

鲍曼不动杆菌耐药性监测与碳青霉烯酶基因型研究

宋晓萍^{1△} 董全江¹ 李程² 孙明娥¹ 路建中¹ 孙滨¹

(1 青岛市海慈医疗集团检验科 山东 青岛 266033 2 青岛市市立医院检验科 山东 青岛 266011)

摘要 目的 对鲍曼不动杆菌耐药性及碳青霉烯酶基因型进行研究,以指导临床合理应用抗生素。方法 收集青岛市海慈医疗集团2009年6月至2010年6月从临床分离的鲍曼不动杆菌60株,用琼脂稀释法测定最低抑菌浓度(MIC),改良Hodge试验检测碳青霉烯酶,用PCR法检测OXA-23、OXA-24、OXA-58基因,并对PCR产物进行测序。结果 ①鲍曼不动杆菌检出率前两位是ICU病房和呼吸科病房,分别占32.3%和27.4%,多重耐药鲍曼不动杆菌阳性率最高的是ICU,为70.6%(12/17),其次为呼吸科病房,为35.0%(7/20),哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星、头孢哌酮/舒巴坦、氨曲南耐药率分别为92.3%、55.4%、88.6%、86.3%、80.3%、30.0%、35.0%、76.6%、79.6%、75.1%、87.1%、48.3%、42.0%和79.6%。②在21株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,有14株碳青霉烯酶表型阳性,检出率为66.7%,有18株PCR扩增出OXA-23基因,检出率85.7%,全部菌株blaOXA-24及blaOXA-58PCR扩增均为阴性,PCR产物测序表明与鲍曼不动杆菌(AY795964.1)blaOXA-23基因序列100%同源。结论 鲍曼不动杆菌多重耐药性严重,表型和基因型检测证实本院临床分离鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药机制主要是产OXA-23型酶。

关键词 鲍曼不动杆菌 碳青霉烯酶 基因型

中图分类号 R378,R978.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)07-1336-04

Acinetobacter baumannii resistance monitoring and research of carbapenemase genotypes

SONG Xiao-ping¹, DONG Quan-jiang¹, LI Cheng², SUN Ming-e¹, LU Jian-zhong¹, SUN Bin¹

(1 Department Of Clinical Laboratory, Qingdao Hiser Medical Group, 266033, Qingdao, China;

2 Department Of Clinical Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, 266011, Qingdao, China)

ABSTRACT Objective: To investigate antibiotic resistance and carbapenemases genotype in *Acinetobacter baumannii*, so as to guide the rational use of antibiotics in clinical. **Methods:** A total of 60 clinical isolates were collected from June 2009 to June 2010 in the Qingdao Hiser Medical Group. Agar dilution method was used to test minimum inhibitory concentrations(MICs) of 14 antibiotics, Hodge test was used to detect carbapenemases, PCR was used to detect OXA-23, OXA-24, OXA-58 genes, and the positive products of OXA genes were sequenced. **Results:** ① The first and the second detection rate of *A. baumannii* is ICU ward and respiratory ward, which accounted for 32.3% and 27.4%, the highest positive rate of Multi-drug resistant *A. baumannii* is ICU, 70.6% (12/17), followed by respiratory ward, 35.0% (7/20). the resistance rates of 60 isolates to piperacillin, piperacillin / tazobactam, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, Gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, cefoperazone / sulbactam and aztreonam, were 92.3%, 55.4%, 88.6%, 86.3%, 80.3%, 30.0%, 35.0%, 76.6%, 79.6%, 75.1%, 87.1%, 48.3%, 42.0% and 79.6% respectively. ② In the 21 strains of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, carbapenemase phenotypic testing results showed that the positive strains were 14, the detection rate of which was 66.7%. 18 strains detected OXA-23 gene, the detection rate of which was 85.7%. All strains were not detected blaOXA-24 and blaOXA-58 genes. The sequenced results were absolutely homology with blaOXA-23 gene. **Conclusion:** The multi-drug resistance phenomenon of *Ab* are serious; Phenotype and genotype test confirmed the mainly mechanism of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* are producing OXA-23-type enzyme in our hospital.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; Carbapenemases; genotype;

