

ICU 病区泛耐药的鲍曼不动杆菌碳青霉烯类药物耐药基因分析

陈士华 魏取好 吕火焯

摘要 目的 研究 ICU 区病区分离的泛耐药 (pandrug-resistant, PDR) 鲍曼不动杆菌的耐药机制, 检测菌株所含的主要基因型别及其流行情况, 指导临床合理用药。方法 收集 2009~2010 年两年分离自 ICU 病区的 PDR 鲍曼不动杆菌 20 株, 用浓度梯度法 (E-试条法) 检测 15 种抗菌药物的耐药率, 用 PCR 法检测 blaOXA-23、blaOXA-24、blaOXA-51、blaOXA-58、blaVIM、blaNDM-1 和 blaIMP 7 种基因型别。结果 20 株 PDR 鲍曼不动杆菌, 对常规的 14 种抗菌药物耐药率阿米卡星 55%, 米诺环素 70%, 复方新诺明 80%, 其他药物均 100%; 对多黏菌素 B 的耐药率为 0; PCR 检测结果显示, 检测到 3 种耐药基因, blaOXA-23、blaVIM 和 blaIMP; 其中 14 株细菌 blaOXA-23 阳性, 2 株 blaVIM 阳性, 1 株 blaIMP 阳性, 总阳性率 85.5%。结论 PDR-AB 对绝大多数常规药物均有较高的耐药性, 其耐药机制复杂, 对碳青霉烯类耐药的耐药基因主要为 blaOXA-23, 亟待我们积极深入地探索研究。

关键词 泛耐药 鲍曼不动杆菌 基因型别 PCR

Analysis of The Carbapenems Resistant Genes in the Pandrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* from ICU Wards. Chen Shihua, Wei Quhao, Lv Huoyang. Department of Clinical Laboratory, Pinghu People's Hospital, Zhejiang 314200, China

Abstract Objective To investigate the carbapenems resistant genotypes of pandrug-resistance of ICU wards isolates of *Acinetobacter baumannii* in order to provide a scientific basis for the rational use of antibiotics. **Methods** Totally 20 strains of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* were collected and the minimum inhibition concentration was tested with E-test method. The carbapenems resistant genotypes of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51, blaOXA-58, blaVIM, blaNDM-1 and blaIMP were performed by PCR method. **Results** The resistance rates of 20 strains of *Acinetobacter baumannii* to piperacillin, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, cefoperazone-sulbactam, imipenem, meropenem, gentamycin and ciprofloxacin were all 100%, but to amikacin 55%, to minocycline 70%, to trimethoprim-sulfamethoxazole 80% and to polymyxin B 0.0%. PCR experiment showed that 14 strains with blaOXA-23 and 2 strains with blaVIM and one strain with blaIMP were positive. **Conclusion** The pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* was seized of higher drug-resistance rates. The main cause of carbapenems resistance of pandrug resistant *Acinetobacter baumannii* was producing β -lactams such as carbapenemase. The main genotypes were blaOXA-23 and blaVIM. More steps should be taken to control the spread of these resistance isolates.

Key words Pandrug-resistant (PDR); *Acinetobacter baumannii* (AB); Genotypes; PCR

泛耐药 (pandrug-resistant, PDR) 是指分离菌株对临床常用的绝大多数抗菌药物均耐药的菌株。鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, AB) 特别是泛耐药的鲍曼不动杆菌 (pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, PDR-AB) 是院内定植及导致难治性医院感染的主要病原体^[1,2]。随着广谱或超广谱抗菌药物的广泛及不协规范的使用, 导致 PDR-AB 发生率

