

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.016

90 株鲍曼不动杆菌 OXA 基因及 ISAbal 对 OXA-23 基因表达的影响

李 美, 杨正海, 李 婕, 李小宁[△]

(皖南医学院弋矶山医院检验科, 安徽芜湖 241001)

摘要:目的 研究该院鲍曼不动杆菌(Ab)OXA 基因流行趋势及 ISAbal 对 OXA-23 基因表达的影响。方法 采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪检测 90 株非重复 Ab, 多重聚合酶链式反应(PCR)检测 Ab 的 OXA 基因和插入序列(ISAbal)。TA 克隆耐药基因全序列 blaOXA-23、插入序列 ISAbal 和 ISAbal-blaOXA-23, 并分别用大肠杆菌进行转化, 肉汤稀释法测定阳性菌株和转化子对亚胺培南和美罗培南的最低抑菌浓度(MIC)。结果 多重 PCR 检测 90 株 Ab, blaOXA-23 阳性 73 株, blaOXA-51 阳性 90 株, ISAbal 阳性 86 株, 未检测到 blaOXA-24、blaOXA-58 阳性菌株。17 株未检测到 blaOXA-23 阳性的菌株中有 11 株对亚胺培南敏感, 其中 11 株中有 4 株未检测到 ISAbal。转化阳性菌株 pET28b(+)-blaOXA-23、pET28b(+)-ISAbal、pET28b(+)-ISAbal-blaOXA-23 和转化子[pET28b(+)]对亚胺培南 MIC 值分别为 4.00、1.00、64.00 和 0.12 μg/mL; 对美罗培南 MIC 值分别为 4.00、0.50、16.00 和 0.03 μg/mL。结果显示 ISAbal 对 blaOXA-23 基因的表达有影响。结论 该院 Ab 流行以 blaOXA-23 和 blaOXA-51 为主。ISAbal 对 blaOXA-23 的高表达可能是 Ab 对碳青霉烯类抗菌药物高度耐药的主要原因。

关键词:鲍曼不动杆菌; OXA 基因; ISAbal; 碳青霉烯类抗菌药物

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)18-2740-04

Research OXA gene and effect of ISAbal to blaOXA-23 in 90 Acinetobacter baumanniiLI Mei, YANG Zhenghai, LI Jie, LI Xiaoning[△]

(Department of Clinical Laboratory, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241001, China)

Abstract: Objective To study the the Yijishan Hospital of Wannan Medical College about OXA gene popular trend, as well as the effect of ISAbal to blaOXA-23 in Acinetobacter baumannii. **Methods** Using VITEK 2 compact automatic microbe testing of 90 non-replicate Acinetobacter baumannii strains, multiple polymerase chain reaction (PCR) detection of OXA gene and inserted sequence (ISAbal) in Acinetobacter baumannii. TA cloning resistant gene sequence blaOXA-23, insertion sequence ISAbal and ISAbal-blaOXA-23, carrying on the transformation with E. coli. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of the positive strains and the products of the transformation to imipenem and meropenem were determined using broth dilution. **Results** Multiple polymerase chain reaction PCR detection of 90 non-replicate Acinetobacter baumannii strains, 73 of blaOXA-23 positive strains, 90 of blaOXA-51 positive strains, 86 of ISAbal positive strains, not detected blaOXA-24 and blaOXA-58 positive strains. Totally 17 of blaOXA-23 negative strain had 11 strains were sensitive to imipenem, in which 11 strains of four strains were not detected ISAbal. The MIC of positive strains, pET28b(+)-blaOXA-23, pET28b(+)-ISAbal, pET28b(+)-ISAbal-blaOXA-23 and transformant[pET28b(+)] to imipenem were 4.00 μg/mL, 1.00 μg/mL, 64.00 μg/mL and 0.12 μg/mL respectively; To the meropenem were 16.00 μg/mL, 4.00 μg/mL, 0.50 μg/mL and 0.03 μg/mL respectively. Results showed that the ISAbal affected blaOXA-23 gene expression. **Conclusion** The south of Anhui province popular gene are blaOXA-23 and blaOXA-51. ISAbal result high expression to blaOXA-23, may be carbapenems antibiotics highly resistant main reasons in Acinetobacter baumannii.

