

· 论 著 ·

# 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

汤荣睿<sup>1,2</sup>, 龚雅利<sup>1</sup>, 张晓兵<sup>1</sup> $\Delta$ 

(1. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038; 2. 重庆市沙坪坝区人民医院检验科 400030)

**摘要:**目的 研究碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌耐药性及产金属  $\beta$ -内酰胺酶情况。方法 采用 K-B 法(CLSI 2008 年标准)筛选对碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌临床分离株;用乙二胺四乙酸(EDTA)抑制试验测定鲍曼不动杆菌产金属  $\beta$ -内酰胺酶的情况;PCR 方法检测 IMP-1、IMP-2、VIM、VIM-2 金属酶。结果 51 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌为多重耐药菌株,除阿米卡星外,其他抗生素的敏感率都很低;IMP-1、VIM-2 基因阳性率分别为 25.5%、19.6%;IMP-2、VIM 基因均为阴性。结论 产生金属  $\beta$ -内酰胺酶是西南医院鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药的主要机制之一。碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌是院内感染的多重耐药株,值得关注。

**关键词:**鲍曼不动杆菌;碳青霉烯类;耐药性; $\beta$ -内酰胺酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.21.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)21-2094-02

## Detection of Metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

Tang Rongrui<sup>1,2</sup>, Gong Yali<sup>1</sup>, Zhang Xiaobing<sup>1</sup> $\Delta$ 

(1. Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Shapingba District, Chongqing 400030, China)

**Abstract: Objective** To investigate antimicrobial resistance and detection of Metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Methods** Antimicrobial susceptibility test was done on 51 strains of *Acinetobacter baumannii* isolated by Kirby-Bauer method. Results were assessed according to the standards recommended by CLSI (2008). Metallo- $\beta$ -lactamases was detected by EDTA inhibition test. The genotype of IMP-1, IMP-2, VIM, VIM-2 was performed by polymerase chain reaction (PCR). **Results** 51 strains *Acinetobacter baumannii* were multi-drug resistant. Sensitive to antibiotics except Amikacin were low. Positive rate of strains of IMP-1, VIM-2 was 25.5%, 19.6%, respectively. But no IMP-2, VIM was detected. **Conclusion** Production of Metallo- $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* is one of the main mechanisms of carbapenems resistance at our hospital. It brings concern that carbapenem-resistant clone was multipleresistant strains.

**Key words:** acinetobacter baumannii; carbapenems; resistance;  $\beta$ -lactamases

鲍曼不动杆菌是医院感染常见病原菌,该菌广泛存在于自然界、人体皮肤等环境,是医院感染最主要的条件致病菌之一。碳青霉烯类抗生素对于大多数  $\beta$ -内酰胺酶都很稳定,抗菌谱广,杀菌活性强,在临床上经常作为治疗革兰阴性菌感染的最强有力的药物,是免疫功能低下重症感染患者的首选治疗药物。但随着临床碳青霉烯类抗生素的广泛应用,鲍曼不动杆菌对其耐药性亦日益增多,已成为国内外医学关注的热点之一。鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药涉及的分子机制有多方面的<sup>[1]</sup>。金属  $\beta$ -内酰胺酶(metallo- $\beta$ -lactamases, MBLs)是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药的原因之一。为了解本院碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌耐药性及产金属  $\beta$ -内酰胺酶情况,本文就上述问题进行研究,现报道如下。

### 1 材料与与方法

**1.1 菌株来源** 130 株鲍曼不动杆菌株均分离自 2008 年 1~12 月不重复分离(同一患者只留取初次分离株)。全部菌株均使用 VITEK 全自动微生物鉴定系统鉴定菌种。

**1.2 抗菌药物敏感性试验** 用 K-B 法测定 17 种抗菌药物的敏感性。药敏纸片:替卡西林、哌拉西林、哌拉西林/三唑巴坦、头孢唑肟、头孢曲松、亚胺培南、美洛培南、头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、氨基糖苷、复方新诺明、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、左旋氧氟沙星、环丙沙星为英国 Oxoid 公司产品。MH 培养基由重庆庞通医疗器械有限公司提供。根据美国 CLSI

2008 年版标准进行敏感性判断,其中把碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌作为本研究的实验菌株。

