

• 临床检验研究论著 •

亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究

宋晓萍, 王静静, 孙 滨, 王 建

(山东省青岛市海慈医疗集团检验科 266033)

摘 要:目的 对临床分离亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌耐药性及碳青霉烯酶基因型进行研究,以指导临床合理应用抗生素。方法 用琼脂稀释法检测最低抑菌浓度(MIC),聚合酶链反应(PCR)检测 OXA-23、OXA-24、OXA-58、IMP 和 VIM 碳青霉烯酶基因,并对 PCR 产物进行测序。结果 鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药率为 36.9%,且亚胺培南耐药组菌株对 12 种抗菌药物耐药率与敏感组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);在 24 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中 21 株 PCR 扩增出 OXA-23 基因,2 株扩增出 VIM 基因,检出率分别为 87.5%和 8.3%,OXA-24、OXA-58、IMP 基因均未检出;PCR 产物测序表明与 Genbank 相关基因同源性为 100%。结论 该院亚胺培南耐药鲍不动杆菌耐药现象严重;OXA-23 碳青霉烯酶基因的产生是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药的重要机制之一。

关键词:鲍氏不动杆菌; 基因; 碳青霉烯酶; OXA-23 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1191-02

Analysis of carbapenemase genotypes in Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

Song Xiaoping, Wang Jingjing, Sun Bin, Wang Jian

(Department of Laboratory Medicine, Qingdao Hiser Medical Group, Qingdao, Shandong 266033, China)

Abstract: **Objective** To investigate antibiotic resistance and carbapenemases genotype in Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, so as to guide the rational usage of antibiotics in clinical. **Methods** Agar dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentrations(MIC) of *Acinetobacter baumannii*, polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify OXA-23, OXA-24, OXA-58, VIM and IMP genes, and the positive amplified products were sequenced. **Results** The resistant rate to Imipenem was 36.9%. The resistant rate to 12 kinds of antibiotics in resistant group was significantly higher than in sensitive group ($P<0.05$). In the 24 strains of Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, 21 strains were detected with OXA-23 gene and 2 strains with VIM gene, the detection rates of which were 87.5% and 8.3% respectively. All strains were negative with OXA-24, OXA-58 and IMP genes. The sequenced results were absolutely homology with the corresponding genes in Genbank. **Conclusion** The resistance phenomenon of Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* might be serious, and producing OXA-23 carbapenemase could be one of the important mechanisms of carbapenem-resistance in *Acinetobacter baumannii* in this hospital.

Key words: acinetobacter baumannii; genes; carbapenemases; OXA-23 gene

鲍曼不动杆菌是重要的医院内感染病原菌,在发生于下呼吸道感染医院内感染的革兰阴性病原菌中仅次于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌,居第 3 位^[1]。且鲍曼不动杆菌检出率及耐药率呈逐年上升趋势,尤其是对碳青霉烯类抗生素耐药菌株的出现更给临床抗感染治疗带来极大挑战。本研究旨在对本院鲍曼不动杆菌耐药性及碳青霉烯酶基因型进行研究,为临床防治提供依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

1.1.1 临床菌株 收集 2010 年 1 月至 2011 年 1 月青岛市海慈医疗集团微生物实验室分离的鲍曼不动杆菌 65 株(同一患者无重复菌株)。菌株来源为痰液、血液、尿液、分泌物等。所有菌株均由 VITEK2-compact 微生物鉴定系统 GNI 卡鉴定。

1.1.2 质控菌株 铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 由本实验室保存。

1.2 主要仪器及试剂 VITEK2-compact 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃)、MIT-P 型多点接种仪(日本 Sakuma)、Tanon EPS-100 型电泳仪(北京原平皓生物技术有限公司)、PTC-200 型扩增仪(美国伯乐)、凝胶成像系统(美国 BIO. RAD 公司)等。实验中所用抗菌药物为哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、左氧氟沙星、环丙沙星、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟及头孢哌酮/舒巴坦均购自中国药品生物制品检定所;庆大霉素、

阿米卡星、亚胺培南及美罗培南购自杭州默沙东公司。聚合酶链反应(PCR)试剂盒为 Promega 公司产品,引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 采用琼脂稀释法检测菌株对 12 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),实验方法及结果判断标准参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2008 年版,根据试验结果将临床菌株分为亚胺培南耐药组和敏感组。

1.3.2 碳青霉烯酶基因检测 细菌 DNA 提取采用煮沸法;OXA-23、OXA-24 引物及反应条件参考文献[2],OXA-58 引物及反应条件参考文献[3],IMP、VIM 引物及反应条件参考文献[4];PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果并用凝胶成像系统照相保存结果,引物序列见表 1。

1.3.3 PCR 产物测序 使用上海英骏生物技术有限公司 ABI377 全自动 DNA 测序仪,结果在 Genbank 基因库中比对分析。

1.4 统计学处理 用 WHONET5.4 软件和 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,两组耐药率比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 在 65 株鲍曼不动杆菌中对亚胺培南耐药 24 株,敏感 41 株,耐药率为 36.9%。两组耐药率比较见

表 2。

2.2 碳青霉烯酶基因检测结果 在 24 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中 21 株 PCR 扩增出 OXA-23 基因,2 株扩增出 VIM

