

广泛耐药鲍曼不动杆菌 OXA 酶基因检测及 OXA-23 基因分析*

张丽婷¹, 戚永孝¹, 舒红云¹, 孙国强¹, 王冬国^{2△} (1. 台州学院医学院, 浙江台州 318000; 2. 台州学院医学院附属市立医院检验科, 浙江台州 318000)

【摘要】目的 研究台州学院医学院附属市立医院广泛耐药的鲍曼不动杆菌(Ab)苯唑西林酶(OXA 酶)基因的分布特性及 OXA-23 基因特点。**方法** 对 60 株 Ab 采用肉汤稀释法检测其最低抑菌浓度(MIC);聚合酶链反应(PCR)检测 OXA 酶的基因型,阳性产物进行 DNA 测序;对 OXA-23 阳性的菌株通过 BamH I 酶切分析 OXA-23 以及周围基因的特性。**结果** 60 株 Ab 对 15 种抗菌药物同时存在 13 种以上耐药;全部菌株检出 OXA-2、OXA-10、OXA-24 和 OXA-58,为普遍流行;27 株检测到 OXA-51,为次要流行。普遍流行的 OXA-2 以 OXA-2 基因型(61.7%)和 OXA-53 基因型(21.7%)为主;OXA-10 以 OXA-10 基因型(53.3%)和 OXA-56 基因型(23.3%)为主;OXA-24 以 OXA-24 基因型(38.3%)和 OXA-33 基因型(36.7%)为主;OXA-58 只有 OXA-58(100%)为唯一基因型;次要流行的 27 株 Ab OXA-51 中有 18 株为 OXA-51 基因型(30.0%)。另外 3 株 Ab 属于 OXA-23,都是 OXA-23 基因型,有关的基因结构包含转座子 Tn2008 和基因结构 ISAbal-blaOXA-23。**结论** 该院的 OXA 型 β-内酰胺酶基因型以 OXA-58 与 OXA-2 为主要流行,而对于 3 株 OXA-23 及其周围基因检测表明,ISAbal 与转座子 Tn2008 复合基因以及 ISAbal 与 blaOXA-23 的复合基因是其与众不同的特点。

【关键词】 广泛耐药; 鲍曼不动杆菌; OXA 基因; β-内酰胺酶

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)23-3312-02

鲍曼不动杆菌(Ab)在医院环境中分布广泛且可长期存活,对危重患者威胁很大,近年来已成为医院感染的重要机会致病菌^[1]。伴随着 Ab 感染的不断增多,且其耐药性日益严重,特别是“广泛耐药”鲍曼不动杆菌的出现,已引起临床高度重视,造成其耐药的主要原因之一是苯唑西林酶(OXA 酶)^[2]。为了解浙江台州市立医院的广泛耐药的鲍曼不动杆菌 OXA 酶基因的流行趋势及特点,本研究收集广泛耐药的 Ab 97 株,随机选取其中的 60 株作 D 类 β-内酰胺酶 OXA 酶基因类型检测及相关基因序列分析,结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 60 株实验菌株分离于浙江台州学院医学院附属市立医院住院患者的各类标本,经 VITEK60 微生物分析仪鉴定为 Ab,鉴定概率为 99%。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853,购自卫生部临床检验中心。

1.2 药敏试验 采用肉汤稀释法检测 60 株 Ab 对 15 种常用抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),用 Microscan 公司药敏板来检测药敏结果,试验方法和结果判定标准均参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)规定(M100-S21-2011 版)进行。

1.3 仪器与试剂 聚合酶链反应(PCR)仪为 AB stepone 实时荧光定量 PCR 系统(real-time PCR system);引物由上海生物工程股份有限公司合成;Taq 酶、PCR 试剂及 DNA Marker 购自 Fermentas 公司;电泳仪为 Bio-Rad 公司的 CHEF-Mapper XA PFGE 系统;λDNA 购自 Amersham Biosciences 公司;限制性内切酶 Apa I、BamH I 购自 Takara 公司。

1.4 基因检测 采用 PCR 扩增,按常规方法建立 PCR 体系,

循环参数为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,合适温度下退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察结果并拍照。OXA 基因家属分簇检测引物参照文献^[3],OXA-23 及其周围基因的引物见表 1。

