

• 基础实验研究论著 •

耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌相关耐药基因研究^{*}

王丽娟, 李 巍, 季 萍[△]

(新疆医科大学第一附属医院检验科, 新疆乌鲁木齐 830054)

摘 要:目的 探讨临床分离的对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌耐药性和相关的耐药基因。方法 收集 42 株对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌。采用纸片扩散法测定亚胺培南耐药菌株对 18 种抗菌药物的敏感性, 采用 PCR 扩增碳青霉烯酶基因, 超广谱 β -内酰胺酶基因以及氨基糖苷类酶基因。结果 42 株对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌对阿米卡星耐药率最低(28.5%); 42 株对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌有 33 株携带 OXA-23 组基因, aac(3)-I 21 株, aac(3)-II 1 株, aac(6')-I b15 株, ant(3'')-I 20 株, ant(2'')-I 38 株, PER15 株, TEM124 株, 未检测到其他耐药基因。结论 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药现象非常严重, OXA-23 型是最主要的碳青霉烯酶, TEM、PER 是最主要的 β -内酰胺酶, aac(3)-I、aac(3)-II a、aac(6')-I b、ant(3'')-I、ant(2'')-I 是最主要的氨基糖苷类酶。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 耐药性; 碳青霉烯酶; β -内酰胺酶; 氨基糖苷类酶

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)22-2945-02

Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* associated resistance genes analysis^{*}

Wang Lijuan, Li Wei, Ji Ping[△]

(Department of Medical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To identify the antibiotic resistance and the carbapenemases genotypes of imipenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Methods 42 imipenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* were isolated. The drug susceptibility of imipenem-resistant strains to 18 antimicrobial agents were determined by K-B method. The genotypes of carbapenemases were determined by PCR. Results The resistant rates of 42 isolates of *Acinetobacter baumannii* to amikacin were the lowest(28.5%). 33 isolates were positive for OXA-23 gene. Conclusion The phenomenon of resistance in imipenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* is serious. OXA-23-like genes are the most popular carbapenemases coding genes. TEM and PER are the most popular β -lactamases. The enzymes of aac(3)-I, aac(3)-II a, aac(6')-I b, ant(3'')-I, and ant(2'')-I are the most popular aminoglycosides modifying enzymes.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; resistance; carbapenemases lactamase; β -lactamases; aminoglycosides modifying enzyme

鲍曼不动杆菌(Ab)是引起医院感染的一种重要的条件致病菌。目前大多数鲍曼不动杆菌为多重耐药菌株, 同时对 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药, 甚至出现了耐碳青霉烯类耐药, 且不断增加, 给临床治疗带来极大困难^[1-2]。本研究收集了对碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌, 分析其耐药性、碳青霉烯酶基因型, 同时检测超广谱 β -内酰胺酶以及氨基糖苷类酶, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 42 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌均分离自 2013 年 1~6 月间新疆医科大学第一附属医院住院患者临床标本。

1.2 仪器与试剂 Vitek-II 全自动微生物分析仪(生物梅里埃公司)、PCR 仪(Bio-RAD 公司)、DYY-6D 电泳仪(北京市六一仪器厂)、凝胶成像分析系统(Bio-RAD 公司)。抗菌药物及药敏纸片: 氨苄西林、哌拉西林、头孢吡肟、头孢替坦、头孢曲松、头孢唑林、头孢他啶、环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、庆大霉素、呋喃妥因、氨基曲南、复方磺胺甲噁唑、替考西林/棒酸、哌拉西林/他唑巴坦、氨苄西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦, 以上药敏纸片均来自英国 Oxoid 公司。引物合成由上海生工公

司完成, PCR 产物测序由博迈德生物公司完成。2×PCRTaq Mix 购于东盛生物公司, DNA 标志物(DNAMarkerIV)购于博迈德生物公司。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感试验 用琼脂纸片扩散法(K-B 法)依据美国临床实验室标准化委员会(CLSI) 2013 年标准判断。质控菌株为大肠杆菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自卫生部临床检验中心。

1.3.2 DNA 模板的提取 用煮沸法制备 DNA 模板, 将在 M-H 平板上培养过夜的细菌菌落混悬于 2 mL 的 8.5 g/L NaCl 中, 使成 5 个麦氏单位, 13 000 r/min 离心 2 min, 并置干式恒温器煮 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液保存于 -20℃ 备用。