Key words: Acinetobacter baumannii; OXA genes; ISAbal; carbapenems antibiotics

鲍曼不动杆菌(Ab)属于一种条件致病菌,有着较强的耐药性,大多数感染 Ab 的患者仅仅对碳青霉烯

类及多黏菌素类药物有效^[1]。根据统计数据显示,目前该菌株的临床检出率已经超过铜绿假单胞

菌,位于非发酵菌的首位,并且随着多重耐药菌株的出现,Ab 的耐药能力与耐药广泛性大幅度提高,因此如何控制 Ab 的传播及如何快速有效地诊治感染耐多药 Ab 的患者,已经变成临床医学和检验医学研究人员遇到的棘手问题^[2]。按照 2015 年全国细菌耐药监测网数据统计显示,不动杆菌属(Ab 占 93.4%)对亚胺培南与美罗培南的耐药已经达到 62.0%与 70.5%^[3]。所以,分析其耐药原因及消除和防控该菌的感染是十分关键的^[4]。本研究对本院 Ab OXA 基因,以及 ISAbal 对 OXA-23 基因表达的影响进行分析,分析 Ab 对碳青霉烯类抗菌药物有着较高耐药率的因素,通过迅速检测 Ab 的 ISAbal 与 OXA 基因型,为早期诊断耐药性的 Ab、及时配合临床科学化用药治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料来源 收集本院 2015 年 5 月至 2016 年 5 月临床分离的非重复 Ab 共 90 株。其中男性标本 65 株,女性标本 25 株,平均年龄均为 64 岁。其中痰 78

株,分泌物 4 株,血、尿和脓液各 2 株,引流液及脑脊液各 1 株。常规分离培养菌株,VITEK 2 Compact 型全自动微生物鉴定仪鉴定为 Ab 后保存于 -80 °C。质控菌株 AbATCC15151 购自美国菌种中心,铜绿假单胞菌 ATCC27853 购自原国家卫生计生委临床检验中心。pET-28b(+)克隆载体,大肠埃希菌 DH5 α 由安徽师范大学生命科学院朱国萍教授赠送。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 Compact 型全自动微生物鉴定仪及菌种鉴定和药敏卡(法国梅里埃公司)、比浊仪(Bio-Merieux 公司);CO₂ 培养箱(Thermo Fisher 公司);生物安全柜(ESCO 公司);电泳仪、PCR 仪、凝胶成像系统(Bio-Rad 公司);超纯水仪、超低温冰箱(美国 NBS 公司)等。2 \times Prime STAR MAX,细菌基因组 DNA 提取试剂盒,DNA Marker II, DNA Marker III,溴乙锭,MH 琼脂,琼脂糖均购自北京天根生物科技有限公司;PCR 引物合成,测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。本实验中所用引物,见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

目的基因	引物名称	引物序列 5'~3'	片段长度 (bp)	GenBank 登录号	参考文献
多重 PCR 检测 OXA 基因和 IS					
blaOXA-23	OXA-23F	ACCCGAGTCAGATGTTC AAGG	606	NC017171.1	5
	OXA-23R	CCAGCCCACTTGTGGTTTATAT			
blaOXA-24	OXA-24F	GTCCCTGCATCAACATTTAAGATGC	477	GQ476987.1	5
	OXA-24R	CACCCAACCAGTCAACICAACCTACCT			
blaOXA-51	OXA-51F	GCTATGGTAATGATCTTGCTCGTGC	509	EU255295.1	5
	OXA-51R	TCCAGTTAACCAGCCTACTTGTGGG			
blaOXA-58	OXA-58F	ATATGGCACGCATTTAGACCGAG	515	HQ005471.1	5
	OXA-58R	CAACAAAACCCACATACCAACC			
ISAbal	ISAbal-F	CTGAATCGCCATTTGAACATAGTCT	759	GQ861439.1	本实验
	ISAbal-R	GCAGGTCAGTATTTGATTTATCGTC			
PCR 扩增 blaOXA-23 和 ISAbal 的完整序列					
blaOXA-23	NdeI-OXA-23F*	GGGAATTCATATGCTCTGTACACGACAAATTCAC	822	GQ861439.1	本实验
	XhoI-OXA-23R*	GGGAATTCATATGCTCTGTACACGACAAATTCAC			
ISAbal	NdeI-ISAbal-F*	GGGAATTCATATGCTCTGTACACGACAAATTCAC	1 181	GQ861439.1	本实验
	XhoI-ISAbal-R*	CCGCTCGAGCTCTGTACACGACAAATTCACAG			

