

# 鲍曼不动杆菌 D 类碳青霉烯酶及其基因环境研究进展\*

于文静 综述, 多丽波<sup>△</sup> 审校

(哈尔滨医科大学附属第二医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150086)

关键词: 鲍曼不动杆菌; D 类碳青霉烯酶; 耐药基因环境

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)02-0192-03

近年来非发酵菌在临床分离到的致病菌中呈增长趋势, 其中重要的细菌为鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)。Ab 为不动杆菌属的一种非发酵革兰阴性球杆菌, 是非常重要的条件致病菌, 在人体免疫力低下时引起感染。而随着广谱抗菌药物和免疫抑制剂的使用世界范围内陆续出现了泛耐药或多重耐药鲍曼不动杆菌(multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDRAB)的报道。碳青霉烯类抗菌药物曾被认为是临床治疗 Ab 感染最有效的抗菌药物之一, 但近年来由于碳青霉烯类药物在医院中的大量使用, 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistance *Acinetobacter baumannii*, CRAB)的比例也逐年增高。一旦细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药, 对其他的抗菌药物也基本都耐药。这使由 CRAB 引起感染的治疗陷入无药可用的境地, 给临床抗感染治疗带来巨大难题。所以讨论鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制已十分必要。

CRAB 的耐药机制主要可以归结为以下几方面<sup>[1]</sup>: (1) 产生碳青霉烯酶; (2) 与青霉素结合蛋白的亲合力减低; (3) 外膜通道蛋白表达下调或缺失; (4) 细菌膜上的主动外排泵活性增加。其中关于碳青霉烯酶的报道最多, 也是 CRAB 最重要的耐药机制。但研究显示部分碳青霉烯酶只有很弱的水解活性, 细菌多重耐药性的产生往往是在药物水解酶、外排泵系统, 插入序列和整合子-基因盒系统的共同作用下产生的。

## 1 碳青霉烯酶的产生及分类

碳青霉烯酶是指能够明显水解至少亚胺培南或美罗培南的一类 β-内酰胺酶, 它包括 Ambler 分子结构分类的 A、B、D 三类酶。其中 A 类、D 类为丝氨酸酶, 分别属于 Bush 分类中的 2f 和 2d 亚组。A 类酶主要见于肠杆菌科细菌, D 类酶(oxacillinases, OXA 型酶)主要见于不动杆菌属, B 类酶为金属酶(metallo-beta-lactamase, MBL), 目前已有超过 19 种金属酶在不动杆菌属中检测到<sup>[2]</sup>, 其中大部分为 Ab。本文主要对 D 类碳青霉烯酶及其基因环境作一综述。

**1.1 D 类碳青霉烯酶** D 类酶为苯唑西林酶, 具有活性丝氨酸位点, 能水解碳青霉烯, 但不能被克拉维酸抑制。其亚型较多, 到目前为止, 大约有 100 多种突变衍生物。OXA 酶对 β 内酰胺类抗菌药物的水解作用具有多样性, 窄谱 OXA 酶可以水解包括氯唑西林、苯唑西林和甲氧西林在内的青霉素类抗菌药物, 但对窄谱头孢菌素只有较弱的水解活性。广谱 OXA 酶可以水解第 3、4 代头孢, 单环 β-内酰胺类抗菌药物和包括亚胺培南和美罗培南在内的碳青霉烯类抗菌药物, 但对广谱头孢菌素没有类似作用。目前耐药鲍曼不动杆菌产生的 OXA 型酶主要包括 OXA-23、OXA-24、OXA-58、OXA-51 等 4 个重要家族:

