·基层园地·

多重耐药鲍曼不动杆菌 *adeABC* 外排泵基因分布及 *adeB* 表达水平与耐药性的相关性研究

顾桂芳，赵姗姗

【摘要】目的　探讨多重耐药鲍曼不动杆菌（MDRAB）中 *adeABC* 外排泵系统基因分布特征及 *adeB* 表达与碳青霉烯类抗生素耐药性的相关性。**方法**　本研究为横断面研究。收集 2022 年 7 月至 2023 年 12 月绍兴市上虞人民医院分离的非重复 MDRAB 菌株 110 株，琼脂稀释法测定所有菌株对亚胺培南、美罗培南的最低抑菌浓度（MIC）。将利血平、羟基氰氯苯腙（CCCP）、MC207110 3 种不同浓度的外排泵抑制剂，分别与亚胺培南、美罗培南联合进行体外药敏试验；若联合抑制剂后 MIC 降低≥4 倍，则判定为外排泵介导耐药表型阳性。提取所有菌株基因组 DNA，根据 GeneBank 公布的 *adeA*、*adeB*、*adeC* 基因及其调控基因 *adeS*、*adeR* 序列设计特异性引物，采用聚合酶链式反应（PCR）明确 *adeABC* 外排泵系统在 MDRAB 中的基因分布特征。以 16S rRNA 作为内参、标准鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 为校准样本，采用实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测 *adeB* 基因表达水平，结合 MIC、外排表型及基因型数据进行统计学关联分析。**结果**　110 株 MDRAB 对亚胺培南、美罗培南的 MIC 范围均为 8 ～ 128 μg/mL，MIC50/MIC90 分别为（32 μg/mL）/（128 μg/mL）、（64 μg/mL）/（128 μg/mL）。40 μg/mL MC207110 的抑制效果最佳，可使 84 株（76.36%）、80 株（72.73%）菌株对亚胺培南、美罗培南的 MIC 降低≥4 倍。*adeB* 基因携带率最高（90.91%），其次为 *adeC* 基因（87.27%）、*adeA* 基因（85.45%）；调控基因 *adeR*、*adeS* 携带率分别为 89.09%、88.18%。基因组合分析显示，同时携带 *adeA/B/C* 基因的菌株有 86 株（78.18%），其中 84 株（97.67%）同时携带 *adeR/S* 基因，是主要基因组合类型。携带 *adeB* 菌株的外排泵表型阳性率显著高于未携带 *adeB* 菌株（$P < 0.05$）；同时携带 *adeA/B/C* 基因菌株的外排表型阳性率亦显著高于其他基因组合类型（$P < 0.05$）。30 株临床菌株 *adeB* 基因相对表达量范围为 1.00 ～ 28.60，外排泵表型阳性 *adeB* 相对表达量显著高于阴性（$P < 0.05$），且 *adeB* 相对表达量与亚胺培南、美罗培南 MIC 均呈正相关（r=0.78、0.76，均 $P < 0.05$）。**结论**　*adeABC* 外排泵系统在 MDRAB 中广泛分布，*adeB* 高表达与碳青霉烯类耐药水平及外排表型密切相关，可能是 MDRAB 多重耐药的关键分子机制之一。

【关键词】　鲍曼不动杆菌；多重耐药；外排泵系统；碳青霉烯类抗生素
DOI:10.3969/j.issn.1671-0800.2026.08.020
【中图分类号】　R378.99　**【文献标志码】**　A　**【文章编号】**　1671-0800(2026)08-0915-04