**1.3 细菌处理** 挑纯培养菌落置 0.5 mL 离心管内(内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200  $\mu$ L),56  $^{\circ}$ C 水浴 2 h,改 95  $^{\circ}$ C 水浴 10 min,离心(15 000 r/min)30 s,上清液即为基因检测的模板液,-20  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。质粒碱裂解提取试剂、染色体 DNA 提取试剂、PCR 扩增试剂盒为上海生工生物公司。

**1.4 金属  $\beta$ -内酰胺酶的表型检测(EDTA 增强和协同实验)** 0.5 麦氏单位的待检菌涂布 MH 平板,贴美罗培南(10  $\mu$ g)药敏纸片 2 片,相距 4 cm,其中一张美罗培南药敏纸片滴加 0.5 mol/L EDTA 10  $\mu$ L;在另一张美罗培南药敏纸片相距 1.5 cm 处贴空白纸片并滴加 0.5 mol/L EDTA 10  $\mu$ L。35  $^{\circ}$ C 培养过夜后观察,若美罗培南抑菌圈在靠近 EDTA 纸片侧明显扩大者和加 EDTA 美罗培南纸片抑菌圈比没加 EDTA 美罗培南抑菌圈大 5 mm 者判断金属酶阳性。

**1.5 耐药基因检测** 用 PCR 方法检测 IMP-1、IMP-2、VIM-1、VIM-2 酶的编码基因。各基因的扩增引物如表 1。

各靶基因 PCR 扩增体系均为:每反应体系 P1、P2 引物各 0.5  $\mu$ mol/L, dNTPs 各 200  $\mu$ mol/L, KC1 10 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, Tris-HCl(pH9.0)10 mmol/L, BSA 0.02 (wt/vol), Taq DNA pol 1 U。总反应体积 20  $\mu$ L(其中模板液 5  $\mu$ L)。PCR 扩增产物大于 500 bp 热循

$\Delta$  通讯作者, Tel:15123967161; E-mail: xhpg85@yahoo.com.cn.

环参数均为:93℃预变性 2 min,然后 93℃ 60 s,55℃ 60 s,72℃ 60 s,循环 35 周期,最后 72℃ 延长至 5 min。PCR 扩增产物小于 500 bp 热循环参数均为:93℃预变性 2 min,然后 93℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,循环 35 周期,最后 72℃ 延长至 5 min。扩增产物作 2%琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶电泳成像仪下观察,并纪录结果。

表 1 靶基因 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
IMP-1	P1:CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	587
	P2:AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	
IMP-2	P1:GGC AGT CGC CCT AAA ACA AA	737
	P2:TAG TTA CTT GGC TGT GTG ATG G	
VIM	P1:ATG GTG TTT GGT CGC ATA TC	510
	P2:TGG GCC ATT CAG CCA GAT C	
VIM-2	P1:AAA GTT ATG CCG CAC TCA CC	865
	P2:TGC AAC TTC ATG TTA TGC CG	

2 结 果

2.1 51 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌来源以及对常用抗生素药敏情况 51 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌来源分布情况:41 株来源于痰液,7 株来源于脓液,其余 3 株分别来源于血液、脑脊液和胸水,分布在呼吸科(22 株)、神经外科(10 株)、急救部(7 株)、重症监护室(4 株)、肝胆科(3 株)、烧伤科(2 株)、胸外科(1 株)、骨科(1 株)、老年科(1 株)。51 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌对常用抗生素药敏情况如表 2 所示。

表 2 51 株鲍曼不动杆菌对抗菌药物敏感性(%)

抗生素名称	敏感	中介	耐药
庆大霉素	7.8	43.1	49.1
阿米卡星	94.1	0.0	5.9
妥布霉素	35.3	11.8	52.9
环丙沙星	0.0	0.0	100
左旋氧氟沙星	3.9	19.6	76.5
氨曲南	1.9	1.9	96.2
头孢曲松	0.0	0.0	100
头孢吡肟	0.0	1.9	98.1
头孢噻肟	0	0	100
头孢他啶	1.9	5.9	92.2
替卡西林	0.0	0.0	100
哌拉西林/他唑巴坦	1.9	0	98.1
哌拉西林	0.0	0.0	100
头孢唑肟	0.0	1.9	98.1
美洛培南	3.9	0.0	96.1
亚胺培南	1.9	3.9	94.2
复方新诺明	3.9	0	96.1



