

鲍曼不动杆菌 SHV 型 β -内酰胺酶 耐药基因分子流行病学研究

黄支密 毛培华 陈榆 仵蕾 吴晶

【摘要】 目的 分析自临床分离的产 SHV 型 β -内酰胺酶(β -lactamases, BLA)多重耐药鲍曼不动杆菌的 SHV 型 BLA 耐药基因序列并确定其所产 BLA 耐药基因亚型。方法 在 2000 年 7 月至 2002 年 12 月间从临床分离 60 株鲍曼不动杆菌,经药敏试验、超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)表型确证试验和 SHV 型 BLA 耐药基因的聚合酶链反应(PCR)检测,筛选出 2 株具有多重耐药特性、SHV 基因型均阳性的分离株(HZ02、HZ10 株),对耐药基因进行序列分析。结果 在 2001 年 6 月至 2002 年 1 月间分离到的 18 株(30.0%)鲍曼不动杆菌质粒上携带 SHV 型 BLA 耐药基因;HZ02 株和 HZ10 株的 SHV PCR 扩增阳性,其基因片段分别含 825 个和 833 个核苷酸,与 Nuesch-Inderbinen 等首先发现的 SHV-12 亚型 ESBLs 编码基因序列(GenBank 注册号:X98105)完全相同。结论 30.0%鲍曼不动杆菌质粒上携带 SHV 型(超广谱) β -内酰胺酶耐药基因并引起一次医院感染爆发。同时证实在我国浙江省湖州地区临床分离的鲍曼不动杆菌中存在产 SHV-12 亚型 ESBLs 耐药基因菌株。

【关键词】 鲍曼不动杆菌; β -内酰胺酶类; 基因; 流行病学; 分子; 序列分析

Study on the molecular epidemiology of SHV type β -lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant acinetobacter baumannii HUANG Zhi-mi, MAO Pei-hua, CHEN Yu, WU Lei, WU Jing. Microbiology Laboratory, The People's Liberation Army 98th Hospital, Huzhou 313000 China

【Abstract】 Objective To analyse the plasmid-mediated SHV type β -lactamases-encoding genes sequence and to identify its subtype of multiple-drug-resistant *acinetobacter baumannii* isolated from Huzhou district, Zhejiang province, China. **Methods** Sixty strains of *acinetobacter baumannii* were isolated from hospitalized patients between Jul 2000 and Dec 2002. Susceptibility of antimicrobial agents and confirmatory tests for Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) were tested by microdilute method. SHV type β -lactamases-encoding genes were tested by polymerase chain reaction (PCR). SHV sequences of *acinetobacter baumannii* HZ02 and HZ10 strains were detected by ABI automated sequencer and were analysed to compare with SHV genes that had been published in GenBank. **Results** Eighteen (30.0%) strains of *acinetobacter baumannii* isolated between Jun, 2001 and Jan, 2002 were carrying SHV β -lactamases resistant gene of plasmids. Detected SHV sequences of *acinetobacter baumannii* HZ02 strain and HZ10 strain had 825 and 833 nucleotides respectively and had the same gene sequence as the gene encoding SHV-12 subtype of ESBLs discovered in Switzerland. **Conclusions** Thirty percentage of the clinically isolated *acinetobacter baumannii* were carrying SHV type (extended-spectrum) β -lactamases resistant gene of plasmids and causing an outbreak in hospital and was discovered to have carried the strains of SHV-12 subtype producing ESBLs gene in *acinetobacter baumannii* which was the first reported case in the world.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii*; β -lactamases; Genes; Epidemiology, molecular; Sequence analysis

近年来,由产 β -内酰胺酶(β -lactamases, BLA)鲍曼不动杆菌(*acinetobacter baumannii*, Ab)引起的感染发病率在逐年提高、爆发或流行也时有发生^[1-6],因此,加强对其 BLA 耐药基因的研究,了解基因类型分布及流行情况显得很有必要。经中国期刊网