Chinese Library Classification: R378, 978.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1336-04

前言

鲍曼不动杆菌是重要的医院感染病原菌,在发生于下呼吸道医院感染的革兰阴性病原菌中,其仅次于大肠埃希菌和铜绿

假单胞菌,居第三位^[1]。且鲍曼不动杆菌的耐药性呈上升趋势,尤其是出现了碳青霉烯类抗生素耐药菌株,给临床治疗带来很大挑战。本研究旨在对本院鲍曼不动杆菌耐药性及碳青霉烯酶基因型进行研究,为临床防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集2009年6月至2010年6月青岛市海慈医疗医院分

作者简介 宋晓萍(1978),女,研究生,主管检验师,主要研究方向 病原生物学

△通讯作者 宋晓萍,电话:13375565072, E-mail: qdgads@163.com

(收稿日期 2011-01-06 接受日期 2011-01-31)

离的鲍曼不动杆菌 60 株(同一患者无重复菌株)。菌株来源为：痰液、血液、尿液、分泌物。所有菌株均由 VITEK2-compact 微生物鉴定系统 GNI 卡鉴定。

1.2 主要仪器及试剂

VITEK2-compact 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃) ;PTC-200 型扩增仪(美国伯乐) ;Tanon EPS-100 型电泳仪(北京原平皓生物技术有限公司) ;MIT-P 型多点接种仪(日本 Sakuma) 细菌浊度仪(英国 Oxoid 公司)。实验中所用抗菌药物 左氧氟沙星、环丙沙星、加替沙星、哌拉西林、哌拉西林 / 他唑巴坦、头孢哌酮 / 舒巴坦、头孢吡肟、头孢他啶及头孢曲松均购自中国药品生物制品检定所 ;阿米卡星、庆大霉素、氨曲南、亚胺培南及美罗培南购自杭州默沙东公司 ;厄他培南纸片(ETP) 及 MH 粉剂均购自英国 Oxoid 公司 ;PCR 反应体系及引物均来自上海赛百盛基因技术有限公司。以本实验室保存的铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希氏菌 ATCC25922 作为质控菌株。

1.3 抗菌药物敏感试验

采用琼脂稀释法检测菌株对 14 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),实验方法及结果判断标准参照 CLSI2008 年版。

1.4 碳青霉烯酶表型检测

根据药敏结果筛选出对碳青霉烯类药物耐药的鲍曼不动杆菌,采用 Jeon 等^[2]报道的改良 Hodge 试验方法。即取单个菌落接种于 L-B 液体培养基中,在 35℃震荡并培养过夜。把配制好的 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌 ATCC25922 涂于 MH 平板上,等菌液干后在平板中央贴厄他培南纸片,然后挑取 L-B 培养基中已培养好的菌株从纸片外缘向平板边缘划一直线,置 35℃细菌培养箱过夜。产碳青霉烯酶的菌株会在厄他培南抑菌圈内呈现矢状生长。

1.5 OXA 酶基因检测

采用热裂解法提取模版, blaOXA-23、blaOXA-24 引物及反应条件参考文献^[3] blaOXA-58 引物及反应条件参考文献^[4], PCR 引物、序列及大小(表 1), PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,

紫外灯下观察结果并用凝胶成像仪照相保存结果。

1.6 PCR 产物测序

PCR 产物采用 Sanger 双脱氧链终止法进行双向序列测定,由上海英骏生物技术有限公司 ABI 377 全自动 DNA 测序仪完成。结果在 GenBank 基因库中比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

2 结果

2.1 菌株科室分布

共分离到鲍曼不动杆菌 60 株,检出率以 ICU 病房最高,占总数的 53.3%(32 / 60);其次为呼吸科病房,占 23.3%(14 / 60)。多重耐药鲍曼不动杆菌主要分布于 ICU 病房及呼吸科,分别占总数的 76.9%和 15.4%,尤其 ICU 病房中 62.5%鲍曼不动杆菌都呈现多重耐药性(表 2)。

