

• 基础实验研究论著 •

多重耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究

吴春阳, 钱雪峰, 顾国浩[△]

(苏州大学附属第一医院检验科, 江苏苏州 215000)

摘要:目的 研究多重耐药鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药性及其携带的碳青霉烯酶基因型。方法 琼脂二倍稀释法测定亚胺培南对多重耐药鲍曼不动杆菌的 MIC; PCR 检测与碳青霉烯类抗菌素耐药相关的基因, 并分析与耐药程度的相关性。结果 76 株多重耐药鲍曼不动杆菌有 65 株对亚胺培南耐药, 65 株亚胺培南耐药株 OXA-23、OXA-51 和 OXA-58 阳性率分别为 96.9%、98.5%、1.5%。结论 本院多重耐药鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药严重, OXA-23 和 OXA-51 是主要的碳青霉烯酶基因型。

关键词: 不动杆菌属; 亚胺培南; 基因型; 抗药性; 微生物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.13.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)13-1638-02

Carbapenemase genotype among multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*

Wu Chunyang, Qian Xuefeng, Gu Guohao[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Jiangsu, Suzhou 215000, China)

Abstract: Objective To study the imipenem resistance and carbapenemase genotype of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Methods** The MIC of imipenem was determined by 2-fold agar dilution method followed by NCCLS recommendations. The genes associated with carbapenemase were amplified by PCR. **Results** There were 65 strains resistant to imipenem among 76 multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. The positive rate of OXA-23, OXA-51 and OXA-58 in 65 imipenem-resistant *Abaumannii* were 96.9%, 98.5% and 1.5%. **Conclusion** The multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* have a high resistant rate to imipenem and OXA-23 and OXA-51 type carbapenemase are the major carbapenemase that contributes to the nosocomial infection of *Acinetobacter baumannii*.

Key words: acinetobacter; imipenem; genotype; drug resistance; microbial

碳青霉烯类抗菌素的抗菌谱比较广, 包括革兰阳性菌、革兰阴性菌和厌氧菌, 常用来治疗严重感染^[1]。鲍曼不动杆菌是常见的引起院内感染的非发酵菌; 极易形成对常用抗菌素的耐药性^[2], 多耐药情况比较严重, 这就使得碳青霉烯类药物的使用越来越广泛。但是近几年, 耐亚胺培南的鲍曼不动杆菌分离株亦越来越多; 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌素的耐药机制十分复杂, 通常各种酶解或非酶解机制共同作用, 而不是某一机制单独作用, 其中最重要的机制是产生碳青霉烯酶^[3]。研究表明, 鲍曼不动杆菌 OXA 酶基因的表达产物能够水解碳青霉烯类抗菌素^[4]。本次试验选取 4 个最具代表性的 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58 型碳青霉烯酶为研究对象, 观察它们在本组标本中的分布, 同时分析其和鲍曼不动杆菌耐药的关系。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 收集苏州大学附属第一医院检验科 2012 年 3 月至 2012 年 6 月临床分离的多重耐药的鲍曼不动杆菌 76 株 (剔除同一病人同部位的重复标本), 其中痰标本 53 株, 其他无菌部位及体液标本 23 株。均经法国 Bio-Merieux 公司 VITEK II Compact 重新鉴定, 接种于 Microbank 中 -30 °C 保存。质控菌株: 铜绿假单胞菌 ATCC27853, 大肠埃希菌 ATCC25922。

1.1.2 试剂 药敏纸片 (OXOID); 亚胺培南 (默沙东); Microbank (PRO-LAB); 2× Taq PCR MasterMix (Tiangen); PCR 引物由上海闪晶公司合成; DNA Ladder (Tiangen)。

1.1.3 仪器 VITEKII 微生物鉴定 (法国 Bio-Merieux 公司); Sakuma MIT-P 细菌多点接种仪 (日本 Sakuma 株式会社); Gene Amp PCR System 9700 扩增仪 (美国 ABI 公司); Bio-Rad 凝胶图像分析仪, 生物安全柜。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 琼脂二倍稀释法测定 MIC 的操作规程^[5];

