

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2015.10.003

· 论 著 ·

多重耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺类耐药基因研究

杨 燕¹, 肖慈然², 邹玖明¹, 李智山¹

(1 襄阳市中心医院, 湖北 襄阳 441021; 2 阆中市人民医院, 四川 阆中 637400)

[摘 要] **目的** 了解 β -内酰胺类耐药基因在某院临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)中的流行情况。**方法** 对该院临床分离的 22 株 MDRAB 进行药敏试验,同时,采用聚合酶链反应(PCR)技术对其进行 β -内酰胺类耐药基因(*TEM*、*SHV*、*CTX-M*、*PER*、*DHA*、*IMP*、*VIM*、*SIM*、*OXA-23*、*OXA-24*、*OXA-58*)检测。**结果** 22 株 MDRAB 对头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星和复方磺胺甲噁唑耐药率均为 100.00%;对亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 50.00%、40.91%、31.82%,中介率分别为 31.82%、36.36%、31.82%。22 株(100.00%)MDRAB 均携带耐药基因 *OXA-23* 群,16 株(72.73%)携带 *TEM*,12 株(54.55%)携带 *IMP*,4 株(18.18%)携带 *PER*;*SHV*、*CTX-M*、*DHA*、*VIM*、*SIM*、*OXA-24* 群、*OXA-58* 群基因检测均为阴性。**结论** 携带 *IMP*、*TEM*、*PER*、*OXA-23* 耐药基因是导致该院 MDRAB 对 β -内酰胺酶类抗生素耐药的重要机制。

[关 键 词] 鲍曼不动杆菌;超广谱 β -内酰胺酶; β -内酰胺类;耐药基因;抗药性;微生物;多重耐药

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)10-0658-05

Study on drug resistance genes for β -lactams in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

YANG Yan¹, XIAO Ci-ran², ZOU Jiu-ming¹, LI Zhi-shan¹ (1 Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441021, China; 2 Langzhong People's Hospital, Langzhong 637400, China)

[Abstract] **Objective** To investigate prevalence of resistance genes for β -lactams in clinically isolated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB) in a hospital. **Methods** 22 clinically isolated MDRAB strains were performed antimicrobial susceptibility testing, resistance genes for β -lactams (*TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *PER*, *DHA*, *IMP*, *VIM*, *SIM*, *OXA-23*, *OXA-24*, and *OXA-58*) in these strains were detected with polymerase chain reaction. **Results** The resistant rates of 22 isolates of MDRAB to ceftazidime, cefotaxime, cefepime, gentamycin, amikacin, ciprofloxacin, and compound sulfamethoxazole were all 100.00%; to imipenem, meropenem, and cefoperazone / sulbactam were 50.00%, 40.91%, and 31.82% respectively, intermediated rates were 31.82%, 36.36%, and 31.82% respectively. The carriage rates of *OXA-23*, *TEM*, *IMP*, and *PER* were 100.00% ($n=22$), 72.73% ($n=16$), 54.55% ($n=12$), and 18.18% ($n=4$) respectively. Detection results of *SHV*, *CTX-M*, *DHA*, *VIM*, *SIM*, *OXA-24*, and *OXA-58* were all negative. **Conclusion** Carriage of *IMP*, *TEM*, *PER*, and *OXA-23* resistance genes are the major resistance mechanisms of MDRAB to β -lactamase antimicrobial agents in this hospital.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; extended-spectrum β -lactamase; β -lactams; drug-resistant gene; drug resistance, microbial; multidrug resistance

[Chin Infect Control, 2015, 14(10):658-662]

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB) 表及医院环境中。AB 作为机会致病菌,可在机体
是一种非发酵的革兰阴性杆菌,广泛分布于人体体 免疫力下降或功能受损时引发严重感染,如败血症、

[收稿日期] 2015-01-10
[基金项目] 襄阳市研究开发计划 襄科计[2011]5 号
[作者简介] 杨燕(1961-),女(汉族),湖北省襄阳市人,主管技师,主要从事细菌耐药机制研究。
[通信作者] 李智山 E-mail: lizhishan55@163.com