近年来，多重耐药鲍曼不动杆菌（multidrug-resistant acinetobacter baumannii，MDRAB）的检出率持续升高，尤其对亚胺培南、美罗培南等碳青霉烯类抗生素的耐药现象日益严峻，不仅严重限制临床抗感染治疗的选择，还显著增加患者病死率与医疗负担。AdeABC 外排泵系统作为耐药-结节-分化（resistance-nodulation-division，RND）家族的重要成员，已被证实是介导 MDRAB 对碳青霉烯类、氟喹诺酮类等多种抗菌药物产生交叉耐药的关键机制[1-2]。相关研究表明[3]，*adeB* 表达水平的上调可显著增强细菌对抗生素的主动外排能力，从而导致最低抑菌浓度（minimal inhibitory concentration，MIC）升高。已有研究证实[4-5]，*adeABC* 外排泵基因在临床 MDRAB 分离株中普遍存在，但其基因分布特征及其与碳青霉烯类抗生素耐药表型之间的定量关联仍缺乏系统性研究。基于以上背景，本研究收集 110 株非重复 MDRAB 菌株，通过体外药敏试验、聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）等方法，系统分析 *adeABC* 外排泵系统基因分布特征，评估 *adeB* 表达水平与碳青霉烯类抗生素耐药性的相关性，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株来源　本研究为横断面研究。收集 2022 年 7 月至 2023 年 12 月绍兴市上虞人民医院分离的非重复 MDRAB 菌株 110 株，均经 VITEK 2 Copmact

作者单位： 312300 绍兴，绍兴市上虞人民医院
通信作者： 顾桂芳，Email：qweqaz202404@163.com

全自动微生物鉴定系统鉴定。标准鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 购自美国标准菌库。研究获得绍兴市上虞人民医院医学伦理委员会批准（PJ-2026-研 012-01）。

1.1.2　主要试剂与仪器　亚胺培南、美罗培南标准品购自中国食品药品检定研究院；利血平、羟基氰氯苯腙（carbonyl cyanidem-chlorophenylhydrazone，CCCP）、MC207110 购自美国 Sigma-Aldrich 公司，均用二甲亚砜配置成高浓度储存液，过滤除菌后分装，−20 ℃避光保存；细菌基因组 DNA 提取试剂盒、TRIzolTM Reagent 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。全自动微生物鉴定系统、恒温培养箱、高速冷冻离心机购自杭州华端生物科技有限公司，PCR 仪、实时荧光定量 PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，qRT-PCR）仪购自中山大学达安基因股份有限公司，移液器、酶标仪购自上海科华生物工程股份有限公司。

1.2　方法

1.2.1　体外药物敏感性试验　严格按照 CLSIM100-Ed33 指南操作。采用琼脂稀释法测定所有菌株对亚胺培南和美罗培南的 MIC。将亚胺培南、美罗培南分别加入 Mueller-Hinton（MH）琼脂中，配置成终浓度梯度为 0.25 ～ 128 μg/mL 的系列含药平板。取新鲜培养 18 ～ 24 h 的单菌落，用无菌 0.9%氯化钠注射液调整菌浓度至（1 ～ 2）×10^8 CFU/mL，稀释 100 倍后点种于各含药平板，同时点种不含药的 MH 琼脂平板作为生长对照。37 ℃孵育 24 h 后，判读 MIC（以肉眼无可见菌落生长的最低药物浓度为准）。

1.2.2　外排泵抑制剂表型检测与筛选　选取 3 种常用外排泵抑制剂：利血平、CCCP、MC207110，分别设置不同工作浓度梯度：利血平（0、10 及 20 μg/mL）、CCCP（0、10 及 25 μg/mL）、MC207110（0、20 及 40 μg/mL）。将上述不同浓度的抑制剂分别加入含亚胺培南或美罗培南的 MH 琼脂平板中，同步开展不含抑制剂的平行药敏试验作为对照。结果判定：培养结束后，记录各平板上菌株生长情况，并计算联合抑制剂后菌株 MIC 的变化。将联合抑制剂后菌株 MIC 降低≥4 倍，判定为外排泵介导耐药表型阳性；MIC 降低＜ 4 倍，判定为外排泵介导耐药表型阴性。根据阳性率，筛选最优抑制剂及其有效作用条件。

