

· 论 著 ·

耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶基因型研究

王 政, 刘 丁[△], 陈 萍, 成 瑶, 王 豪

(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所/重庆市医院感染控制中心, 重庆 400042)

摘要:目的 研究重庆地区对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌(CRAB)的耐药性及碳青霉烯酶基因型。方法 收集 2007 年 1 月至 2009 年 12 月重庆地区某两所教学医院 153 株从患者分离的对亚胺培南耐药的 CRAB, 用琼脂稀释法测定 14 种抗菌药物的最小抑菌浓度, PCR 扩增 D 类碳青霉烯酶基因 *bla*_{OXA-23-like}、*bla*_{OXA-24-like}、*bla*_{OXA-51-like}、*bla*_{OXA-58-like}。用 EDTA 纸片法检测金属酶表型, PCR 检测基因型 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{SIM}。结果 所有耐碳青霉烯类的 CRAB 除对阿米卡星、庆大霉素和左氧氟沙星等保持一定敏感性外, 对其余抗菌药物耐药率均为 100%。所有耐碳青霉烯类的 CRAB 均产 OXA-23 型碳青霉烯酶, 在 *bla*_{OXA-23-like} 上游连接有 ISAbal 启动元件。结论 重庆地区流行的对亚胺培南耐药的 CRAB 均产 OXA-23 型碳青霉烯酶。

关键词:鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯酶; 金属酶; 医院感染

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.024

中图分类号: R378; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)24-3357-03

Study on the carbapenemases genotypes of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strainsWANG Zheng, LIU Ding[△], CHEN Ping, et al.

(Research Institute of Surgery/Center of Nosocomial Infection Control, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To identify the antibiotic resistance, and the carbapenemases genotypes of imipenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from Chongqing. **Methods** Collected 153 strains of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from 2 teaching hospitals in Chongqing. Broth dilution method detected patterns of resistant against 14 antimicrobial agents, PCR was performed to detected class D β -lactamase encoding genes. Detected phenotype of Metallo β -lactamase by EDTA disk method, PCR amplified *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}. **Results** All strains kept low susceptibility to amikacin, gentamicin and levofloxacin, but resistance to other agents. All strains produced carbapenemases which were confirmed as OXA-23 by PCR, a promoter ISAbal was found in the upstream of OXA-23. Metallo β -lactamase was negative in any of the isolates. **Conclusion** OXA-23 gene is the most popular carbapenemases coding genes in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Chongqing.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; Carbapenemase; Metallo β -lactamase; Nosocomial infection

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, CRAB)是一种不发酵糖的革兰阴性杆菌, 广泛分布于水、土壤、人体皮肤及医院环境中, 已成为医院获得性感染的最主要致病菌。其可引起菌血症、泌尿道感染、伤口感染以及呼吸机相关性肺炎。随着碳青霉烯类药物的广泛使用, 出现了对亚胺培南耐药的 CRAB, 给临床抗感染治疗带来了较大的困难, 对医院感染的控制提出了新的要求。近年来, 我国相继报道了对亚胺培南耐药的 CRAB 导致的医院感染, 而西南地区缺乏相关报道。本研究收集了重庆某两所教学医院共 153 株对亚胺培南耐药的 CRAB, 并分析其耐药性及碳青霉烯酶基因型, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集 2007 年 1 月至 2009 年 12 月重庆地区某两所教学医院 153 株从患者分离的对亚胺培南耐药的 CRAB, 剔除同一患者相同部位重复分离到的相同细菌, 经 VITEK-2 自动细菌鉴定仪鉴定到种。

1.2 药敏试验 用琼脂稀释法检测最小抑菌浓度(MIC), 根据临床与实验室标准协会(CLSI)说明^[1]判断结果。质控菌为大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。用 WHONET5.4 软件分析 2007~2009 年 ICU 内 CRAB 的耐

