

# 多重耐药鲍曼不动杆菌 OXA-23 基因与 qacE $\Delta$ 1 基因检测的研究\*

余 琳, 江凤茹, 卢鉴财, 苏丹虹 $\Delta$  (广州医学院第一附属医院, 广州 510120)

**【摘要】** 目的 对本院分离的多重耐药鲍曼不动杆菌(MRAB)OXA-23 和 qacE $\Delta$ 1 耐药基因进行检测分析。方法 收集 2009 年 1 月至 2010 年 12 月分离的 85 株多重耐药鲍曼不动杆菌, 用聚合酶链反应(PCR)方法检测 OXA-23 和 qacE $\Delta$ 1 耐药基因并测序, 序列与基因库比对。结果 85 株耐药菌中 OXA-23、qacE $\Delta$ 1 基因的阳性率依次为 55.3%、81.2%。其中 58 株耐亚胺培南 MRAB OXA-23、qacE $\Delta$ 1 基因的阳性率为 75.86%、84.48%; 而其余 27 株亚胺培南敏感 MRAB 两个基因的阳性率分别为 11.11%、74.07%。结论 OXA-23 基因存在与鲍曼不动杆菌耐亚胺培南密切相关, qacE $\Delta$ 1 基因检测结果提示这些菌株 81.2% 携带 I 类整合子, 是本组细菌多重耐药表型的主要原因之一。

**【关键词】** 多重耐药; 鲍曼不动杆菌; OXA-23 基因; qacE $\Delta$ 1 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.15.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)15-1793-02

**Study on the genotypes of OXA-23 and qacE $\Delta$ 1 in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii\*** YU Lin, JIANG Feng-ru, LU Jian-cai, SU Dan-hong $\Delta$  (The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510120, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the resistance genes of OXA-23 and qacE $\Delta$ 1 in multidrug-resistance Acinetobacter baumannii(MRAB) isolated from our hospital. **Methods** 85 strains of MRAB were isolated from Jan 2009 to Dec 2010. PCR was performed on 85 clinical isolates using primers specific for OXA-23 and qacE $\Delta$ 1, respectively, and the PCR product was sequenced, then we compared the sequences with the gene bank. **Results** Among the 85 strains of MDRA, the positive rates of genotypes of OXA-23 and qacE $\Delta$ 1 were 55.3% and 81.2%; The positive rates in 58 stains of IPM resistant were 75.86% and 84.48%, while the positive rates in 27 stain of IPM sensitive were 11.11% and 74.07%. **Conclusion** The existance of OXA-23 is closely related to resistance of IPM in Acinetobacter baumannii. And it is the main reason of multidrug-resistance that 81.2% of these stains have qacE $\Delta$ 1.

**【Key words】** multidrug-resistance; Acinetobacter baumannii; OXA-23; qacE $\Delta$ 1

鲍曼不动杆菌(acinetobacter baumannii, Aba)广泛存在于自然界、医院环境、人体皮肤表面, 甚至是自来水中。有文献报道, Aba 在住院患者中的定植率可高达 75%<sup>[1]</sup>。Aba 已成为医院感染中的重要病原菌之一, 特别是在免疫力低下的患者中, 可以引起严重的, 甚至致死性的感染。近年来, 随着新型广谱抗菌药物频繁的应用, Aba 对抗菌药物的耐药性不断增强, 特别是泛耐药/多重耐药的鲍曼不动杆菌在医院引起的感染, 已成为临床抗感染治疗的一个难点。本次实验通过 PCR 方法检测 85 株多重耐药鲍曼不动杆菌(multidrug-resistance acinetobacter baumannii, MRAB)的 OXA-23 和 qacE $\Delta$ 1 耐药基因, 探究 MRAB 对多种抗菌药物的耐药机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 菌株来源** 85 株非重复性多重耐药鲍曼不动杆菌来源于广州医学院第一附属医院 2009 年 1 月至 2010 年 12 月住院和门诊患者送检的标本, 包括痰、中段尿、血液、胸腔积液、胆汁、纤支镜灌洗液、分泌物及静脉导管。

**1.2 细菌鉴定及药敏试验** 细菌鉴定为常规方法, 采用 VITEK-II 鉴定系统, 细菌鉴定到种。参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)制订标准(NCCLS 2001 年版)以纸片扩散法进行细菌药敏分析<sup>[2]</sup>。

