

亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶和16S rRNA甲基化酶研究

周华 杜小幸 杨青 周建英 俞云松 李兰娟

【摘要】 目的 研究中国部分地区临床分离亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶基因型及16S rRNA甲基化酶基因。方法 收集6省市25家医院2004年12月至2005年12月临床分离的342株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌;采用琼脂稀释法和E-test法测定菌株对14种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC);脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析亚胺培南耐药菌株同源性;PCR及克隆测序分析碳青霉烯酶基因和16S rRNA甲基化酶基因型。结果 342株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌对氨苄西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦两个含舒巴坦制剂耐药率分别为68.0%、54.2%,对多粘菌素E耐药率最低为10.8%,对米诺环素耐药率75.9%,对妥布霉素耐药率87.4%,对其他抗菌药物的耐药率均在90%以上;342株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌PFGE分型中303株菌株属于6个广泛流行的克隆株;342株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中322株携带OXA-23基因,全部携带OXA-66基因,314株菌株OXA-23基因上游检测到插入序列ISAbal,13株OXA-66基因上游检测到ISAbal;287株对阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、异帕米星、奈替米星全部耐药的菌株中有221株携带*armA*型16S rRNA甲基化酶基因。结论 OXA-23组D类β-内酰胺酶基因是最主要的碳青霉烯酶基因型,插入序列ISAbal在介导鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药中起重要作用;16S rRNA甲基化酶基因*armA*基因在中国亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中分布广泛;克隆播散是亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌最主要的传播方式。

【关键词】 鲍曼不动杆菌;脉冲场凝胶电泳;碳青霉烯酶;16S rRNA甲基化酶

Study on carbapenemase and 16S rRNA methylase of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*
ZHOU Hua, DU Xiao-xing, YANG Qing, ZHOU Jian-ying, YU Yun-song, LI Lan-juan. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China
Corresponding author: YU Yun-song, Email: yvys119@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the prevalence of 16S rRNA methylases gene in imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from China. **Methods** A total of 342 imipenem-resistant *A.baumannii* isolates were collected between December 2004 and December 2005, from 25 hospitals of China. Agar dilution was used to determinate the minimal inhibitory concentration (MIC) of these isolates. The homology of these isolates was analyzed by pulse-field gel electrophoresis (PFGE). Several 16S rRNA methylase genes and carbapenemase genes were detected by PCR-based assays and PCR products were sequenced. **Results** The rates of resistance to ampicillin-sulbactam, cefoperazone-sulbactam, tobramycin, and minocycline were 68.0%, 54.2%, 87.4%, and 75.9%, respectively. The rate of resistance to polymyxin E was 10.8%, the lowest among the tested agents. The rates of resistance to all other tested antimicrobial agents were more than 90%. The *A.baumannii* isolates belonged to 29 distinct clones. Among them, 6 clones were dominant, consisting of 303 isolates in total. All isolates contained the *bla*OXA-51-like gene (*bla*OXA-66) and 322 isolates contained the *bla*OXA-23-like gene. PCR with the ISAbal-OXA-23-like primers generated a PCR product in 314 isolates, and PCR with the ISAbal-OXA-51-like primers generated a PCR product in 13 strains. 221 *armA*-positive isolates were identified. **Conclusion** Most of the imipenem-resistant *A.baumannii* contained *bla*OXA-23, with ISAbal upstream of the gene. 16S rRNA methylase gene *armA* was widely distributed in these isolates. The results suggested that the spread of clones played an important role in the outbreak of imipenem-resistant *A. baumannii* in China.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii*; Pulse-field gel electrophoresis; Carbapenemase; 16S rRNA methylase

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.03.017

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770116)

作者单位:310006 杭州,浙江大学医学院附属第一医院呼吸科(周华、周建英),传染病诊治国家重点实验室(杜小幸、俞云松、李兰娟),检验科(杨青)

