

· 论 著 ·

## 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的 OXA 酶基因研究\*

陆丹倩<sup>1</sup>, 芮勇宇<sup>2</sup>, 杨秋<sup>2</sup>, 顾向明<sup>1</sup>, 邓冲<sup>1</sup>, 王巧媚<sup>1</sup>, 邓聚辉<sup>1</sup>, 刘美嫦<sup>3</sup>

(1. 广东省中山市中医院检验科 528400; 2. 南方医科大学南方医院, 广州 510515; 3. 广东医科大学, 广东湛江 523770)

**摘要:**目的 研究广东省中山市中医院分离耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)耐药性、苯唑西林(OXA)酶基因及流行特性。方法 收集广东省中山市中医院 2012 年 7 月至 2013 年 12 月临床分离 40 株 CRAB, 采用纸片扩散法(K-B 法)药敏试验, 改良 Hodge 试验筛查碳青霉烯酶; 用聚合酶链式反应(PCR)法对  $\beta$ -内酰胺酶基因 oxa-23, oxa-24, oxa-51 和 oxa-58 进行扩增、序列分析。结果 40 株 CRAB 对 16 种药物中, 对多黏菌素和米诺环素敏感性最高, 耐药率小于或等于 5.0%; 改良 Hodge 试验阳性 29 株(占 72.5%); 所有菌株均被检测到含有 oxa-51 基因(占 100.0%), oxa-23 基因为 38 株(占 95.0%), 未检出 oxa-24 和 oxa-58 基因。结论 oxa-51 及 oxa-23 基因是广东省中山市中医院流行 CRAB 的主要基因型。

**关键词:**耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌; 改良 Hodge 试验; 聚合酶链式反应; 苯唑西林

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.22.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)22-3108-03

Research on OXA carbapenemases gene of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*\*LU Danqian<sup>1</sup>, RUI Yongyu<sup>2</sup>, YANG Qiu<sup>2</sup>, GU Xiangming<sup>1</sup>, DENG Chong<sup>1</sup>, WANG Qiaomei<sup>1</sup>, DENG Juhui<sup>1</sup>, LIU Meichang<sup>3</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Zhongshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan, Guangdong 528400, China; 2. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 3. Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 523770, China)

**Abstract:** Objective To investigate the drug resistance of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*(CRAB) clinically isolated from hospital, OXA carbapenemases gene and epidemiological characteristics. Methods A total of 40 clinically isolated strains of CRAB were collected in this hospital from July 2011 to December 2012. oxa-23, oxa-24, oxa-51 and oxa-58 were amplified and sequenced by adopting the PCR method. Results Forty strains of CRAB had the highest sensitivity to polymyxin B and minocycline among 16 kinds of drugs, with the resistance rate less than 5.0%; 29 strains(72.5%) were positive in the modified Hodge test; the oxa-51 gene was detected in all strains, accounting for 100.0%, in which 38 strains(95.0%) contained oxa-23 gene, no oxa-24 and oxa-58 genes were detected. Conclusion oxa-51 and oxa-23 genes are the main genotypes of epidemic CRAB in Zhongshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine.

**Key words:** CRAB; modified Hodge test; PCR; OXA

近年来, 鲍曼不动杆菌成为医院感染的重要病原菌<sup>[1-2]</sup>, 多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)菌株和耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)的分离比例逐年升高<sup>[3-4]</sup>。鲍曼不动杆菌的耐药机制主要是产碳青霉烯酶水解酶, 且碳青霉烯酶主要为 D 类苯唑西林(OXA)酶<sup>[5]</sup>。OXA 酶仅见于不动杆菌, 其对  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物高度耐药, 能降低外膜蛋白表达或外排系统增强, 产生多重耐药。OXA 酶主要包括 4 组: OXA-23 型、OXA-24 型、OXA-51 型和 OXA-58 型<sup>[6]</sup>。笔者对广东省中山市中医院 2012 年 7 月至 2013 年 12 月临床分离 40 株 CRAB 的耐药现状及其 OXA 酶基因携带情况进行研究, 以了解其是否存在突变、突变对耐药性的影响, 摸清医院 CRAB 的耐药机制及流行克隆情况。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 40 株 CRAB 来自广东省中山市中医院 2012 年 7 月至 2013 年 12 月住院患者送检痰液、伤口分泌物、中段尿及血液标本, 同一患者留取初次分离菌株。采用美国 BD 公司 Phoenixtm 100 全自动细菌鉴定仪对所有菌株进行分离。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853