2.2 药敏结果

分离的 60 株鲍曼不动杆菌对 14 种抗生素药敏检测结果(表 3)。

2.3 碳青霉烯酶表型检测结果

在 21 株耐碳青霉烯类药物的鲍曼不动杆菌中有 14 株碳青霉烯酶表型试验阳性,检出率为 66.7%(14/21)。在阳性的 14 株中有 10 株矢状线非常明显,药敏显示对亚胺培南和美罗培同时耐药,其余 4 株仅对美罗培南耐药。有 7 株碳青霉烯酶表型试验阴性,未检出碳青霉烯酶。

2.4 PCR 扩增结果

在 21 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,有 18 株 OXA-23 基因 PCR 扩增到大小一致,约 1000 bp 的条带,3 株阴性,检出率为 85.7%; OXA-24 及 OXA-58 基因 PCR 扩增电泳结果均没有出现条带,故全部菌株 blaOX A-24 及 blaOX A-58PCR 扩增均为阴性。以上所有结果均重复两次以上,结果均相同(图 1)。

2.5 PCR 产物测序结果

经比对, OXA23 扩增产物序列与耐药基因 blaOXA23 (GenBank AY795964. 1) 序列 100%一致。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The sequences of primers used for PCR

Primer	Sequence(5' - 3')	Product size/bp
blaOXA-23	R: TCACAACAATAAAAGCACTGT	1058
	F :GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	
blaOXA-24	R: TTAA ATGATTCCAAGATTTTCTAGC	825
	F :ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	
blaOXA-58	R: TAACCTCAAACCTCTAATTC	934
	F: TTATCAAAATCCAATCGGC	

表 2 鲍曼不动杆菌来源分布

Table 2 The source distribution of A cinetobacter baumannii

Source	The number of AB [▲]		The number of MDRAB [●]		Relevance ratio of the department(%)
	Strain amount	Constituent ratio(%)	Strain amount	Constituent ratio(%)	
ICU	32	53.3	20	76.9	62.5
Pneumnology department	14	23.3	4	15.4	28.6

Generalsurgerydepartment	6	10.0	1	3.8	16.7
Military surgery	5	8.3	1	3.8	20.0
Dermatologicaldepartment	1	1.7	0	0.0	0.0
Others	2	3.3	0	0.0	0.0
Total	60	100.0	26	100.0	

Note : ▲ Acinetobacter baumannii ; ● multi-drug resistant Acinetobacter baumannii

表 3 60 株临床分离鲍曼不动杆菌对 14 种抗菌药物的药敏检测结果 (%)

Tab 3 the susceptibility test results of 60 isolates to 14 kinds of antibiotics

Drugs	R%	I%	S%
Piperacillin	92.0	2.5	5.5
Piperacillin / tazobactam	55.4	22.4	22.2
Ceftriaxone	88.6	9.5	1.9
Ceftazidime	86.3	2.1	11.6
Cefepime	80.3	11.0	8.7
Imipenem	30.0	7.0	63.0
Meropenem	35.0	9.0	56.0
Gentamicin	76.6	1.2	22.2
Amikacin	79.6	3.5	16.9
Ciprofloxacin	75.1	3.0	21.9
Levofloxacin	87.1	5.1	7.8
Gatifloxacin	48.3	26.0	25.7
Cefoperazone / sulbactam	42.0	23.8	34.2
Aztreonam	79.6	0.5	19.9

Note:M, DNA Marker;1:negative control;9:positive control;3:Imipenem and meropenem both sensitive Ab.

