

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

邹玖明, 张爱平, 李智山, 杨 燕, 邓三季

(华中科技大学同济医学院附属襄樊医院, 湖北 襄樊 441021)

[摘要] 目的 了解某院神经内科重症监护室(ICU)暴发流行耐亚胺培南鲍曼不动杆菌感染的基因型及耐药机制。方法 以 API20NE 鉴定菌株, 纸片扩散法测定分离菌株对常用抗菌药物的敏感性, 聚合酶链反应(PCR)扩增 3 种酶基因(OXA、IMP、VIM), 并对产物进行测序。结果 患者痰标本分离的 7 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌均携带 OXA-23 基因, 未检出 IMP、VIM 基因。结论 此次暴发流行中, 耐碳青霉烯类药物的鲍曼不动杆菌携带的耐药基因为 OXA-23 基因。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; 亚胺培南; OXA-23; 医院感染; 暴发流行; 流行病学; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)04-0235-03

An infection outbreak of OXA-23 carbapenemase-producing imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

ZOU Jiu-ming, ZHANG Ai-ping, LI Zhi-shan, YANG Yan, DENG San-ji (Xiangfan Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Xiangfan 441021, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the gene types and drug-resistance mechanism of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) causing infection outbreak in an intensive care unit (ICU). **Methods** *A. baumannii* isolates were identified by API20 NE, antimicrobial susceptibility were detected by disc agar diffusion methods. Three genes including OXA, IMP, and VIM were amplified by polymerase chain reaction (PCR), sequences were analysed using BLAST 2.0. **Results** Seven imipenem-resistant *A. baumannii* isolates all carried OXA-23 gene, IMP and VIM genes were not detected. **Conclusion** The outbreak was mainly caused by *A. baumannii* which carried OXA-23 gene.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; imipenem; OXA-23; nosocomial infection; outbreak and epidemic; epidemiology; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2010, 9(4): 235-237]

鲍曼不动杆菌是导致医院感染的重要病原菌, 在免疫力低下的患者中, 可以引起严重的感染, 而随着抗菌药物的广泛应用, 泛耐药鲍曼不动杆菌的比例也在逐渐增加, 其在重症监护室(ICU)引起的暴发, 国内外屡有报道^[1]。2009年10—11月, 某院神经内科 ICU 发生耐亚胺培南鲍曼不动杆菌感染暴发, 我们对引起本次暴发流行的耐亚胺培南鲍曼不动杆菌进行了耐药表型分析及基因检测, 为制定有效控制暴发流行措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 7 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌均分离自某院神经内科 ICU 2009 年 10—11 月间发生感染的患者, 同一患者只取首次分离菌株。标本分布: 痰标本 4 份, 尿标本 1 份, 血液标本 1 份, 脑脊液标本 1 份。质控菌株铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和大肠埃希菌 ATCC 25922 为本实验室保存。

1.2 试剂与仪器 聚合酶链反应(PCR)扩增试

[收稿日期] 2009-12-22

[作者简介] 邹玖明(1979-), 男(汉族), 湖北省襄樊市人, 主管技师, 主要从事细菌耐药性研究。

[通讯作者] 李智山 E-mail: lizhishan55@163.com

剂购自大连宝生物公司,API20NE 试剂条及 M-H 培养基购自法国生物梅里埃公司,抗菌药物纸片购于英国 OXOID 公司。序列分析在上海生工公司进行,Prism 7300 型 PCR 扩增仪为美国 ABI 公司产品。

1.3 药敏试验 采用纸片扩散法,按照美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 2009 版的检测方法和判读标准,测定分离的鲍曼不动杆菌对头孢他啶 (CAZ)、头孢噻肟 (CTX)、头孢吡肟 (FEP)、亚胺培南 (IPM)、阿米卡星 (AMK)、庆大霉素 (GEN)、环丙沙星 (CIP)、复方磺胺甲噁唑 (SXT)、四环素 (TET)、头孢哌酮/舒巴坦 (CSF) 的敏感性。

1.4 基因检测 本研究采用 PCR 技术共进行 3 种酶基因 (OXA、IMP、VIM) 检测。具体方法:挑纯培养菌落置 0.5 mL 离心管内 (内预置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200 μL),56°C 水浴 2 h,然后 95°C 水浴 10 min,加入 Chelex 2100 40 μL,离心 15 000 r/min 30 s。上清液即为基因检测的模板液,-20°C 冰箱保存备用。参照文献 [1] 设计引物 (表 1),各种靶基因 PCR 扩增反应体系均为:模板液 5 μL,P1、P2 引物各 0.5 μmol/L,dNTPs 各 200 mmol/L,KCl 10 mmol/L,(NH₄)₂SO₄ 8 mmol/L,MgCl₂ 2 mmol/L,TrisHCl (pH 9.0) 10 mmol/L,NP40 0.5%,BSA 0.02% (w/v),Taq DNApol 1 U,总反应体积 20 μL。热循环参数为 93°C 预变性 2 min,93°C 变性 1 min,55°C 退火 1 min,72°C 延伸 5 min,共进行 35 次循环,PCR 产物经含溴化乙锭 (EB) 的 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯凝胶电泳成像仪下观察结果。阳性产物送上海生工公司测序,并将结果在 Genbank 数据库中进行同源性分析。

2 结果

2.1 药敏试验 7 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌经

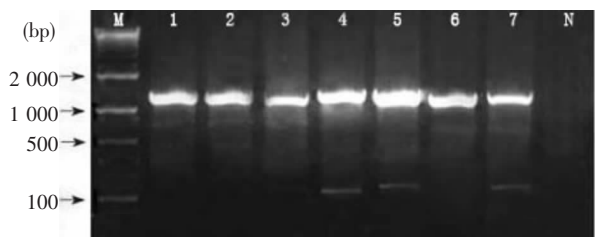
API20NE 鉴定为同一生物类型,药敏结果显示对所有监测的抗菌药物均不敏感,仅对 CSF 表现为中介,详见表 2。