1~4 和 6~9 电泳条带相同,5 显示电泳条带与其他不相同。

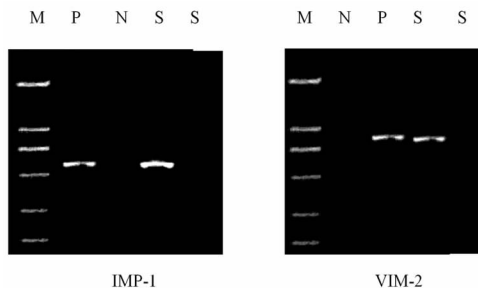
图 1 PDRA 电泳结果图

2.2 金属 β-内酰胺酶表型检测检验结果 EDTA 增强与协同实验实验结果(图 1);51 株鲍曼不动杆菌 27 株阳性,阳性率为 52.9%。

2.3 耐药基因检测结果 分析结果得出,51 株 CRAB 产 B 类碳青霉烯酶(金属酶)有 23 株,阳性率为 45.1%,见表 3、图 2。

表 3 51 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌耐药基因检测结果

基因名称	阳性株数	阳性率(%)
IMP-1	13	25.5
IMP-2	0	0
VIM	0	0
VIM-2	10	19.6



M:marker;S:标本;N:阴性对照;P:阳性对照。

图 2 金属 β-内酰胺酶基因 PCR 产物电泳图

3 讨 论

鲍曼不动杆菌是医院感染重要病原菌,该菌常常呈多重耐药,甚至泛耐药,并且耐药菌可以在特定的病房引起大规模的暴发流行。由于鲍曼不动杆菌感染的发病率和病死率的报道日益增加,有学者将其誉为“革兰阴性的对苯唑西林耐药的金黄色葡萄球菌(MRSA)”[2]。

碳青霉烯类抗生素是目前临床应用最广泛、抗菌活性最强大的抗生素之一。随着该药的广泛使用,已出现碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌。对碳青霉烯类耐药,就意味着对现有的常用 β-内酰胺类耐药,甚至出现泛耐药株(pan-resistance PDRA)。PDRA 引起的感染,常常无药可用,病死率高,引起广泛的重视。本研究也调查西南医院 2008 年鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类的耐药为 37%[3],较前几年有较大幅度的升高。本研究分析 51 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌对常用抗生素的耐药情况表明:除氨基糖苷类和左旋氧氟沙星外,其他常用抗生素的耐药率均在 90%以上。阿米卡星耐药率仅为 5.9%,可作为碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌治疗的首选,但由于其不良反应又限制其在临床使用。

鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制是产生碳青霉烯酶[4]。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,包括 Ambler 分类中的 A、B、D 三类酶。在不动杆菌中发现的碳青霉烯酶主要为 B 类和 D 类酶[5]。B 类为金属酶,常见有 IMP 和 VIM 型 β-内酰胺酶;D 类为苯唑西林酶(OXA 类酶),按同源性可分为 2 组,第 1 组代表有 OXA-23,第 2 组代表有 OXA-24。

金属 β-内酰胺酶检测的方法有 EDTA 增强、协同实验,本研究结果 51 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌金属 β-内酰胺酶阳性率为 52.9%(27/51)。本实验通过分子生物学方法检测:IMP1 阳性率为 25.5%(13/51),VIM-2 阳性率为 19.6%(10/51)。从这些数据可以看出在西南医院碳青(下转第 2098 页)