呼吸相关性肺炎(VAP)、脑膜炎、泌尿系统感染等,尤其以重症监护病房(ICU)、神经外科等病房多见,是医院感染的重要病原体之一。近年来,随着广谱抗菌药物的大量使用,AB 对临床常用抗菌药物的耐药性也越来越高。中国细菌耐药监测网(CHINET)监测资料显示,2007—2010 年 AB 对亚胺培南的耐药率依次为:39.4%、48.1%、54.8%、57.1%,对美罗培南的耐药率依次为:44.5%、49.3%、57.2%、58.3%,对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率依次为5.8%、14.6%、26.3%、30.7%。2007 年 AB 多重耐药(MDR)率为 47.7%,泛耐药(PDR)率为 2.8%,2008 年泛耐药率为 10.9%(333/3 058),2009 年 MDRA 和 PDRA 检出率分别为 44.4%和 17.0%,2010 年泛耐药株数比 2009 年显著增多^[1-4]。细菌耐药的主要机制为携带各类耐药基因。研究^[5]表明,携带各种 β -内酰胺酶编码基因是导致 AB 对 β -内酰胺酶类抗生素耐药的重要原因。为了解某院临床分离的 MDRA β -内酰胺酶编码基因流行情况,本研究采用聚合酶链反应(PCR)技术对临床分离的 22 株 MDRA β -内酰胺酶编码基因进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定 收集 2010 年 8 月—2011 年 7 月我院临床分离的非同一患者的 MDRA 22 株。应用法国公司 API20NE 试验条(生物梅里埃公司,法国)和 WalkAway-40 微生物鉴定/药敏测试系统(西门子公司,德国)进行细菌鉴定。同时用大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853 作为室内质控的标准菌株。

1.2 药敏试验 药敏试验为肉汤稀释法。采用西门子的 WalkAway-40 微生物鉴定/药敏测试系统测定 AB 对 11 种抗菌药物的敏感性,分别为头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星和复方磺胺甲噁唑。结果判读根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)2011 年版标准进行。采用 WHO-

NET 5.4 进行数据分析。

1.3 PCR 扩增模板制备 将分离的 AB 接种于 LB 液体培养基(碧云天,中国)中培养 24 h,取 1.5 mL 培养过夜的菌液,13 000 r/min 离心 30 s,使用树脂型 TM 基因组 DNA 提纯试剂盒(赛百盛,中国)提取细菌 DNA, -20℃ 冰箱保存备用。

1.4 PCR 耐药基因检测 各种目的基因(*TEM*、*SHV*、*CTX-M*、*PER*、*DHA*、*IMP*、*VIM*、*SIM*、*OXA-23*、*OXA-24*、*OXA-58*)的引物序列^[5]见表 1。分别向 EQ2.2-25 PCR 反应体系管中加入 0.5 mmol/L 上下游引物各 1 μ L, 10 mmol/L $MgCl_2$ 3 μ L, 1 U DNA 聚合酶 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 2.5 μ L, 10×反应缓冲液 2 μ L, DNA 模板液 3 μ L, ddH₂O 加至 20 μ L。PCR 反应条件:预变性 95℃ 5 min、变性 95℃ 20 s、退火 59℃ 40 s、延伸 72℃ 60 s,循环 35 个周期,最后延伸 72℃ 5 min。PCR 产物分析,运用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳,电压 80 V,时间为 40 min,使用凝胶成像系统观察凝胶,并拍照记录结果。

1.5 *PER* 基因亚型的确定 使用双脱氧末端终止法检测 *PER* 耐药基因序列并分型。

2 结果

2.1 药敏试验 22 株 MDRA 对头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星和复方磺胺甲噁唑耐药率均为 100.00%。对亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 50.00%、40.91%、31.82%,中介率分别为 31.82%、36.36%、31.82%。

