

重症监护病房中多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因型及同源性分析

吴祥林¹, 潘晓龙², 周东升² (1. 广东省深圳市光明新区公明人民医院检验科 518106; 2. 安徽省铜陵市人民医院检验科 244000)

【摘要】 目的 分析 22 株重症监护病房(ICU)中多重耐药鲍曼不动杆菌耐药表型, 耐药基因型及基因同源性。**方法** 菌株鉴定采用 Vitek-32 细菌鉴定仪, 药物敏感试验采用 K-B 法。三维试验检测 ESBLs 和 AmpC 酶, 协同试验检测金属酶(MBL)。PCR 检测各类 β -内酰胺酶类、氨基糖苷类抗菌药耐药基因及喹诺酮类相关 *gyrA* 基因。脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行基因同源性分析。**结果** (1)对亚胺培南耐药率最低为 4.5%, 头孢哌酮/舒巴坦耐药率较低为 22.7%, 对其他所测抗菌药耐药率均大于 90%。(2)产 AmpC 酶 21 株占 95.5%; 产 ESBLs 和 MBL 各 5 株, 分别占 22.7%。(3)100% 携带 AmpC 酶基因、TEM-1 型广谱 β -内酰胺酶基因、*aacA4* 氨基糖苷乙酰转移酶基因; *aacC1*、*aadA1* 型氨基糖苷乙酰转移酶基因各占 95.5%; 有 *gyrA* 型 DNA 旋转酶基因突变; 各 1 株检测到 OXA-23 型碳青霉烯酶基因、PER 型 ESBLs 基因和 *aphA1* 型氨基糖苷乙酰转移酶基因, 分别占 4.5%; 未检测到 SHV 型 β -内酰胺酶基因、VEB 型 ESBL 基因、IMP 型和 VIM 型金属酶基因、OXA-24 型碳青霉烯酶基因。(4)PFGE 结果显示 20 株出现完全相同条带, 具有高度同源性, 另 2 株各自为独立株。**结论** 22 株多重耐药鲍曼不动杆菌中存在一个克隆流行株, 携带 AmpC 酶基因、TEM-1 型 β -内酰胺酶基因及 *aacA4*、*aacC1*、*aadA1* 型氨基糖苷类修饰酶基因, 高产 AmpC 酶, 治疗应首选亚胺培南。

【关键词】 鲍曼不动杆菌; 医院感染; 多重耐药; 耐药基因; 分子流行病学

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.06.010 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)06-0664-05

Analysis of resistant genotypes and homogeneity in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* from ICU WU Xiang-lin¹, PAN Xiao-long², ZHOU Dong-sheng². (1. Department of Clinical Laboratory, Guangming People's Hospital, Shenzhen 518106, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tongling Peoples' Hospital, Anhui Province 244000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the resistance of *Acinetobacter* (A.) *baumannii* to antibiotics, to determine the β -lactamases of the multidrug resistant A. *baumannii* and its drug-resistant genes and to analyze the homology of the drug-resistant associated genes. **Methods** The collected isolates from one hospital were identified by Vitek32. The susceptibility tests were performed with the Kirby-Bauer agar diffusion method. The extended-spectrum β -lactamases producing strains were confirmed by agar dilution test and three dimensional test. The AmpC enzyme was detected by three dimensional test and the mental β -lactamases were determined by synergy test. The genes of TEM, SHV, AmpC, OXA-23, OXA-24, PER, VEB, IMP, VIM and *aacC1*, *aadA1*, *aphA1*, *gyrA* for these strains were amplified with polymerase chain reaction (PCR) and part of them were sequenced. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for homologous analysis. **Results** (1) Over 90% (20/22) of the isolates were found to be resistant to the third and fourth generations of cephalosporins, SMZ, CIP, ATM, and GEN. The resistance rate to SCF was 22.7% whereas the intermediate rate was 72.7%. The susceptibility to IMP accounted for 95.5%. (2) 21 strains showed AmpC enzyme activity, 5 strains produced ESBLs and 5 isolates produced MBL enzyme. (3) The genes coding for AmpC, TEM-1, *aacA4* and *gyrA* were found to be in all of the 22 strains; 21 had *aacC1* and *aadA1* gene; OXA-23, PER and *aphA1* gene existed in 1 strain, respectively. No SHV, VEB, IMP, VIM and OXA-24 genes were found in all isolates. (4) The homologous analysis showed that 20 strains belong to one clone. **Conclusion** There is one clone in the 22 strains of A. *baumannii*, coding the genes of AmpC, TEM-1, *aacC1*, *aacA4* and *aadA1*. AmpC enzyme is predominant.