(<http://www.cnki.net/>)及 GenBank 网(www.ncbi.nlm.nih.gov)检索文献得知,到目前为止,尚没有在 Ab 中检出 SHV 型超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)耐药基因的报道^[4]。为此,我们对从临床分离的 60 株 Ab 进行了药敏试验、ESBLs 表型确证试验及 SHV 型 BLA 耐药基因的聚合酶链反应(PCR)检测,并对 2 株(编号为 HZ02 和 HZ10 株)基因型阳性菌株进行 SHV 全长基因 DNA 序列测定比较分析。

结果报告如下。

材料与方法

1. 菌株来源、分布及鉴定 :60 株试验菌株均分离自我院 2000 年 7 月至 2002 年 12 月住院患者送检的各种临床细菌学检验标本 ,分别为 :痰液 33 份、创伤伤口分泌物 13 份、烧伤创面分泌物 10 份、气管切开口分泌物 2 份、中段尿和血液各 1 份 ,并用法国生物-梅里埃公司 API 20 NE 鉴定菌种。未及时发现检测的菌株于 -30°C 速冻保存备用。标准菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

2. 药敏及 ESBLs 表型确证试验抗菌药物 :阿莫西林(AMO)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、哌拉西林(PIC)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、替卡西林(TIC)、替卡西林/克拉维酸(TCC)、头孢噻吩(CFT)、头孢呋肟(CXM)、头孢替坦(CTT)、头孢西丁(CXT)、头孢磺吡苄(CFS)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢匹肟(FEP)、氨曲南(ATM)、亚胺培南(IMP)、美洛培南(MER)、复方新诺明(TSU)、妥布霉素(TOB)、阿米卡星(AKN)、庆大霉素(GEN)、奈替米星(NET)、环丙沙星(CIP)、多粘菌素 E(COL)、磷霉素(FOS)、头孢他啶/舒巴坦(SCA)及氨曲南/舒巴坦(SAT)均购自生物-梅里埃公司,为稀释法;头孢哌酮(CFP)和头孢哌酮/舒巴坦(SCF)纸片购自杭州天和生物制品有限公司,为 K-B 法。其中 ATM、SAT 和 CAZ、SCA 两对抗生素用于 ESBLs 表型确证试验,当不加/加舒巴坦的最小抑菌浓度(MIC)差值 ≥ 4 个稀释度时,提示 ESBLs 阳性,否则为阴性或“不确定”。

3. 细菌质粒 DNA 提取 :采用碱裂解法提取质粒 DNA。

4. 巢式聚合酶链反应(nPCR)及测序引物 :由无锡市克隆遗传技术研究所提供。SHV 基因通用引物两对 :外套引物 P1 :5'-TCG,GCC,TTC,ACT,CAA,GGA,TG-3',P2 :5'-TTA,GCG,TTG,CCA,GTG,CTC-3';内套引物 P3 :5'-GGT,TAT,GCG,TTA,TAT,TCG,CC-3',P4 :5'-TCC,CGC,AGA,TAA,ATC,ACC,A-3';终产物长 786 bp。SHV 基因的 PCR 扩增参数为 94°C 预变性 5 min,然后 94°C 45 s 56°C 45 s 72°C 1 min,循环 35 次,最后 72°C 延伸 5 min。PE9600 基因扩增仪扩增。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察结果并拍照保存。设标准产 SHV-18 型酶肺炎克雷伯菌

ATCC700603 作阳性对照、大肠埃希菌 ATCC25922 作阴性对照。

5. 核苷酸序列测定及分析 :扩增的 PCR 产物经纯化后,按 Sanger 双脱氧末端终止法,用 ABI 自动 DNA 测序仪进行正反向测序,结果在 GenBank 网上查询比较。

结 果

1. SHV 基因型 nPCR 检测 :18 株(30.0%) SHV 基因扩增结果呈阳性。

2. SHV 基因型阳性菌株的 ESBLs 表型确证试验结果 :11 株(包括 HZ02 株)阳性,7 株(包括 HZ10 株)“不确定”。

3. SHV 基因型阳性菌株的药敏试验结果 :全部耐药的有 AMO、TIC、CFT、CXM、CTT、CXT、CFS、CFP、TSU、TOB、AKN、GEN、NET、CIP 和 FOS,全部敏感的有 SCP、IMP、MER、COL。其余 8 种结果见表 1。

