

多重耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因的研究

赵书平 马华 宗桂珍

【摘要】 目的 调查本院院内分离的多重耐药鲍曼不动杆菌中碳青霉烯酶基因的存在情况,为临床合理使用抗菌药物和控制院内感染提供科学依据。**方法** 采用微量稀释法和纸片扩散法测定菌株的药敏情况,PCR 法检测 OXA23 组等碳青霉烯酶基因,并对部分阳性基因进行测序。**结果** 所收集的 46 株多重耐药鲍曼不动杆菌中,41 株(89.1%) OXA23 组基因阳性,6 株(13%) IMP 基因阳性,其余基因检测均显示阴性。**结论** 本院多重耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因以 OXA23 组为主,其次是 IMP 基因。

【关键词】 多重耐药;鲍曼不动杆菌;碳青霉烯酶基因

Carbapenemas gene in multi-drug resistant acinetobacter baumannii ZHAO Shu-ping, MA Hua, ZONG Gui-zhen. Central Hospital of Tai'an, Tai'an 271000, China

Corresponding author: ZHAO Shu-ping, Email: dczhshp@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the presence of carbapenemas gene in multi-drug resistant *acinetobacter baumannii* isolated from our hospital, and to provide scientific basis for rational application of antibiotics and control of nosocomial infection. **Methods** Drug susceptibility of the strains were detected by microdilution method and disk diffusion method, and the presence of OXA23-type carbapenemas genes were detected by PCR, and part of the positive products selected by PCR were sequenced. Among the 46 multi-drug resistant *acinetobacter baumannii* isolated from our hospital, gene sequencing was performed in some positive strains. **Results** Among the 46 strains of multi-drug resistant *acinetobacter baumannii*, 41 (89.1%) strains carried OXA23, 6 (13%) strains carried IMP, while all the other genes were negative. **Conclusions** Carbapenems genes of multi-drug resistant *acinetobacter baumannii* isolated from our hospital was mainly OXA23-type gene and secondly was IMP gene.

【Key words】 Multi-drug resistance; *Acinetobacter baumannii*; Carbapenemas gene

报道显示鲍曼不动杆菌引起的院内感染有逐年增多的趋势^[1],尤其是泛耐药和多重耐药鲍曼不动杆菌的出现给临床治疗带来了极大的困难^[2-4]。有研究显示,碳青霉烯酶是引起不动杆菌属对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制^[5-7]。临床上经常用碳青霉烯类和含舒巴坦合剂的抗菌药物治疗鲍曼不动杆菌引起的感染,但近年来这两类药物的耐药性逐步升高。本研究调查了碳青霉烯酶基因在本院分离的多重耐药鲍曼不动杆菌中的存在情况,以期临床合理使用抗菌药物提供一定的理论依据。

资料与方法

一、菌株来源

2010 年 6 月~2011 年 6 月在本院住院患者标

本中共分离出 46 株多重耐药鲍曼不动杆菌,其中分离自痰液 44 株,穿刺液 1 株,分泌物 1 株。

二、细菌鉴定及药敏试验

采用 Walk Away 96 PLUS NC31 复合板鉴定菌种及药敏试验,用 K-B 纸片扩散法测定对头孢哌酮/舒巴坦、美罗培南、替加环素、米诺环素和多西环素等抗菌药物的敏感性,用 ATB PSE 药敏板检测菌株对多黏菌素 E 等抗菌药物的敏感性。M-H 琼脂和药敏纸片均为英国 Oxoid 产品。

三、耐药基因的检测

采用多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)进行检测,引物设计参照文献^[8]。碳青霉烯酶基因的 PCR 扩增引物序列见表 1。

四、所筛选的阳性基因 DNA 测序

IMP 阳性基因和部分 OXA23 组阳性基因 PCR 产物由上海桑尼生物科技有限公司进行测序,测序结果在 GenBank 网上查询,进行比对分析。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.06.015

作者单位:271000 泰安,泰安中心医院检验科(赵书平),血液科(马华),药剂科(宗桂珍)