注:* 为 PCR 扩增 blaOXA-23 和 ISAbal 全序列所用引物;- 为无数据

1.3 方法

1.3.1 模板 DNA 的制备 根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)说明书按照操作步骤提取 DNA 模板,PCR 电泳检测确认,-20 °C 保存备用。

1.3.2 耐药基因的检测 多重 PCR 检测(10 μ L 体系):多重 PCR 检测 OXA 基因及插入序列 1 (blaOXA-23、blaOXA-24、blaOXA-51、blaOXA-58 和 ISAbal)。

PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s、56 °C 复性 30 s、72 °C 延伸 20 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,12 °C 保存。PCR 扩增产物经含 0.5 μ g/mL 溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下观察结果并拍照。

PCR 扩增耐药基因全序列(50 μ L 体系): blaOXA-23 和 ISAbal 基因完整序列的扩增。其 PCR 反

应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,55 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 15 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,12 °C 保存。ISAbal-blaO_{XA-23} 基因完整序列的扩增,其 PCR 反应条件为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,60 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,12 °C 保存。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物经含 0.5 μg/mL 溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下观察结果并拍照。

1.3.4 PCR 产物的纯化 天根生化公司 DNA 产物纯化试剂盒,按说明书进行 PCR 产物纯化。

1.3.5 PCR 产物的连接 双酶切的 PCR 产物 blaO_{XA-23} 和 ISAbal 和 ISAbal-blaO_{XA-23} 与双酶切的 pET-28(+)质粒的连接。

1.3.6 PCR 连接产物的转化与测序 将连接产物转化到大肠埃希菌 DH5α 感受态,筛选出阳性转化子。对阳性转化子进行鉴定。对 PCR 阳性的转化子扩大培养后送南京金斯瑞生物科技有限公司采用 3730 DNA 自动测序仪(Applied Biosystems 公司)双向测序。测序结果经 BioEdit 软件拼接后在 GenBank 数据库在线 Blast,分析 blaO_{XA-23} 序列的一致性,并用 BioEdit 软件制作比对图。

1.3.7 药敏实验 采用肉汤稀释法测定转化阳性菌株和空载质粒重组菌株对亚胺培南和美罗培南的最低抑菌浓度(MIC)值,操作及结果解释参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)2015 年标准判断。

2 结 果

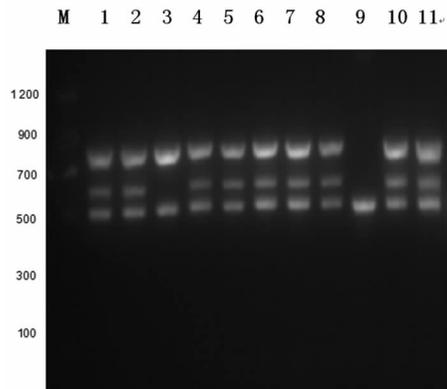
2.1 OXA 酶基因和插入序列 ISAbal 检测结果 90 株 Ab 中,耐碳青霉烯类药物的菌株有 61 株,所有菌株 blaO_{XA-51} 均是阳性,其中 blaO_{XA-23} 阳性菌株 73 株,ISAbal 阳性菌株 86 株,未检测到 blaO_{XA-24},blaO_{XA-58} 阳性菌株,17 株未检测到 blaO_{XA-23} 阳性的菌株中有 11 株对亚胺培南敏感,11 株对亚胺培南敏感的菌株中有 4 株也未检测到 ISAbal,见表 2。部分多重 PCR 电泳结果,见图 1。

表 2 90 株 Ab blaO_{XA} 酶基因及 ISAbal 的检出率

测序基因	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
blaO _{XA-23}	73	17	81.11
blaO _{XA-24}	0	90	0.00
blaO _{XA-51}	90	0	100.00
blaO _{XA-58}	0	90	0.00
ISAbal	86	4	95.56