2, 4:Sensitive to imipenem,but meropenem resistant Ab. 5-8 :imipenem and meropenem resistant Ab

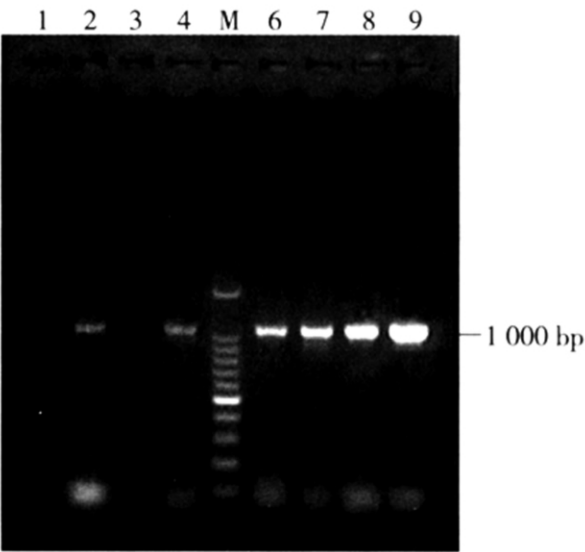


图 1 OXA-23PCR 产物电泳结果

Fig1 Electrophoresis result of OXA-23 PCR product

3 讨论

随着临床上越来越广泛地使用各种新型广谱抗生素,鲍曼

不动杆菌在临床上的检出率及对各种抗生素的耐药率呈逐年上升趋势.近几年甚至出现了对亚胺培南等碳青霉烯类药物耐药的菌株,给临床治疗带来新的挑战。鲍曼不动杆菌的耐药机制包括外膜孔蛋白的丢失、外排泵的激活、青霉素结合蛋白的改变,而最重要的是碳青霉烯酶的产生^[5]。

2009 年 6 月至 2010 年 6 月青岛市海慈医疗集团分离的鲍曼不动杆菌 60 株,检出率以 ICU 病房最高,占总数的 53.3% (32 / 60) ,其次为呼吸科病房,占 23.3% (14 / 60) 。ICU 收治的患者均病情危重,住院时间较长且侵入性操作较多,加之长期大量使用各类抗生素;而呼吸科收治的大多为老年患者,这些病人均有基础病,且抵抗力低下,加之也长期大量的使用抗生素,上述原因使这两个科室鲍曼不动杆菌的医院感染率明显高于其他病房。其次青岛市海慈医院检出的鲍曼不动杆菌耐药性强,环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星耐药率为 75.1%、87.1%、48.3%,哌拉西林、哌拉西林 / 他唑巴坦耐药率为 92.3%、55.4%,头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮 / 舒巴坦耐药率为 88.6%、86.3%、80.3 %、42.0 %,庆大霉素、阿米卡星为 76.6%、79.6 %,氨曲南、亚胺培南、美罗培南耐药率为 79.6%、30.0%、35.0%,这与 2008 年 CHINET 监测的结果基本