1.2.3　*adeABC* 及相关调控基因检测　根据 GeneBank 公布的 *adeA*（AY040098）、*adeB*（AY040099）、*adeC*（AY040100）基因及其调控基因 *adeS*（AY040101）、*adeR*（AY040102）序列设计特异性引物（上海生工生物工程股份有限公司合成）。使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 110 株 MDRAB 的基因组 DNA，以 25 μL 体系进行 PCR 扩增：95 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，以标准鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的 PCR 产物作为阳性对照，以无菌去离子水代替模板 DNA 作为阴性对照。若扩增产物出现与预期扩增片段长度一致的特异性条带，则判定该菌株携带相应基因；若无特异性条带，则判定为缺失。统计各基因在 110 株 MDRAB 菌株中的携带率，明确 AdeABC 外排泵系统的基因分布特征。

1.2.4　*adeB* 基因表达水平检测　基于分层抽样策略，从 110 株 MDRAB 中选取涵盖不同亚胺培南、美罗培南 MIC 水平（高、中、低）、外排泵介导耐药表型（阳性、阴性）的代表性菌株进行 *adeB* 表达分析。收集菌株，在新鲜 Mueller-Hinton 肉汤中培养至对数生长期。取适量菌液，离心收集菌体，采用 TRIzol™ Reagent 试剂提取总 RNA，经 DNase I 消化去除基因组 DNA 污染。严格按照逆转录试剂盒说明书，将提取的总 RNA 逆转录为 cDNA。以 16S rRNA 为内参，标准鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 为校准样本，采用 qRT-PCR 检测 *adeB* 表达水平，每个样本设置 3 个技术重复，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各菌株 *adeB* 基因的相对表达量，评估 *adeB* 表达水平与碳青霉类抗生素耐药性之间的关联。

1.3　统计方法　数据采用 SPSS 26.0 软件分析，符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示，采用 *t* 检验；不符合正态分布的计量资料以 M（P_{25}，P_{75}）表示，采用非参数检验。计数资料采用 χ^2 检验。Spearman 相关性分析法评估相关性。P ＜ 0.05 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　亚胺培南、美罗培南的耐药情况　110 株 MDRAB 对亚胺培南、美罗培南的 MIC 范围均为 8 ～ 128 μg/mL，MIC50/MIC90 分别为（32/128）μg/mL 及（64/128）μg/mL。

2.2　外排泵抑制剂体外抑制效果　3 种抑制剂中，40 μg/mL MC207110 的抑制效果最佳，可使 84 株（76.36%）及 80 株（72.73%）菌株对亚胺培南、美罗培南的 MIC 降低≥4 倍，见表 1。

2.3　*adeABC* 及相关调控基因分布特征　*adeABC* 外排泵系统基因广泛存在，其中 *adeB* 基因携带率最高（90.91%），其次为 *adeC* 基因（87.27%）、*AdeA* 基因（85.45%）；调控基因 *adeR*、*adeS* 携带率分别约为 89.09%、88.18%。基因组合分析显示，同时携带 *adeA/B/C* 基因的菌株有 86 株（78.18%），其中 84 株（97.67%）同时携带 *adeR/S* 基因，是主要基因组合类型。携带 *adeB* 菌株的外排泵表型阳性率（81.00%）显著高于未携带 *adeB* 菌株（0.00%）（χ^2=30.72，P < 0.05）；同时携带 *adeA/B/C* 基因菌株的外排表型阳性率（87.21%）亦显著高于其他基因组合类型（Z=25.49，P < 0.05），见表 2。

2.4　*adeB* 表达水平　30 株临床菌株 *adeB* 基因相对表达量范围为 1.00 ～ 28.60，且外排泵表型阳性 *adeB* 相对表达量显著高于外排泵表型阴性（P < 0.05）。药物 MIC 分层分析显示，随着亚胺培南、美罗培南 MIC 的升高，*adeB* 相对表达量呈上升趋势（P < 0.05），见表 3。

2.5　*adeB* 表达水平与耐药表型的相关性　Spearman 相关性分析结果显示，30 株 MDRAB 菌株中 *adeB* 基因相对表达量与亚胺培南 MIC、美罗培南 MIC 均呈正相关（r=0.78、0.76，均 P < 0.05）。

