

• 基础实验研究论著 •

## 多重耐药鲍氏不动杆菌的碳青霉烯酶耐药基因的检测<sup>\*</sup>

胡 锐<sup>1</sup>, 卢水英<sup>2</sup>, 张秀渝<sup>2</sup>, 黄长武<sup>2</sup>, 陈维贤<sup>2△</sup>

(1. 重庆市中医骨科医院检验科, 重庆 400012; 2. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

**摘 要:**目的 了解多重耐药鲍氏不动杆菌的碳青霉烯酶耐药基因的分布情况。方法 收集 80 株多重耐药鲍氏不动杆菌, 采用聚合酶链反应(PCR)检测多重耐药鲍氏不动杆菌的碳青霉烯酶耐药基因 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58、SIM、IMP、VIM、GIM、SPM。结果 80 株多重耐药鲍氏不动杆菌检出耐药基因 OXA-23[49(61.3%)], OXA-51[73(91.3%)], OXA-58[7(8.8%)], OXA-24[1(1.3%)], IMP[17(21.3%)]及 VIM[2(2.5%)], 未检测出 GIM、SIM、SPM 基因。结论 IMP、OXA、VIM 是多重耐药鲍氏不动杆菌携带的主要基因类型。

**关键词:**鲍氏不动杆菌; 抗药性, 多药; 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1238-03

### Detection of carbapenemase-resistant genes in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*<sup>\*</sup>

Hu Rui<sup>1</sup>, Lu Shuiying<sup>2</sup>, Zhang Xiuyu<sup>2</sup>, Huang Changwu<sup>2</sup>, Chen Weixian<sup>2△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Orthopaedics Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400012, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract:** Objective To investigate the distribution of carbapenemase-resistant genes carried by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Methods 80 strains of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* were collected. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect carbapenemase-resistant genes, such as OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, SIM, IMP, VIM, GIM and SPM, in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Results Drug resistant gene OXA-23 [49 (61.3%)], OXA-51 [73 (91.3%)], OXA-58 [7 (8.8%)], OXA-24 [1 (1.3%)], IMP [17 (21.3%)] and VIM [2 (2.5%)] were found in 80 strains of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, while GIM, SIM and SPM gene were not found. Conclusion IMP, OXA, VIM is the main genotypes carried by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; drug resistance, multiple; gene

鲍氏不动杆菌对多种抗菌药天然耐药,随着广谱抗菌药的广泛应用,其耐药谱也日益增宽。碳青霉烯类抗菌药是目前有效治疗鲍氏不动杆菌的抗菌药物之一。1991 年耐亚胺培南的鲍氏不动杆菌被首次报道以来,人们发现鲍氏不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药的耐药性呈快速增加的趋势,国内、外学者相继报道了耐碳青霉烯类抗菌药的鲍氏不动杆菌感染<sup>[1-2]</sup>。为了解本地区鲍氏不动杆菌中碳青霉烯酶基因的携带情况,本研究对 80 例多重耐药的鲍氏不动杆菌菌株进行了多种碳青霉烯酶基因型检测。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 菌株来源于重庆医科大学附属第二医院检验科菌种库,80 株多重耐药的鲍氏不动杆菌分离自 2008~2011 年的住院患者,标本包括痰液、创面或伤口分泌物、血液、脑脊液等。80 株多重耐药菌株中,52 株对亚胺培南耐药,53 株对替卡西林/克拉维酸耐药,55 株对左氧氟沙星耐药,65 株对氨苄西林/舒巴坦耐药,对其他如庆大霉素、头孢吡肟、头孢曲松、复方磺胺甲异噁唑、环丙沙星及妥布霉素等常用药物的耐药率均超过 90%。

**1.2 主要试剂与仪器** 主要试剂:MicroScan NC31、NC33 微

生物鉴定/药敏测试复合板购自美国德灵公司,MiniBEST 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、dNTP、*rTaq* DNA 聚合酶及其他聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)配套试剂等购自宝生物工程(大连)有限公司,DNA Marker 购自天根生化科技(北京)有限公司。主要仪器:T-personal Cycle PCR 仪为德国 Biometra 公司产品,DYY-6C 电泳仪为北京市六一仪器厂产品,GelDoc XR System 凝胶成像系统为美国 Bio-rad 公司产品。

**1.3 引物的设计与合成** 根据各耐药基因序列,采用 Primer Design 引物设计软件,结合参考文献[3-4],设计 9 对 PCR 引物(表 1),由上海英俊生物技术有限公司合成。

**1.4 细菌培养** 将细菌复苏后,采用哥伦比亚巧克力血平板培养基进行分离纯化培养,于 37℃ 孵育过夜,挑取单个菌落,并将其接种于 3 mL 液体 LB 培养基中,以 300 r/min、37℃ 震荡培养过夜。

**1.5 基因组 DNA 的制备** 取 3 mL 过夜培养的鲍氏不动杆菌菌液,采用基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,按照试剂说明书操作。提取的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