2.2 PCR 扩增 分别用 3 对特异性引物对 7 株菌进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳结果表明,所有菌株均未扩增到 IMP、VIM 基因,而 OXA-23 引物扩增均出现阳性条带 (图 1)。用 BLAST 程序中的 blasxt 进行序列分析,与 GenBank 网络 OXA-23 标准序列比较,100% 同源,证实这些菌株均产生了 OXA-23 型碳青霉烯酶。

表 1 靶基因 PCR 引物序列

Table 1 Primers of PCR amplification of target genes

引物名称	序列 (5'—3')	扩增长度 (bp)
blaOXA-23-like	F:GATGTGTCATAGTATTTCGTCG R:TCACAACAACATAAAAGCACTG	1 036
blaIMP	F:CATGGTTTGGTGGTTCTTGT R:ATAATTTGGCGGACTTTGGC	528
blaVIM	F:ATTGGTCTATTTGACCGCGTC R:TGCTACTCAACGACTGAGCG	425



M:DNA 分子标准;1—7:7 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌;N:阴性对照

图 1 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌 OXA-23 基因 PCR 电泳图谱

Figure 1 Electrophoresis of PCR products of OXA-23 in imipenem-resistant *A. baumannii* isolates

表 2 7 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌流行株临床资料及药敏谱

Table 2 Clinical informations and antimicrobial susceptibility patterns of 7 imipenem-resistant *A. baumannii* isolates

患者编号	性别	年龄 (岁)	标本	药敏谱										生物类型	
				CAZ	CTX	FEP	IPM	AMK	GEN	CIP	SXT	TET	CSF		
1	男	56	痰液	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	0041473
2	男	42	痰液	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	0041473
3	男	60	痰液	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	0041473
4	男	62	痰液	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	0041473
5	男	55	尿液	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	0041473
6	男	48	血液	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	0041473
7	男	55	脑脊液	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	0041473

R:耐药;I:中介

3 讨论

鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素主要耐药机制是产生由质粒或染色体编码的碳青霉烯酶。目前已发现的碳青霉烯酶主要有 B 类(VIM、IMP) 金属酶和 D 类酶(即 OXA 酶)。B 类酶水解底物范围广, 耐药性强, VIM 和 IMP 两大基因家族现已发现各有十几种亚型; D 类酶水解碳青霉烯类的作用较弱。OXA-23 最早于 1985 年在英国发现。目前国内其他地区相继报道的产碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌均为 OXA-23 型^[2], 表明在我国大陆的鲍曼不动杆菌中, 主要以 OXA-23 型为主。我们在患者标本中分离的 7 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌均含有 OXA-23 基因, 未检出 VIM、IMP 耐药基因, 除此之外, 是否存在其他的耐药基因有待进一步研究。

耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌引起的医院感染暴发性流行, 国内外均有报道^[2-3]。该菌种的此种能力与其强的外界生存能力密不可分。研究显示^[4], 鲍曼不动杆菌在物体表面可存活达 5 个月之久。在过去的 10 年内, 鲍曼不动杆菌在 ICU 引起的感染呈逐渐上升趋势, 而且大多数情况下导致暴发性流行的菌株往往比引起零星感染的菌株耐药问题更为突出, 耐药机制更加复杂^[5]。

彻底控制医院感染暴发性流行, 必须采取封闭病区、隔离患者、对病区全面消毒的根本措施^[6]。此外, 加强医护人员医院感染知识的培训, 限制碳青霉

烯类抗生素的应用, 做好手卫生及医疗器械的消毒以杜绝接触传播等, 对于预防 ICU 病区碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌感染暴发性流行的发生至关重要。

[参 考 文 献]

- [1] Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore D M. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(2):583-588.
- [2] 周铁丽, 李响新, 陆红, 等. 5 年间鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶特性与耐药相关性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(1):40-43.
- [3] Jamulitrat S, Thongpiyapoom S, Suwalak N. An outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* at Songklanagarind Hospital; the risk factors and patient prognosis[J]. J Med Assoc Thai, 2007, 90(10):2181-2191.
- [4] Wendt C, Dietze B, Dietz E, et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(6):1394-1397.
- [5] Meric M, Kasap M, Gacar G, et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 282(2):214-218.
- [6] Stone S P, Cooper B S, Kibbler C C, et al. The ORION statement: guidelines for transparent reporting of outbreak reports and intervention studies of nosocomial infection[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5):833-840.

(上接第 263 页)

- [2] Aldeen W E, Bingham M, Aiderzada A, et al. Comparison of the TOX A/B test to a cell culture cytotoxicity assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools[J]. Diag Microb Infect Dis, 2000, 36(4):211-213.
- [3] Sloan L M, Duresko B J, Gustafson D R, et al. Comparison of real-time PCR for detection of the *tdcC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6):1996-2001.
- [4] Barbut F, Delmée M, Brazier J S, et al. A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*[J]. Clin Microbiol Infect, 2003, 9(10):989-996.
- [5] Can M, Besirbellioglu B A, Avci I Y, et al. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated

- diarrhea: a prospective study[J]. Med Sci Monit, 2006, 12(4):19-22.
- [6] Poxton I R, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*[J]. Clin Microbiol Infect, 2001, 7(6):421-427.
- [7] Wilkins T D, Lyerly D M. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging[J]. Clin Microbiol, 2003, 41(2):531-534.
- [8] Reller M E, Lema C A, Perl T M, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*[J]. Clin Microbiol, 2007, 45(11):3601-3605.