

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.05.003

· 论 著 ·

不同来源革兰阴性菌 *armA* 基因分布与氨基糖苷类抗生素耐药性龚林^{1,2}, 李娟¹, 袁敏¹, 陈霞¹, 卢金星¹, 梁建生², 罗成旺¹

(1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206; 2 武汉市疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430015)

[摘要] **目的** 调查不同来源的革兰阴性菌中 16S rRNA 甲基化酶 *armA* 的分布及其与耐药性的关系。**方法** 采用常规药敏试验对 953 株不同来源的革兰阴性菌进行分析, 荧光定量 PCR 方法检测 *armA* 基因, 分析 *armA* 基因携带与氨基糖苷类抗生素敏感性之间的关系。**结果** 共收集 846 株临床来源革兰阴性菌和 107 株养殖场来源克雷伯菌属菌株, 其中不动杆菌属对阿米卡星和庆大霉素耐药率分别达到 86.4% (152/176) 和 89.8% (158/176)。不动杆菌属携带 *armA* 基因的比率也最高, 达 66.5%。养殖场来源的 107 株克雷伯菌属菌株对阿米卡星、庆大霉素的耐药率以及 *armA* 基因携带率均比临床来源高, 分别达到 74.8%, 79.4% 和 65.4%。256 株携带 *armA* 基因的菌株对阿米卡星和庆大霉素耐药率分别高达 95.7% 和 98.4%。**结论** 不同种属革兰阴性菌对氨基糖苷类抗生素的敏感性和 *armA* 基因的携带率不同, 但均表现出 *armA* 基因的携带与氨基糖苷类耐药表型具有很高的一致性, 提示在革兰阴性菌中 *armA* 的检测结果可以预测菌株对氨基糖苷类抗生素的敏感情况。

[关键词] 革兰阴性菌; 氨基糖苷类; *armA* 基因; 耐药性; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)05-0380-05

Distribution of *armA* gene and aminoglycoside resistance in gram-negative bacteria from different sources

GONG Lin^{1,2}, LI Juan¹, YUAN Min¹, CHEN Xia¹, LU Jin-xing¹, LIANG Jian-sheng², LUO Cheng-wang¹ (1 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430015, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution of 16S rRNA methylase *armA* and its relationship with drug resistance of gram-negative bacteria from different sources. **Methods** 953 strains of gram-negative bacteria from different sources were analyzed by conventional antimicrobial susceptibility testing, *armA* gene was detected by quantitative fluorescence polymerase chain reaction, relationship between carrying of *armA* gene and aminoglycoside susceptibility was analyzed. **Results** A total of 846 clinical gram-negative bacteria and 107 zoonotic *Klebsiella spp.* strains were collected, resistance rates of *Acinetobacter spp.* to amikacin and gentamicin were 86.4% (152/176) and 89.8% (158/176) respectively. Carrying rate of *armA* gene in *Acinetobacter spp.* was up to 66.5%. Resistance rates of 107 zoonotic *Acinetobacter spp.* strains to amikacin and gentamicin, as well as carrying rate of *armA* gene were all higher than clinical *Klebsiella spp.* strains, which were 74.8%, 79.4%, and 65.4% respectively. Resistance rates of 256 *armA*-carrying strains to amikacin and gentamicin were 95.7% and 98.4% respectively. **Conclusion** Different species of gram-negative bacteria had different aminoglycoside susceptibility and with different carrying rates of *armA* gene, but they all show high consistence between carrying of *armA* gene and aminoglycoside resistance phenotype, which suggest that the detection results of *armA* in gram-negative bacteria can predict the susceptibility of strains to aminoglycosides.