药性。

1.3 试剂及仪器 DNA 抽提试剂盒(One-Step Bacterial DNAout, TIANDZ, 中国)、PCR 反应体系(EX Taq, TAKARA, 日本)、细菌鉴定药敏仪(VITEK, bioMerieux, 法国)、PCR 仪(PCR System 9700, Applied Biosystems, 美国)等。

1.4 碳青霉烯酶及金属酶的检测 根据 Chu 等^[2]的方法, 检测所有菌株的金属酶(metallo- β -lactamase, MBLs)表型。根据文献合成引物(表 1), PCR 扩增编码 D 类 β -内酰胺酶基因 *bla*_{OXA-23}、*bla*_{OXA-51}、*bla*_{OXA-24-like}、*bla*_{OXA-58-like} 及金属酶基因 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{SIM}。根据启动子 ISAbal 的保守序列设计上游引物 ISAbal1F 检测 ISAbal-*bla*_{OXA-23/51-like} 结构^[3]。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 1 \times 缓冲液, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 2 μ M 引物, 1.25 u Taq 酶以及 50 ng DNA 模板。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火温度持续 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂凝胶电泳 5 V/cm 共 50 min, 用溴乙锭染色后在紫外线下成像。

2 结果

2.1 药敏试验 所有菌株除对氨曲南、庆大霉素、阿米卡星、

[△] 通讯作者, E-mail: liudingcq@sohu.com。

表 1 CRAb PCR 扩增引物

| 引物 | 序列(5' to 3') | 退火温度(°C) | 产物长度(bp) |
|-------------|-----------------------------------|----------|----------|
| OXA-51 F | 5'-CTG AAC ATT ATT GCA CTC-3' | 50 | 651 |
| OXA-51 R | 5'-ATA TAC ACT ACC TAC TTG TTC-3' | | |
| OXA-23 F | 5'-TTA TGT TGT GCG GTT CAG C-3' | 53 | 601 |
| OXA-23 R | 5'-CGT CTA TCC ACC AAT TAT G-3' | | |
| OXA-58 F | 5'-ACG TAT TTA GGC TCA TGC TG-3' | 55 | 620 |
| OXA-58 R | 5'-CGT CTC TGC GCT CTA AAT AC -3' | | |
| OXA-24 F | 5'-GAG TGA ATG TTC ATC CAT T-3' | 52 | 692 |
| OXA-24 R | 5'-TCT ACG TCG AGC GTA ACG-3' | | |
| ISAbal-51 F | 5'- CTC GTT TGC AGT ACT TG-3' | 60 | 1 129 |
| ISAbal-51 R | 5'-CTC CTT TGT TGC TAG GC-3' | | |
| ISAbal-23 F | 5'-TAC GAT TTC GAG CAT C-3' | 53 | 1 153 |
| ISAbal-23 R | 5'-GTC AAC CAG ATG ACT T-3' | | |
| VIM F | 5'-TAG ATC GTC GAT GGT GAT CGG-3' | 52 | 502 |
| VIM R | 5'-AGG TAC GTC ATT CTG CTA GA-3' | | |
| IMP F | 5'-GAC AGT CGC CCT ACA TCA AA-3' | 49 | 313 |
| IMP R | 5'-ACA ATT AGT CCG GCC TTA CC-3' | | |
| SIM F | 5'-TAC ATG GGA TGC GAC ATC G-3' | 52 | 544 |
| SIM R | 5'-CTA TAG CCT GTT CTC ATG TG-3' | | |

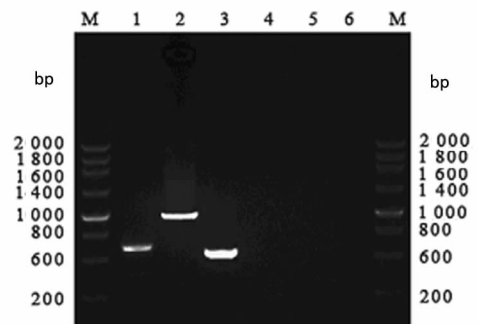
左氧氟沙星保持一定敏感性外,对其他 β -内酰胺类的耐药率均已达 100%(表 2)。2009 年 ICU 分离的所有 CRAb 对亚胺培南、环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率较 2007 年分别上升了 66.8%、39.0%、48.3%。