均由国家卫生和计划生育委员会临床检验中心提供。

**1.2 抗菌药物** 用于纸片扩散法(K-B 法)药敏试验的抗菌药物共 17 种: 米诺环素、多黏菌素 B、头孢哌酮/舒巴坦、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、头孢吡肟、四环素、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林、阿米卡星、庆大霉素、哌拉西林/他唑巴坦、头孢西丁。药敏纸片均为英国 oxiod 公司产品, MH 平板均购自江门凯林公司。

**1.3 仪器与试剂** 聚合酶链式反应(PCR)扩增仪器购自德国 Eppendorf 公司, 凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司。dNTPs、TaqDNA、聚合酶、蛋白酶 K 和 DNA Marker 由大连瑞真生物技术有限公司提供。PCR 引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、10% 十二烷基磺酸钠购自北京鼎国生物技术有限公司。

**1.4 碳青霉烯酶检测** 采用改良 Hodge 试验, 以 0.5 麦氏浊度单位的大肠埃希菌 ATCC25922 菌悬液涂布 MH 平板, 中间贴 10  $\mu$ g/片美罗培南纸片, 将测试菌用接种环以美罗培南纸片为中心向平板边缘划接种线(注意不要划破平板表面)。35  $^{\circ}$ C 孵育 18~24 h 后观察结果, 美罗培南抑菌圈处出现变形者为

\* 基金项目: 广东省中山市科技局基金资助项目(2014A1FC052)。

作者简介: 陆丹倩, 女, 副主任技师, 主要从事临床微生物学方面的研究。

待测菌产碳青霉烯酶。

**1.5 OXA 酶基因检测** 反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ ：含  $\text{Mg}^{2+}$  的  $10\times$ buffer 2  $\mu\text{L}$ ，dNTP 终浓度为 200  $\mu\text{mol/L}$ ，上下游引物分别为 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ ，TaqDNA 聚合酶 1 U，用灭菌去离子水加至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件：95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min；95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s，50~60  $^{\circ}\text{C}$  退火并延伸 1 min，35 个循环；最后 72  $^{\circ}\text{C}$

延伸 10 min。具体退火温度，见表 1。电泳 PCR 反应结束后，取 5  $\mu\text{L}$  扩增产物与 1  $\mu\text{L}$   $6\times$  Loading buffer 上样缓冲液混匀，在 1% 琼脂糖凝胶中电泳，电泳 30 min（缓冲液为  $0.5\times$  TBE，电压为 5 V/cm）。通过凝胶成像仪读取电泳结果。DNA Marker 为 DL2000。

表 1 OXA 酶基因 PCR 引物

目的基因	引物名称	引物序列(5'~3')	片段大小(bp)	退火温度( $^{\circ}\text{C}$ )
oxa-23	oxa-23-F	GGACATAATCAGGTGATTCA	670	55
	oxa-23-R	TAGATGCCGGCATTCTCTGAC		
oxa-24	oxa-24-F	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	780	55
	oxa-24-R	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC		
oxa-51	oxa-51-F	TAATGCTTTGATCGGCCCTTG	320	55
	oxa-51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
oxa-58	oxa-58-F	AGTATTGGGGCTTGTGCT	740	55
	oxa-58-R	AACTTCCGTGCCTATTTG		

**2 结 果**

**2.1 标本来源及临床分布** 40 株 CRAB 标本来源痰液 29 株（占 72.5%）、伤口分泌物 9 株（占 22.5%）、静脉血 1 株（占 2.5%）及中段尿 1 株（占 2.5%）；临床分布重症监护室（ICU）18 株（占 45.0%）、内科 10 株（占 25.0%）、骨科 7 株（占 17.5%）、外科 5 株（占 12.5%）。