OXA-23 族: 1985 年, 英国学者 Paton 等<sup>[3]</sup>首先在耐亚胺培南(imipenem, IPM)的 Ab 中发现具有水解碳青霉烯类抗菌药物活性的碳青霉烯酶 OXA-23, 最初被命名为 ARI-1 (*Acinetobacter resistant to imipenem-1*)。该家族主要包括 OXA-23、OXA-27、OXA-49、OXA-102、OXA-103、OXA-105、OXA-133、OXA-146、OXA-165 等, 它们之间的区别在于 2~5 个氨基酸的改变, 具有 99% 的氨基酸同源性。1985 年之后相继在巴西、法国、新加坡、中国、韩国和塔希提岛又陆续分离出产 OXA-23 酶的耐碳青霉烯类抗菌药物鲍曼不动杆菌, 中国的 CRAB 主要以产 OXA-23 为主, 王辉等<sup>[4]</sup>对全国 11 家教学医院分离到的 221 例非重复 CRAB 研究发现 blaOXA-23-like 的检出率为 97.7%, 并对其中 60 株代表菌株测序证实基因型全部为 OXA-23, 且由染色体编码的 blaOXA-23 上游都存在 ISAba1。Lee<sup>[5]</sup>指出台湾中部地区的 CRAB 也同样以产 OXA-23 为主, 台湾地区 blaOXA-23 的传播是与转座子 Tn2006、Tn2007 和 Tn2008 密切相关的。近年来 Tn2008 也一直被认为是国内 blaOXA-23 在 Ab 间传播主要载体。

OXA-24 族: 与 OXA-23 族的氨基酸同源性为 60%。包括 OXA-24、OXA-25、OXA-26、OXA-72、OXA-139、OXA-143、OXA-160、OXA-182 等, 具有 98% 的同源性。与其他的 D 类酶相比, OXA-24 族酶对苯唑西林、氯唑西林和甲氧西林缺乏水解活性, 但可以水解亚胺培南和美罗培南。该酶活性可被氯离子、他唑巴坦或克拉维酸抑制。OXA-24 最初发现于西班牙的一株耐碳青霉烯类抗菌药物的 Ab 中<sup>[6]</sup>, 编码 OXA-24 的基因位于染色体上, 之后也有报道在质粒上发现该族基因。国内关于 OXA-24 族基因的报道较少, 2006 年王辉等<sup>[4]</sup>对中国 CRAB 的流行情况调查后报道, 在全国 11 家教学医院收集到的 221 例非重复 Ab 中仅有 1 株检测到 blaOXA-24-like, 测序后证实基因型为 OXA-72。

OXA-58 族: 这一族成员是迄今为止在除不动杆菌属细菌之外的其他细菌中尚未发现存在的一族, 主要包括 OXA-58、OXA-96、OXA-97、OXA-164, 该酶与其他苯唑西林酶氨基酸同源性小于 50%。OXA-58 于 2003 年 11 月首先由法国报道在 1 株 CRAB 菌株中发现<sup>[7]</sup>, 后被证实该耐药基因由质粒携带。OXA-58 能水解青霉素、苯唑西林、亚胺培南, 但不能水解广谱头孢菌素类抗菌药物。blaOXA-58 也在西班牙、土耳其、英国、阿根廷、科威特等地出现, 其中阿根廷和科威特的菌株分别分离于 1995 年和 1996 年, 表明 blaOXA-58 基因已在世界范围内广泛存在。郭萍等<sup>[8]</sup>对中国 7 家教学医院分离的 126 例非重复 CRAB 研究结果发现仅浙江有 3 例产 blaOXA-58-like 的菌株, 测序后确定基因型均为 OXA-58。