**1.3 细菌处理** 细菌 DNA 提取: 采用煮沸法提取细菌 DNA。取处于对数生长期的新鲜菌液, 离心收集菌体, 加入适量的 TE 缓冲液, 煮沸 15 min, 快速冷却, 高速离心(15 000 r/min) 10 min, 上清液即可作为 DNA 模板进行 PCR 扩增。

**1.4 PCR 扩增检测 OXA-23 和 qacE $\Delta$ 1 基因** 利用 OXA-23、qacE $\Delta$ 1 引物(表 1)对抽提的 DNA 进行扩增。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 含正向及反向引物各 1  $\mu$ L、DNA 模板 1  $\mu$ L、东盛 PCR-Mix 12.5  $\mu$ L 及超纯水 9.5  $\mu$ L。反应条件分别为 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火时间 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环后 72  $^{\circ}$ C 充分延伸 5 min。最后电泳: 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中 100 V 电压电泳 40 min, EB 染色, 紫外凝胶电泳成像仪下观察、记录结果。

**1.5 测序用双脱氧末端终止法** 在华大基因公司进行基因测序, 结果与 BLASTn(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn)比对。

## 2 结 果

**2.1 85 株 MDRA 标本来源情况** 经筛选的 85 株 MDRA 最主要的标本来源为痰液, 占 64.7%; 其次为分泌物 10.6%; 尿液 9.41%, 分布情况见表 2。

**2.2 85 株 MDRA 的药敏情况** 85 株 MDRA 经 VITEK-2 全自动微生物鉴定系统进行鉴定及药敏检测确定为多重耐药鲍

\* 基金项目: 广东省卫生厅科研资助项目(A2010238); 广州医学院青年基金项目(2010A04)。

$\Delta$  通讯作者, E-mail: sudanhong2003@163.com。

曼不动杆菌,其中 58 株对亚胺培南耐药,27 株敏感;在临床常用的抗菌药物中除丁胺卡那霉素耐药率 12.9%,多黏菌素 B 耐药率 14.11%外,其余均在 85%以上。药敏情况见表 3。

表 1 PCR 引物基因序列及产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')		退火温度	产物长度(bp)
OXA-23	P1:GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	P2:TCACAACAACATAAAAGCACTG	55 °C	1 058
qacEΔ1	P1:TAGCGAGGGTTTACCTAAGC	P2:ATTCAGAATGCCGAACACCG	60.5 °C	300

表 2 85 株多重耐药鲍曼不动杆菌分布情况

标本类型	IPM 耐药	IPM 敏感	总计
痰液	38	17	55(64.7%)
分泌物	7	2	9(10.6%)
尿液	3	5	8(9.41%)
血液	4	1	5
灌洗液	1	1	2
胸腔积液	1	0	1
胆汁	1	0	1
静脉导管	2	0	2
其他	1	1	2

表 3 85 株多重耐药鲍曼不动杆菌药敏情况

抗菌药物	IPM 耐药			IPM 敏感		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
氨曲南(AZM)	55	3	0	26	1	0
氨苄西林(AMP)	58	0	0	27	0	0
头孢曲松(CRO)	58	0	0	25	2	0
头孢唑啉(CZO)	58	0	0	27	0	0
头孢吡肟(CEF)	52	4	2	22	3	2
头孢他啶(CAZ)	58	0	0	23	3	1
氨苄西林/舒巴坦(SAM)	56	2	0	24	0	3
哌拉西林/他唑巴坦(TZP)	53	5	0	5	18	4
丁胺卡那霉素(AMK)	7	0	51	4	0	23
庆大霉素(GEN)	56	2	0	23	0	4
妥布霉素(TOB)	53	3	2	20	0	7
环丙沙星(CIP)	58	0	0	25	2	0
左旋氧氟沙星(LVX)	46	11	1	15	9	3
呋喃妥因(NIT)	58	0	0	27	0	0
复方新诺明(SXT)	56	0	2	25	0	2
多黏菌素(B)	8	0	50	4	0	23