一致^[6],也与其他学者报道基本一致^[7-8]。检到的 26 株多重耐药鲍曼不动杆菌中,以 ICU 病房检出率最高,占 76.9% (20 / 26) 其次为呼吸科,占 15.4% (4 / 26) 。ICU 病房分离的鲍曼不动杆菌中,多重耐药菌占 62.7%,耐药性极其严重。OXA23 型苯唑西林酶 (oxacillinase) 属于 D 类 β - 内酰胺酶,能水解头孢菌素类及碳青霉烯类抗生素,是引起鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因之一^[9-12]。本实验采用 Jeon 等改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶,结果有 14 株表型试验阳性,检测到碳青霉烯酶。依据药敏检测结果显示,对碳青霉烯类药物耐药的有 21 株,即有 7 株虽对亚胺培南和 (或) 美罗培南耐药,但表型试验却是阴性的,即未检测到碳青霉烯酶。究其原因可能是鲍曼不动杆菌在体外试验中产酶活性非常弱,以至于用改良 Hodge 试验检测不到 或者是青霉素结合蛋白改变、药物主动外排和膜孔道蛋白缺失中的 1 种或多种机制共同作用的结果。在 21 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,有 18 株检测到 OXA-23 基因,检出率为 85.7%,说明产 OXA-23 型碳青霉烯酶是本院耐碳青霉烯类药物鲍曼不动杆菌的主要耐药机制。这与国内外学者的报道基本相符^[13-16]。本试验中有 4 株基因检测阳性但表型阴性,碳青霉烯酶表型检测结果与基因检测结果的差异可能是由于碳青霉烯酶基因前面调控序列的缺失,使具有生物活性的碳青霉烯酶不能表达,也有可能是基因在转录或转录后加工修饰过程中存在着缺陷,使碳青霉烯酶活性降低或根本无活性。有 3 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 OXA-23、OXA-24 及 OXA-58 基因均未检出,提示本院耐碳青霉烯类药物鲍曼不动杆菌的耐药机制,除了产碳青霉烯酶以外,极有可能是青霉素结合蛋白改变、外膜蛋白缺失和外排泵等^[17-18]多种机制共同作用的结果。因此有一部分 blaOXA 阴性的耐药株,其耐药机制还有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 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):272-274
Du Rong, Feng Ping, Chen Hui-li, et al. Acinetobacter baumannii clinical isolates resistant and OXA-carbapenemase genotype [J]. Sichuan University (Medical Sciences), 2009,40(2):272-274
- [2] 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
- [3] Byung Chan J, Seok H J, Il KB, et al. Investigation of nosocomial outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 β -lactamase in Korea [J]. J Clin Microbiol, 2005; 43(5):2241-2245
- [4] Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, et al. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant acinetobacter baumannii[J]. Clin Microbiol, 2007,45(2):453-460
- [5] Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Conejo MC, et al. Relationship between β -lactamase Production, outer membrane protein and Penicillin-binding protein profile on the activity of carbapenems against clinical isolates of Acinetobacter baumannii [J]. J Antimicrob Chemother, 2003,51:565-574
- [6] 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):321-330.
Wang Fu, Chu de-mei, Hu fu-pin, et al. In 2008, China CHINET surveillance of bacterial resistance [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy miscellaneous, 2009,9(5):321-330
- [7] 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):4054-4057
- [8] Ying CM, Ling T K, Lee CC, et al. Characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Shanghai and Hong Kong [J]. J Med Microbiol, 2006,55(Pt 6):799-802
- [9] Brown S, Amyes S G. The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii from four continents[J]. Clin Microbiol Infect, 2005,11(4):326-329
- [10] Federico P, Andrea M H, Kristine M H, et al. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007,51(10):3471-3484
- [11] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006,50(3):373-383
- [12] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology [J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(9):826-836
- [13] 王辉,孙宏莉,廖康,等.北京和广州地区四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):636-641
Wang Hui, Sun Hong-li, Liu Kang, et al. Beijing and Guangzhou in four hospitals Acinetobacter carbapenemase genotype [J]. Journal of Laboratory Medicine, 2005,28(6):636-641
- [14] Zhou H, Pi BR, Yang Q, et al. Dissemination of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii strains carrying the ISAba1 blaOXA-23 genes in a Chinese hospital [J]. J Med Microbiol, 2007,56(8):1076-1080
- [15] 刘原,谭湘淑,韩新鹏.西安地区耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶及同源性研究[J].中国感染与化疗杂志,2009,9(1):37-41
Liu Yuan, Tan Xiang-shu, Han Xin-peng. Xi'an imipenem-resistant Acinetobacter baumannii in carbapenem enzyme homology [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2009,9(1):37-41
- [16] Koh TH, Sng LH, Wang GC, et al. MI P 4 and OXA lactamases in Acinetobacter baumannii from Singapore [J]. J Antimicrob Chemother, 2007,59(4):627-632
- [17] Villegas MV, Kattan JN, Correa A, et al. Dissemination of Acinetobacter baumannii clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian Hospitals [J]. Antimicrob Agents Chemother 2007,51(6):2001-2004
- [18] Bratu S, Landman D, Martin DA, et al. Correlation of antimicrobial resistance with β -Lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of Acinetobacter baumannii endemic to New York city [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008,52(9):2999-3005