增高, PDR-AB 的耐药机制复杂, 且多种耐药机制共存, 常见的包括 β -内酰胺酶特别是碳青霉烯酶的产生、药物作用靶位的改变、外膜通透性下降及药物主动外排等等。近年来, 研究表明 PDR-AB 对碳青霉烯类抗菌药物的耐药主要其产生多耐药碳青霉烯酶, 如 blaVIM、blaNDM-1 和 blaIMP 和 OXA 酶, 而其中最为多见的为 OXA 酶。OXA 酶可分为 4 个族, 第 1 族是 blaOXA-23, 第 2 族是 blaOXA-24, 第 3 族是 blaOXA-51 和第 4 族 blaOXA-58, 其中第 1 族和第 4 族是由质粒介导, 而中间 2 和 3 族是由染色体介导^[3]。本研究对近 2 年分离自笔者医院的 20 株 PDR-AB 进行了耐药性及耐药基因的检测, 现报道如下。

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2110743)

作者单位: 314200 浙江省平湖市第一人民医院检验科 (陈士华); 310014 杭州, 浙江省人民医院检验科 (魏取好、吕火焯)

通讯作者: 吕火焯, 主任技师, 电子信箱: lab_lhx@126.com

材料与方法

1. 菌株来源:2009 年 1 月~2010 年 12 月从笔者医院 ICU 病区分离的泛耐药的鲍曼不动杆菌(*pandrug – resistant Acinetobacter baumannii*, PDR – AB) 20 株,所有菌株均由 Vitek – 32 全自动微生物鉴定系统鉴定及药物敏感性试验筛查。质控菌株大肠杆菌 ATCC 25922,铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自卫生部临床检验中心。

2. 仪器与试剂:全自动微生物鉴定系统 Vitek – 32 及配套试剂革兰阴性杆菌鉴定卡 (GNI +);哌拉西林 (*piperacillin*, PIP)、哌拉西林/他唑巴坦 (*piperacillin/tazobactam*, TZP)、头孢噻肟 (*cefotaxime*, CTX)、头孢他啶 (*ceftazidime*, CAZ), 头孢曲松 (*ceftriaxone*, CRO), 头孢吡肟 (*cefepime*, FEP), 头孢哌酮/舒巴坦 (*cefoperazone/sulbactam*, CPS), 亚胺培南 (*imipe-*

nam, IMP), 美罗培南 (*meropenem*, MEM), 庆大霉素 (*gentamycin*, GEN), 阿米卡星 (*amikacin*, AMK), 环丙沙星 (*ciprofloxacin*, CIP), 米诺环素 (*minocycline*, MIN), 复方新诺明 (*trimethoprim – sulfamethoxazole*, SXT) 和多黏菌素 B (*polymyxin B*, POB) E – 试条均购自法国梅里埃公司;PE – 9700 PCR 仪 (美国 ABI 公司);Eppendorf 5417R 高速离心机 (德国艾本得);Bio – Rad GelDoc 凝胶电泳成像分析系统 (美国伯乐公司);MH 琼脂干粉购自英国 OXIOD 公司;PCR 通用试剂盒 EmeraldAmp™ PCR Master Mix 及 DNA 分子质量标准 DL2000™ DNA Marker 均为宝生物工程 (大连) 有限公司新产品,各种耐药基因引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成,其序列见表 1。

表 1 PCR 扩增基因种类引物序列及产物大小 (bp)

基因名称	引物序列 (5'→3')	产物 (bp)	基因名称	引物序列 (5'→3')	产物 (bp)
IMP – F	CGGCCGTCAGGAGACGGTCTTT	822	OXA – 24F	TTCCCCTAACATGAATTTGT	582
IMP – R	AACCAGTTTGCCTTTACCTAT		OXA – 24R	GTACTAATCAAAGTTGTGAA	
VIM – F	ATTCCGGTCGGAGGAGGTCCG	587	OXA – 51F	CTAATAATTGATCTACTCAAG	975
VIM – R	GAGCAAGTCTAG – ACCGCCCCG		OXA – 51R	CCAGTGGATGGATGGATAGATTATC	
NDM – F	GCCAGCTCGCACCGAAT	567	OXA – 58F	GCTGAGCATAGTATGAGTCG	691
NDM – R	GAACGCCGCACCAAACG		OXA – 58R	AAGCAAATGCCACCACTTGC	
OXA – 23F	GTCTTTTCAGAGTACGGCATT	683			
OXA – 23R	GATTTTCTTAGCGGCAACTTA				