\* 基金项目: 黑龙江省卫生厅科研课题(2011-103)。作者简介: 于文静, 女, 初级检验师, 主要从事临床微生物检验及耐药机制研究。

△ 通讯作者, E-mail: duolb@yahoo.cn。

OXA-51 族:与 OXA-23 族和 OXA-24 族氨基酸同源性 < 63%,是目前发现亚型最多的一族,以 OXA-51 为代表,于 2005 年时发现于阿根廷的一株耐 IPM 的鲍曼不动杆菌<sup>[9]</sup>。该酶只能缓慢的水解苯唑西林和氯唑西林,对美罗培南没有水解活性,这一特性与 OXA-23 和 OXA-40 类似。插入序列可以加强 blaOXA-51-like 的表达,从而使菌株表现为对碳青霉烯类抗菌药物耐药。blaOXA-51-like 被认为是 Ab 固有基因<sup>[10]</sup>,因此指出可将 blaOXA-51 作为临床快速鉴定鲍曼不动杆菌的一个分子生物学诊断指标。2012 年 Pagano 等<sup>[11]</sup>对收集到的 58 株鲍曼不动杆菌 PCR 结果显示 CRAB 的 blaOXA-51-like 检出率为 100%,而碳青霉烯类抗菌药物敏感鲍曼不动杆菌(carbapenem-sensitive acinetobacter baumannii, CSAB)也全部检出 blaOXA-51-like,这一结果支持上述 blaOXA-51-like 是鲍曼不动杆菌固有基因的说法。然而,近期有研究报导显示<sup>[12]</sup>在不动杆菌属 13TU(acinetobacter genomic species ensu tjernberg and ursing, 13TU)中也检测到 blaOXA-51 基因。说明通过检测 blaOXA-51 基因的这种方法鉴定 Ab 仍有局限性。

最近 Chen 指出<sup>[13]</sup>采用 PCR 方法检测发现在部分实验菌株 blaOXA-51-like 上游存在一个 fxsA 基因(1 303 bp),称为 blaOXA-51-like-fxsA 结构,进一步扩大 PCR 反应长度,则可检测到长度为 1 920 bp fxsA-ISAbal-blaOXA-51-like 片段,并将该菌株称为 F 型菌株。同样方法扩增得到 2 388 bp 长度的含有 nuc-ISAbal-blaOXA-51-like 基因结构的菌株即为 N 型菌株。并经 Southern-blot 实验证明 F 型菌株的耐药基因是由染色体编码,N 型菌株的耐药基因则是由质粒携带的,从而说明了 blaOXA-51-like 基因不仅可以由染色体携带,还可以通过质粒传播,造成耐药菌株的流行播散。

综上所述 OXA-23 族、OXA-24 族、OXA-58 族和 OXA-51 族四族碳青霉烯酶均可不同程度地经由质粒携带,可以通过转移性基因元件在细菌间横向传播。

醋酸钙鲍曼不动杆菌(acinetobacter calcoaceticus)、Ab、不动杆菌属基因型 3(acinetobacter genomic species 3)、不动杆菌属基因型 13(13TU)被统称为醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合体<sup>[14]</sup>。由于它们基因型和表型的高度相似,使其在临床诊断实验室很难区分,因此临床检验科一般报告为醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合体,或者直接报告为 Ab。Ab 的耐药性要高于其他几种基因型,因此正确鉴定鲍曼不动杆菌对于流行病学分析和耐药性统计具有重要意义。目前已报道多种 PCR 方法<sup>[15]</sup>鉴定 Ab,特异性可达 100%,例如检测 16sRNA、16sRNA-23sRNA 基因的间隔区域(ITS)、recA 基因,但这种方法还仅适用于科研,临床实验室尚未采用。

## 2 D 类碳青霉烯酶基因环境

D 类碳青霉烯酶的多重耐药性多与插入序列(IS)或整合子(Int)等基因元件有关。整合子的捕获和插入序列的移动功能使得耐药基因在细菌质粒间传播变得异常容易,所以插入序列或整合子介导的 D 类碳青霉烯酶的传播已引起临床的广泛关注。

**2.1 由插入序列介导的 MDRAB 的耐药机制** 插入序列<sup>[16]</sup>是最小的可独立移动基因原件,一般长度小于 2.5 kb。最常见的 IS 是 ISAbal,属于 IS4 家族,拥有 2 个 16 bp 的不完整倒置重复序列可在转座子上游产生的 1 个 9 bp 的靶位克隆,转座酶由两个编码 189 和 178 个氨基酸的开放阅读框架组成。

目前已有 30 种以上的 IS 在不动杆菌属中发现,其中至少有 19 种是与  $\beta$ -内酰胺酶相关的,但 IS 并未在肠杆菌科和铜绿假单胞菌中检测到。研究报道显示在鲍曼不动杆菌 OXA-23、