【Key words】 *acinetobacter baumannii*; nosocomial infection; multidrug resistance; drug-resistant gene; molecular epidemiology

鲍曼不动杆菌是医院内感染重要致病菌之一, 在非发酵菌中仅次于铜绿假单胞菌。尽管在内外科病房有鲍曼不动杆菌爆发的报道, 但重症监护病房(ICU)是爆发最常见的病区^[1-2]。本文就 ICU 中多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性、耐药基因型及同源性进行分析, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 22 株多重耐药鲍曼不动杆菌分离自某院 2007 年 4 月至 2007 年 12 月 ICU 患者标本, 同一患者同部位相同菌株不计在内。其中, 痰液 21 株、创面 1 株。

1.2 质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌

ATCC27853、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 均购自卫生部临检中心,阴沟肠杆菌 029M 由安徽医科大学第一附属医院惠赠。

1.3 药敏纸片和药物干粉 纸片均为英国 OXOID 公司产品。干粉克拉维酸为南京本原制药厂生产,干粉氯唑西林为上海四药股份有限公司生产。

1.4 方法

1.4.1 细菌分离鉴定和药敏试验 将收集的菌株接种于 Vitek-GNI 鉴定卡,经 Vitek-32 型全自动微生物鉴定仪鉴定。药物敏感试验采用琼脂纸片扩散法(K-B 法)。大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 为质控菌株,按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)要求定期测试。

1.4.2 ESBLs、AmpC 酶及 MBL 检测 采用粗提酶液头孢西

丁三维试验^[3-4]检测超广谱-β-内酰胺酶(ESBLs)和 AmpC 酶。阴沟肠杆菌 029M 为高产 AmpC 酶的阳性对照,肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 为 ESBLs 阳性对照。按照文献[5]协同法检测金属酶(MBL)。

1.4.3 耐药基因检测 质粒 DNA 的提取严格按照上海申能博彩生物科技有限公司质粒 NDA 小量抽提纯化试剂盒(3S Spin Plasmid miniprep Kit V3.1)说明进行操作。染色体 DNA 的提取严格按照上海申能博彩生物科技有限公司基因组 DNA 小量抽提纯化试剂(3S Spin Gonomic DNA miniprep Kit for Gram Negative Bacterial K713N)说明进行操作。根据 GenBank 提供的耐药基因采用 primer 软件设计引物,部分引物参考有关文献^[6],见表 1。引物均由上海申能博彩生物公司合成。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	上游引物	下游引物	产物长度(bp)
TEM	5'-CAGAAACGCTGGTGAAAG-3'	5'-AACTACGATACGGGAGGG-3'	701
SHV	5'-TATTATCTCCCTGTTAGCCAC-3'	5'-GCCTCATTCACTTCCGTTTCC-3'	482
PER	5'-CATTGGTTCGGCTTGAC-3'	5'-CCACTGTAGGCGTTGC-3'	720
VRE	5'-AAATGCCAGAATAGGAGTAG-3'	5'-GAAGTCCCTGTTTTATGAGC-3'	606
AmpC	5'-GCCTGGTAAGTATTGGAA AG-3'	5'-CCGAAACGGTTAGTTGAGCC-3'	696
IMP	5'-GCTCACGCAACTGGTCGC-3'	5'-CCGCCTGCTCTAATGTAAG-3'	913
VIM	5'-CCGTAGAAGAACAGCAAGGC-3'	5'-CCATCGGCAATCTGGTAAAG-3'	593
OXA-23	5'-GATGTGTCATAGTATTCGTCG-3'	5'-GTCACGAAAATCAACAACACT-3'	1 067
OXA-24	5'-GTACTAATCAAAGTTGTG AA-3'	5'-TGTTTAAGTACAATCCCTT-3'	1 024
aacA4	5'-GAAGAAGCACGCCCACAC-3'	5'-TCGGATCGCTCGCAAGTTG-3'	333
aacC1	5'-CCACCTACTCCCAACATCAG-3'	5'-TCACTTCTTCCCGTATGCCC-3'	337
aadA1	5'-TGATTTGCTGTTACGGTGAC-3'	5'- CGTATGTTCTCTTGCTTTTG-3'	284
aphA1	5'-ATACAGAGACCACCATACAGT-3	5'-GGACAATCAATAATAGCAAT-3'	234
gyrA	5'-AATCTGCCCGTGTCGTTGG-3'	3'-CCACGACGCCCATAGCGG-5'	332