通信作者:俞云松,Email: yvys119@163.com

不动杆菌已成为医院获得性感染的主要致病菌之一,主要引起医院获得性肺炎尤其是呼吸机相关性肺炎、菌血症、尿路感染、继发性脑膜炎等^[1]。随着广谱抗菌药物的广泛使用,多重耐药不动杆菌日趋增多,其在干燥物体表面生存时间可以长达 25 d 以上,极易造成流行,给临床抗感染治疗带来很大困难,也对院内感染的控制提出新的要求^[2-4]。碳青霉烯类抗生素对不动杆菌有较好的抗菌活性,是治疗不动杆菌重症感染的重要抗生素。但近年来,有关碳青霉烯类抗生素耐药不动杆菌的报道日益增多。其耐药机制包括外膜孔蛋白的丢失、外排泵的激活、青霉素结合蛋白的改变,而最重要的是碳青霉烯酶的产生^[5]。D 类碳青霉烯酶是鲍曼不动杆菌中最重要的碳青霉烯酶,目前报道按照氨基酸同源性可分为 8 组,在鲍曼不动杆菌中报道的主要是 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58 四组,其中 OXA-51 组基因是鲍曼不动杆菌染色体天然携带的基因^[6]。OXA-23-like 和 OXA-51-like 基因上游存在 IS_{Aba1}^[7],插入序列 IS_{Aba1} 与 OXA 类碳青霉烯酶编码基因的同源重组以及表达调控有关^[7]。氨基糖苷类抗生素通过与细菌 30S 核糖体亚单位的 16S rRNA 特异性位点不可逆结合,干扰蛋白质合成从而阻止细菌生长^[8],是临床上治疗革兰阴性菌所致严重感染的常用药,常与细菌细胞壁活性抗菌药物联合应用。近年来鲍曼不动杆菌耐药性迅速上升,且已出现同时对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类抗菌药物同时耐药的三重耐药菌株的流行^[9]。16S rRNA 甲基化酶最早在产生氨基糖苷类抗生素的非致病微生物体中发现,2002 年首次在临床分离的绿脓假单胞菌中发现了 16S rRNA 甲基化酶^[10]。16S rRNA 甲基化酶能使氨基糖苷类抗生素的作用靶位甲基化,药物无法结合到细菌 16S rRNA,导致临床常用氨基糖苷类抗生素高水平耐药。欧洲和日本学者先后在一系列肠杆菌科的细菌中发现存在该种基因,全球性的播散已经越来越引起关注^[11]。

本研究旨在对国内 6 省市临床分离的亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶和 16S rRNA 甲基化酶耐药基因进行筛选并研究菌株的同源性。

材料与方 法

1. 材料:

(1) 菌株来源:收集北京、辽宁、重庆、广东、上海、浙江 6 省市 8 家省级医院及浙江省 11 个地区 17 家市级医院共计 25 家医院 2004 年 12 月至 2005 年 12

月临床分离的亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌 342 株。菌株均经生物梅里埃公司 API 鉴定条 20NE 鉴定,大肠埃希菌 ATCC25922、绿脓假单胞菌 ATCC27853 作为药敏质控菌;所有菌株除鉴定条鉴定外利用 OXA-51 基因 PCR 扩增及序列分析进行确认。

(2) 抗菌药物:多粘菌素 E(CO)、氨基西林/舒巴坦(SAM)、头孢哌酮/舒巴坦(CPS)、哌拉西林/三唑巴坦(TZP) 4 种抗菌药物 E-test 条均购自瑞典 AB Biodisk 公司。其余抗菌药物的标准品均购自中国药品生物制品检定所。

(3) 主要试剂与仪器:Taq 酶购自大连宝生物公司,PCR 纯化试剂盒、限制性内切酶 Apa I 购自上海申能博彩公司,引物由上海生物工程公司合成,DNA 扩增仪为美国 PE 公司产品,Lambda DNA-PFGE Markers 购自美国 Amersham Biosciences 公司,CHEF-Mapper XA 型脉冲电泳仪为美国 BioRad 公司产品。

2. 方法:

(1) 测定亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌对 17 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC):CO、SAM、CPS、TZP 采用浓度梯度法(E-test)测定 MIC 值,亚胺培南(IMP)、美罗培南(MEM)、哌拉西林(PIP)、环丙沙星(CIP)、氨基曲南(ATM)、头孢吡肟(FEP)、头孢他啶(CAZ)、米诺环素(MC)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、异帕米星(ISP)、奈替米星(NET)、妥布霉素(TBO)采用琼脂稀释法测定 MIC。结果按 2006 年 CLSI 标准判定^[12],其中 CPS 采用头孢哌酮的折点标准,ISP 采用 NET 的折点标准,ATM 采用对铜绿假单胞菌的折点判断标准。