1.3.3 PCR 扩增耐药基因 碳青霉烯酶基因包括 OXA-23、OXA-24、OXA-58、IMP、VIM, 超广谱 β -内酰胺酶基因包括 TEM、PER、SHV 以及氨基糖苷类酶包括 aac(3)-I、aac(3)-II、aac(6'')-I ad、aac(6'')-I b、aac(6'')-II、ant(3'')-I、ant(2'')-I, 各种靶基因引物序列和目的产物长度见表 1。PCR 扩增反应体系共 25 μ L: 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μ L, 上

^{*} 基金项目: 乌鲁木齐市科学技术计划项目(Y111310024)。 作者简介: 王丽娟, 女, 检验师, 主要从事细菌耐药基因研究。 [△] 通讯作者, E-mail: 592565508@qq.com。

下游引物(10 pmol/L)各 1 μL,模板 2 μL,dsH₂O 8.5 μL。基因扩增的循环参数为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,循环 35 次;最后 72 ℃ 延伸 10 min。1. 2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。

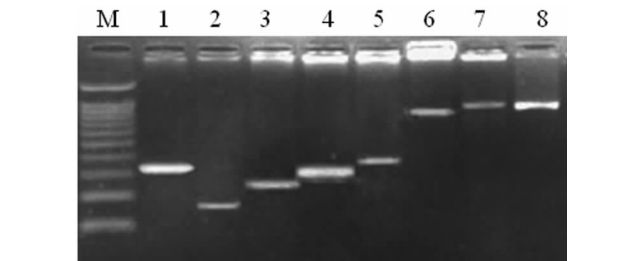
表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'~3')	长度(bp)
OXA-23	P1 GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCGT,P2 TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG T	1 058
OXA-24	P1 ATG AAA AAA TTT ATA CTT CCT ATA TTC AGC,P2 TTA AAT GAT TCC AAG ATT TTC TAG C	825
OXA-58	P1 AAA ACC CAC ATA CCA ACC,P2 ACG CAT TTA GAC CGA GCA	505
IMP	P1 CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG,P2 AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	587
VIM	P1 ATT GGT CTA TTT GAC CGC GTC,P2 TGC TAC TCA ACG ACT GAG CG	780
aac(3)-I	P1 ACC TAC TCC CAA CAT CAG CC,P2 ATA TAG ATC TCA CTA CGC GC	169
aac(3)-II	P1 ACT GTG ATG GGA TAC GCG TC,P2 CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA	237
aac(6')-Iad	P1 ATG ATT AGA AAA GCA ACT GTC CAA G,P2 TTA AAG TTG CTT TGT AAA ACA AAT C	435
aac(6')-Ib	P1 TAT GAG TGG CTA AAT CGA,P2 CCC GCT TTC TCG TAG CA	394
aac(6')-II	P1 TTC ATG TCC GCG AGC ACC CC,P2 GAC TCT TCC GCC ATC GCT CT	178
ant(3'')-I	P1 TGA TTT GCT GGT TAC GGT GAC,P2 CGC TAT GTT CTC TTG CTT TTG	284
ant(2'')-I	P1 GAG CGA AAT CTG CCG CTC TGG,P2 CTG TTA CAA CGG ACT GGC CGC	320
PER-1	P1 ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC,P2 AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA	967
TEM-1	P1 ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA,P2 GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATC A	1056
SHV	P1 GGT TAT GCG TTA TAT TCG CC,P2 GGT TAG CGT TGC CAG TGC TC	650

2 结 果

2.1 药敏结果 氨苄西林、头孢吡肟、头孢曲松、头孢呋辛、呋喃妥因五种药物耐药率达到 100. 0%,哌拉西林耐药率 85. 7%,头孢替坦耐药率 96. 4%,头孢他啶耐药率 53. 6%,环丙沙星耐药率达到89. 3%,左氧氟沙星耐药率 53. 6%,阿米卡星耐药率 28. 5%,庆大霉素耐药率 53. 6%,氨曲南耐药率 89. 3%,氨曲南耐药率89. 3%,复方磺胺甲噁唑耐药率 89. 3%,替考西林/棒酸耐药率 89. 3%,哌拉西林/他唑巴坦耐药率92. 9%,氨苄西林/舒巴坦耐药率 82. 2%,头孢哌酮/舒巴坦耐药率39. 3%。

2.2 相关耐药基因 PCR 扩增结果 OXA-23 基因 33 株阳性,阳性率 78. 6%;PER-1 基因 5 株阳性,阳性率 11. 9%;TEM 基因 24 株阳性,阳性率 57. 1%;aac(3)- II 基因 1 株阳性,阳性率 2. 4%;aac(6?) - I b 基因 15 株阳性,阳性率35. 7%;ant(3'') - I 基因 20 株阳性,阳性率 47. 6%;aac(3)- I 基因 21 株阳性,阳性率 50. 0%;ant(2'') - I 基因 38 株阳性,阳性率 90. 5%;其他耐药基因均阴性。见图 1。