[收稿日期] 2017-08-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81501783); 国家重点基础研究发展计划/973 项目(2015CB554200); 武汉市临床医学科研项目(WG17Q02)

[作者简介] 龚林(1988-), 男(汉族), 湖北省潜江市人, 医师, 主要从事医院感染监控与管理研究。

[通信作者] 罗成旺 E-mail: luochengwang@icdc.cn

[Key words] gram-negative bacteria; aminoglycoside; *armA* gene; drug resistance, microbial

[Chin J Infect Control, 2018, 17(5): 380-384]

近年来,越来越多的菌株产生了对氨基糖苷类抗生素的耐药性,使临床上常用的氨基糖苷类抗生素的临床抗感染效果日益减弱。16S rRNA 甲基化酶的产生是氨基糖苷类抗生素耐药的重要机制,该类酶的产生阻断了氨基糖苷类药物与作用靶点的接合,介导细菌对几乎所有的氨基糖苷类药物高水平耐药^[1]。

编码该酶的基因包括 *npmA*、*armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD*、*rmtE*、*rmtF*、*rmtG* 和 *rmtH*^[2], 其中 *armA* 基因是分布最广泛的 16S rRNA 甲基化酶基因^[3]。它于 2003 年在法国一株肺炎克雷伯菌中被发现^[4], 随后的几年里, 西班牙、日本、保加利亚、韩国、台湾地区等均有报道^[5-10]。且该基因也发现于多种革兰阴性菌中, 包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、黏质沙雷菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌等^[6-10], 在世界各地呈现出散发或暴发的趋势。*armA* 基因由 774 个碱基组成, 其 G + C 含量为 30.4%, 比其他 16s rRNA 甲基化酶基因都低, 并且 *armA* 基因编码的氨基酸与其他 16s rRNA 甲基化酶氨基酸的同源性均低于 30%^[11]。该编码基因通常位于质粒、转座子或 I 类整合子^[11]上, 通过其高度可移动性, 可在菌株间广泛转移和传播。目前, 耐氨基糖苷类抗生素的 *armA* 基因在不同地区的革兰阴性菌中分布相差悬殊^[12-15]。因此, 有必要对其进行流行病学调查, 以阐明 *armA* 在氨基糖苷类抗生素耐药中的作用和地位。本研究对不同来源的革兰阴性菌进行了氨基糖苷类耐药性分析和 *armA* 基因检测, 以了解该基因在本地区的流行特征以及基因型与药敏表型的关系。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集 2011 年 2 月—2014 年 11 月不同来源的革兰阴性菌 953 株, 其中 846 株菌株分离自国内 3 所三甲医院住院患者送检的痰、分泌物、尿、血、脑脊液等非重复标本; 107 株菌株来自于山东某养鸡场和屠宰场的种鸡体表、种鸡内脏、养殖人员体表、屠宰人员体表、屠宰水、屠宰鸡等标本。

1.2 仪器和试剂 荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)、VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃公司)、荧光定量 PCR 反

应试剂(瑞士 Roche 公司)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

1.3 菌株鉴定及药敏试验 所有菌株鉴定及药敏试验采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922, 按美国临床实验室标准化协会(CLSI)2016 年版标准判读药敏试验结果。

1.4 *armA* 基因的检测 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取革兰阴性菌基因组。荧光定量 PCR 的方法检测 *armA* 基因, 引物及探针如下: *armA*-F: 5'-TCAAAAACCTATACTTTATCGTTCGTCTT -3', *armA*-R: 5'-TATTTTAGATTTTGGTTGTTGGCTTCA -3', TaqMan 探针: FAM-AACTTCCCAATAAT-GCTAC-MGB, 扩增片段长度为 162bp^[16]。扩增反应体系参考相关文献^[16]。LightCycler[®]480 荧光定量 PCR 扩增程序如下: (1) 预变性: 95℃ 3 min; (2) 扩增: 95℃ 10 s, 55℃ 20 s, 72℃ 1 s, 40 个循环; (3) 冷却: 40℃ 10 s。

1.5 统计学方法 应用 SAS 9.0 统计软件对所得数据进行分析, 计量资料采用中位数(M)或均数(\bar{x}), 计数资料根据具体情况分析, 采用四格表 χ^2 检验, 配对四格表 χ^2 检验或配对四格表确切概率检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况 本研究共收集 953 株革兰阴性菌, 其中 846 株为临床来源菌株, 107 株为养殖场来源菌株。临床来源菌株种属分布为: 克雷伯菌属 385 株, 不动杆菌属 176 株, 埃希菌属 91 株, 假单胞菌属 66 株, 肠杆菌属 48 株, 沙雷菌属 27 株, 其他种属 53 株; 养殖场来源均为克雷伯菌属菌株。