3. 菌株鉴定及抗菌药物的耐药性试验:按全自动微生物鉴定系统 Vitek – 32 及配套试剂革兰阴性杆菌鉴定卡 (GNI +)使用说明书对菌株进行鉴定;哌拉西林 (PIP)、哌拉西林/他唑巴坦 (TZP)、头孢噻肟 (CTX)、头孢他啶 (CAZ), 头孢曲松 (CRO), 头孢吡肟 (FEP), 头孢哌酮/舒巴坦 (CPS), 亚胺培南 (IMP), 美罗培南 (MEM), 庆大霉素 (GEN), 阿米卡星 (AMK), 环丙沙星 (CIP), 米诺环素 (MIN), 复方新诺明 (SXT) 和多黏菌素 B (POB) 的耐药性检测用浓度梯度法 (E – 试条法),其耐药性解释标准 (除 CPS) 参照 CLSI2011 中关于不动杆菌属的规定^[4];CPS 的解释标准参照辉瑞公司建议的标准 (MIC 值:≤16 S, 32 I, ≥64 R)。

4. 耐药基因检测:模板 DNA 的提取各种靶基因 PCR 扩增检测参加文献进行略作修改^[5]。具体为:每反应体系 P1 引物 1μl (1. 0μmol/L)、P2 引物 1μl (1. 0μmol/L), dNTPs 2μl (2mmol/L), 10 倍缓冲液 2μl [KCl 10mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 8mmol/L, MgCl₂ 2mmol/L, Tris – HCl (pH9. 0) 10mmol/L, NP₄₀ 0. 5%, BSA 0. 02% (wt/vol)], Taq DNA pol 1U (不计体积), 超纯水 9μl, 模板液 5μl, 总反应体积 20μl。PCR 扩增热循环参数均为:94℃ 预变性 2min, 然后 94℃ 60s→50℃ 60s→72℃ 60s, 循环 35 周期, 最后 1 个 72℃ 延长至 5min。产物经

2% 琼脂糖凝胶电泳, 出现与阳性对照分子相当的目的条带为阳性。

结 果

1. 抗菌药物浓度梯度法检测结果:20 株 PDR – AB 对 PIP、TZP、CTX、CAZ、CRO、FEP、CPS、IMP、MEM、GEN、CIP 的耐药率均为 100%; AMK 的耐药率 55%, MIN 的耐药率 70%, SXT 的耐药率 80%, POB 的耐药率为 0%; 各菌株的详细结果见表 2。

2. 耐药基因 PCR 扩增结果:20 株 PDR – AB 株, 检测 blaOXA – 23、blaOXA – 24、blaOXA – 51、blaOXA – 58、blaVIM、blaNDM – 1 和 blaIMP 7 种耐药基因, 检测 blaOXA – 23、blaVIM 和 blaIMP 基因阳性 9 株, 阳性率 45%; blaOXA – 23 阳性, 6 株, 占阳性菌株中的 66. 7% (6/9), 分别为 1 号、5 号、6 号、9 号、12 号和 17 号菌株; blaVIM 阳性 2 株, 占阳性菌株中的 22. 2% (2/9), 分别为 2 号和 15 号菌株; blaIMP 阳性 1 株, 为 19 号菌株。20 株 PDR – AB PCR 扩增 blaOXA – 23 基因电泳结果见图 1。

表 2 20 株 PDR - AB 对 15 种抗菌药物耐药性的体外检测结果

菌株编号	各种抗菌药物的检测结果														
	PIP	TZP	CTX	CAZ	CRO	PEP	CPS	IMP	MEM	CIP	GEN	AMK	MIN	SXT	POB
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S
3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S
6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
18	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
R%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	55	70	80	0