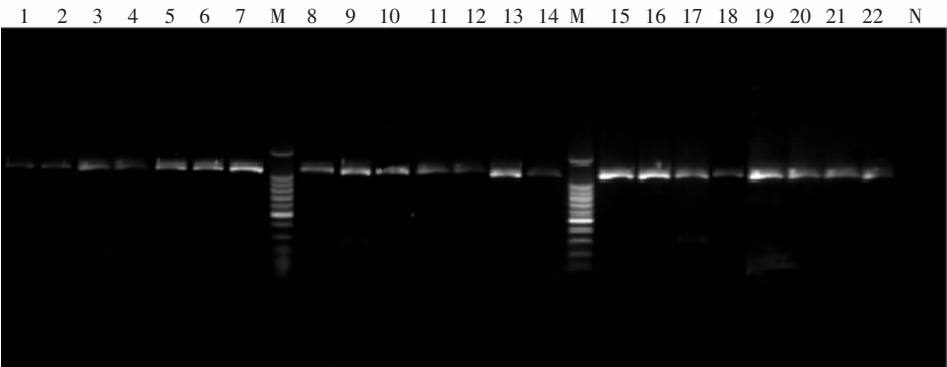
2.2 耐药基因 PCR 检测结果 22 株(100.00%) AB 携带耐药基因 *OXA-23* 群,16 株(72.73%)携带 *TEM*,12 株(54.55%)携带 *IMP*,4 株(18.18%)携带 *PER*。*SHV*、*CTX-M*、*DHA*、*VIM*、*SIM*、*OXA-24* 群、*OXA-58* 群基因检测均为阴性。部分电泳图见图 1~3。

2.3 *PER* 耐药基因亚型 使用双脱氧末端终止法证实 4 株 *PER* 基因为 *PER-1* 型基因。见图 4。

表 1 耐药基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for drug-resistant genes

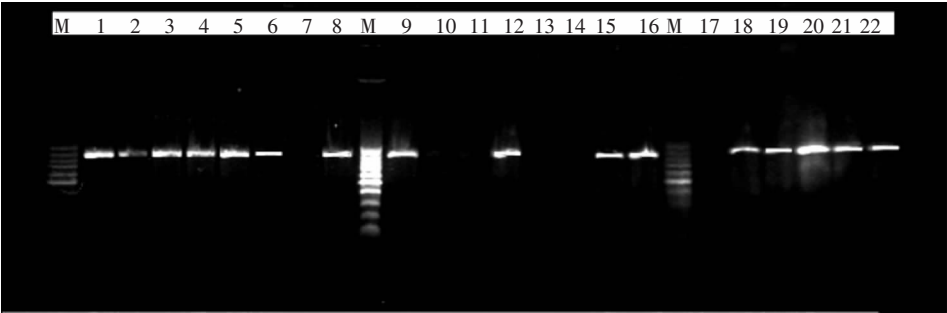
耐药基因	分型	引物序列(5'→3')		目的片段长度(bp)
超广谱 β-内酰胺酶基因	TEM	上游引物	ATGAGTATTCAACATTTCCGT	861
		下游引物	TTACCAATGCTTAATCAGTGA	
	SHV	上游引物	CCGGGTATTCTTATTTGTCGCT	831
		下游引物	TAGCGTTGCCAGTGCTCG	
	CTX-M	上游引物	GATTGACCGTATTGGGAGTTT	947
		下游引物	CGGCTGGGTAAAATAGGTCA	
	PER	上游引物	GTTAATTTGGGCTTAGGGCAGA	855
		下游引物	CAGCGCAATCCCCACTGT	
头孢菌素酶基因	DHA	上游引物	AAC TTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
金属酶基因	IMP	上游引物	CATGGTTTG GTGTTCTTGT	488
		下游引物	ATAATTTGGCGGACTTTGGC	
	VIM	上游引物	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	780
		下游引物	TGCTACTCAACGACTGAGCG	
	SIM	上游引物	ACAAGGGATTCTGGCATCGTT	355
		下游引物	TTATCTTGAGTGTGTCTCTGG	
碳青霉烯酶类基因	OXA-23 群	上游引物	GATGTGTCATAGTATTCGTCG	1 058
		下游引物	TCACAACA ACTAAAAGCACTG	
	OXA-24 群	上游引物	GTACTAATCAAAGTTGTGAA	825
		下游引物	TTCCCCTAACATGAATTTGT	
	OXA-58 群	上游引物	CGATCAGAATGTTCAAGCGC	528
		下游引物	ACGATTCTCCCTCTGCGC	