1.5 携带 bla_{OXA-23} 基因的 Ab 作脉冲场凝胶电泳(PFGE)检测

阳性株的 DNA 按照 Gouby 等^[4]报道的方法采用 40 U Apa I 内切酶进行检测;电泳采用 CHEF-Mapper XA PFGE 系统在 14 ℃、0.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)/硼酸/乙二胺四乙酸(EDTA)缓冲液中工作 22 h,工作条件为 6 V/cm,120 U 脉冲角、5~20 s 的脉冲时间;λDNA 梯度作为 DNA 分子大小的标尺,电泳条带使用 0.5 mg/L 溴化乙锭染色,在 UV 灯下照相;DNA 内切酶类型分析参照 Tenover 等^[5]报道来解释。

表 1 OXA-23 及其周围基因的引物

引物	碱基序列(5'→3')	定位
OXA23 F	GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG	bla _{OXA-23} 基因正链
OXA23 R	TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG	bla _{OXA-23} 基因负链
ATPase R	GCT TCA TCC AGA AGC GTC CGG	ATPase 基因负链
ISAbal F	ATG CAG CGC TTC TTT GCC AGG	ISAbal 基因正链
ISAbal R	AAT GAT TGG TGA CAA TGA AG	ISAbal 基因负链
ISAbal-ext F	AAG CAC TTG ATG GGC AAG GC	ISAbal 外部基因正链
ISAbal4 F	ATT TGA ACC CAT CTA TTG GC	ISAbal4 基因正链
ISAbal4 R	ACT CTC ATA TTT TTT CTT GG	ISAbal4 基因负链

* 基金项目:浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)(2013R428030);台州学院青年基金(2012QN31)。

△ 通讯作者,E-mail:wdgtzs@163.com。

1.6 包含 bla_{OXA-23} 及其周围基因的 Ab 基因结构检测 按照 Jeon 等^[6]、Lee 等^[7]和 Woodford 等^[8]报告的操作程序,使用表 1 所列的引物扩增 bla_{OXA-23}、ATPase、ISAbal 和 ISAb4 等基因;从 PCR 产物纯化 DNA 并使用 BamH I 内切酶消化,将所得片段连接到 pBKCMV 质粒,并转化到大肠杆菌 DH10B 中^[9]。

1.7 DNA 测序 PCR 扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司进行 DNA 双向序列测定。测序结果使用 Contig Express Project 软件拼接,BLASTn 比对核苷酸序列。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 60 株 Ab 对常用 15 种抗菌药物同时存在 13 种以上耐药,仅有 1~2 株 Ab 对极其有限的抗菌药物敏感,如头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南和美洛培南,对其他绝大部分都耐药。见表 2。

表 2 60 株鲍曼不动杆菌对 15 种抗菌药物的药敏结果[n(%)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药
氨苄西林	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
阿莫西林/克拉维酸	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
头孢呋辛	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
头孢吡肟	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
头孢哌酮/舒巴坦	1(1.7)	1(1.7)	58(96.6)
头孢唑肟	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
头孢噻肟	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
头孢西丁	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
头孢他啶	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
阿米卡星	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
庆大霉素	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
亚胺培南	1(1.7)	2(3.3)	57(95.0)
左氧氟沙星	0(0.0)	0(0.0)	60(100.0)
美洛培南	2(3.3)	1(1.7)	57(95.0)
哌拉西林/他唑巴坦	0(0.0)	1(1.7)	59(98.3)

2.2 OXA 基因 PCR 检测 60 株广泛耐药 Ab D 类 β-内酰胺酶 OXA 酶基因 PCR 检测,其中全部检测到 OXA-2、OXA-10、OXA-24 和 OXA-58,为普遍流行;27 株(45%)检测到 OXA-51,为次要流行。

2.3 基因测序分型结果 60 株 Ab 普遍流行的 OXA-2 以 OXA-2 基因型(37 株,占 61.7%)和 OXA-53 基因型(13 株,占 21.7%)为主;60 株 OXA-10 以 OXA-10 基因型(32 株,占 53.3%)和 OXA-56 基因型(14 株,占 23.3%)为主;60 株 OXA-24 以 OXA-24 基因型(23 株,占 38.3%)和 OXA-33 基因型(22 株,占 36.7%)为主;60 株 OXA-58 只有 OXA-58(100.0%)为唯一基因型;27 株次要流行的 OXA-51 中有 18 株(占 30.0%)为 OXA-51 基因型;还有 3 株 Ab 属于 OXA-23,都是 OXA-23 基因型(占 5.0%)。