质控菌株: 铜绿假单胞菌 ATCC27853, 大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2.2 PCR 扩增目的基因 煮沸法制备 DNA 模板, PCR 反应体系及条件如下: 2× Taq PCR MasterMix 17 μL, 上、下游引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 共 20 μL, 稍离心混匀。94 °C 预变性 5 min, 循环参数为: 94 °C 变性 3 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 30 次循环, 72 °C 延伸 10 min; 以铜绿假单胞菌 ATCC27853 为阴性对照, 同时设空白对照。2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因	序列 (5'~3')	目的基因长度
blaOXA-24F	ACACCCATTCCCATCCA	300 bp
blaOXA-24R	GGCATTGTGTCAGCAGTTCCAG	
blaOXA-23F	TGAAACCCCGAGTCAGATTG	251 bp
blaOXA-23R	ATGACCTTTTCTCGCCCTTC	
VIM-1F	CGCAGCACCAGGATAGAAGA	337 bp
VIM-1R	CTACCCGTCCAATGGTCTCA	
ImpF	TCTCCGCAACTGTTCTTCG	322 bp
ImpR	CAAAAAGAGGCCACCAGGACA	
OXA51F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353 bp
OXA51R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
OXA-58F	ATTTAAGTGGGATGGAAGCC	337 bp
OXA-58R	ACGATTCTCCCTCTGCG	

2 结果

2.1 药敏试验结果 以亚胺培南的 MIC ≥ 16 μg/mL 为耐药的判断标准。本组多重耐药鲍曼不动杆菌 (76 株) 对亚胺培南耐药 (65 株) 情况严重, 耐药率 85.5%。MIC 为 16 μg/mL、32 μg/mL、64 μg/mL 分别有 23、23、17 株, 有 2 株菌为高耐药

作者简介: 吴春阳, 女, 检验师, 主要从事微生物及分子生物学研究。

[△] 通讯作者, E-mail: GuGuoHao@yahoo.com.cn.

(MIC \geq 128 μ g/mL)。11 株非耐药菌仅两株对亚胺培南敏感,其余均为中介。

2.2 PCR 扩增结果 PCR 反应后用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,凝胶置紫外灯下观察结果,并经凝胶成像系统扫描成像,产物经琼脂糖凝胶电泳出现与目的基因相对分子质量相当的条带为阳性,铜绿假单胞菌 ATCC27853 为阴性对照。部分电泳结果见图 1,PCR 结果见表 2。本组标本 OXA-24、VIM、Imp 基因均未检出,OXA-58 基因仅在 2 株标本检出。

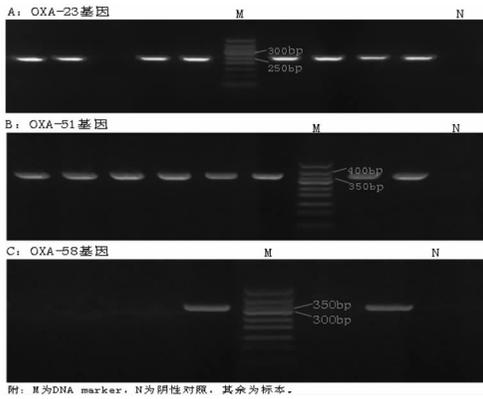


图 1 电泳结果

表 2 PCR 结果

基因	亚胺培南耐药组 (n1=65 株)		亚胺培南非耐药组 (n2=11 株)	
	阳性率(%)	阳性数(n)	阳性率(%)	阳性数(n)
OXA-23	96.9	63	45.5	5
OXA-51	98.5	64	63.6	7
OXA-58	1.5	1	9.1	1

从 MIC 和 PCR 结果来看:OXA-23 阴性的标本有 8 株,其 MIC 结果为 2 株 16 μ g/mL,2 株 8 μ g/mL,4 株敏感。OXA-51 阴性的标本有 5 株,仅 1 株为 16 μ g/mL,其余敏感。OXA-58 基因阳性仅 2 株,1 株耐药,1 株中介。