**2.2 耐药性分析** 40 株 CRAB 对常用 17 种抗菌药物的耐药性分布，见表 2。

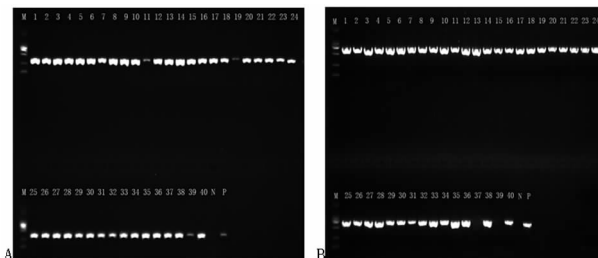
表 2 40 株 CRAB 对 17 种抗菌药物的耐药率（%）

抗菌药物	敏感	中介	耐药
米诺环素	97.5	0.0	2.5
多黏菌素 B	95.0	0.0	5.0
头孢哌酮/舒巴坦	5.0	75.0	20.0
左氧氟沙星	10.0	35.0	55.0
复方磺胺甲噁唑	37.5	0.0	62.5
氨苄西林/舒巴坦	0.0	23.6	76.4
环丙沙星	5.0	0.0	95.0
头孢吡肟	0.0	5.0	95.0
四环素	2.5	0.0	97.5
头孢他啶	0.0	0.0	100.0
亚胺培南	0.0	2.5	97.5
美罗培南	0.0	0.0	100.0
哌拉西林	0.0	0.0	100.0
阿米卡星	0.0	0.0	100.0
庆大霉素	0.0	0.0	100.0
哌拉西林/他唑巴坦	0.0	0.0	100.0
头孢西丁	0.0	0.0	100.0

**2.3 碳青霉烯酶检测** 改良 Hodge 试验结果，40 株 CRAB 的改良 Hodge 试验结果显示，阳性 29 株（占 72.5%）呈矢状生

长，阴性 11 株（占 27.5%）。

**2.4 OXA 酶基因检测结果** 40 株 CRAB 中，40 株 oxa-51 阳性（占 100.0%），38 株 oxa-23 阳性（占 95.0%），未检出 oxa-24 和 oxa-58。电泳结果，见图 1。



注：图 1A 为 oxa-51 电泳结果，图 1B 为 oxa-23 电泳结果。

图 1 OXA 酶基因电泳结果

**3 讨 论**

目前，鲍曼不动杆菌临床检出率逐年升高，以呼吸道感染最常见<sup>[4,7-8]</sup>。本研究显示，其以呼吸道感染为主（占 72.5%，29/40），其次为伤口感染（占 22.5%，9/40）、血流感染（占 2.5%，1/40）和泌尿系感染（占 2.5%，1/40）。提示鲍曼不动杆菌在呼吸系统容易引起感染或定植，难以清除。分布科室主要是以 ICU 为主<sup>[9-10]</sup>，可能与 ICU 患者住院时间长、病情严重、机体免疫力差、大量使用广谱抗菌药物及各种侵入性检查和治疗等有关。

耐药性分析显示，鲍曼不动杆菌耐药情况严重，呈多重耐药和泛耐药。目前，广东省中山市中医院 40 株 CRAB 对多黏菌素 B、米诺环素敏感性最高，耐药率分别为 2.5%、5.0%，对头孢哌酮/舒巴坦耐药率为 20.0%，故上述 3 种药物可作为 CRAB 感染的治疗选择。其他 13 种抗菌药物耐药率为 55%~100%，表明 CRAB 耐药现象严重，临床应严格控制抗菌药物应用，减少鲍曼不动杆菌感染。

鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶是其主要耐药机制。碳青霉烯酶主要包括 A、B 和 D 等 3 类酶，主要为产 D 类酶（OXA 酶），仅见于不动杆菌。国内流行耐药基因为 oxa-23 和 oxa-

51<sup>[11-13]</sup>。本试验检测 40 株 CRAB 的 OXA 酶基因,结果显示所有菌株均携带有 oxa-51(占 100.0%),38 株 oxa-23 阳性(占 95.0%),未检测到 oxa-24 和 oxa-58,说明广东省中山市鲍曼不动杆菌的基因型是以 oxa-51 和 oxa-23 为主,与国内流行相符。oxa-51 是鲍曼不动杆菌的重要标志,也是鲍曼不动杆菌的固有基因<sup>[14]</sup>,可用以区别于其他不动杆菌属;水解碳青霉烯类药物能力较弱,不能水解头孢菌素类药物<sup>[15]</sup>。oxa-23 能介导细菌耐碳青霉烯类药物,是目前流行传播最广的 D 类碳青霉烯类基因。40 株 CRAB 中有 29 株改良 Hodge 试验表型检测为阳性(占 72.5%),11 株表型检测为阴性(占 27.5%),可能由于基因表达水平受诸多因素影响,低水平表达时表型无法检测而呈阴性。