2.2 对氨基糖苷类药敏结果 除沙雷菌属和不动杆菌属外, 其他菌属对阿米卡星药物敏感性的 MIC₅₀ 均 $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$; 不动杆菌属的耐药率最高, 为 86.4%, 埃希菌属的耐药率最低, 仅为 7.7%。菌株对庆大霉素药物敏感性的 MIC₅₀ 均 $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$; 各菌属对庆大霉素耐药率均在 54% 以上, 其中耐药率最高的为不动杆菌属, 达 89.8%。见表 1。

2.3 *armA* 基因携带情况 本研究收集的菌株 *armA* 阳性率为 26.9% (256/953), 其中 *armA* 阳性

率最高的是不动杆菌属,高达 66.5%;埃希菌属和假单胞菌属 *armA* 阳性率较低,仅为 3.3% 和 3.0%。见表 1。

表 1 不同种属菌株对氨基糖苷类抗生素耐药情况及 *armA* 基因检测结果

Table 1 Aminoglycoside resistance and detection result of *armA* gene of different bacterial species

种属	株数	阿米卡星			庆大霉素			<i>armA</i> 基因阳性	
		MIC ₅₀ (μg/mL)	耐药株数	耐药率 (%)	MIC ₅₀ (μg/mL)	耐药株数	耐药率 (%)	株数	检出率 (%)
肠杆菌属	48	≤8	18	37.5	≥16	30	62.5	13	27.1
埃希菌属	91	≤8	7	7.7	≥16	58	63.7	3	3.3
克雷伯菌属	492	≤8	129	26.2	≥16	271	55.1	105	21.3
沙雷菌属	27	≥64	15	55.6	≥16	15	55.6	14	51.9
假单胞菌属	66	≤8	8	12.1	≥16	36	54.5	2	3.0
不动杆菌属	176	≥64	152	86.4	≥16	158	89.8	117	66.5
其他菌属	53	≤8	18	34.0	≥16	30	56.6	2	3.8

2.4 *armA* 基因携带与药物敏感性的关系 256 株 *armA* 阳性菌株对阿米卡星和庆大霉素耐药率高达 95.7% 和 98.4%,极少数 *armA* 阳性菌株对阿米卡星和庆大霉素敏感,比率分别为 4.3% 和 1.6%; 697 株 *armA* 阴性菌株中仍有部分菌株对阿米卡星和庆大霉素耐药,比率分别为 14.6% 和 49.6%,见表 2。对两表中基因与药物作关联性分析,阿米卡星、庆大霉素关联系数 (*r*) 分别为 0.598、0.408,均 *P* < 0.001,携带 *armA* 基因的菌株与两种氨基糖苷类抗生素的药敏表型均存在关联,且与阿米卡星药敏表型的关联性更强。

2.5 对不同氨基糖苷类药物耐药率的比较 携带 *armA* 基因的革兰阴性菌对庆大霉素与阿米卡星耐药率的差异无统计学意义 (均 *P* > 0.05); 未携带

armA 基因的革兰阴性菌中,临床来源的肠杆菌属、埃希菌属、克雷伯菌属、假单胞菌属和不动杆菌属对庆大霉素的耐药率均高于阿米卡星,差异有统计学意义 (均 *P* < 0.05)。见表 3。

表 2 953 株革兰阴性菌 *armA* 基因携带及其对阿米卡星、庆大霉素的耐药情况 (株)

Table 2 Carrying of *armA* gene, as well as amikacin and gentamicin resistance of 953 gram-negative bacterial strains (No. of isolates)

<i>armA</i> 携带	株数	阿米卡星		庆大霉素	
		耐药	非耐药	耐药	非耐药
阳性	256	245	11	252	4
阴性	697	102	595	346	351
合计	953	347	606	598	355

表 3 不同菌属 *armA* 基因携带及其对氨基糖苷类耐药情况 (株)

Table 3 Carrying of *armA* gene and aminoglycoside resistance of different bacterial strains (No. of isolates)