的高电子密度沉积物。经实验结果观察,本实验采用微量注射器未对大鼠脊髓造成任何损伤。

通过 OECs 移植不但可以促进神经元和轴突再生,并且可以通过分泌补充神经营养因子来挽救濒死的神经元成为研究者的共识。本研究显示,脊髓内 OECs 移植后 4、8 周结果,能够显著促进尼氏染色中脊髓运动神经元的存活百分比,并且可以显著提高再生运动神经元的数目,修复神经元的超微结构。并且随时间增长作用逐渐增强。因此,本研究通过脊髓内 OECs 细胞直接移植观察到其对脊髓运动神经元存活和再生的双重促进作用,希望能为临床治疗中枢和周围神经损伤提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Woodhall E, West AK, Chuah MI. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 88(1-2): 203-213.
- [2] Rogerio F, Teixeira SA, Junior HJ, et al. mRNA and protein expression and activities of nitric oxide synthases in the lumbar spinal cord of neonatal rats after sciatic nerve transection and melatonin administration [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 407(2): 182-187.
- [3] 李绍波, 路会侠, 周雪. 嗅鞘细胞与脊髓损伤再生修复 [J]. *重庆医学*, 2008, 37(19): 2244-2247.
- [4] Cao L, Zhu YL, Su Z, et al. Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor [J]. *Glia*, 2007, 55(9): 897-904.
- [5] Curtis MA, Kam M, Nannmark U. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension [J]. *Science*, 2007, 315(11): 1243-1249.
- [6] Raisman G. Repair of spinal cord injury by transplantation of olfactory ensheathing cells [J]. *C R Biol*, 2007, 330(6-7): 557-560.
- [7] Martin LJ, Liu Z. Adult olfactory bulb neural precursor cell grafts provide temporary protection from motor neuron de-

generation, improve motor function, and extend survival in amyotrophic lateral sclerosis mice [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007, 66(11): 1002-1018.

- [8] Kawaja MD, Boyd JG, Smithson LJ, et al. Technical strategies to isolate olfactory ensheathing cells for intraspinal implantation [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(2): 155-177.
- [9] Yang LY, Huang TH, Ma L. Bone marrow stromal cells express neural phenotypes in vitro and migrate in brain after transplantation in vivo [J]. *Biomed Environ Sci*, 2006, 19(5): 329-335.
- [10] Radtke C, Wewetzer K. Translating basic research into clinical practice or what else do we have to learn about olfactory ensheathing cells? [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 456(3): 133-136.
- [11] Fairless R, Frame MC, Barnett SC. N-cadherin differentially determines Schwann cell and olfactory ensheathing cell adhesion and migration responses upon contact with astrocytes [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 28(2): 253-263.
- [12] Feng L, Meng H, Wu F, et al. Olfactory ensheathing cells conditioned medium prevented apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells through modulation of intrinsic apoptotic pathways [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(3-4): 323-329.
- [13] Zhang J, Wang B, Xiao Z, et al. Olfactory ensheathing cells promote proliferation and inhibit neuronal differentiation of neural progenitor cells through activation of Notch signaling [J]. *Neuroscience*, 2008, 153(4): 406-413.
- [14] Bunge MB. Novel combination strategies to repair the injured mammalian spinal cord [J]. *J Spinal Cord Med*, 2008, 31(3): 262-269.
- [15] Shen YX, Zhang P, Zhao JG. A potential therapeutic approach for human spinal cord injuries; subarachnoid puncture for OECs transplantation [J]. *Med Hypotheses*, 2009, 73(5): 863-864.

(收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2011-02-15)

(上接第 2095 页)

霉烯类耐药鲍曼不动杆菌金属酶阳性率较高, 达到了 45.1% (23/51)。当然, 可以看出利用虽然 EDTA 增强、协同实验检测金属酶都出现假阳性, 但是用该方法筛选金属酶还是具有一定的临床意义。

总之, 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌逐年增多, 给医务工作者再次敲响了警钟, 临床医生一定要注意合理用药, 而实验室工作人员应加强耐药菌的监测以及对产酶菌株进行筛选, 及时发现产酶菌株, 以便早期预防, 同时配合医院控感部门, 做好感染控制工作, 防止产酶菌的暴发流行。

#### 参考文献:

- [1] Shiri NV, Ronen BA, Yehuda C. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the

health care setting [J]. *Curr Opin in Infect Dis*, 2005, 18(4): 306-311.

- [2] Rello J. *Acinetobacter baumannii* infection in the ICU; customization is the key [J]. *Chest*, 1999, 115: 1226-1229.
- [3] 张晓兵, 龚雅利, 余军校, 等. 鲍氏不动杆菌 16S rRNA 甲基化酶、氨基糖苷类修饰酶基因研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(11): 1513-1515.
- [4] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *acinetobacter baumannii*; mechanisms and epidemiology [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(9): 826-836.
- [5] Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases; a problem in waiting [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2000, 3(5): 489-495.

(收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2011-02-03)