表 2 PCR 扩增条件

引物名称	预变性	循环数 34 个			终延伸
		变性	退火	延伸	
TEM-1	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	56 ℃ 45s	72 ℃ 90 s	72 ℃ 7 min
SHV-1	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	56 ℃ 45s	72 ℃ 60 s	72 ℃ 7 min
PER-1	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	53 ℃ 45s	72 ℃ 90 s	72 ℃ 7 min
VEB-1	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	50 ℃ 40 s	72 ℃ 60 s	72 ℃ 7 min
AmpC	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	52 ℃ 45s	72 ℃ 75s	72 ℃ 7 min
IMP	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	53 ℃ 45s	72 ℃ 90 s	72 ℃ 7 min
VIM-2	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	56 ℃ 45s	72 ℃ 60 s	72 ℃ 7 min
OXA-23	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	52 ℃ 40 s	72 ℃ 75s	72 ℃ 7 min
OXA-24	94 ℃ 4 min	94 ℃ 60 s	50 ℃ 60 s	72 ℃ 90 s	72 ℃ 10 min
aacA4	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	55 ℃ 45s	72 ℃ 30 s	72 ℃ 5 min
aacC1	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	55 ℃ 45s	72 ℃ 30 s	72 ℃ 5 min
aadA1	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	55 ℃ 45s	72 ℃ 30 s	72 ℃ 5 min
aphA1	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	55 ℃ 45s	72 ℃ 30 s	72 ℃ 5 min
gyrA	94 ℃ 4 min	94 ℃ 30 s	55 ℃ 45s	72 ℃ 30 s	72 ℃ 5 min

1.4.4 PCR 扩增 反应体系均为 50 μL,其中 Buffer 5 μL,10 mmol/L 4 × dNTP 1 μL,50 mmol/L 上下游引物各 2 μL, pfuDNA 多聚酶 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,无菌多重蒸馏水

37.5 μL。以 TEM-26 型大肠埃希菌作 TEM 型阳性对照,以 ATCC700603 肺炎克雷伯作 SHV 型阳性对照。根据不同引物摸索建立不同 PCR 扩增条件,见表 2。

1.4.5 基因测序 选择部分 PCR 产物送上海申能博彩生物公司进行基因测序,测序结果直接在 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行序列比对分析。

1.4.6 基因同源性分析 将实验菌株用限制性内切酶酶切后进行脉冲场凝胶电泳(上海华山抗生素研究所协助)。根据 TENOVER 推荐方法^[7]判读,判断标准:完全相同;紧密相关:2 ~3 条带不同;有可能相关:4~6 条带不同;不同:≥7 条带不同。