N: 阴性对照; 编号 1—22: 为 22 株 MDAB; M: 相对分子质量标志, 由上而下分别为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp

图 1 MDAB OXA-23 群基因 PCR 扩增电泳图谱

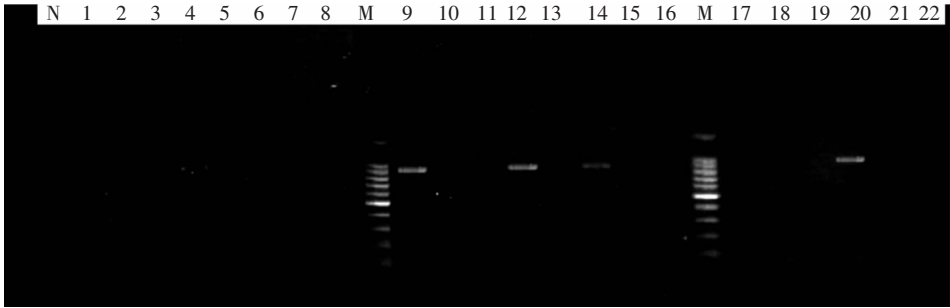
Figure 1 PCR amplification electrophoresis map of OXA-23-type β-lactamase genes in MDAB



N: 阴性对照; 编号 1—22: 为 22 株 MDAB; M: 同上

图 2 MDAB TEM 型基因 PCR 扩增电泳图谱

Figure 2 PCR amplification electrophoresis map of TEM-type β-lactamase genes in MDAB



N:阴性对照;编号 1—22:为 22 株 MDRAB;M:同上

图 3 MDRAB *PER* 型基因 PCR 扩增电泳图谱

Figure 3 PCR amplification electrophoresis map of *PER*-type β -lactamase genes in MDRAB

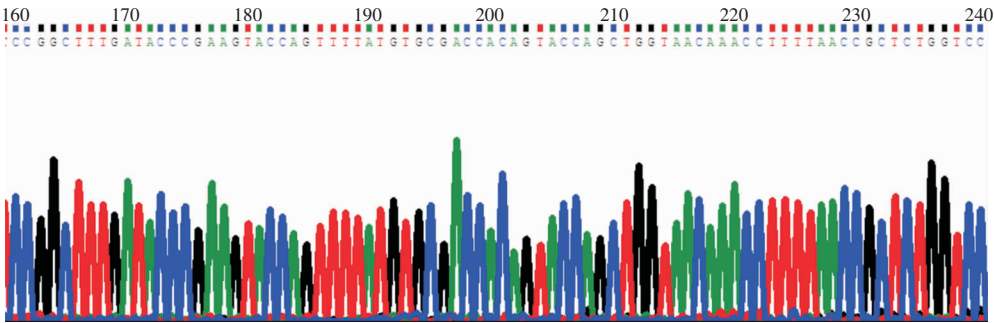


图 4 *PER* 基因序列图

Figure 4 Sequences of *PER* gene

3 讨论

本研究显示 MDRAB 对头孢哌酮/舒巴坦耐药率最低,其敏感性高于碳青霉烯类抗生素,因此,前者仍不失为治疗 MDRAB 感染的有效药物之一。

超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 基因主要包含 *TEM*、*SHV*、*CTX-M*、*PER* 等,其中 *TEM* 基因是检出次数最多的基因型。国内外报道的 AB 携带 *TEM* 型基因已超过 100 多种^[6-7]。本组实验共有 16 株 MDRAB 携带 *TEM* 型基因,是本次实验检出率最高的 ESBLs 基因型,且该 16 株菌对头孢他啶、头孢吡肟均表现为耐药,但部分菌株对亚胺培南、美罗培南、头孢哌酮/舒巴坦表现为中介或敏感。携带 *TEM* 型 ESBLs 的 AB 能水解青霉素类、头孢菌素和氨基南等,但对碳青霉烯类药物敏感,且其活性能被 β -内酰胺酶抑制剂抑制^[8]。本研究检出 4 株携带 *PER* 型 ESBLs 基因的 AB,对环丙沙星、阿米卡星、头孢他啶均耐药,这主要由于 *PER* 型 ESBLs 的作用靶标广泛,可导致细菌同时对氨基糖甙类、氟喹喏