菌属	<i>armA</i> 基因阳性			χ^2	<i>P</i>	<i>armA</i> 基因阴性			χ^2	<i>P</i>
	株数	阿米卡星耐药	庆大霉素耐药			株数	阿米卡星耐药	庆大霉素耐药		
临床										
肠杆菌属	13	13	13	-	-	35	5	17	-	0.019*
埃希菌属	3	2	3	-	1.000*	88	5	55	46.30	<0.001
克雷伯菌属	35	31	34	-	0.250*	350	18	152	132.03	<0.001
沙雷菌属	14	14	14	-	-	13	1	1	-	-
假单胞菌属	2	2	2	-	-	64	6	34	-	0.026*
不动杆菌属	117	115	115	-	-	59	37	43	-	<0.001*
其他菌属	2	2	2	-	-	51	16	28	-	<0.001*
养殖场										
克雷伯菌属	70	66	69	-	0.250*	37	14	16	-	0.500*
合计	256	245	252	-	0.500*	697	102	346	238.14	<0.001

* :Fisher's 确切概率法

2.6 不同来源克雷伯菌属 *armA* 基因携带与耐药性的比较 养殖场来源克雷伯菌属对阿米卡星、庆大霉素耐药率和 *armA* 基因携带率分别为 74.8%、

79.4% 和 65.4%,均高于临床来源菌株 (χ^2 值分别为 166.59、32.79、158.26,均 *P* < 0.05)。见表 4。

表 4 不同来源克雷伯菌属对氨基糖苷类抗生素耐药及 *armA* 基因检出情况[株(%)]

Table 4 Aminoglycoside resistance and detection results of *armA* gene in *Klebsiella spp.* strains from different sources (No. of isolates[%])

来源	菌株数	阿米卡星 耐药	庆大霉素 耐药	<i>armA</i> 基因 阳性
临床来源	385	49(12.7)	186(48.3)	35(9.1)
养殖场来源	107	80(74.8)	85(79.4)	70(65.4)

3 讨论

氨基糖苷类抗生素是临床抗感染治疗的重要药物。了解细菌对氨基糖苷类抗生素耐药现状及其耐药性发展趋势,将为控制耐药菌的传播提供重要信息^[17]。由于 *armA* 基因在国内外各地区的革兰阴性菌中分布相差悬殊,本研究较大规模的调查了国内部分地区的临床来源和养殖场来源的革兰阴性菌对氨基糖苷类抗生素的药物敏感性和 *armA* 的携带情况,为了解该地区细菌中 *armA* 的分布提供线索,明确该地区 *armA* 在氨基糖苷类抗生素耐药中的作用。但本试验仍存在部分局限性:菌株来源非随机样本,不能完全反映研究地区的氨基糖苷类耐药和基因携带水平。

本研究收集的 953 株革兰阴性菌对阿米卡星和庆大霉素的耐药率分别为 36.4% 和 62.7%,与吴琼等^[18]报道的基本一致。其中不动杆菌属对阿米卡星和庆大霉素的耐药率已分别达到 86.4% 和 89.8%,提示氨基糖苷类抗生素已很难有效地治疗由不动杆菌属引起的感染。其次克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属对氨基糖苷类抗生素的耐药性也日益严重。如果耐药菌的产生和传播不能得到有效控制,将进一步削弱氨基糖苷类抗生素的临床使用价值。

本研究菌株中 *armA* 基因阳性率为 26.9%。潘韵峰等^[19]在国内多个省市各医院调查发现,鲍曼不动杆菌中 *armA* 基因阳性率达 47.7%,本研究的调查结果为 66.5%,提示该基因在鲍曼不动杆菌中存在进一步扩散的可能。此外,*armA* 阳性率在沙雷菌属、肠杆菌属中也高达 51.9% 和 27.1%,提示 *armA* 基因的传播可能已突破菌属界限,实现了种属间的水平传播。