表 2 153 株对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌的耐药率

| 抗菌药物 | MIC($\mu\text{g/mL}$) | | | 耐药率% | | |
|-----------|-------------------------|-------------------|-------------------|------|----|----|
| | 范围 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | R | I | S |
| 氨苄西林 | 32~32 | 32 | 32 | 100 | 0 | 0 |
| 氨苄西林/舒巴坦 | 32~32 | 32 | 32 | 100 | 0 | 0 |
| 哌拉西林/他唑巴坦 | 128~128 | 128 | 128 | 100 | 0 | 0 |
| 氨曲南 | 64~64 | 64 | 64 | 96 | 0 | 4 |
| 头孢吡肟 | 32~64 | 64 | 64 | 100 | 0 | 0 |
| 头孢噻肟 | 64~64 | 64 | 64 | 100 | 0 | 0 |
| 头孢他啶 | 64~64 | 64 | 64 | 100 | 0 | 0 |
| 头孢唑肟 | 64~64 | 64 | 64 | 100 | 0 | 0 |
| 庆大霉素 | 1~16 | 16 | 16 | 69 | 5 | 26 |
| 美罗培南 | 16~16 | 16 | 16 | 100 | 0 | 0 |
| 亚胺培南 | 16~16 | 16 | 16 | 100 | 0 | 0 |
| 阿米卡星 | 2~64 | 4 | 64 | 17 | 0 | 83 |
| 环丙沙星 | 4~4 | 4 | 4 | 100 | 0 | 0 |
| 左氧氟沙星 | 1~8 | 8 | 8 | 87 | 10 | 3 |

2.2 碳青霉烯酶及金属酶的检测 PCR 扩增 *bla*_{OXA-23-like} 和 *bla*_{OXA-51-like} 基因均阳性(图 1),经测序确定为 *bla*_{OXA-23} 和 *bla*_{OXA-51} 型,在 OXA-23 序列上游发现启动元件 ISAbal1。所有菌株的金属酶表型均为阴性(图 2),*bla*_{OXA-24-like}、*bla*_{OXA-58-like}、

*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{SIM} 型基因扩增均为阴性。



M: TAKARA Ladder marker; 1: *bla*_{OXA-51-like}; 2: ISAbal1-

*bla*_{OXA-23-like}; 3: *bla*_{OXA-23-like}

图 1 *bla*_{OXA-51-like}、ISAbal1-*bla*_{OXA-23-like}、*bla*_{OXA-23-like}、*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{SIM} 的 PCR 扩增结果

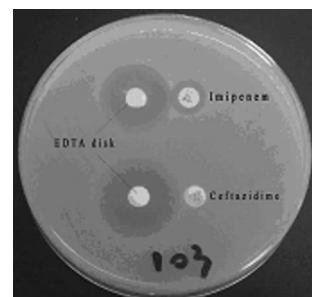


图 2 金属酶表型检测

3 讨论

CRAb 普遍存在于环境中,是临床重症感染患者常见的革

兰阴性非发酵菌。随着广谱抗菌药物应用所形成的选择性压力,多重耐药的 CRAB 日趋增多。碳青霉烯类是治疗多重耐药 CRAB 感染的首选抗菌药物之一。然而随着碳青霉烯类药物的广泛使用,CRAB 对碳青霉烯类的敏感性也在逐年下降^[4-5],其耐药株引起的医院感染的暴发流行已成为日益严重的医疗事件和公共卫生问题。

本研究的 MIC 结果显示,亚胺培南和美罗培南的 MIC 均大于 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对 β -内酰胺类的耐药率已达 100%,只对氨基糖苷类和奎诺酮类药物保持较低敏感性。而 2009 年内 ICU 分离的所有 CRAB 对亚胺培南、环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率较 2007 年分别上升了 66.8%、39.0%、48.3%^[6]。