OXA-51、OXA-58 基因的上游或下游已检测到插入序列 ISAbal,该插入序列可以为耐药基因提供一个强启动子,导致这些耐药基因高度表达,而引起菌株对碳青霉烯类抗菌药物耐药。Chen<sup>[13]</sup>将 ISAbal-blaOXA-82 和 blaOXA-82 分别转化到 Ab ATCC15151 中,通过比较两株转化子对 IPM 的最低抑菌浓度(mnimal inhibitory concentration, MIC)来观察 ISAbal 对 D 酶表达的影响,结果显示含有 ISAbal 的转化子对 IPM 的 MIC 从 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  增至 32.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,而不含 ISAbal 的转化子对 IPM 敏感程度几乎无变化(从 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  增至 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。Turton<sup>[17]</sup>对引起英国多次暴发流行的鲍曼不动杆菌代表菌株调查发现,ISAbal 存在于英国所有广泛流行的克隆株,并且也仅在 blaOXA-51-like 上游存在 ISAbal 的菌株表现出对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性。巴西 Pango 等<sup>[11]</sup>的研究却显示相反结果,即 blaOXA-51-like 上游 ISAbal 的存在与鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性无任何相关性( $P=0.36$ ),这一观点也已经得到美国 Bratu 等<sup>[18]</sup>的证实。澳大利亚学者 Valenzuela<sup>[19]</sup>认为 blaOXA-51-like 的低表达可能是其转录过程中的调节异常所致。由此可见 IS 在 D 类酶介导的 CRAB 中所起的作用仍有待进一步探究。

**2.2 由整合子介导的 MDRAB 的耐药机制** 整合子是一种运动性 DNA 分子,具有捕获外源游离基因片断的功能,且整合酶的自由整合功能可能会随着环境中抗菌药物压力的增加而不断加强。Ab 多药耐药株的出现,亦有可能是由于 Ab 在整合酶的作用下整合了多种耐药性基因盒的结果。临床上出现 MDRAB 与整合子对耐药基因的积累是分不开的。

通常根据整合酶的不同可将整合子分为 6 类,其中 I 类整合子是临床分布最广的一类整合子。Hu 等<sup>[20]</sup>对中国天津一所教学医院分离的 71 例非重复耐亚胺培南鲍曼不动杆菌(imipenem-resistant A. baumannii, IRAB)进行研究,结果显示 91.6%(65 株)I 类整合子阳性,其中 61 株测序后发现它们携带基因盒 aacA4、aadA1 和 catB8。这些基因盒可导致宿主对氨基糖苷类抗菌药物、第 3、4 代头孢菌素和亚胺培南均耐药。Johannes 等<sup>[21]</sup>对 48 株鲍曼不动杆菌(其中 25 株为 11 所医院的流行株)进行 PCR,发现有 50% 测试菌株携带有整合子,并且发现这些菌株表现出的多重耐药性要比其余 PCR 检测整合子阴性菌株更为严重。Donald 等<sup>[22]</sup>研究认为 blaOXA-23 是定位在整合子上的,因为他们发现 blaOXA-23 存在于一个类似于整合子的结构上,该结构含有一个近似于 59 be 的反向重复序列和两个 GTTA 序列重组位点。但在已测通的 I 类整合子结构基因中没有发现 blaOXA-23, blaOXA-23 和未测通的 I 类整合子的关系将在今后的工作中作进一步的研究。整合子在鲍曼不动杆菌的耐药机制中起到非常重要的作用,在抗菌药物的选择压力下整合子会不断进化产生更加复杂的耐药方式,成为治疗鲍曼不动杆菌引起感染的棘手问题。

## 3 小 结

Ab 对碳青霉烯类抗菌药物耐药机制极其复杂,因为导致其耐药的因素并非单一的,在可移动基因原件如插入序列、整合子、转座子的综合作用下,使得耐药基因大范围的传播。到目前为止还有许多耐药机制尚未被阐明,如 D 类酶耐药基因的调节机制,整合子基因盒的起源进化方式等,这些问题仍需在今后的工作中进一步研究。