1.4.7 数据处理 采用 WHONET5.4 软件,对菌株药敏结果进行录入、分析、统计。

2 结 果

2.1 药敏结果 22 株鲍曼不动杆菌均为多重耐药菌,21 株菌对亚胺培南敏感,1 株耐药(为 a023 号菌)。1 株对头孢哌酮/舒巴坦敏感,16 株中介,5 株耐药。2 株对氧氟沙星和环丙沙星敏感,20 株耐药。3 株对氨苄西林/舒巴坦中介,其他 19 株均耐药。实验菌株对其他药物均耐药。结果见表 3。

2.2 ESBLs、AmpC 酶及 MBL 结果 三维试验结果检测出 5 株 ESBLs 菌株,其中 a023 号为单产株,高产 AmpC 酶 21 株菌为阳性株,其中 4 株菌同时产 ESBLs,a023 号为阴性。协同试验 5 株菌检出与 CAZ 或 IPM 有明显协同作用,为 MBL 阳性,

其他菌株均为阴性,见表 4。

表 3 22 株多重耐药鲍曼不动杆菌药敏结果			
抗菌药	耐药	敏感	中介
阿莫西林/克拉维酸	22	0	0
氨苄西林/舒巴坦	19	0	3
哌拉西林	22	0	0
哌拉西林/他唑巴坦	22	0	0
替卡西林/克拉维酸	22	0	0
头孢呋辛	22	0	0
头孢曲松	22	0	0
头孢噻肟	22	0	0
头孢他啶	22	0	0
头孢吡肟	22	0	0
头孢哌酮	22	0	0
头孢哌酮/舒巴坦	5	1	16
头孢西丁	22	0	0
氨基曲南	22	0	0
亚胺培南	1	21	0
庆大霉素	22	0	0
阿米卡星	22	0	0
环丙沙星	20	2	0
左氧氟沙星	20	2	0
复方磺胺甲噁唑	22	0	0

2.3 耐药基因结果 所有 22 株菌均检测到 TEM 型广谱酶基因、AmpC 酶基因、aacA4 氨基糖苷乙酰转移酶基因和 gyrA 型 DNA 旋转酶基因; a023 号菌株检测 PER 型超广谱酶基因为阳性,其他 21 株菌 PER 型超广谱酶基因均为阴性; a023 号扩增出 OXA-23 型碳青霉烯酶基因,其他 21 株菌则为阴性;21 株菌均带 aacC1、aadA1 基因,有 1 株菌 aphA1 基因为阳性;22 株菌均未检测到 SHV 型广谱酶或超广谱酶、VEB 型超广谱酶、IMP 型和 VIM 型金属酶、OXA-24 型碳青霉烯酶基因。各菌株耐药基因结果见表 5。

表 4 三维试验结果			
菌株号	ESBLs	AmpC	MBL
a001 s	—	+	—
a002 s	—	+	—
a003 s	—	+	+
a007 s	—	+	—
a010 s	—	+	—
a023 s	+	—	—
a025 w	—	+	+
a026 s	—	+	—
a033 s	—	+	—
a035 s	—	+	—
a038 s	+	+	+
a040 s	+	+	—
48 s	+	+	—
59 s	—	+	—
62 s	—	+	—
72 s	+	+	+
106 s	—	+	—
154 s	—	+	—
155 s	—	+	+
185 s	—	+	—
187 s	—	+	—
191 s	—	+	—

注: + 表示阳性, — 表示阴性。

2.4 脉冲场凝胶电泳结果 a023 及 62 号菌株含有不同的酶切带,其他 20 株菌呈现明显相同的条带,具有高度同源性,经耐药基因聚类分析,其中 20 株完全相同,a023 号、62 号为独立菌株。

表 5 PCR 基因扩增检测各菌株耐药基因情况

菌株号	TEM-1	SHV1	PER-1	VEB1	AmpC	IMP1	VIM2	OXA-23	OXA-24	aacA4	aacC1	aadA1	aphA1	gyrA
a001 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a002 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a003 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a007 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a010 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a023 s	+	—	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	+
a025 w	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
a026 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a033 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a035 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a038 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
a040 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
48 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
59 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
62 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
72 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
106 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+

