得碳青霉烯类耐药菌逐年增高,给临床治疗带来了较大困难。碳青霉烯酶主要存在于铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌中,在大肠埃希菌中并不多见,但中国细菌耐药监测网(CHINET)数据显示近几年该菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性逐年增加^[6-7]。本研究发现,碳青霉烯耐药大肠埃希菌对临床常用的抗菌药物均表现出较高的耐药性,这与文献报道的碳青霉烯耐药肠杆菌多为泛耐药和多耐药菌株结果一致^[8-9],其原因可能为在抗菌药物压力条件下,细菌通过移动序列和质粒获得更多的耐药基因,耐药基因的共同表达导致了多耐药和泛耐药菌株的出现。

碳青霉烯酶的产生是大肠埃希菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的最主要原因。目前,碳青霉烯酶根据氨基酸序列及分子结构特点可分为 A 类(丝氨酸蛋白酶)、B 类(金属酶)和 D 类[苯唑西林酶(OXA 酶)]^[10]。Carb NP 表型确证试验是 2015 年美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的用于检测肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属细菌产碳青霉烯酶类型的方法。研究表明,该方法对于检测 A 类和 B 类碳青霉烯酶灵敏度和特异度较好(均大于 90%),而对 OXA-48 型碳青霉烯酶具有较低的灵敏度^[11]。PCR 作为耐药基因检测的金标准,本研究通过两种方法检测 20 株碳青霉烯耐药大肠埃希菌的耐药基因,结果显示仅有 7 株不产酶,其中 8 株 NDM 阳性,3 株

IMP 阳性,1 株 KPC 阳性,而有 1 株产酶却 PCR 扩增阴性,可能因存在碳青霉烯酶基因的变异而导致扩增失败。Carba NP 试验结果与耐药基因 PCR 检测的相符度为 95%,因 Carba NP 为表型试验,更为准确,也有利于抗菌药物的选择,作为一种快速、简单、便于大规模检测的方法具有更广阔的应用前景。研究中碳青霉烯耐药菌株其耐药基因阳性率为 60%,主要流行的碳青霉烯酶为 NDM 和 KPC,与国内流行的种类相似^[12],并未发现国外流行的 VIM 和 OXA 酶^[13],该结果说明碳青霉烯酶的分布具有较强的地域差异。NDM 是大肠埃希菌最主要的碳青霉烯酶,在 2009 年才首次发现,远迟于 KPC 和 IMP 等酶的报道^[14]。在本研究中 NDM 是最主要的碳青霉烯酶类型,提示 NDM 具有快速传播的特点,临床应引起高度的重视。

产生 RND 家族外排泵是大肠埃希菌一个重要的耐药机制,此家族包括 AcrAB-TolC、AcrCD-TolC 和 AcrEF-TolC 3 个外排泵,其中 AcrAB-TolC 因具有底物谱广、外排能力强等特点而研究较多^[15]。本研究发现,碳青霉烯酶阴性菌株具有较高的 *acrAB* 基因表达。有研究表明,*acrAB* 高表达与喹诺酮类、头孢他啶和四环素类抗菌药物耐药相关^[16-17]。而碳青霉烯酶阳性菌株的 *acrAB* 基因表达水平较低,可能由于碳青霉烯酶水解 IMP 药物,使药物在细菌体内蓄积的浓度较低,不足以激活 *acrAB* 的表达。此外,碳青霉烯酶主要存在于质粒中,而质粒在抗菌药物压力作用下不断进化,可携带多种抗菌药物的水解酶和钝化酶,在短时间内即可使抗菌药物快速降解,*acrAB* 的作用被弱化。1/4 MIC IMP 对碳青霉烯酶阴性菌株 *acrAB* 基因均具有明显的诱导作用,说明 *acrAB* 高表达在大肠埃希菌耐碳青霉烯类药物中具有一定的作用。然而,*acrAB* 并没有特异性,其高表达对于菌株产生高耐药和泛耐药也同样具有重要的意义。

本研究发现,碳青霉烯耐药菌株对多种抗菌药物均显示出较高的耐药性,提示在抗菌药物压力作用下,细菌耐药性会不断增高,因此临床应根据其药物敏感性选择联合使用抗菌药物。此外,*acrAB* 的高表达是大肠埃希菌耐药的重要因素,是亚-MIC 抗菌药物诱导细菌耐药的机制之一,因此临床治疗耐药菌引起的感染时应加大抗菌药物给药剂量,提高血药浓度,使其尽快达到或超过细菌 MIC 值,这对于增加治疗效果及预防出现更高水平的耐药具有重要意义。

参考文献

- [1] POTTER R F, D'SOUZA A W, DANTAS G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae [J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 29: 30-46.
- [2] SCHUSTER S, VAVRA M, SCHWEIGGER T M, et al. Contribution of AcrAB-TolC to multidrug resistance in an *Escherichia coli* sequence type 131 isolate [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2017, 50(3): 477-481.
- [3] POURNARAS S, KOUMAKI V, SPANAKIS N, et al. Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48(1): 11-18.
- [4] DORTET L, POIREL L, NORDMANN P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(12): 6437-6440.
- [5] CHEN Z, LI H, FENG J, et al. NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes* [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 294.
- [6] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2009, 9(5): 321-329.
- [7] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(6): 685-694.
- [8] TRECARICHI E M, TUMBARELLO M. Therapeutic options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections [J]. *Virulence*, 2017, 8(4): 470-484.
- [9] BHATIA M, LOOMBA P S, MISHRA B, et al. Reduced susceptibility of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to biocides: an emerging threat [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2016, 34(3): 355-358.
- [10] 徐旋, 曲芬. 碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌诊断进展 [J]. *生物工程学报*, 2018, 34(8): 1338-1345.
- [11] 张薇薇, 王辉. 2015 年 CLSI M100-S25 主要更新内容介绍 [J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(4): 229-232.
- [12] LI Y, SUN Q L, SHEN Y, et al. Rapid increase in prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in CRE in a hospital in Henan, China [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(4): e01932-17.
- [13] DAGHER C, SALLOUM T, ALOUSI S, et al. Molecular characterization of Carbapenem resistant *Escherichia coli* recovered from a tertiary hospital in Lebanon [J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203323.
- [14] 史庆丰, 蒋良芝, 李春燕. 碳青霉烯酶的起源与进化及流行和传播 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(9): 1424-1428.
- [15] PUZARI M, CHETIA P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*; a major issue worldwide [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2017, 33(2): 24.
- [16] SHEN J, YANG B, GU Q, et al. The role of AcrAB-TolC efflux pump in mediating fluoroquinolone resistance in naturally occurring *Salmonella* isolates from China [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2017, 14(12): 728-734.
- [17] PAGÈS J M, PESLIER S, KEATING T A, et al. Role of the outer membrane and porins in susceptibility of beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae to ceftazidime-avibactam [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 60(3): 1349-1359.