本研究表明,广东省中山市中医院 CRAB 对常用抗菌药物耐药情况严重,最主要碳青霉烯酶基因型为 oxa-23,存在克隆传播流行。因此,医院应规范临床合理使用抗菌药物,加强对本地区 CRAB 耐药性及耐药机制的监测及关注,加强手卫生、患者隔离、环境清洁消毒等感控措施,其对指导临床合理用药、避免 CRAB 医院感染暴发流行具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(5):321-330.
- [2] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [3] 杨均均,黄文祥,史芳静,等. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌流行特征及耐药基因分析[J]. 中国抗生素杂志,2012,37(5):343-347.
- [4] 吴伟元,金晓菲,吴诗品,等. 深圳市人民医院近 8 年耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌感染特征及其克隆变迁[J]. 中华医学杂志,2015,95(8):585-590.
- [5] 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.

- [6] Jan WJ, Hoiby N. OXA-type carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother,2006,57(3):373-383.
- [7] 孙晴,张正银. 临床分离广泛耐药鲍曼不动杆菌同源性分析及常见耐药基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(1):28-31.
- [8] 王娟,宋立强,王磊,等. 下呼吸道感染广泛耐药鲍曼不动杆菌耐药性分析和部分碳青霉烯酶基因检测[J]. 国际呼吸杂志,2015,35(2):87-90.
- [9] 毛璞,李建春,邱桂霞,等. 重症监护病房耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(3):253-256.
- [10] 叶继辉,李超芬,丁群力. 亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌医院感染危险因素分析[J]. 浙江医学,2015,37(4):300-303.
- [11] 杨正海,李小宁. 碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌 OXA 酶基因研究[J]. 中国抗生素杂志,2015,40(3):203-207.
- [12] 李茜,李庆淑,李智,等. 青岛两所医院鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因及同源性分析[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(7):437-442.
- [13] 刘超梅,李雪梅,陈志英,等. 呼和浩特地区耐亚胺培南鲍曼不动杆菌耐药性及 OXA 基因检测[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(5):289-293.
- [14] 钟敏,黄文芳. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌产 OXA 酶的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2013,25(1):122-125.
- [15] Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterization of oxa-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(1): 15-23.

(收稿日期:2016-04-11 修回日期:2016-06-17)

(上接第 3107 页)

- 2008,24(6):649-653.
- [7] Bednarek J, Wysocki H, Sowiński J. Oxidative stress peripheral parameters in Grave's disease; the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy[J]. Clin Biochem, 2005, 38(1): 13-18.
- [8] 任利民,袁晓辉,王雅贤,等. 参芪王浆制剂对老龄大鼠皮肤和血清 SOD 的影响[J]. 医药学报,2005,33(4):41-42.
- [9] Aslan M, Cosar N, Celik H, et al. Evaluation of oxidative status in patients with hyperthyroidism[J]. Endocrine, 2011, 40(2):285-289.
- [10] Abalovich M, Llesuy S, Gutierrez S, et al. Peripheral parameters of oxidative stress in Graves' disease; the effects of methimazole and 131 Iodine treatments[J]. Clin Endo-

crinol;Oxf,2003,59(3):321-327.

- [11] Rostami R, Aghasi MR, Mohammadi A, et al. Enhanced oxidative stress in Hashimoto's thyroiditis; inter-relationships to biomarkers of thyroid function[J]. Clin Biochem, 2013,46(4/5):308-312.
- [12] 宋长虹. 甲状腺功能减退与亚临床甲状腺症患者氧化应激指标变化分析[J]. 中国医学创新,2012,9(27):61-62.
- [13] Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, et al. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies[J]. Am J Pathol, 2003, 162(1):115-125.

(收稿日期:2016-05-15 修回日期:2016-08-08)