表 1 18 株 SHV 基因型阳性鲍曼不动杆菌对 8 种抗生素的药敏结果

抗生素	中敏株数 (%)	耐药株数 (%)	抗生素	中敏株数 (%)	耐药株数 (%)
AMC	1(5.6)	16(88.9)	CTX	1(5.6)	17(94.4)
PIC	1(5.6)	17(94.4)	CAZ	2(11.1)	16(88.9)
TZP	4(22.2)	6(33.3)	FEP	4(22.2)	14(77.8)
TCC	9(50.0)	5(27.8)	ATM	1(5.6)	17(94.4)

4. 测序结果 :HZ02 株和 HZ10 株的 SHV PCR 产物经自动测序仪进行序列分析,分别测得 825 个、833 个核苷酸。经 GenBank 网上同源性比较,发现该序列与 Nuesch-Inderbinen 等^[7]在瑞士首先发现的 SHV-12(GenBank 注册号 :X98105)的编码基因序列完全相同,从而确认此 2 株 Ab 的质粒携带产 SHV-12 亚型 ESBLs 耐药基因。HZ02 株具体测序结果及氨基酸序列见图 1,其序列已在美国核酸数据库(GenBank)成功登录(注册号 :AY259163)。

讨 论

ESBLs 是指由细菌质粒介导的能水解氧氨基-β-内酰胺(oxyimino-β-lactam)抗生素,并可被 β-内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸)所抑制的一类酶^[8]。由于质粒介导的 ESBLs 耐药基因如 TEM、SHV、OXA 及 PER 等具有在不同种属细菌之间转移和传播的特性,极易造成医院感染的爆发,并且产 ESBLs 细

菌往往为多重耐药株,这给临床抗菌感染治疗造成了极大困难。因此加强对 ESBLs 表型及基因型检测对于控制 ESBLs 菌株的传播、防止医院感染的爆发具有十分重大的意义。

T
 002 ATTCCGCTGTGATTATCTCCCTGTTAGCCACCTGCCGCTGGCCGTACAGCCGACGCCG
 I R L C I I S L L A T L P L A V H A S P 27
 062 CAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGCGAAAGCCAGCTGTCGGGCCCGTAGGCATGATA
 Q P L E Q I K Q S E S Q L S G R V G M I 47
 122 GAAATGGATCTGGCCAGCGCGGCAGCGTGAACCGCTGGCCGCGCGATGAACGCTTTCCC
 E M D L A S G R T L T A W R A D E R F P 67
 182 ATGACTGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTGTCGGCGGAGCTGCGCGGGTGGATGCCGCT
 M M S T F K V V L C G A V L A R V D A G 87
 242 GACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATGCCAGCAGGATCTGGTGACTACTCGCCG
 D E Q L E R K I H Y R Q Q D L V D Y S P 107
 302 GTCACGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGCTCGCGGAACCTCTGCGCCGCGCCATT
 V S E K H L A D G M T V G E L C A A A I 127
 362 ACCATGAGCGATAACAGCGCCCAATCTGCTGCTGCCACCGCTCGCGCGCCCGCAGGA
 T M S D N S A A N L L L A T V G G P A G 147
 422 TTGACTGCTTTTGGCGCAGATCGCGGACACGCTCACCCGCTTGACCGCTGGGAAACG
 L T A F L R Q I G D N V T R L D R W E T 167
 482 GAECTGAATGAGCGCTTCCCGCGACGCCCGGACACACTACCCGCGCCAGCATGGCC
 E L N E A L P G D A R D T T T P A S M A 187
 542 CGGACCTGCGCAAGCTGCTGACAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGCTTCCGCAACGCGAGCTG
 A T L R K L L T S Q R L S A R S Q R Q L 207
 602 CTCGAGTGGATGGTGAACGATCGGGTCGCGGACCGTGTACCGCTCCGTGCTCGCCGCG
 L Q W M V D D R V A G P L I R S V L P A 227
 662 GGCTGGTTTATCGCGATAAAGACCGGAGCTAGCAAGCGGGTTCGCGCGGATGTCGCC
 G W F I A D K T G A S K R G A R G I V A 248
 722 CTCGCTGGCCGAATAACAAAGCAGAGCGCAATGTTGGTGATTATCTCGCGGATAACCGG
 L L G P N N K A E R I V V I Y L R D T P 268
 782 GCGAGCATGCGCCGAGCGAAATCAGCAATCGCCGGATCGCCG
 A S M A E R N Q Q I A G I G