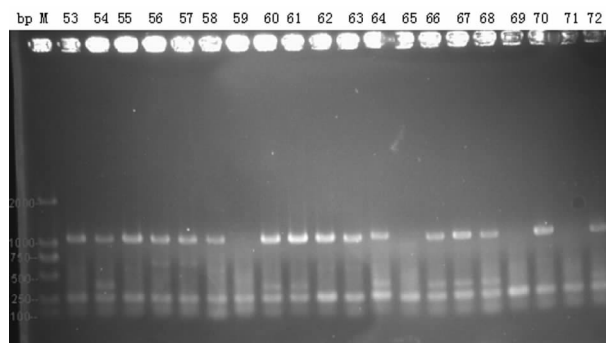
2.3 引物 OXA-23、qacEΔ1 扩增结果

2.3.1 OXA-23 PCR 扩增产物目的条带相对分子质量约 1 058 bp,结果显示 85 株耐药菌有 47 株携带该基因,占 55.3%,部分菌株扩增结果见图 1。

2.3.2 qacEΔ1-PCR 扩增产物目的条带相对分子质量约 300 bp,结果显示有 69 株检出扩增产物,阳性率 81.2%。见图 2。

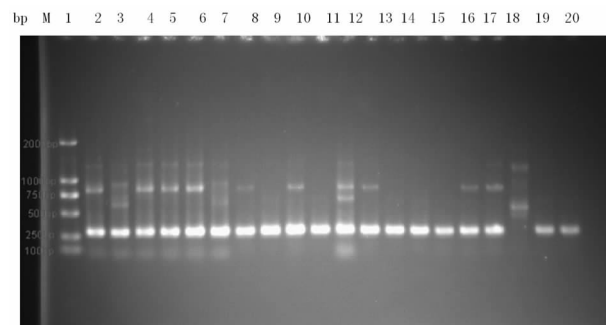
2.4 85 株 MRAB 菌株检出 OXA-23 基因阳性 47 株, qacEΔ1-sul1 基因阳性 69 株,任取 OXA-23 和 qacEΔ1-sul1 基因阳性 PCR 产物进行测序,经 BLASTn 比对,与美国 GenBank

已登录基因序列相同。



注:M,相对分子质量;编号 53~72,检出的 MDRA,均为亚胺培南耐药。

图 1 OXA-23 PCR 部分扩增产物图



注:M,相对分子质量;编号 1~20,检出的 MDRA,均为亚胺培南耐药。

图 2 qacEΔ1-PCR 部分扩增产物图

3 讨论

由于广谱抗生素的大量使用,致使多重耐药鲍曼不动杆菌不断得到选择生存<sup>[3]</sup>。2009 年 1 月至 2010 年 12 月,广州医学院第一附属医院共分离到 Aba 123 株,剔除同一患者、不同部位后(即每位患者只留取一株菌)有 96 株,多重耐药菌占 36.4%。而 2010 年 1~12 月,共分离到 195 株,同样每位患者只留取一株菌后有 148 株,其中多重耐药菌占 50.7%,比 2009 年上升 14.3%。而本实验发现,MRAB 菌株主要分离于痰标本,85 株 MDRA 菌中痰检出率达 64.7%,说明本院 MRAB 感染以肺部感染多见。

同时,本院分离的 Aba 对临床常用的抗菌药物均存在一定的耐药性,从实验结果可见,由于亚胺培南的大量使用,使亚胺培南(IPM)的耐药性已高达 68.2%,但仍然是本院治疗鲍曼不动杆菌较为敏感的抗菌药物,而本院的药敏结果显示耐亚胺培南鲍曼不动杆菌绝大部分只对丁胺卡那霉素和多黏菌素 B 敏感,暂时未发现泛耐药。由此可见 MRAB 的耐药性不断增强,感染率也不断上升。故为指导临床更为(下转第 1797 页)

的重要任务之一。

美国临床实验室修正法案(Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, CLIA'88)以及国际标准化组织颁布的医学实验室认可标准 ISO15189<sup>[6]</sup>均要求临床实验室对临床检验分析系统或方法的分析性能进行评价,并提供其性能指标,其中就包含正确度性能评价。我国政府发布的《医疗机构临床实验室管理办法》公报(卫医发[2006]73 号)亦明确规定不同血细胞分析仪须进行比对。

本文比对结果显示,不可比的项目包括 Hb 和 Hct: Hb 只在医学决定水平为 230 g/L 处,在 ACT-2 与 Sysmex XE-2100 结果比较时不可比; Hct 只有在 K4500-1 与 Sysmex XE-2100 比较,且当 X 值为 0.40 时,两者结果可比,其余情形下则否。导致结果不可比的可能原因包括:仪器老化、性能欠佳、管道欠清洁、试剂失效、方法学差异等。本实验室依据比对结果及仪器已使用年限,已报废 ACT-5 及 ACT-2 血细胞分析仪(使用期超过 10 年),并已购进 2 台新的血细胞分析仪。另一方面,对 K4500-1 和 K4500-2 进行充分维护保养,包括清洁样本旋转阀(Sample Rotor Valve, SRV)分血片等,再执行简化比对方案,结果显示此两台仪器的 Hct 指标与 Sysmex XE-2100 比较时,SE(%)均≤1/2 CLIA'88 允许误差范围,表明结果可比。