2.4 携带 bla_{OXA-23} 基因的 Ab 特性 携带 bla_{OXA-23} 基因的 3 株临床分离的 Ab 中,有 2 株携带转座子 Tn2008,但 2 株细菌的 PFGE 不一样,分别为 C 型(Ab12)和 A 型(Ab28);还有 1 株

携带 ISAbal-bla_{OXA-23},其 PFGE 为 B 型(Ab5)。包含 bla_{OXA-23} 基因的 Tn2008 以及 ISAbal-bla_{OXA-23} 基因结构,(1)转座子 Tn2008,由 BamH I 内切酶消化后得到大约 7.3 kb 的 DNA 片段(Ab12 和 Ab28 的重组质粒 pAB12B 和 pAB28B);(2)基因结构 ISAbal-bla_{OXA-23},由 BamH I 内切酶消化后得到大约 7.3 kb 的 DNA 片段(Ab5 的重组质粒 pAB5)。

3 讨 论

本文 60 株 Ab 对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类等 15 种常用抗菌药物同时存在 13 种以上耐药,仅有 1~2 株 Ab 对头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南和美洛培南敏感,说明此 60 株 Ab 为“广泛耐药”株。本研究对实验菌株 OXA 基因 PCR 分簇检测表明,OXA-2、OXA-10、OXA-24 和 OXA-58 普遍流行,60 株实验菌株全部检测到;OXA-51 为次要流行,共 27 株检测到。进一步作基因测序分型表明,本院 60 株“广泛耐药”的 Ab 中,被检测的 OXA 型 β-内酰胺酶基因型主要为 OXA-58(100.0%)、OXA-2(61.7%)、OXA-10(53.3%)、OXA-24(38.3%)、OXA-33(36.7%)、OXA-51(30.0%)和 OXA-53(21.7%)。

对于 3 株 OXA-23 的 Ab,OXA-23 是其唯一基因型,本研究作 PFGE 与 bla_{OXA-23} 基因结构的检测与分析,发现虽然都属于 OXA-23 基因,但他们的 PFGE 类型不一样,分别为 C 型(Ab12)、A 型(Ab28)和 B 型(Ab5);通过酶切测序分析,对应的基因结构包含转座子 Tn2008、Tn2008 和基因结构 ISAbal-bla_{OXA-23}。国外的一些研究表明,包含转座子 Tn2008、Tn2007 和 Tn2006 的多药耐药的 Ab 欧洲株 I、II、III 型在一些地方广泛流行^[10-11]。在本研究检测的 60 株 Ab 中只有 2 株检测到 Tn2008,未检出 Tn2007 和 Tn2006;从 Ab12 和 Ab28 分离的 Tn2008 是 bla_{OXA-23} 基因的主要运载工具。在 Tn2008 左右两边存在 16 bp 的序列作为 ISAbal 的 IRL 和 IRR;ISAbal 的单一拷贝能够识别 IRL 为新的边界来转运 bla_{OXA-23} 和 ATPase,16 bp 的 ISAbal 反向重负序列 IRR 又提示 ISAbal 可能是 bla_{OXA-23} 的另外边界^[12]。

综上所述,本院的 OXA 型 β-内酰胺酶基因型以 OXA-58 和 OXA-2 为主,而对于少量菌株的 OXA-23 及其周围基因检测表明,ISAbal 与转座子 Tn2008 复合基因以及 ISAbal 与 bla_{OXA-23} 的复合基因,又是 OXA-23 基因与众不同的特点。

参 考 文 献

- [1] 杜娟,李薇. 148 株鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2013,10(2):155-156.
- [2] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother,2006,57(3):373-383.
- [3] 胡海莹,王冬国,魏志英,等. 多药耐药大肠杆菌 OXA 基因检测及聚类分析[J]. 医学研究杂志,2012,41(9):129-133.
- [4] Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of Acinetobacter baumannii[J]. J Clin Microbiol,1992,30(6):1588-1591.
- [5] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, (下转第 3315 页)

GAP-PCR 和 PCR-RDB 技术对 361 例地贫初筛阳性孕产妇进行基因检测,确诊为地贫 165 例,阳性率为 45.71%,表明基因检测有利于地贫诊断,为孕产妇考虑是否选择终止妊娠提供了快速可靠的科学参考,对指导优生优育,提高人口素质有重要意义。因此,开展婚检、孕前、孕期中地贫基因诊断,有利于防止中、重型地贫患儿出生。