通讯作者:赵书平,Email:dczhshp@126.com

表 1 碳青霉烯酶基因的 PCR 扩增引物序列

引物	引物序列序 (5'→3')	产物长 度(bp)	退火温 度(℃)
OXA23gp-F	CCCCGAGTCAGATTGTTC	291	55
OXA23gp-R	GCTTCATGGCTTCTCTAG		
OXA24gp-F	ACGAGCAAAATAAAGAAATATGTCCC	496	52
OXA24gp-R	CACCCAACCACTCAACCAAC		
OXA48gp-F	GGGATGGACAGACMC GSGATA	300	55
OXA48gp-R	TGGCTTGRITGACYATACGC		
OXA55gp-F	GCTGAGGGTTGGCAAGAGGT	179	57
OXA55gp-R	AACGCAATAAGGCTGGAGGG		
OXA58gp-F	TGGCACGCATTTAGACCG	507	52
OXA58gp-R	AAACCCACATACCAACCC		
OXA60gp-F	TCACCGCCGACCGTACCTAT	177	59
OXA60gp-R	CGTGCTCCCACTGCTCGTAA		
OXA64gp-F	TCAGCCTGCTCACCTTAT	406	52
OXA64gp-R	CACGCTTCACTTCKTTAGAC		
OXA66qc-F	ATGAACATTAAAGCACTC	825	52
OXA66qc-R	CTATAAAATACCTAATTG		
VIMqc-F	TTGAATTCCTTATGCCGCACTCACCCC	910	55
VIMqc-R	TTGGATCCAAGTTCAGCCGCCAGAA		
IMP-1gp-F	TCTCATTTTCATAGRGACAG	353	51
IMP-1gp-R	ACCAGTTTTCGCTTACCATA		
IMP-2gp-F	CTTGTAACACWAGACGCCTAT	134	52
IMP-2gp-R	GTGCTGTCGCTATGGAAT		
IMP-11gp-F	GKGTCTTTGCCTGATTTA	256	51
IMP-11gp-R	CTATTCCACCCGWGCTGT		
IMP-14gp-F	RGACAGTACGGCTGGAATAG	239	55
IMP-14gp-R	CAAAGCAACCACCGAATAAA		
IMP-12gp-F	TTRCATAGCGACAGRACG	277	52
IMP-12gp-R	CARCCAAATTACCWAGACC		
IMP-2qc-F	CGGAATTCATGAAGAAATTATTT- GTTTTATGTG	741	55
IMP-2qc-R	CCGTCTAGATTAGTACTTGGCTGT- GATG		
GIMI-F	ATTACTTGTAGCGTTGCC	418	48
GIMI-R	CTCTATAAGCCCATTTCC		
SPM1-F	GCCATCAATACGCATTTTCA	526	57
SPM1-R	ACAGTCTCATTTGCCCAACG		
KPC-gp-F	GCGGAACCATTCGCTAAACTC	340	55
KPC-gp-R	CGCCCAACTCCTTCAGCAACA		
KPC-qc-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	882	55
KPC-qc-R	TTACTGCCCGTTGACGC		

结 果

一、抗菌药物的敏感试验结果

本研究所分离的 46 株多重耐药鲍曼不动杆菌中,对替加环素和米诺环素的敏感性分别为 60.9% (28/46) 和 54.3% (25/46); 对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率为 54% (25/46), 中介水平耐药为 32% (15/46); 对庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星的耐药率均为 93% (43/46); 对头孢他啶、头孢曲松、环丙沙星、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林和哌拉西林/他唑巴坦均耐药; 95.7% (44/46) 对左氧氟沙星耐药, 4.3% (2/46) 对左氧氟沙星中介水平耐药; 2.2% (1/46) 对复方新诺明敏感, 对多黏菌素 E 均敏感。

二、碳青霉烯酶基因的检测结果

46 株多重耐药鲍曼不动杆菌中, 41 株 (89.1%) 为 OXA23 组基因阳性, 未检出其他 OXA 基因, 6 株 (13%) 携带 IMP 基因, 4 株 (8.7%) 同时携带 OXA23 和 IMP-4 酶, 其余基因均阴性。OXA23 组基因和 IMP 基因 PCR 产物电泳结果见图 1~2。

三、OXA-23 基因 PCR 扩增产物的测序结果

取 3 株 OXA23 组基因阳性 PCR 扩增产物进行测序, 测序结果均为 OXA-23 基因, 与编码 JN207493 序列 100% 同源, 测序图见图 3。

四、IMP 基因 PCR 扩增产物的测序结果

对 6 株 IMP 基因阳性 PCR 扩增产物进行测序, 测序结果均为 IMP-4 基因, 其中 4 株与编码 JN106667 序列 100% 同源, 2 株 99% 同源, 测序图见图 4。