3 讨论

鲍曼不动杆菌是引起医院感染的重要病原菌,其分离率位居我国临床常见革兰阴性杆菌第 3 位,仅次于大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌^[6]。由于鲍曼不动杆菌抵抗力强,易形成耐药,临床上亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌(IMRABs)分离株越来越多。IMRABs 对碳青霉烯耐药涉及的分子机制中以产碳青霉烯酶尤为重要。不动杆菌产碳青霉烯酶主要是 Ambler 分类中的 B 类和 D 类:B 类酶(金属酶)包括 VIM 和 IMP 两大家族,它们需要锌离子介导接触反应的活性,对碳青霉烯类抗菌素的水解活性较强,目前在鲍曼不动杆菌中发现的金属酶有 IMP-2、IMP-4、IMP-5、VIM-1、VIM-2;D 类型酶(OXA 型酶)在不动杆菌中共发现 20 余种,分为 4 组,第一组由 OXA-23、OXA-27 和 OXA-49 组成,它们相互区别在于 2~5 个氨基酸的改变;第二组由 OXA-24、OXA-25、OXA-26、OXA-40 和 OXA-72 组成,它们之间有 1~5 个氨基酸的差别;第三组由 OXA-51、OXA-64、OXA-66、OXA-68、OXA-69、OXA-70、OXA-71、OXA-75、OXA-76、OXA-77、OXA-78 组成,存在 1~15 个氨基酸的变异;第 4 组只有一个 OXA-58。OXA 酶具有独特的结构,几乎对所有 β -内酰胺类抗菌素高度耐药,能降低鲍曼不动杆菌外膜蛋白的表达^[7]。OXA 酶的分布很广,世界各地均有报道^[8]。OXA-23 是鲍曼不动杆菌中最早被报道的 OXA 型碳青霉烯酶,自 1993 年被发现后世界各地陆续出现携带 blaOXA-23 的鲍曼不动杆

菌导致医院感染的报道^[9-10]。国内 2006 年文献^[11]报道,耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌 80% 产 OXA-23 型碳青霉烯酶。

本组多重耐药鲍曼不动杆菌标本对亚胺培南的耐药比较严重,耐药率达 85.5%,有 2 株为高度耐药(MIC \geq 128 μ g/mL);该菌感染经验治疗选用抗菌药物已十分困难,应加强耐药监测,尽量根据药敏结果选用敏感药物进行治疗^[12]。OXA-23 的阳性率为 89.5%,对亚胺培南耐药的 65 株菌中仅 2 株未检出 OXA-23,;OXA-51 阳性率为 93.4%,对亚胺培南耐药的 65 株菌仅 1 株未检出 OXA-51;OXA-58 基因阳性率为 2.6%;OXA-24、VIM、Imp 均未检出;故认为 OXA-23 和 OXA-51 型碳青霉烯酶为本组标本亚胺培南耐药的主要原因,也是本院主要的碳青霉烯酶类型。

本次试验运用分子生物学技术检测 OXA 基因,也可用于临床耐药细菌的基因型筛选,对耐药基因予以监测并及时反馈临床,可有效减少高耐、多重耐抗菌素的细菌产生。此外,应开展耐药基因的联合检测,避免过度使用抗菌素。当然我们对临床耐药细菌的基因型研究不应只考虑一种基因的单纯作用,同时还考虑是否有两种或者两种以上的基因协同作用,甚至更为复杂的机制。

综上所述,OXA-23 和 OXA-51 是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌素耐药的重要原因之一,还有可能联合其他的耐药机制,如外排泵、外膜蛋白或其他,有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Nicolau D. Carbapenems: a potent class of antibiotics[J]. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9(1): 23-37.
- [2] Livermore D and Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. [J] Trends Microbiol, 2006, 14: 413-419.
- [3] Queenan A and Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20: 440-458.
- [4] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(3): 373-383.
- [5] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 北京: 卫生部, 2006.
- [6] 朱德妹, 汪复, 胡付品, 等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(5): 321-329.
- [7] Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant Acinetobacter baumannii strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high level carbapenem resistance in A. baumannii is not due solely to the presence of β -lactamases[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3299-3305.
- [8] Higgins P, Dammhayn C, Hackel M, et al. Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65: 233-238.
- [9] Byung-Chan J, Seok HJ, Il KB, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 β -lactamase in Korea[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2241-2245.
- [10] Boo TW, Walsh F, Crowley B, et al. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of Acinetobacter species in the Irish Republic[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(5): 1101-1102.
- [11] 李蓉, 李文林, 石小玉, 等. 产 ESBLs 鲍曼不动杆菌的耐药特性、质粒谱及耐药基因型[J]. 中国抗菌素杂志, 2006, 31(4): 202.
- [12] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(2): 76-85.