M: DNA 标志物, 从下至上依次为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500 bp;1:ant(2'')- I ;2:aac(3)- I ;3:aac(3)- II ;4:ant(3'')- I ;5:aac(6')- I b;6:PER-1;7:TEM;8:OXA-23。

图 1 PCR 扩增产物电泳图

3 讨 论

鲍曼不动杆菌对碳青霉烯抗菌药物耐药涉及的分子机制有多个方面,如产生灭活酶、抗菌药物作用靶位点的改变、细菌外膜孔道蛋白的缺失、突变而导致膜通透性降低、细菌对药物的主动外排^[3]等,其中以产碳青霉烯酶最为重要^[4]。鲍曼不动杆菌所产生的该类酶分为 B 和 D 两大类^[4],B 类酶主要是指金属酶,包括 IMP 类以及 VIM 类。D 类酶在鲍曼不动杆菌中报道的主要是 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58 四组^[5]。本研究显示 33 株 OXA-23 基因阳性,未检出 OXA-24、OXA-58、IMP、VIM 基因,说明 OXA-23 酶是介导鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药最主要的碳青霉烯酶基因,与文献报道基本相符^[6]。

耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的耐药性普遍较高,本研究除阿米卡星耐药率为 28. 5%外,对临床常用的 18 种药物耐药率高达 39. 9%~100%,值得注意的是检出 OXA-23 型基因的 33 株 Ab,均属 PDRA 株,表明亚胺培南耐药与泛耐药有密切关系。

细菌对 β-内酰胺类抗菌药物耐药主要是产生 BLA,作用机制为使酰胺键断裂从而水解 β-内酰胺环。在土耳其^[7]、广州^[8]有产 PER-1 型超广谱 β-内酰胺酶菌株报道的,本院耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌中有 5 株 PER-1 阳性占 11. 9%,有 24 株 TEM-1 阳性占 57. 1%,检出率低于头孢类抗菌药物的耐药率,由于超广谱 β-内酰胺酶种类很多,因此有存在其他耐药基因的可能。

细菌对氨基糖苷类药物耐药的机制十分复杂,包括产生 AME,膜通透性改变,主动外排,核糖体位点改变等,但主要机制是产生多种修饰酶。一种氨基糖苷药物能被一种或多种酶修饰,而不同的氨基糖苷药物可被同一种酶所修饰,因此在不同的氨基糖苷药物之间可存在不完全的交叉耐药性^[9]。本研究从 42 株 Ab 中有 38 株(90. 5%)AME 基因阳性,共涉 ant(2'')- I 、aac(3)- I 、aac(3)- II 、ant(3'')- I 、(下转第 2948 页)

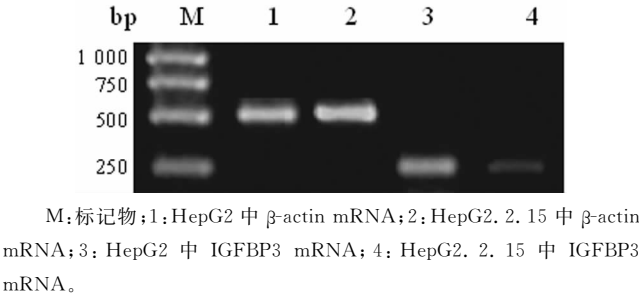


图 1 RT-PCR 检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞 IGFBP3 mRNA

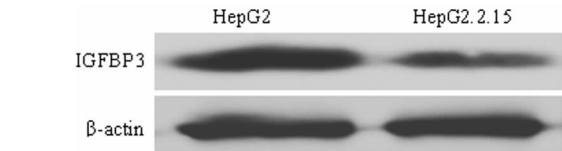


图 2 免疫印迹检测 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞 IGFBP3 蛋白表达

2.2 乙肝患者 IGFBP3 血清学水平降低 采用 ELISA 检测了乙肝患者和对照组的 IGFBP3 的血清学水平,结果表明,IGFBP3 在乙肝患者[(1 255.7±564.5) ng/mL]显著低于健康对照组[(2 987.5±953.2) ng/mL],差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