中国浙江、杭州等沿海地区报道了产 OXA-23 型碳青霉烯酶的 CRAB 导致医院感染暴发的事件^[7-8],而最近 1 年时间西南地区也相继发现导致医院感染的 CRAB 同样产 OXA-23 型碳青霉烯酶^[9-10],这表明了该型酶在 7 年内从我国沿海发达地区迅速传入西南欠发达地区^[11]。本研究所有菌株均携带 *bla*_{OXA-23} 和 *bla*_{OXA-51} 型碳青霉烯酶基因,同中国其他报道相同,说明我国内陆地区分布的 CRAB 均以 OXA-23 为主。此外,只在 *bla*_{OXA-23} 基因上游发现 IS*Aba*1 启动子,插入序列 IS*Aba*1 可能与 D 类碳青霉烯酶编码基因的同源重组以及表达调控有关^[12]。

本研究发现重庆地区对碳青霉烯类耐药的 CRAB 对头孢菌素类的耐药率均已达 100%,对庆大霉素、阿米卡星、左氧氟沙星耐药性正逐年递增。且全部携带 *bla*_{OXA-23} 型碳青霉烯酶基因。随着 CRAB 耐药性的增强^[13-15],临床医务工作者及感染控制专家应重视并积极采取有效措施加以预防和控制。

参考文献:

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard[M]. 8th ed. Wayne: PA, 2009.

[2] Chu YW, Cheung TK, Ngan JY, et al. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, 26(4):338.

[3] Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al. The role of IS*Aba*1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acine-*

tobacter baumannii[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 258(1):72.

[4] Barisic GB, Bedenic B, Tonkic M, et al. First report of molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in different intensive care units in university hospital split, Croatia[J]. *J Chemotherapy*, 2007, 19(4):416.

[5] 王辉,孙宏莉,廖康,等.北京和广州地区 4 家医院不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(6):636.

[6] 王政,刘丁,陈萍,等.2008 年重庆大坪医院细菌耐药性监测[J]. *重庆医学*, 2009, 38(19):2400.

[7] 裘莉佩,潘登,徐炜烽,鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型及分子流行病学研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2007, 48(4):381.

[8] Zhou H, Yang Q, Yu YS, et al. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(12):4054.

[9] 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.

[10] 谭湘淑,刘原,韩新鹏,等.西安地区鲍曼不动杆菌耐亚胺培南的机制研究[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(7):1391.

[11] Wang H, Liu YM, Chen MJ, et al. Mechanism of carbapenems resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao*, 2003, 25(5):567.

[12] Segal H, Garny S, Elisha BG. Is IS*Aba*-1 customized for *Acinetobacter*? [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 243(2):425.

[13] 梅燕萍,王一杉.635 株鲍曼不动杆菌的分布及耐药性分析[J]. *检验医学与临床*, 2009, 6(24):2085.

[14] 郑丽玲,黄仲玲.新生儿病房鲍曼不动杆菌感染者的临床特点及耐药情况分析[J]. *海南医学*, 2010, 21(1):92.

[15] 刘旗明.痰标本不动杆菌属细菌分离及药敏分析[J]. *安徽医药*, 2006, 10(7):531.

(收稿日期:2010-10-14)

(上接第 3356 页)

analysis[J]. *Ann Epidemiol*, 2009, 19(6):372.

[12] Choi WS, Kim SH, Jeon EG, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units and successful outbreak control program[J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(7):999.

[13] 王自林,冯中伟,张世武.重症监护病房分离大肠埃希菌耐药性及分子流行病学检测[J]. *安徽医药*, 2008, 12(6):

521.

[14] 姚贝,张捷.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌分子流行病学研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2010(1):78.

[15] Chen YY, Sun YX, Chen JW, et al. Quantification of the severity of an outbreak in human infection control[J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(3):3.

(收稿日期:2010-10-14)