讨 论

鲍曼不动杆菌是不动杆菌属中最常见的引起呼吸道感染的条件致病菌, 该菌与铜绿假单胞菌、嗜麦芽寡养单胞菌为常见的非发酵革兰阴性杆菌。2006~2011 年本院临床分离的非发酵菌中, 发现自 2009 年以来鲍曼不动杆菌菌株分离率迅速增加, 且多重耐药鲍曼不动杆菌迅速增加。有报道称吸痰器、呼吸机、空调和输液系统均可被污染而将病原菌传播给患者^[9], 鲍曼不动杆菌以下呼吸道感染最为常见^[10]。本研究 46 例感染多重耐药鲍曼不动杆菌的患者中, 有 44 例为呼吸道感染者, 提示本院鲍曼不动杆菌引起的感染以呼吸道感染为主。碳青霉烯酶是指能水解碳青霉烯类抗菌药物的一类 β -内酰胺酶, 包括 Ambler 分类中的 A、B、D 三类酶。A 类常见有 KPC 型 β -内酰胺酶; B 类为金属酶, 常见有 IMP 和 VIM 型 β -内酰胺酶; D 类为 OXA 类酶。

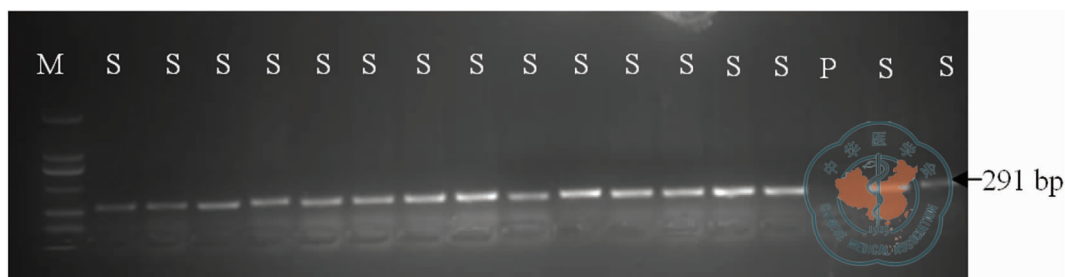


图 1 OXA23 组基因 PCR 产物部分电泳图

注: M: Marker; S: 阳性标本; P: 阴性标本



图 2 IMP 基因 PCR 产物部分电泳图

注: M: Marker; S: 阳性标本; P: 阴性标本



图 3 OXA-23 基因测序图

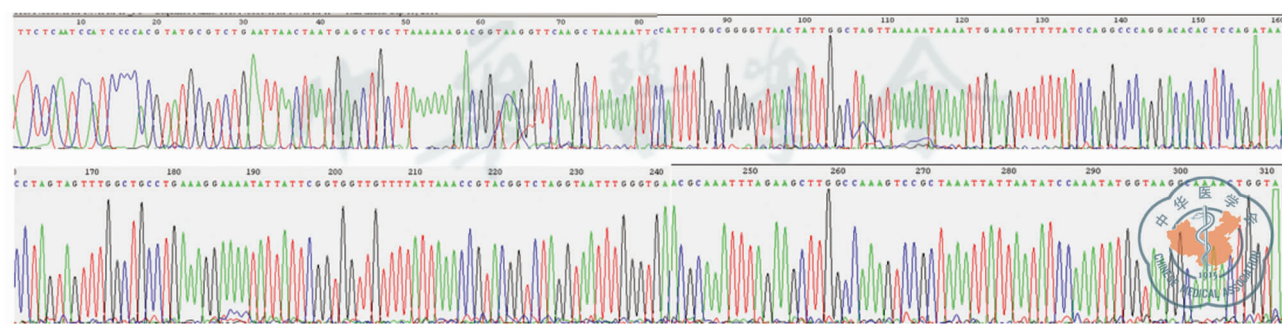


图 4 IMP-4 基因测序图

OXA-23 属 D 类碳青霉烯酶耐药基因,能水解碳青霉烯类抗菌药物,是引起鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因之一^[11-12]。本研究共收集 46 株多重耐药鲍曼不动杆菌,其中 41 株为 OXA23 组基因阳性,阳性率为 89.1% (41/46),随机取 3 株 PCR 扩增产物进行测序,结果显示均为 OXA-23 基因。6 株携带