<sup>\*</sup> 基金项目:国家“十二五”科学技术重大专项基金资助项目(传染病监测技术平台 2012ZX10004212003)。 作者简介:胡锐,女,主管技师,主要从事临床检验工作。 △ 通讯作者,E-mail:chenweixian75@163.com。

表 1 靶基因 PCR 扩增引物序列

目的基因	引物	产物大小(bp)
<i>bla</i> OXA-51-like	F:5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'	353
	R:5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'	
<i>bla</i> OXA-23-like	F:5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3'	501
	R:5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3'	
<i>bla</i> OXA-24-like	F:5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3'	246
	R:5'-AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3'	
<i>bla</i> OXA-58-like	F:5'-AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG-3'	599
	R:5'-CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC-3'	
<i>bla</i> GIM-1	F:5'-TCA ATT AGC TCT TGG GCT GAC-3'	72
	R:5'-CGG AAC GAC CAT TTG AAT GG-3'	
<i>bla</i> SIM-1	F:5'-GTA CAA GGG ATT CGG CAT CG-3'	569
	R:5'-TGG CCT GTT CCC ATG TGA G-3'	
<i>bla</i> SPM-1	F:5'-CTA AAT CGA GAG CCC TGC TTG-3'	798
	R:5'-CCT TTT CCG CGA CCT TGA TC-3'	
<i>bla</i> IMP	F:5'-GAA TAG (A/G) (A/G) TGG CTT AA (C/T) TCT C-3'	188
	R:5'-CCA AAC (C/T) ACT A(G/C) GTT ATC-3'	
<i>bla</i> VIM	F:5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC-3'	382
	R:5'-AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG-3'	
16S rRNA	F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	1 499
	R:5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	

**1.6 PCR 反应** (1)PCR 反应采用 25  $\mu$ L 体系:*rTaq* 酶 0.3  $\mu$ L,上、下游的引物各 1  $\mu$ L,1 $\times$ PCR buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L,2.5 mmol/L dNTP 2.5  $\mu$ L,DNA 模板 1  $\mu$ L,加入双蒸水至 25  $\mu$ L。将该体系分为 A、B 两组分别进行扩增,A 组包括 *OXA*-23、*OXA*-24、*OXA*-51、*OXA*-58;B 组包括 *IMP*、*VIM*、*SIM*、*GIM*、*SPM*,内参照为 16S rRNA。(2)扩增条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,53  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,11 个循环;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,54  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s,26 个循环;72  $^{\circ}$ C 补充延伸 8 min;4  $^{\circ}$ C 保持 5 min。(3)扩增产物检测:产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳 1 h(25 mA、70 V),紫外凝胶电泳成像仪下观察,出现与 DNA Marker 相当的目的条带为阳性。

2 结 果

**2.1 多重 PCR 扩增产物电泳结果** PCR 扩增完成后,采用琼脂糖凝胶电泳。16S rRNA 片断为阳性质控,所有菌株均扩增出该片断。*OXA*-23、*OXA*-51、*OXA*-58、*OXA*-24、*IMP* 及 *VIM* 检测呈阳性,图 1。



A1、A2、A4、A5、A10: *OXA*-23 + *OXA*-51; A7、A8: *OXA*-23 + *OXA*51+*OXA*58; A3: *OXA*-24; A6: *OXA*-51; B3~5: 16S rRNA; B2、B6、B8~10: 16S rRNA+*IMP*; B1、B7: 16S rRNA+*VIM*。

图 1 部分碳青霉烯酶多重 PCR 扩增产物电泳图

**2.2 细菌耐药基因的检测结果** 80 株多重耐药细菌检出耐药基因 *OXA*-23[49(61.3%)],*OXA*-51[73(91.3%)],*OXA*-58[7(8.8%)],*OXA*-24[1(1.3%)],*IMP*[17(21.3%)]及 *VIM* [2(2.5%)],其中,D 类碳青霉烯酶中以 *OXA*-51 和 *OXA*-23 基因检出率最高,B 类金属酶中检出 *IMP* 和 *VIM* 基因,未检测出 *GIM*、*SIM*、*SPM* 基因。

3 讨 论

碳青霉烯酶属于  $\beta$ -内酰胺酶,能水解多种碳青霉烯类抗菌药,细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的机制之一为产碳青霉烯酶。根据 Ambler 分子分类原则,碳青霉烯酶分 A、B、D 3 类[5]。A 类为丝氨酸蛋白酶,可被他唑巴坦、克拉维酸等药物抑制,它对亚胺培南的水解作用高于美罗培南;B 类为金属  $\beta$ -内酰胺酶,可被巯基类化合物、金属螯合剂等抑制,而不能被他唑巴坦、舒巴坦、克拉维酸等药物抑制,大多数 B 类酶对亚胺培南的水解作用高于美罗培南;D 类为苯唑西林酶,可被舒巴坦等药物抑制。在鲍氏不动杆菌中,B、D 类酶多见,而 A 类酶较为少见。