表 1　外排泵抑制剂体外抑制效果

外排泵抑制剂	外排泵抑制剂浓度（μg/mL）	亚胺培南 MIC 降低≥4 倍		美罗培南 MIC 降低≥4 倍	
		株数（株）	阳性率（%）	株数（株）	阳性率（%）
利血平	0	0	0.00	0	0.00
	10	28	25.45	24	21.82
	20	36	32.73	32	29.09
CCCP	0	0	0.00	0	0.00
	10	42	38.18	38	34.55
	25	58	52.73	54	49.09
MC207110	0	0	0.00	0	0.00
	20	66	60.00	62	56.36
	40	84	76.36	80	72.73

注：CCCP 为羟基氰氯苯腙

表 2　*adeABC* 及相关调控基因分布特征

基因	携带菌株数（株）	携带率（%）	外排泵表型阳性菌株数（株）	外排泵表型阳性率（%）
adeA	94	85.45	76	80.85
adeB	100	90.91	81	81.00
adeC	96	87.27	78	81.25
adeR	98	89.09	79	80.61
adeS	97	88.18	78	80.41
adeABC	86	78.18	75	87.21
未携带 *adeB*	10	9.10	0	0.00

注：*adeABC* 组合菌株中，84 株同时携带 *adeR*、*adeS* 基因；外排泵表型阳性判定基于 40 μg/mL MC207110 联合亚胺培南的检测结果

表 3　*adeB* 表达水平

菌株	菌株数（株）	*adeB* 相对表达量	t 值	P 值
外排泵表型阳性	18	12.40±2.80	12.31	< 0.05
外排泵表型阴性	12	2.30±0.45		
亚胺培南低 MIC	8	2.80±0.50	72.19	< 0.05
亚胺培南中 MIC	12	8.60±1.20		
亚胺培南高 MIC	10	12.50±2.60		
美罗培南低 MIC	6	2.10±0.30	75.47	< 0.05
美罗培南中 MIC	10	7.90±1.08		
美罗培南高 MIC	14	11.40±2.05		

注：MIC 为最低抑菌浓度

3　讨论

本研究基于绍兴市上虞人民医院分离的 110 株非重复 MDRAB，系统分析了 *adeABC* 外排泵系统的基因分布特征及核心组分 *adeB* 表达水平与碳青霉烯类抗生素耐药性的关联。结果显示，MDRAB 对亚胺培南、美罗培南的 MIC 均处于较高水平（8 ～ 128 μg/mL），参考 CLSI 2023 年的耐药折点（≥8 μg/mL），表明该地区 MDRAB 分离株可能存在以外排泵为介

导的碳青霉烯类共耐药强化机制。这一现象与国内外多项流行病学调查结果趋势一致，反映出碳青霉烯类药物在该区域针对MDRAB感染的临床疗效已严重受限，凸显当前抗感染治疗的严峻形势。

为进一步探究 *abeB* 表达水平与碳青霉烯类抗生素耐药强度的关系，本研究采用qRT-PCR对30株代表性菌株进行 *adeB* 相对表达量测定。结果显示，*adeB* 相对表达量与亚胺培南、美罗培南的MIC均呈显著正相关。上述结果完整揭示了从基因携带-基因高表达-外排功能活化-耐药水平升高的分子逻辑链条，明确了 *adeB* 表达水平是调控 *adeABC* 外排泵系统功能活性的核心环节。