续表 5 PCR 基因扩增检测各菌株耐药基因情况

菌株号	TEM1	SHV1	PER1	VEB1	AmpC	IMP1	VIM2	OXA23	OXA24	aacA4	aacC1	aadA1	aphA1	gyrA
154 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
155 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
185 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
187 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+
191 s	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	—	+

注：+表示阳性，—表示阴性。

3 讨 论

从药敏试验结果可知,亚胺培南具有良好的杀菌效果和对多种 β-内酰胺酶稳定的特性,敏感率最好,达 95% 以上,可作为治疗多重耐药鲍曼不动杆菌的首选用药,但容易诱导其他耐药菌的产生,需要选择使用。

本课题研究的 22 株多重耐药的鲍曼不动杆菌均产生 TEM-1 型广谱 β-内酰胺酶,国内到目前尚未发现 TEM 型 ESBLs 鲍曼不动杆菌,所以,TEM 型广谱 β-内酰胺酶在多重耐药鲍曼不动杆菌中广泛存在,该型酶可以广泛水解第 1 代头孢菌素类和对酶不稳定的第 1 代青霉素类抗菌药,尽管该酶在鲍曼不动杆菌的多重耐药中可能不是主要角色,但是和其他耐药机制共同作用与鲍曼不动杆菌多重耐药性有关。然而在多重耐药的鲍曼不动杆菌中并未发现 SHV 型 β-内酰胺酶,可能与本地尚未有此型流行株有关,有别于国内其他地区^[8]。

三维试验检出 5 株鲍曼不动杆菌产 ESBLs,基因扩增发现 1 株存在 PER-1 型 ESBLs 基因,经 PCR 产物双向测序比对分析显示与目标基因 Z21957 完全相符,均未发现 VEB 型 ESBLs 基因。PER-1 型基因首先在法国发现于铜绿假单胞菌,后来在土耳其相继发现 PER-1 基因编码产 ESBLs 的鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌,据调查有 46% 的鲍曼不动杆菌携带该基因而且是不同的生物型。在韩国的不同医院也发现 PER-1 型产 ESBLs 鲍曼不动杆菌广泛存在于 ICU,最近在比利时及俄罗斯也有报道^[9-10]。浙江杭州某医院有爆发流行产该类酶基因的菌株报道,上海地区也有散发报道。其主要表现为对第 3、4 代头孢菌素、青霉素类和单环类抗菌药全部耐药,对 β-内酰胺酶抑制剂、头霉素类和碳青霉烯类抗菌药敏感,而且对氨基糖苷类、喹诺酮类也表现出明显的耐药性。另有 4 株鲍曼不动杆菌从三维试验中检测有 ESBLs,而基因检测为阴性,很可能是其他基因型所致,有待进一步研究。

三维试验检出 21 株鲍曼不动杆菌产 AmpC 酶,22 株基因扩增均发现 AmpC 酶基因存在,对 4 份扩增产物单向测序结果比对分析,结果与目标基因 AJ009979 有 100% 同源关系。以染色体介导的高产 AmpC 酶在鲍曼不动杆菌的多重耐药中有重要意义。其氨基酸序列与 C 类头孢菌素酶密切相关,而且该酶可被酶抑制剂舒巴坦、他唑巴坦 40%~50% 的抑制,只能被克拉维酸很微弱地抑制。像其他 C 类 β-内酰胺酶一样,该 AmpC 酶对水解头孢菌素的效率比较强,也可适量地水解头孢西丁,过量表达则对青霉素类、第 3 代头孢霉素类都有较强的水解作用,但对亚胺培南的水解活性较弱。近年来,由质粒介导的 AmpC 酶在世界各地被发现,已陆续报道了 25 种以上,大大提高了 AmpC 酶横向传播的能力。质粒 AmpC 基因大小为 7~180 kb,临床分离株常同时携带 AmpC 以外的其他 β-内酰胺酶基因,表现为对第 1 代至第 3 代头孢菌素、头霉素、氨基糖苷类和抗假单胞菌青霉素均耐药,但对第 4 代头孢、碳