建立血细胞分析仪比对程序并定期执行比对试验,存在不可比项目时进行整改,包括对仪器进行必要的维护、保养及检修或校准乃至更新仪器,找出不可比的本质原因,采取相应措施解决存在的问题后重新比对,直至实现可比,这已成为确保

临床实验室为临床疾病诊疗及预后提供准确、可靠检验数据的有力措施之一。

参考文献

[1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-second edition[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002.

[2] England JM, Rowan RM, Van Assendemt OW, et al. Protocol for evaluation of automated blood cell counters[J]. Clin Lab Haematol, 1984, 6(1): 69-84.

[3] 彭黎明, 李丽娟, 彭志勇, 等. 几种血细胞分析仪结果的比对和质控[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(2): 94-97.

[4] 刘艳, 马晓露, 王秀伟, 等. 血细胞分析仪比对实验应用的评价探讨[J]. 大连医科大学学报, 2008, 30(4): 387-389.

[5] 王谦, 展凤霞, 郑桂喜, 等. 新鲜全血在不同血细胞分析仪比对试验中的评价. 山东大学学报: 医学版, 2009, 47(11): 68-73.

[6] David Burnett. ISO 15189: 2003-Quality management, evaluation and continual improvement[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(6): 733-739.

(收稿日期: 2011-05-05)

(上接第 1794 页)

合理的应用抗菌药物,了解鲍曼不动杆菌的耐药机制是十分必要的。为此,本实验选取 OXA-23、qacEΔ1 两种耐药基因进行监测。

OXA-23 是 D 类碳青霉烯酶耐药基因,能水解头孢菌素类及碳青霉烯类抗菌药物,是引起鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因之一<sup>[4-6]</sup>。本次实验 85 株标本总检出率是 55.3%,其中有 58 株对亚胺培南耐药, OXA-23 耐药基因的阳性率为 75.86%,而 27 株对亚胺培南敏感的菌株,阳性率仅 11.11%。提示 OXA-23 基因是医院鲍曼不动杆菌碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因之一。

qacEΔ1 位于 I 类整合子 3' 末端,并与 sul1 基因为重叠基因。qacEΔ1-sul1 基因是 I 类整合子的遗传标记,很多研究证明 I 类整合子可携带多种耐药基因盒。本组 85 株菌有 69 株 qacEΔ1 基因阳性,阳性率 81.2%,这比杨志伟等<sup>[7]</sup>的研究(菌株来源 2007 年, qacEΔ1 基因阳性率 52.5%)明显上升,这也是本组细菌表型为多重耐药主要原因之一。说明滥用及过度使用抗菌药物是本院鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物耐药性增强的原因。

综合上述资料,说明在多种抗菌药物的诱导下,鲍曼不动杆菌选择性生存,从由一种基因控制演变成多个基因共同介导对抗菌药物的耐药,使多耐/泛耐药菌的分离率不断提高。为此,应大力加强临床联合用药的意识,合理应用抗菌药物,降低细菌不断选择生存产生耐药的概率。

参考文献

[1] 张樱. 不动杆菌感染及耐药机制的研究进展[J]. 国外医

学: 流行病学传染病学分册, 2005, 32(2): 109-112.

[2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. M2-A6 and M7-A4: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 11th inform supplement[S]. Wayne PA: NCCLS, 2001: 23-52.

[3] 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.

[4] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471-3484.

[5] 虞涛, 鲍连生, 刘芳, 等. 儿童鲍曼不动杆菌产 IMP-4 及 OXA-23 型碳青霉烯酶分子流行病学[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(12): 1171-1175.

[6] 邹玖明, 张爱平, 李智山, 等. OXA-23 基因阳性耐亚胺培南鲍曼不动杆菌感染暴发调查研究[J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9(4): 235-537.

[7] 杨志伟, 季萍, 张坚, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 16S rRNA 甲基化酶基因及 qacEΔ1-sul1 基因检测的研究[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(5): 389-390.

(收稿日期: 2011-05-31)