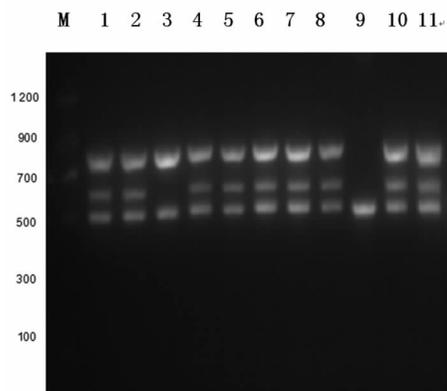
2.2 转化实验结果 挑选 blaO_{XA-23} 和 ISAbal 阳性菌株进行全序列 PCR 扩增,扩增后的 blaO_{XA-23},ISAbal,ISAbal-blaO_{XA-23} 全序列转化 DH5α,重组质粒

PCR 鉴定结果显示 blaO_{XA-23}, ISAbal, ISAbal-blaO_{XA-23} 和 PET-28b(+)载体均连接成功,PCR 电泳结果,见图 2。提取经双酶切鉴定正确的阳性克隆菌株 1ml 交送南京金斯瑞有限公司采用双向测序,测序引物为 pET-28b(+)通用引物。用 BioEdit 软件与 GenBank 中已报道的基因序列进行比对,都与注册号 GQ861439.1 的 Ab 菌株 100% 一致。



注: M 为标记物; 1~2, 4~8, 10~11 泳道为含有 blaO_{XA-23}, blaO_{XA-51} 和 ISAbal 的菌株检测结果; 3 泳道为含有 blaO_{XA-51} 和 ISAbal 的菌株检测结果; 9 泳道为仅含有 blaO_{XA-51} 的菌株检测结果

图 1 多重 PCR 检测 4 种 OXA 酶基因及插入序列 1 的扩增产物条带



注: M 为标记物; 1 泳道为空白对照; 2 泳道为含有 blaO_{XA-23} 的重组质粒的检测; 3 泳道为含有 ISAbal 的重组质粒检测结果; 4 泳道为含有 ISAbal-blaO_{XA-23} 的重组质粒检测结果

图 2 重组质粒双酶切鉴定

2.3 转化菌株药敏实验 转化阳性菌株 pET28b(+)-blaO_{XA-23}、pET28b(+)-ISAbal、pET28b(+)-ISAbal-blaO_{XA-23} 和空载的 pET28b(+)对亚胺培南 MIC 值分别为 4.00、1.00、64.00、和 0.12 μg/mL。对美罗培南 MIC 值分别为 4.00、0.50、16.00 和 0.03 μg/mL。

3 讨 论

现如今医疗水平不断在迅猛发展,但是全球范围内都有着同样一个趋势,即 Ab 的临床感染和耐药现状日益严重,尤其是对耐碳青霉烯类的 Ab 治疗方法十分有限,应当引起医务人员的高度重视^[6]。因此研

究 Ab 流行菌株的耐药基因特征对于指导合适的抗菌药物针对性的治疗就显得极其重要^[7]。

众所周知, D 类 blaO_{XA} 是 Ab 最常见的碳青霉烯酶。除了固有的 blaO_{XA-51} 酶, 还包括 blaO_{XA-23}, blaO_{XA-24}, blaO_{XA-58} 类型的碳青霉烯水解酶^[8]。

本实验通过检测 90 株 Ab 的 OXA 酶基因和 ISAbal, 其中耐碳青霉烯类药物的菌株有 61 株, 发现所有的菌株均携带 blaO_{XA-51}, blaO_{XA-23} 阳性菌株 73 株, ISAbal 阳性菌株 86 株, blaO_{XA-23} 和 ISAbal 均为阳性的菌株 73 株, 未检测到 blaO_{XA-24}, blaO_{XA-58} 阳性菌株, 17 株未检测到 blaO_{XA-23} 阳性的菌株中有 11 株对亚胺培南敏感, 11 株对亚胺培南敏感的菌株中有 4 株也未检测到 ISAbal, 说明本地区的 OXA 酶基因型主要以 blaO_{XA-23} 和 blaO_{XA-51} 为主, Ab 对碳青霉烯类抗菌药物存在较高的耐药性与 blaO_{XA-23} 基因的表达存在关系, 插入 ISAbal 也在耐碳青霉烯的 Ab 中发挥着一定的作用。61 株耐碳青霉烯的 Ab 中有 55 株 blaO_{XA-23} 阳性(占 90.16%), 与 WU 等^[9]的研究结果相符, 即在中国 blaO_{XA-23} 是 Ab 中最常见的碳青霉烯酶基因, 并且 90% 的亚胺培南耐药菌株存在 blaO_{XA-23}。