酮类药物的耐药,尤其对氧亚氨基头孢菌素具有高度的水解活性^[9]。

IMP 型金属酶 1999 年在意大利首次发现于铜绿假单胞菌中,随后国外各地报道了产 *IMP* 型金属酶 AB^[10-11],国内宗志勇等^[12]首次报道该基因。金属酶能水解几乎所有 β -内酰胺类抗生素,并且现有 β -内酰胺酶抑制剂不能抑制其水解活性,因此,携带该类基因的细菌可对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类药物以及 β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂的药物耐药。经过检测 *IMP*、*VIM*、*SIM* 3 个类型金属酶基因,发现 22 株 MDRAB 中有 12 株菌含有 *IMP* 型金属酶基因,提示该院 MDRAB 对碳青霉烯类、头孢哌酮/舒巴坦耐药率较高与携带 *IMP* 型金属酶基因有关。

AB 携带的 D 类碳青霉烯酶根据同源性的不同可分为 4 个亚群,分别为: *OXA-23* 群 (*OXA-23*、*OXA-27*、*OXA-49*)、*OXA-24* 群 (*OXA-24/40*、*OXA-25*、*OXA-26*、*OXA-72*)、*OXA-58* 群 (*OXA-58*、*OXA-96*)、*OXA-51* 群。碳青霉烯酶基因主要位于染色体上,*OXA-51* 群基因可存在于 AB 所有的

染色体上,因此 OXA-51 群遗传物质是 AB 重要的基因遗传标志^[13-15]。本次采用单管 PCR 反应体系,对 22 株 MDRAB 的 OXA-23 群、OXA-24 群、OXA-58 群基因进行检测,结果发现 22 株 AB 均携带了 OXA-23 群碳青霉烯酶基因。结合该院 AB 对亚胺培南、美罗培南的耐药性,提示该院 AB 对碳青霉烯类药物耐药率较高主要源于其较高的 OXA-23 群基因携带率。该基因的高携带率可能与其上游的 ISAba1 启动序列促进 OXA-23 群基因水平转移有关^[13]。

[参 考 文 献]

[1] 史俊艳, 张小江, 徐英春, 等. 2007 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 9(3): 196 - 200.

[2] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5): 321 - 329.

[3] 张小江, 徐英春, 俞云松, 等. 2009 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(6): 441 - 445.

[4] 朱德妹, 汪复, 胡付品, 等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(5): 321 - 329.

[5] Sung JY, Kwon KC, Park JW, et al. Dissemination of IMP-1 and OXA type beta-lactamase in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Korean J Lab Med, 2008, 28(1): 16 - 23.

[6] 侯天文, 尹晓琳, 李玮, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌相关耐药基因检测分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(4): 379 - 383.

[7] 季萍, 张朝霞, 于飞, 等. 新疆地区鲍曼不动杆菌 β -内酰胺酶基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(8): 496 - 498.

[8] 刘原, 韩新鹏, 谭湘淑, 等. 西安地区鲍曼不动杆菌超广谱 β -内酰胺酶基因研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2008, 39(6): 1040 - 1042.

[9] Yamano Y, Nishikawa T, Fujimura T, et al. Occurrence of PER-1 producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan and their susceptibility to doripenem [J]. J Antibiot (Tokyo), 2006, 59(12): 791 - 796.

[10] Lee K, Ha GY, Shin BM, et al. Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas spp.* and increase of IMP-producing *Acinetobacter spp.* [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 50(1): 51 - 58.

[11] Gales AC, Tognim MC, Reis AO, et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 45(1): 77 - 79.

[12] 宗志勇, 吕晓菊, 高燕渝, 等. 产金属 β -内酰胺酶的鲍氏不动杆菌在我国内地出现[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(10): 603 - 605.

[13] H  ritier C, Poirel L, Fournier PE, et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(10): 4174 - 4179.

[14] 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.

[15] Turton JF, Woodford N, Glover J, et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2974 - 2976.

(本文编辑:周鹏程)