外排泵抑制剂可通过抑制细菌外排泵功能，减少抗生素被排出菌体外的量，从而恢复细菌对药物的敏感性，其是逆转外排泵介导耐药的有效策略[6]。本研究结果显示，40 μg/mL MC207110 可使超过70%的菌株MIC下降≥4倍，且其对MDRAB中 *adeABC* 外排泵系统具有较强且浓度依赖的抑制活性。亦有研究基于液体微量稀释技术[7]，发现MC207110对MDRAB中 *adeABC* 外排泵系统及生物膜形成君具有强抑制作用。上述结果相互印证，提示MC207110 在不同地域背景下对 MDRAB 中 *adeABC* 外排泵系统具有稳定且可重复的抑制作用。然而，联合MC207110后仍有部分菌株MIC下降＜4倍，这与部分研究中“单一外排泵抑制剂难以完全逆转MDRAB耐药”的结论趋势一致[8]。其潜在机制一方面可能是部分菌株的耐药性主要由靶点突变、产生碳青霉烯酶等其他机制介导，外排泵仅为辅助耐药因素，增敏效应不达阈值[9]；另一方面可能在于该地区部分菌株可能同时携带 *adeDE*、a*deFGH* 等其他类型外排泵基因，MC207110对这些外排泵的抑制作用较弱或缺乏特异性，导致单一抑制剂无法有效逆转整体耐药表型[10]。上述结果表明，MDRAB的耐药网络具有高度冗余性和异质性，单一抑制剂往往难以覆盖所有耐药路径，未来抗耐药干预策略应考虑多靶点联合阻断，如同时应用外排泵抑制剂与β-内酰胺酶抑制剂，以获得更有效的耐药逆转与治疗增效。

综上所述，*adeABC* 外排泵系统在MDRAB中广泛分布，其结构基因 *adeB* 高表达与碳青霉烯类抗生素耐药水平及外排表型密切相关，可能是介导MDRAB多重耐药的关键分子机制之一。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　顾桂芳：酝酿和设计实验，实施研究，采集数据，起草文章，对文章的知识性内容作批评性审阅，统计分析，获取研究经费，指导；赵姗姗：采集数据，分析/解释数据，指导

参 考 文 献

[1] Farshadzadeh Z, Khoshnood S, Akrami S, et al. Relationship between antibiotic resistance and biofilm-forming capacity with RND efflux pumps expression in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates[J]. Arch Microbiol, 2025, 207(7): 153.

[2] Moreno J E, Querol-Audi J, Tejada A M, et al. Effect of meropenem, sulbactam, and colistin combinations on resistance gene expression in multidrug-resistant A. *Baumannii* clinical isolates from *Panama*[J]. Antibiotics (Basel), 2025, 14(10): 999.

[3] 潘蓓珍,刘岩,宿建胜,等.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌生物膜形成与外排泵基因 AdeABC 表达的相关性研究[J].中国抗生素杂志,2024,49(8):898-902.

[4] Luna-De-Alba A, Flores-Trevino S, Camacho-Ortiz A, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and synergy assessment of antimicrobial combinations[J]. Antibiotics (Basel), 2024, 13(11): 1079.

[5] 郭俊妙,袁润奇,邓晓龙,等.多重耐药鲍曼不动杆菌对替加环素不敏感的耐药机制研究[J].中国感染控制杂志,2025,24(1):45-51.

[6] Gupta A, Verma A, Katiyar K. Phytochemical-based drug designing against efflux-pump of ESKAPE pathogen to combat multidrug-resistant: An in silico study[J]. J Biomol Struct Dyn, 2025, 43(18): 10898-10918.

[7] Rühl-Teichner J, Müller D, Stamm I, et al. Inhibitory effect of antimicrobial peptides Bac7(17), PAsmr5-17 and PAβN on bacterial growth and biofilm formation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Microorganisms, 2025, 13(3): 639.

[8] Plasencia-Rebata S, Levy-Blitchtein S, Del Valle-Mendoza J, et al. Effect of phenylalanine-arginine beta-naphthylamide on the values of minimum inhibitory concentration of quinolones and aminoglycosides in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Antibiotics (Basel), 2023, 12(6): 1071.

[9] Brindangnanam P, Ashokkumar K, Kamaraj S, et al. Exploring imidazo [4, 5-*g*] quinoline-4, 9-*Dione* derivatives as *Acinetobacter baumannii* efflux pump inhibitor: An in *silico* approach[J]. J Biomol Struct Dyn, 2025, 43(1): 53-72.

[10] Roson-Calero N, Lucas J, Gomis-Font MA, et al. Cyclic peptide MV6, an aminoglycoside efficacy enhancer against acinetobacter baumannii[J].Antibiotics (Basel),2024,13(12):1147.

收稿日期：2026-03-11

（本文编辑：钟美春）