“R”表示耐药,“I”表示中介,“S”表示敏感

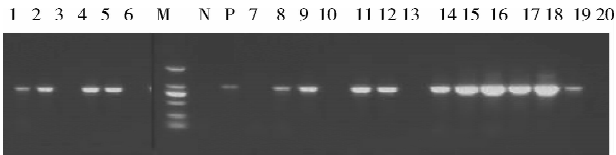


图 1 PCR 扩增 blaOXA - 23 基因结果

M. marker(从下到上分别为 100、200、400、500、750、1000bp); N. 阴性对照; P. 阳性对照; blaOXA - 23 分子质量为 685bp; 1、2、3、4、5、6 为另一块胶的电泳结果

讨 论

ICU 病区由于病人基础疾病较重,抗菌药物使用较广,多耐药菌株的分离率相对较高。PDR - AB 是这些菌株中的典型代表菌,为条件致病菌,近年来已成为医院感染的主要病原菌之一,引起的感染逐年增加^[6-8]。笔者医院 ICU 分离到的 20 株 PDR - AB 对临床常用的 14 种抗菌药物中的 11 种全部耐药,只对阿米卡星(AMK)、米诺环素(MIN),复方新诺明(SXT)3 种部分菌株敏感;而对临床不常用的多黏菌素 B,所有菌株均敏感(表 2)。对由 PDR - AB 感染的病人,临床可综合考虑选用阿米卡星(AMK)、米诺环素(MIN),复方新诺明(SXT)及多黏菌素 B 进行治疗。

研究表明,PDR - AB 对碳青霉烯类药物的耐药机制由以下几个因素引起,一是产生各种碳青霉烯类

酶(包括金属 β - 内酰胺酶),二是青霉素结合蛋白(PBPs)的改变,三是通透性的改变(如膜孔蛋白 OprD 的缺失),四是主动外泵的增加等,而其中最为主要的因素是产生各种碳青霉烯类酶^[9-11]。本研究对 20 株 PDR - AB 主要检测了 blaOXA - 23、blaOXA - 24、blaOXA - 51、blaOXA - 58、blaVIM、blaNDM - 1 和 blaIMP 7 种碳青霉烯类药物的耐药基因。检测到 blaOXA - 23、blaVIM 和 blaIMP 基因阳性 9 株,阳性率 45%;其中 blaOXA - 23 阳性,6 株,占阳性菌株中的 66.7% (6/9);blaVIM 阳性 2 株,占阳性菌株中的 22.2% (2/9);blaIMP 阳性 1 株,占阳性菌株中的 11.1% (1/9) (图 1)。说明笔者医院 ICU 病区的 PDR - AB 可能存在有 3 种以上的碳青霉烯酶基因,而在这些基因中又以 blaOXA - 23 为主。OXA 类酶为 Bush 分类中的 D 类(2d) β - 内酰胺类酶,结构上与 C 类青霉素结合蛋白相关,具有活性丝氨酸位点,能水解碳青霉烯类药物,不能被克拉维酸抑制。编码 OXA 类酶的基因 blaOXA 可以在染色体上,质粒上,转座子上。目前已发现 140 多种 OXA 类酶。OXA 型酶耐药谱一般较窄,但近年来可水解第 3 代头孢菌素和(或)亚胺培南的超广谱 OXA 酶不断被发现,主要由 OXA - 2 或 OXA - 10 突变衍生而来,其编码

基因通常位于质粒或整合子上,具有很强的扩散能力。对鲍曼不动杆菌的研究主要集中在 4 族突变 (blaOXA - 23、blaOXA - 24、blaOXA - 51、blaOXA - 58) 体上,blaOXA - 23 为其中的一族(包括 blaOXA - 23、blaOXA27 和 blaOXA - 49),由质粒介导^[3],易引起传播,故临床对分离到此 PDR - AB 的病人应尽快做好隔离。

本研究检测到另外 2 型碳青霉烯酶基因 blaVIM 和 blaIMP,均为金属 β - 内酰胺酶 (metallo - beta - lactamase, MBL) 基因,能水解除单环类抗菌药外包括碳青霉烯类在内的几乎全部的 β - 内酰胺类抗生素,基因可位于染色体或质粒高度可移动遗传因子上,并可被整合子捕获,这使得 MBLs 基因具有可传播性,MBLs 不能被 β - 内酰胺酶抑制剂所抑制,成为治疗的一大难题^[12,13]。