本次研究分析了携带 *armA* 基因菌株的药物敏感性,其对阿米卡星和庆大霉素耐药率高达 95.7%

和 98.4%。由此可见,*armA* 基因的携带与氨基糖苷类抗生素耐药表型具有很高的一致性,此结果也与 *armA* 的耐药机制相吻合:修饰氨基糖苷类抗生素的作用靶点,从而导致细菌几乎对所有氨基糖苷类抗生素高水平耐药。本研究中发现部分菌株虽然耐药,但未检出 *armA* 基因,提示还存在其他氨基糖苷类耐药机制。也有极少数菌株虽然基因检测阳性,但表现为敏感,*armA* 基因是否发生了突变或者是否其转录、表达受到了抑制尚待进一步验证^[20]。养殖场来源克雷伯菌属菌株的 *armA* 基因携带率高于临床来源,提示 *armA* 基因在养殖场来源菌株中的流行度可能更广。相关部门应加强动物养殖中对抗菌药物使用的监管,密切监测动物源菌的耐药情况以及流行趋势,采用各种防治手段进行控制,以减少耐药菌的传播^[20]。

[参考文献]

- [1] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Lancet*, 2003, 362(9399):1888 - 1893.
- [2] 王珊,吕媛,李耘,等. 我国阿米卡星耐药大肠埃希菌 16S rRNA 甲基化酶基因及其水平转移研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(4):283 - 285.
- [3] 潘韵峰,周华,俞云松. 导致高水平氨基糖苷类抗生素耐药的新型 16S rRNA 甲基化酶基因研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(6):699 - 701.
- [4] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(8): 2565 - 2671.
- [5] Yamane K, Wachino J, Doi Y, et al. Global spread of multiple aminoglycoside resistance gene [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(6): 951 - 953.
- [6] Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, et al. Plasmid mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high level resistance to aminoglycosides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 491 - 496.
- [7] Waehino J, Yamane K, Shibayama K, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high level resistance against various aminoglycosides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(1): 178 - 184.
- [8] Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3): 852 - 856.
- [9] Van JJ, Wu JJ, Ko WC, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in

- Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals[J]. J Anitimicrob Chemother, 2004, 54(6): 1007 - 1012.
- [10] González-Zorn B, Teshager T, Casas M, et al. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(6): 954 - 956.
- [11] 韩玲. 革兰阴性菌中 16S rRNA 甲基化酶基因的检测[D]. 大连:大连医科大学,2010.
- [12] 倪舒芳,钱雅芬,孙婷婷,等. 鲍曼不动杆菌临床分离株 16S rRNA 甲基化酶基因研究[J]. 中国抗生素杂志,2011,36(12): 935 - 938.
- [13] Shrestha S, Tada T, Shrestha B, et al. Emergence of aminoglycoside resistance due to *armA* methylase in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Nepal[J]. J Nepal Health Res Counc, 2016, 14(33): 72 - 76.
- [14] 黄和赞,罗来恒,万鸣春,等. 鲍曼不动杆菌耐药性及 *armA* 甲基化酶检测与分析[J]. 中国抗生素杂志,2014,39(3): 234 - 235.
- [15] Piekarska K, Zacharczuk K, Wolkowicz T, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital in Poland[J]. Adv Clin Exp Med, 2016, 25(3): 539 - 544.
- [16] 龚林,袁敏,陈霞,等. 氨基糖苷类药物耐药基因 *armA* 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 疾病监测,2014,29(11): 901 - 904.
- [17] 代敏. PCR 和核酸探针检测猪源沙门氏菌四环素耐药基因 *tetC* 的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(5): 482 - 485.
- [18] 吴琼,韩立中,孙景勇,等. 氨基糖苷类耐药的肠杆菌科细菌 16S rRNA 甲基化酶基因研究[J], 检验医学,2014,29(5): 528 - 534.
- [19] 潘韵峰,周华,俞云松. 16S rRNA 甲基化酶基因在鲍曼不动杆菌中的分布[J]. 中华传染病杂志,2007,25(10): 593 - 596.
- [20] 龚林. 氨基糖苷类耐药基因 *armA* 实时荧光 PCR 检测方法的建立、应用及 NDM-5 阳性大肠埃希菌的特征研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心,2015.

(本文编辑:陈玉华)