注:与广谱酶 SHV-1 的编码基因(GenBank 注册号:AF124984)相比,方框内为突变的核苷酸或氨基酸

图 1 HZ02 株 SHV PCR 产物基因及氨基酸序列

国内外研究表明,Ab 对β-内酰胺类抗生素耐药主要是由于其产生各种不同类型的 BLA 如广谱 OXA 型酶^[6]、超广谱 PER-1 型酶^[2,4]和 IMP^[5]型金属酶等。本研究则在世界上首次发现了在 Ab 中存在产 SHV 型(SHV-12)ESBLs 菌株。可见世界各地流行的基因类型不尽相同。

1983 年,第一个质粒介导的 SHV 型 ESBLs——SHV-2 亚型在联邦德国被发现。而质粒介导的 SHV-12 亚型 ESBLs 则在瑞士首先被发现^[7],随后在意大利也有发现^[9],不过以东南亚一带更为常见,日本、韩国、泰国以及中国台湾、浙江等地均有报道^[10-13],但这些菌株均系肠杆菌科细菌。我们的结果进一步证实了 SHV-12 是亚洲地区 ESBLs 主要流行亚型之一的观点^[13],并提示 SHV 型 ESBLs 正在向肠杆菌科以外细菌转移。至于 Ab 中是否还存在产其他基因型或亚型,甚至新型 ESBLs 菌株,正在进一步研究中。

药敏结果显示,SHV 阳性菌株的多重耐药状况十分严重。此药敏谱特征与大多数其他产 ESBLs 菌株相类似^[3]。SHV 阳性菌株分离的时间为 2001 年 6 月至 2002 年 1 月,来自 4 个病区,以颅脑外伤病区为主(72.2%),主要引起下呼吸道感染。分析表明由此引起的医院感染为一次较小规模的爆发。

参 考 文 献

- 1 Landman DM, Quale J, Mayorga D, et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *acinetobacter baumannii* and *pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. Arch Intern Med 2002, 162:1515-1520.
- 2 Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicro Agents Chemother, 1997, 41:2265-2269.
- 3 陈东科, 崔巧珍, 胡云建. 医院内不动杆菌流行现状及耐药性分析. 中华流行病学杂志 2003 24:640-641.
- 4 蒋晓飞, 乐军, 朱月秋, 等. 上海出现 PER-1 型超广谱 β-内酰胺酶. 中华检验医学杂志 2003 26:229-232.
- 5 Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ETS, et al. IMP-4, a novel metallo-β-lactamase from nosocomial *acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicro Agents Chemother, 2001 45:710-714.
- 6 Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *acinetobacter baumannii*. Antimicro Agents Chemother, 2001 45:583-588.
- 7 Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicro Agents Chemother, 1997, 41:943-949.
- 8 Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev, 2001, 14:933-951.
- 9 Laksai Y, Severino M, Perilli M, et al. First identification of an SHV-12 extended-spectrum β-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy. J Antimicro Chemother 2000 45:349-351.
- 10 Nakamura T, Uchida S, Heijyo H, et al. A SHV-derived extended-spectrum β-lactamase (SHV-12) produced by a *escherichia coli* recovered from wound abscess in post operative case with rectal carcinoma. Kansenshugaku Zasshi 2000 74:112-119.
- 11 Kim J, Kwon Y, Pai H, et al. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β-lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. J Clin Microbiol, 1998, 36:1446-1449.
- 12 Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, et al. Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in southern Taiwan. Antimicro Agents Chemother, 2000 44:1348-1442.
- 13 周伟琳, 陈亚岗, 俞云松, 等. 超广谱 β-内酰胺酶 SHV-12 编码基因的克隆及序列分析. 中华传染病杂志 2001, 19:275-277.

(收稿日期:2003-05-09)
 (本文编辑:尹廉)