综合本研究结果,笔者医院 ICU 病区分离的 PDR - AB 对临床绝大多数抗菌药物耐药,选用抗菌药物应依据实验室的检测 results。对碳青霉烯类药物的耐药机制检测表明,笔者医院 ICU 病区的 PDR - AB 以产 blaOXA - 23 型碳青霉烯类酶为主,其次为 blaVIM 和 blaIMP 金属 β - 内酰胺酶 (MBL),由于这些基因均可在质粒上且可被整合子捕获,因此很容易在菌株或菌属之间传播,因此临床加强对此类菌的监测及预防隔离工作。

参考文献

- 1 Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug - resistant and pandrug - resistant Gram - negative bacilli in Europe [J]. Euro Surveill, 2008, 13(47): 1 - 11
- 2 Doi Y, Husain S, Potoski BA, et al. Extensively drug - resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(6): 980 - 982
- 3 Merkier AK, Centrón D. Bla (OXA - 51) - type beta - lactamase

- genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii* [J]. International Journal of Anti - microbial Agents, 2006, 28(2): 110 - 113
- 4 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement, CLSI M100 - S21 [J]. Pennsylvania: CLSI, 2011, 31(1): 62 - 63
- 5 胡丽庆, 史煌波, 孙定河, 等. 宁波地区肠杆菌科细菌碳青霉烯酶基因的检测研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(6): 529 - 532
- 6 王刚, 黄洁, 秦帅. 等. 不同抗菌药物对 ICU 泛耐药鲍曼不动杆菌感染的疗效比较 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2011, 30(1): 111 - 114
- 7 Lee CM, Lim HK, Liu CP, et al. Treatment of pan - drug resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Scand J Infect Dis, 2005, 37(3): 195 - 199
- 8 Zong Z, Lv X, Valenzuela JK, et al. An outbreak of carbapenem - resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA - 23 carbapenemase in western China [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2008, 31(1): 50 - 54
- 9 陈民钧. 细菌对 β - 内酰胺酶药的耐药性及检测方法 [J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(4): 197 - 200
- 10 Mussi MA, Relling VM, Limansky AS, et al. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L - ornithine uptake [J]. FEBS Letters, 2007, 581(29): 5573 - 5578
- 11 韩竹俊, 丁正萍, 张学娟. 碳青霉烯类抗生素耐药菌的耐药机制 [J]. 中国药房, 2011, 22(2): 181 - 183
- 12 赵旺胜, 江淑芳, 顾兵, 等. 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药性及耐药基因型分析 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2006, 26(10): 929 - 932
- 13 Boonkerd N, Pibulpakdi P, Tiloklurs M, et al. Class 1 integron containing metallo beta - lactamase gene blaIMP - 1 in carbapenem - resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand [J]. J Infect Chemother, 2009, 15(4): 257 - 261

(收稿: 2011 - 10 - 10)

(修回: 2011 - 10 - 15)

脂联素对高糖环境心肌细胞氧化应激及凋亡的影响

李美蓉 李 兴

摘 要 目的 通过高糖环境培养人心肌细胞 (human cardiac myocytes, HCM) 建立心肌细胞氧化应激模型, 观察脂联素 (adiponectin, ADPN) 对心肌细胞各氧化应激指标及凋亡的影响, 从而揭示脂联素对心肌细胞可能的保护机制。**方法** 将体外培养的人心肌细胞分为 3 组: 对照组、高糖组、高糖 + 脂联素组, 分别干预 24、48、72h。在倒置显微镜下观察心肌细胞形态变化, 采用黄

基金项目: 山西省归国留学基金资助项目 (2007 - 95)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第二临床医学院内分泌科

通讯作者: 李兴, 电子邮箱: lixinglaoshi@yahoo.com.cn