青霉烯类及氟喹诺酮类敏感。基因检测结果表明染色体介导的 AmpC 酶基因是导致该院 ICU 中鲍曼不动杆菌多重耐药的主要因素。实验中有 1 株鲍曼不动杆菌(a023 号)未检测到 AmpC 酶,而 PCR 方法检测到了 AmpC 基因的存在,同时也表现出多重耐药,可能与该菌株同时携带 PER-1 型 ESBLs 基因和 OXA-23 酶基因有关,或是 AmpC 基因存在低表达等原因,有待作进一步研究分析。利用三维试验检测 AmpC 酶有重要的参考价值,并表明鲍曼不动杆菌产生的 AmpC 酶不需要诱导剂诱导就可产生大量 AmpC 酶,便于检测,与基因检测结果有较高的一致性(95% 以上),可以在常规实验室中应用。

协同试验检测有 5 株鲍曼不动杆菌与 EDTA 有协同作用,但 PCR 检测未发现 IMP 和 VIM 型产金属 β-内酰胺酶的耐药基因,同时药敏试验显示对亚胺培南均敏感,原因有待作进一步研究分析。

药敏试验发现 1 株鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药,基因扩增检测到 OXA-23 型碳青霉烯酶基因,经 PCR 产物测序比对分析显示与目标基因 AY795964.1 完全相符。产 OXA-23 型碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌首先在英国被发现,后来在巴西、法国和韩国均有报道。鲍曼不动杆菌产生的碳青霉烯酶可以水解 β-内酰胺类抗菌药物的特点,与多重耐药有很密切的关系^[11]。尽管 OXA-23 型产碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌不是本次发现的主要流行株,但在以后院内感染的预防中具有重要意义。

药敏结果显示 22 株鲍曼不动杆菌对庆大霉素和阿米卡星均耐药,基因扩增发现 22 株实验菌均检测到了 aacA4 基因,21 株菌携带 aacC1、aadA1 基因,有 1 株菌携带 aphA1 基因。氨基糖苷类修饰酶有 3 类,即乙酰转移酶(AAC)、腺苷酰转移酶(ANT)和磷酸转移酶(APH),与其他许多革兰阴性杆菌一样,鲍曼不动杆菌携带的 aacA4、aacC1、aadA1、aphA1 基因常表现为对氨基糖苷类抗菌药耐药,该类基因常与含有多种耐药基因的基因盒插入到整合子上一起传播,往往表现出多重耐药性。

GyrA 基因编码的 DNA 旋转酶(DNA Gyrase)基因的突变常表现为对喹诺酮类药物的耐受,其 83 位点丝氨酸的突变可以引起鲍曼不动杆菌对环丙沙星等喹诺酮类药物高水平的耐受,若伴有拓扑异构酶(topoisomerase IV)的突变则会增加其更高水平的耐药。通过 gyrA 基因的扩增和 5 株扩增产物的基因序列检测与目标基因 AF100557 比对分析表明:83 位点的丝氨酸均被亮氨酸取代,所以表现出对喹诺酮类药物的耐药。另有 2 株菌未表达对氧氟沙星和环丙沙星的耐药,可能与该基因未突变有关。

多重耐药鲍曼不动杆菌给临床治疗带来困难,容易在一定的时间和空间内爆发,往往由单一来源广泛污染所致^[12]。本研究菌株收集时间段,ICU 发生鲍曼不动杆菌所致院内感染事