IMP 基因,携带率为 13% (6/46)。对 6 株 IMP 基因阳性 PCR 扩增产物进行测序,结果均为 IMP-4 型金属酶。提示本院分离的多重耐药鲍曼不动杆菌中,碳青霉烯酶基因以 OXA-23 型为主,与马序竹等^[13]报道的 OXA-23 酶是我国鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药最主要的碳青霉烯酶一致。本研究在鲍曼不动

杆菌中检出 IMP-4 金属酶基因,并且有 4 株(8.7%)同时携带 OXA23 组碳青霉烯酶和 IMP-4 金属酶,其研究结果低于虞涛等^[14]报道的 28% 患者同时产 IMP-4 型及 OXA-23 型碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌。本研究提示,OXA 碳青霉烯酶和 IMP-4 金属酶是本院院内鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类和头孢菌素类抗菌药物耐药的主要原因之一。

本研究药敏结果显示,多重耐药鲍曼不动杆菌,对庆大霉素和妥布霉素、阿米卡星的耐药率均为 93% (43/46); 95.7% (44/46) 对左氧氟沙星耐药,4.3% (2/46) 对左氧氟沙星中介水平耐药;对环丙沙星、头孢他啶、头孢曲松、环丙沙星、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林和哌拉西林/他唑巴坦均耐药,对替加环素(60.9%)和米诺环素(54.3%)敏感性相对较高,对头孢哌酮/舒巴坦(54%)的耐药率显著低于哌拉西林/他唑巴坦(100%),但对头孢哌酮/舒巴坦为中介水平耐药的多重耐药鲍曼不动杆菌较高,为 32%;1 株对复方新诺明敏感,未发现对多黏菌素 E 耐药的鲍曼不动杆菌。因此,本院临床医师治疗多重耐药鲍曼不动杆菌引起的感染时,可首选多黏菌素 + 头孢哌酮/舒巴坦;头孢哌酮/舒巴坦 + 米诺环素或头孢哌酮/舒巴坦 + 替加环素。

因此,临床医师治疗由多重耐药鲍曼不动杆菌引起的感染时,因可选用的抗菌药物非常有限,应引起高度重视,同时应了解本地区鲍曼不动杆菌的耐药特性,加强临床联合用药的意识,合理选用抗菌药物。

参 考 文 献

- 1 胡婧,都鹏飞. 1003 株鲍氏不动杆菌医院感染的分布与耐药性分析. 中华医院感染学杂志,2010,20(7):1010-1012.
- 2 Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* Infection. *N Engl J Med*,2008,358(12):1271-1281.
- 3 Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*,2008,21(3):538-582.
- 4 Doi Y, Husain S, Potoski BA, et al. Extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*,2009,15(6):980-982.
- 5 Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*,2005,43(5):2241-2245.
- 6 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 Clin Microbiol*,2005,43(9):4826-4829.
- 7 Cao L, Zhu YL, Su Z, et al. Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor. *Glia*,2007,55(9):897-904.
- 8 沈继录,朱德妹,吴卫红,等. 革兰阴性杆菌碳青霉烯酶产生与细菌耐药性关系的研究. 中华检验医学杂志,2008,31(4):408-414.
- 9 沈彩红,欧森. 122 株鲍氏不动杆菌的感染分布及耐药性分析. 检验医学与临床,2008,5(14):853-854.
- 10 张晓兵,龚雅利,刘智勇,等. 鲍氏不动杆菌的临床分布特征及耐药性分析. 中华医院感染学杂志,2008,18(3):428-430.
- 11 邹玖明,张爱平,李智山,等. OXA-23 基因阳性耐亚胺培南鲍曼不动杆菌感染暴发调查研究. 中国感染控制杂志,2010,9(4):235-237.
- 12 余琳,江凤茹,卢鉴财,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 OXA-23 基因与 *qacE Δ 1* 基因检测的研究. 检验医学与临床,2011,15(8):1793-1797.
- 13 马序竹,吕媛,张佳,等. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌耐药性及 OXA 碳青霉烯酶检测. 中国临床药理学杂志,2011,27(4):268-271.
- 14 虞涛,鲍连生,刘芳,等. 儿童鲍曼不动杆菌产 IMP-4 及 OXA-23 型碳青霉烯酶分子流行病学. 中华检验医学杂志,2010,33(12):1171-1175.

(收稿日期:2012-01-10)

(本文编辑:孙荣华)

赵书平,马华,宗桂珍. 多重耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(6):576-579.