HBV 感染引起急慢性肝炎,最终导致肝癌的发生,中国 80% 以上的肝癌患者伴有 HBV 感染^[1],但目前为止,HBV 的致癌机制还不清楚。为探讨 HBV 的致病及致癌机制,本研究前期工作采用基因芯片筛选整合了 HBV 全基因组的 HepG2.2.15 细胞及其对照细胞 HepG2 的差异表达基因^[4],结果发现 IGFBP3 在 HepG2.2.15 细胞表达水平降低,进一步采用 RT-PCR 和免疫印迹对芯片结果进行了验证,发现 HepG2.2.15 细胞中 IGFBP3 mRNA 和蛋白的表达均降低,表明 HBV 能够在体外抑制 IGFBP3 的表达。

IGFBP3 是一种分泌型蛋白,能够分泌到人体血液中,本

研究对比乙肝患者和健康对照者 IGFBP3 的血清学水平差异,发现乙肝患者 IGFBP3 血清含量降低,表明 HBV 能够体内抑制 IGFBP3 的分泌。

研究证实,IGFBP-3 能够抑制肺癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞和直肠癌细胞的增殖和分化,通过 IGF 依赖性作用和 IGF 非依赖性作用的方式,促进细胞凋亡,并抑制血管的生成,具有抗肿瘤的作用^[5-6]。本研究发现 HBV 能够在体内外抑制 IGFBP3 的表达,因此,HBV 可能通过抑制 IGFBP3 的表达进而促进肝癌的发生。但 HBV 具体如何调节 IGFBP3 的表达,IGFBP3 又如何参与肝癌的发生和发展过程,这些都有待进一步研究与探讨。

总之,本研究通过体内外实验探讨了 HBV 对 IGFBP3 的调节作用,为 HBV 相关的肝癌的诊断和治疗提供重要的理论依据。

参考文献

[1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology,2012,142(6):1264-1273.
[2] Fürstenberger G,Senn HJ. Insulin-like growth factors and cancer [J]. Lancet Oncol,2002,3(5):298-302.
[3] Haydon AMM,MacInnis RJ,English DR,et al. Physical activity, insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3, and survival from colorectal cancer[J]. Gut, 2006,55 (5):689-694.
[4] 祝成亮,李艳,高国生,等. 乙型肝炎病毒对载脂蛋白 A1 表达的影响及其机制探讨[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2012,32 (6):504-507.
[5] Ali O,Cohen P,Lee KW. Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3(IGFBP-3) as an anti-cancer molecule[J]. Horm Metab Res,2003,35(11/12):726-733.
[6] Chen B,Liu S,Xu W,et al. IGF-I and IGFBP-3 and the risk of lung cancer:a meta-analysis based on nested case-control studies [J]. J Exp Clin Cancer Res,2009,28(1):89.

(收稿日期:2013-05-08)

(上接第 2946 页)

aac(6′)-I b 四类 AME 基因,并且极大多数菌株为多种基因阳性(35 株,占 92.1%),表明本院流行的 Ab 有极高的 AME 基因携带率,是引起 Ab 对氨基糖苷类药物耐药的重要原因。

参考文献

[1] Mak JK,Kim MJ,Pham J,et al. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. J Antimicrobiol Chemother,2009,63(1):47-54.
[2] Barnaud G,Zihoune N,Ricard JD,et al. Two sequential outbreaks caused by multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates producing OXA-58 or OXA-72 oxacillinase in an intensive care unit in France[J]. Hosp Infect,2010,76(4):358-360.
[3] 姜如金,朱健铭,吴康乐. 多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类与喹诺酮类耐药相关基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21 (21):4431-4434.
[4] Morovat T,Bahram F,Mohammad E,et al. Distribution of different carbapenem resistant clones of Acinetobacter baumannii in Teh-

ran hospitals[J]. New Microbiol,2009,32(3):265-271.
[5] Park YS, Lee H, Lee KS, et al. Extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases-a multicentre study [J]. Int Agents, 2010,36(5):430-435.
[6] 王春新, 谢国强, 严子禾, 等. 耐亚胺培南细菌的临床分离及耐药谱分析[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2005, 26 (9): 666-667.
[7] Heritier C,Poirlé L,Aubert D,et al. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of Acinetobacter baumannii [J]. Antimicro Agents Chemother,2003,47(1):268-273.
[8] 叶惠芬,陈惠玲,周小棉,等. 广州地区鲍曼不动杆菌产 β -内酰胺酶基因型调查[J]. 中国感染与化疗杂志,2008,8(4):307-310.
[9] 韩丽娟,邵海枫,王卫萍,等. 鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类药物的耐药机制研究[J]. 医学研究生学报,2010,23(10):1038-1041.

(收稿日期:2013-08-18)