广谱抗菌药物在医院内重症感染患者中广泛应用所产生的选择压力是 Ab 多重耐药性大幅提升的主要原因,尤其是碳青霉烯类抗菌药物,曾一度被认为是治疗 Ab 引起感染的最有效药物,但多重耐药或泛耐药菌株的出现给临床治疗带来困

难。基于这些原因联合应用抗菌药物比单一应用抗菌药物更有效,因此临床上进一步开发抗菌活性更高,安全性更好的碳青霉烯类抗菌药物将会成为当前研究的热点。

## 参考文献

- [1] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(10):3471-3484.
- [2] Zhao WH, Hu ZQ. *Acinetobacter*: A potential reservoir and dispenser for  $\beta$ -lactamases[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2012, 38(1): 30-51.
- [3] Paton R, Miles RS, Hood J, et al. ARI-1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrob Agents*, 1993, 2(2): 81-87.
- [4] Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11): 4022-4028.
- [5] Lee MH, Chen TL, Lee YT, et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying BlaOXA-23 from hospitals in central Taiwan[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2013, 46(6): 419-424.
- [6] Grosso F, Quinteria S, Poirel L, et al. Role of common bla OXA-2410XA-40-Canying platforms and plasmids in the spread of OXA-2410-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(7): 3969-3972.
- [7] Sani AN, Meral B, Zeynep G, et al. The first report on the outbreak of OXA-24/40-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey[J]. *Iran J Infect Dis*, 2013, 66(5): 439-442.
- [8] 郭萍, 王辉. OXA-51 样 D 类碳青霉烯酶在鲍曼不动杆菌中的广泛分布[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(5): 505-509.
- [9] Brown S, Young HK, Amyes SG, et al. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 26(1): 15-23.
- [10] Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei A, et al. Rapid, cost-effective, sensitive and quantitative detection of *Acinetobacter baumannii* from pneumonia patients[J]. *Iran J Microbiol*, 2011, 3(4): 162-169.
- [11] Pagano M, Martins AF, Machado AB, et al. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAba1 upstream blaOXA-51-like gene in Porto Alegre, southern Brazil[J]. *Epidemiol Infect*, 2012, 19: 1-4.
- [12] Lee, YT, Turton JF, Chen TL, et al. First identification of blaOXA-51-like in non-baumannii *Acinetobacter* spp[J]. *Chemother*, 2009, 21(5): 514-520.
- [13] Chen TL, Lee YT, Kuo SC, et al. Emergence and distribution of plasmids bearing the blaOXA-51-like gene with an upstream ISAba1 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(11): 4575-4581.
- [14] Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, et al. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomic species 13TU*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(8): 1199-1201.
- [15] Chen TL, Siu LK, Wu RC, et al. Comparison of one-tube multiplex PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS) sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(8): 801-806.
- [16] Corvec SL, Poirel T, Naas H, et al. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(4): 1530-1533.
- [17] Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al. The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 258(1): 72-77.
- [18] Bratu S. Correlation of antimicrobial resistance with  $\beta$ -lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(9): 2999-3005.
- [19] Valenzuela JK. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(2): 453-460.
- [20] Hu QJ, Hu ZD, Li Y, et al. Detection of OXA-type carbapenemases and integrons among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Teaching Hospital in China[J]. *J Basic Microbiol*, 2011, 51(5): 467-472.
- [21] Johannes GM, Jeroen S, Madelon WV, et al. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR[J]. *Clin Microbiol*, 2001, 39(1): 8-12.
- [22] Donald HM, Scaife W, Amyes SG, et al. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA-lactamase, responsible for Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(1): 196-199.

(收稿日期: 2013-08-15)

## • 综 述 •

# NT-proBNP 在心力衰竭诊断和预后评估中的应用

江 涛 综述, 王昌富 审校

**关键词:** N 末端 B 型钠尿肽原; 心力衰竭

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 02. 030

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)02-0194-03

心力衰竭(heart failure, HF)是各种心脏疾病的严重阶段,其发病率高,预后差。由于心脏本生的代偿功能,当有心功能

不全时不一定会出现相应体征和症状,当客观检查出现射血分数异常或出现心衰症状时心脏储备功能已经耗竭,此时的治疗