本研究结果表明,在 361 例初筛阳性的孕产妇中确诊 α -地贫 76 例,阳性率为 21.05%, β -地贫 89 例,阳性率为 24.65%,与四川、重庆地区报道的 β -地贫基因携带率高于 α -地贫相似^[7-8]。其中,76 例 α -地贫孕产妇中,确诊 $-^{SEA}/\alpha\alpha$ 型 49 例(64.47%), $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 型 25 例(32.89%), $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 型 2 例(2.63%)。表明 $-^{SEA}/\alpha\alpha$ 是本地区孕产妇 α -地贫基因的主要缺失型。在 89 例 β -地贫孕产妇中,共检出 6 种基因突变类型,其中突变类型前 5 位分别是 CD17 型、CD41-42 型、IVS-II-654 型、CD43 型、28 型,基因构成比分别为 39.33%、30.34%、16.85%、6.74%、4.49%。表明本地区孕产妇 β -突变主要类型是 CD17 型,其次为 CD41-42 型,与云南、贵州、南川报道的主要基因突变类型相似^[9-11];而与王欢等^[8]报道重庆 β -突变主要类型略有不同,这可能与本次研究人群范围不同有关,表明不同地域和人群的 β -地贫基因突变类型的构成不尽相同。

本次研究中有 196 例地贫初筛阳性的孕产妇未检测出相应的珠蛋白基因突变位点,存在缺铁性贫血或其他基因突变类型。由于本次地贫基因诊断采用目前常用的 GAP-PCR 和 PCR-RDB 技术,主要检测 $-^{SEA}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 3 种缺失型及 Qs、CS、WS 3 种点突变类型和我国常见 17 种 β -地贫基因突变位点,不能检测出其他罕见突变类型。

综上所述,本文地贫基因诊断方法对探索建立有效的产前地贫基因诊断提供了科学参考,其研究结果为指导本地区孕产妇地贫的遗传咨询、携带者筛查、产前诊断提供了一定的参考价值。

参考文献

[1] 郑美琴,李伟,吕建新.温州地区汉族人群 β -地中海贫血

(上接第 3313 页)

et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis; criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.

[6] Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2241-2245.

[7] Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(11): 4485-4491.

[8] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp [J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 27(4): 351-353.

患者 B 珠蛋白基因突变分析 [J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(3): 236.

[2] 沈寅琛. 南宁地区 14768 例优生与遗传咨询者的分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17(8): 120.

[3] 朱慧明. 24743 例婚检人群中地中海贫血筛查情况分析 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(23): 3598-3599.

[4] 麦凤鸣, 颜双鲤. 地中海贫血筛查指标的分析评价 [J]. 中华全科医学, 2013, 11(3): 350.

[5] Najmabadi H, Ghamari A, Sahebjam F, et al. Fourteen-year experience of prenatal diagnosis of thalassemia in Iran [J]. Community Genet, 2006, 9(2): 93-97.

[6] 唐盈, 陈桂兰, 何聚莲, 等. 1031 例广州市育龄人群地中海贫血基因诊断分析 [J]. 国际医药卫生导报, 2013, 19(16): 2465-2467.

[7] 王霞, 江虹, 贾劲, 等. 四川地区人群地中海贫血的筛查及基因分析 [J]. 生物医学工程学报, 2011, 28(1): 135-137.

[8] 王欢, 刘申, 黄君富, 等. 953 例重庆地区地中海贫血基因突变类型分析 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(17): 1802-1804.

[9] 朱宝生, 贺静, 张杰, 等. 云南省地中海贫血基因携带者及患者 α 和 β 珠蛋白基因突变谱与产前基因诊断 [J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(2): 85-89.

[10] 马星卫, 许吟, 戴薇, 等. 贵阳地区 1143 例孕妇地中海贫血筛查及基因检测结果分析 [J]. 重庆医学, 2013, 42(17): 1990-1991.

[11] 杨夕, 汪文明, 安刚, 等. 南川地区地中海贫血基因分型的分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(21): 2830-2831, 2834.

(收稿日期: 2014-03-17 修回日期: 2014-05-20)

[9] Héritier C, Poirel L, Fournier PE, et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(10): 4174-4179.

[10] 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.

[11] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.

[12] Wang X, Zong Z, Lü X. Tn2008 is a major vehicle carrying bla(OXA-23) in *Acinetobacter baumannii* from China [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 69(2): 218-222.

(收稿日期: 2014-04-16 修回日期: 2014-06-12)