D 类酶(苯唑西林酶)主要由质粒或染色体上的基因盒编码,对碳青霉烯类抗菌药的水解活性较低,常伴有膜通透性降低和(或)外排泵的激活。按核苷酸序列,人们将 D 类酶分为如下 4 组,第 1 组:*OXA*-23、*OXA*-27、*OXA*-49,具有 99%的氨基酸同源性;第 2 组:*OXA*-24~26、*OXA*-40 及 *OXA*-72,具有 98%的同源性;第 3 组:*OXA*-51、*OXA*-64~66、*OXA*-68~71、*OXA*-75~78、*OXA*-83、*OXA*-84、*OXA*-86~89、*OXA*-91、*OXA*-92、*OXA*-94 及 *OXA*-95;第 4 组:*OXA*-58 及 *OXA*-96。以 *OXA*-23、*OXA*-24、*OXA*-58 最为常见。*OXA*-(下转第 1242 页)

gal susceptibility of a large collection of yeast strains isolated in Tunisian hospitals [J]. Med Mycol, 2013, 51(7): 737-746.

[4] Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2267-2272.

[5] Hof H, Eigner U, Maier T, et al. Differentiation of candida dubliniensis from candida albicans by means of MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Clin Lab, 2012, 58(9/10): 927-931.

[6] Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of Candida species[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(2): 153-158.

[7] Buchan BW, Ledebor NA. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(5): 1359-1366.

[8] Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates[J]. Mycoses. 2013, 56(3): 229-235.

[9] Sendid B, Ducoroy P, François N, et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals [J]. Med Mycol, 2013, 51(1): 25-32.

[10] Hamprecht A, Christ S, Oestreicher T, et al. Performance of two MALDI-TOF MS systems for the identification of yeasts isolated

from bloodstream infections and cerebrospinal fluids using a time-saving direct transfer protocol[J]. Med Microbiol Immunol, 2013 Dec 6. [Epub ahead of print]

[11] Chen JH, Yam WC, Ngan AH, et al. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(12): 3981-3987.

[12] Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of Candida non-albicans isolates from bloodstream infections[J]. J Microbiol Methods, 2013, 94(3): 262-266.

[13] Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of Candida strains isolated from blood cultures[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(1): 65-67.

[14] van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 900-907.

[15] Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8862.

(收稿日期: 2013-12-09)

(上接第 1239 页)

23 主要流行于亚洲、南美洲及欧洲, OXA-58 主要流行于欧洲, OXA-24、OXA-40 主要发现于亚洲及伊比利亚半岛, 但在伊朗、比利时、捷克、美国均有报道<sup>[6]</sup>。本研究收集的 80 例菌株中, 以 OXA-51 及 OXA-23 为主, 这与沈定霞<sup>[7]</sup>、张伟红等<sup>[8]</sup>报道结果相似。

B 类酶因活性位点为金属离子  $Zn^{2+}$ , 称为金属  $\beta$ -内酰胺酶。可水解除单环类抗菌药外的其他  $\beta$ -内酰胺类抗菌药, 其水解活性可被乙二胺四乙酸抑制, 不能被  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抑制, 使细菌对青霉素类、头孢菌素类、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂、碳青霉烯类等常见药物耐药。目前, 报道的鲍氏不动杆菌 B 类酶主要包括 IMP、VIM、SIM、GIM、SPM、AIM、NDM-1 型酶<sup>[9]</sup>。B 类酶主要由整合子上的基因盒编码, 大部分为 I 类整合子。本研究中, B 类金属酶中未检测出 GIM、SIM、SPM 基因, 检出 IMP、VIM 基因, 低于汤荣睿等<sup>[10]</sup>的报道。

鲍氏不动杆菌的耐药机制复杂, 同一菌株可携带不同的耐药基因, 表现为多重耐药性, 耐药基因又可通过质粒、整合子等遗传单元实现水平传播, 导致医院感染的暴发和流行。对细菌耐药基因进行分子分型以及整合子、质粒等可移动遗传单元的研究, 可快速进行耐药菌的克隆传播分析, 为控制病原菌的传播提供参考。

参考文献

[1] 宋彩虹, 陈维贤. 鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1856-1858.

[2] Naas T, Levy M, Hirschauer C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia

[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4826-4829.

[3] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp[J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 27(4): 351-353.

[4] Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(2): 544-547.

[5] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(9): 826-836.

[6] Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, et al. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities[J]. J Infect Dev Ctries, 2009, 3(5): 335-341.

[7] 沈定霞, 闫中强, 罗燕萍, 等. 检测多药耐药鲍氏不动杆菌的碳青霉烯酶及整合酶基因[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(1): 11-13.

[8] 张伟红, 叶惠芬, 杨银梅, 等. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌耐药表型和碳青霉烯酶基因型分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(1): 45-48.

[9] Pogue JM, Mann T, Barber KE, et al. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: epidemiology, surveillance and management [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013, 11(4): 383-393.

[10] 汤荣睿, 龚雅利, 张晓兵. 碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌耐药性分析及金属  $\beta$ -内酰胺酶检测[J]. 重庆医学, 2011, 40(21): 2094-2095.

(收稿日期: 2014-02-21)