基因,检出率分别为 87.5%和 8.3%,OXA-24、OXA-58、IMP 基因均未检出。

表 1 PCR 引物序列

引物	引物序列(5'~3')	片段长度(bp)
OXA-23	R:TCACAACAACATAAAAGCACTGT,F:GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	1 058
OXA-24	R:TTAA ATGATTCCAAGATTTTCTAGC,F:ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	825
OXA-58	R:TAACCTCAAACCTCTAATTC,F:TTATCAAAATCCAATCGGC	934
IMP	R:CTACCGCAGCAGAGTCTTTTG,F:AACCAGTTTGCCTTACCAT	879
VIM	R:TCCGACAGTCAGCGAAAT,F:GCACAACCACCATAGAGCA	548

表 2 两组耐药率比较(%)

药物名称	耐药组 (n=24)	敏感组 (n=41)	χ^2	P
哌拉西林	100.0	80.1	6.115	0.013
哌拉西林/他唑巴坦	90.3	40.6	22.230	0.000
头孢曲松	100.0	76.7	6.918	0.009
头孢他啶	98.8	72.0	5.963	0.015
头孢吡肟	93.3	69.9	4.654	0.031
亚胺培南	100.0	0.0	65.000	0.000
美罗培南	100.0	0.0	65.000	0.000
庆大霉素	98.9	73.2	5.162	0.023
阿米卡星	94.2	70.5	4.662	0.030
环丙沙星	99.0	77.1	4.401	0.036
左氧氟沙星	95.7	72.5	5.962	0.015
头孢哌酮/舒巴坦	58.8	30.2	5.329	0.021

2.3 PCR 产物测序结果 选取 3 个 OXA-23 和 2 个 VIM 阳性扩增产物纯化后进行测序,结果经核酸序列比对(Blast),OXA-23、VIM 基因与 Genbank 相关基因 100%同源。

3 讨 论

据报道鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制主要为产碳青霉烯酶、青霉素结合蛋白改变、膜孔道蛋白缺失、药物主动外排泵的过表达等^[5-7],而最重要的是碳青霉烯酶的产生,碳青霉烯酶是能够水解亚胺培南或美罗培南的一类 β-内酰胺酶,在不动杆菌中主要为 B 类金属 β-内酰胺酶(MBL)和 D 类苯唑西林酶(OXA 类酶)。

本研究结果显示,鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药率为 36.9%(24/65),与 2008 年中国细菌耐药监测网(CHINET)监测结果基本一致^[8]。亚胺培南耐药组除对头孢哌酮/舒巴坦耐药率较低(58.8%)外,对其余 11 种药物耐药率均在 90.0%以上,耐药组对 12 种抗菌药物的耐药率与敏感组比较,差异有统计学意义(P<0.05),表明本院耐亚胺培南鲍不动杆菌对临床常用药物如青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、喹诺酮类几乎都耐药,只有 β-内酰胺类酶抑制剂头孢哌酮/舒巴坦敏感率较高,与周东升等^[9]报道基本一致。在 24 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中 21 株 PCR 扩增出 OXA-23 基因,检出率较高(87.5%),未检出 OXA-24、OXA-58 基因,说明 OXA-23 碳青

霉烯酶基因是本院耐碳青霉烯类药物鲍曼不动杆菌的主要耐药机制,与文献报道基本相符^[10]。本研究有 2 株菌扩增出了 VIM 基因,而未检出 IMP 基因。VIM 基因属于 B 类 MBL,因其 β-内酰胺酶活性位点有锌离子参与,故称为金属酶,目前在国内外不动杆菌中已发现主要有 IMP、VIM 型 MBL。由于 MBL 具有广泛水解包括碳青霉烯类在内的 β-内酰胺类药物的能力,对常用 β-内酰胺酶抑制剂如他唑巴坦、克拉维酸、舒巴坦敏感性也极差,且其产酶基因大多由整合子、质粒或转座子等可移动元件介导,易于传播,所以 MBL 的出现令临床治疗更加陷入了困境。

参考文献:

[1] 杜蓉,冯萍,陈慧莉,等. 鲍曼不动杆菌临床分离株耐药性与 OXA-碳青霉烯酶基因型研究[J]. 四川大学学报:医学版,2009,40(2): 272-274.

[2] Byung Chan J,Seok HJ,Il KB,et al. Invest gat ion of anosocomi al outbreak of impenemresistant Acine tobact erbaumanni producing the OXA-23 β-lactamase in Korea[J]. J ClinMicrobiol,2005, 43 (5):2241-2245.

[3] Valenzuela JK,Thomas L,Partridge SR,et al. Horizontal gene-transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant acineto-bacterbaumanni[J]. Clini Microbiol,2007,45(2):453-460.

[4] 侯盼飞,应春妹,汪雅萍,等. 耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌产 β-内酰胺酶研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(4):285-289.

[5] 应春妹,翁文浩. 鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展[J]. 检验医学,2007,22(2):208-209.

[6] 张晓梅,王苏建,宋静玉,等. 多药耐药鲍曼不动杆菌抗菌剂外排泵基因研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(16):1811-1813.

[7] 汪丽,王峰,王卫华,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌的分子流行病学及耐药机制研究[J]. 中华微生物学与免疫学杂志,2011,31(4): 343-344.

[8] 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):321-330.

[9] 周东升,潘晓龙,王传发. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶基因型研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):631-633.

[10] 金红,曹银光,金苑,等. 鲍曼不动杆菌耐药性及 β-内酰胺酶基因型动态变化研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):1016-1018.