Ab 的耐药机制非常复杂, 其耐药的生化机制主要涉及产氨基糖甙类药物修饰酶、AmpC 酶、碳青霉烯酶、青霉素结合蛋白的改变和主动外排泵出机制、代谢方式的改变、外膜蛋白的丢失或膜孔蛋白的缺损等^[10]。为了更好地了解 blaO_{XA-23}, 与 ISAbal 以及 ISAbal-blaO_{XA-23} 对碳青霉烯类抗菌药物产生的影响, 为了防止其他条件对其造成影响, 本实验选取了 blaO_{XA-23} 基因和 ISAbal 阳性菌株设计了全序列耐药基因 PCR 扩增。分别将 blaO_{XA-23} 基因, ISAbal 和带有插入序列 ISAbal 的 blaO_{XA-23} 全序列片段转化到大肠埃希菌 DH5 α 中, 测序, 其中 ISAbal 位于 blaO_{XA-23} 基因上游 33 bp 处。通过 MH 肉汤稀释法测得转化阳性菌株 pET28b(+)-blaO_{XA-23}、pET28b(+)-ISAbal、pET28b(+)-ISAbal-blaO_{XA-23} 和空载的 pET28b(+)对亚胺培南 MIC 值分别为 4.00、1.00、64.00 和 0.12 μ g/mL。对美罗培南 MIC 值分别为 4.00、0.50、16.00 和 0.03 μ g/mL。检测结论说明, 单独的 blaO_{XA-23} 和 ISAbal 能够对对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性产生影响, 不过 ISAbal 对 blaO_{XA-23} 基因的高表达, 导致 Ab 对碳青霉烯类抗菌药物呈现高度耐药。研究结果和 VIANA 等^[11]的文章报道是一致的。

综上所述, 应用分子生物学技术快速检测 Ab-blaO_{XA-23} 基因和 ISAbal, 可以及时筛选 blaO_{XA-23} 基因

和 ISAbal 阳性的 Ab, 从而避免使用碳青霉烯类药物, 为临床科学用药, 有效减少高耐药、多重耐药细菌的产生提高理论依据。

参考文献

- [1] DA SILVA G J, DOMINGUES S. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*[J]. *Microorganisms*, 2016, 4(3):29.
- [2] 张静, 赵水娣, 张之烽. 南京市部分地区医院感染鲍曼不动杆菌的耐药基因和分子流行病学研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(1):74-76.
- [3] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2016, 16(6):685-694.
- [4] GALLAGHER L A, RAMAGE E, WEISS E J, et al. Resources for genetic and genomic analysis of emerging pathogen *acinetobacter baumannii*[J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(12):2027-35.
- [5] 杨正海, 李小宇. 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.
- [6] 肖美芳, 王昌富, 周义正, 等. 鲍曼不动杆菌耐药性及 blaOXA-23 基因研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(17):2991-2993.
- [7] SUN X, LIU B, CHEN Y, et al. Molecular characterization of Ambler class A to D β -lactamases, IS Abal, and integrons reveals multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in northeastern China[J]. *J Chemother*, 2016, 28(6):469-475.
- [8] NING N, LIU X, BAO C, et al. Molecular epidemiology of bla OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 65-month period in north China[J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1):14.
- [9] WU W, HE Y, LU J, et al. Transition of blaO_{XA-58}-like to blaO_{XA-23}-like in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Southern China: an 8-Year Study[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0137174.
- [10] KAMOLVIT W, SIDJABAT H E, PATERSON D L. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance of *acinetobacter* spp. in Asia and Oceania[J]. *Microb Drug Resist*, 2015, 21(4):424-434.
- [11] VIANA G F, ZAGO M C, MOREIRA R R, et al. ISAbal/bla OXA-23: a serious obstacle to controlling the spread and treatment of *Acinetobacter baumannii* strains[J]. *Am J Infect Control*, 2016, 44(5):593-595.

(收稿日期:2018-01-13 修回日期:2018-03-27)