件明显增多。多重耐药鲍曼不动杆菌基因分型显示 AmpC 酶基因为主,同时携带有广谱 β -内酰胺酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因,基因类型模式相似。通过肠冲肠凝胶电泳发现 20 株多重耐药鲍曼不动杆菌酶切后染色体基因条带完全相同,占 90.9%(20/22),说明确实存在克隆株流行,表现出除亚胺培南和头孢哌酮/舒巴坦敏感或中介外的多重耐药性。出现同时携带 OXA-23 型碳青霉烯酶基因和 PER-1 型质粒基因多重耐药菌株,并表现出对亚胺培南的耐药和对头孢哌酮/舒巴坦中介、对其他抗菌药均耐受的特点。加强环境检测和消毒有重要意义。

参考文献

[1] 张凤林,李春辉,黄昕,等. ICU 多药耐药鲍曼不动杆菌医院感染暴发的危险因素分析[J]. 中国现代医学杂志, 2009,19(9):1355-1358.

[2] 李蓉,李文林,石小玉,等. ICU 常见病原菌及鲍曼不动杆菌质粒上耐药基因的研究[J]. 中国抗生素杂志,2008,33(6):375-378.

[3] Coudron PE, Moland ES, Thomoson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veteran's medical center [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 1791-1996.

[4] 陈东科,张志敏,张秀珍. 三维法检测内酰胺酶的影响因素探讨及方法的改进[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(10):600-604.

[5] Lee K, Lim YS, Yong D, et al. Evaluation of the hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of

Pseudomonas spp. and *Acinetobacter* spp. [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4623-4629.

[6] Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamase associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45: 583-588.

[7] Tenover FC, Arbeit RO, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel eletrophoresis: criteria forbacterial strain tying[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.

[8] 钟瑞雪,叶惠芬,陈惠玲,等. 产 β -内酰胺酶鲍曼不动杆菌基因型研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(7): 626-628.

[9] Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, et al. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58: 178-182.

[10] Naas T, Kernbaum S, Allali S, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, Russia [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13: 669-671.

[11] Mugnier PD, Poirel L, Naas T, et al. Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii* [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1): 35-40.

[12] 李松. 152 株鲍曼不动杆菌的耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(3): 195.

(收稿日期:2010-10-06)

(上接第 663 页)

为进一步研究 Bax 的生物学功能,揭示细胞凋亡的分子机制, Bax 在多种疾病致病过程中的作用,以及为研究肿瘤的临床治疗奠定了重要的基础。

参考文献

[1] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ, et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.

[2] Boumela I, Guillemin Y, Guérin JF, et al. The Bcl-2 family pathway in gametes and preimplantation embryos[J]. Gynecol Obstet Fertil, 2009, 37(9): 720-732.

[3] Pećina-Slaus N. Genetic and molecular insights into apoptosis[J]. Acta Med Croatica, 2009, 2: 13-19.

[4] Kastelan M, Massari LP, Brajac I. The role of bcl-2 family proteins in psoriasis[J]. Lijec Vjesn, 2010, 132(1-2): 31-33.

[5] Jonas E. Bcl-xL regulates synaptic plasticity[J]. Mol Interv, 2006, 6(4): 208-222.

[6] Rautureau GJ, Day CL, Hinds MG. Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(4): 1808-1824.

[7] Autret A, Martin SJ. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis [J]. Mol Cell, 2009, 36(3): 355-363.

[8] Ray S, Bucur O, Almasan A, et al. Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor[J]. Apoptosis, 2005, 10(6): 1411-1418.

[9] Bougras G, Cartron PF, Gautier F, et al. Opposite role of Bax and BCL-2 in the anti-tumoral responses of the immune system[J]. BMC Cancer, 2004, 4: 54.

[10] Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, et al. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(20): 10872-10877.

[11] Krajewska M, Fenoglio-Preiser CM, Krajewski S, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach[J]. Am J Pathol, 1996, 149(5): 1449-1457.

[12] Liu J, Yin S, Reddy N, Spencer C, et al. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin [J]. Cancer Res, 2004, 64(5): 1703-1711.

(收稿日期:2010-10-15)