(2) 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析:将培养过夜的细菌用低熔点胶灌模,蛋白酶 K 50℃ 消化 48 h,限制性内切酶 Apa I 酶切 12 h;脉冲场凝胶电泳:1% 胶,0.5×TBE 缓冲液,14℃,6 V/cm,120°,脉冲时间 5~20 s 电泳 22 h,分子质量标记物为 λ Ladder。电泳后 EB 染色,紫外灯观察结果。分型参照 Tenover 进行^[13]。

(3) 碳青霉烯酶基因的筛选及其与插入序列关系:包括 OXA-23 组、OXA-24 组、OXA-51 组、OXA-58 组、IMP 型、VIM 型、IS_{Aba1}、IS_{Aba1}F/OXA-23R、IS_{Aba1}F/OXA-51R,引物合成、PCR 反应体系及反应条件参照文献[3, 4, 7, 14]。

(4) 16S rRNA 甲基化酶耐药基因筛选:采用 PCR 法扩增主要的介导氨基糖苷类抗生素高水平耐药 16S rRNA 甲基化酶基因,包括 *armA*、*rmlA*、

rmtB、*rmtC*、*rmtD*、*npmA*。引物合成、反应条件参照文献[9, 10, 15-18]。

(5) PCR产物的纯化和测序: PCR扩增产物经纯化试剂盒纯化目的DNA, 采用Sanger末端终止法, 用ABI3730型自动测序仪进行双向测序。结果在GenBank网上查询。

结 果

1. 17种抗菌药物对亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌的抗菌活性: CO耐药率最低为10.8%, CPS、SAM耐药率分别为54.2%和68.0%, MC耐药率75.9%, 对TBO耐药率87.5%, 对其他抗菌药物的耐药率均在90%以上(表1)。

表1 17种抗菌药物对342株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌MIC(mg/L)及耐药率(R%)

药物	MIC	MIC ₅₀	MIC ₉₀	R%
CO	0.19~256	0.75	6	10.8
CPS	0.50~256	48	256	54.2
SAM	0.25~256	32	256	68.0
IMP	16~128	128	128	100.0
MEM	16~128	128	128	100.0
CAZ	1~128	128	128	92.0
FEP	1~128	128	128	94.7
TZP	4~256	256	256	93.5
PIP	4~128	128	128	95.0
ATM	2~128	128	128	99.1
CIP	1~128	128	128	95.8
MC	0.25~128	64	128	75.9
GEN	1~128	128	128	98.2
AMK	2~128	128	128	92.6
NET	0.50~128	128	128	92.4
ISP	0.50~128	128	128	90.9
TBO	1~128	128	128	87.5

2. PFGE分型: 342株鲍曼不动杆菌菌株根据PFGE分析发现其中303株属于6个主要流行克隆株。其中A克隆62株, 分布在浙江、北京、重庆、浙江的11家医院; B克隆有32株, 分布于杭州、上海、沈阳的3家医院; C克隆有160株, 分布于浙江和上海的12家医院; D克隆有31株菌株, 分布于浙江的3家医院; 属于克隆E的10株菌株在广州中山大学附属第一医院流行; 属于克隆F的8株菌株在浙江金华中心医院流行。另外有44株菌株为散发菌株。

3. 碳青霉烯酶编码基因PCR扩增: 342株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中, 所有引物扩增均阴性的菌株3株, 其余339株OXA-24-like、OXA-58-like、IMP型、VIM型基因阴性。OXA-23组引物扩增阳

性322株, 序列分析证实为OXA-23(GenBank登录号: AJ132105)。342株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌OXA-51组引物扩增全部阳性, 序列分析证实为OXA-66基因(GenBank登录号: AJ132105)。ISAbalF/OXA-23-likeR引物阳性313株, ISAbalF/OXA-51-likeR引物阳性13株。

4. 16S rRNA甲基化酶PCR扩增: *armA*基因阳性221株(64.6%)。 *armA*基因阳性菌株对测定的5种氨基糖苷类抗生素均耐药, 在287株5种氨基糖苷类抗生素均耐药的菌株中 *armA*基因阳性率达到88.6%。PCR产物经克隆测序与GenBank上 *armA*的序列完全一致(GenBank登录号: AY220558)。其余4种16S rRNA甲基化酶基因均阴性(表2)。

表2 碳青霉烯酶基因和16S rRNA甲基化酶基因在亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中的分布

克隆	菌株数	各种基因阳性菌株数				
		<i>bla</i> OXA-51	ISAbal-OXA-51	<i>bla</i> OXA-23	ISAbal-OXA-23	<i>armA</i>
A	62	62	3	58	57	36
B	32	32	-	32	32	28
C	160	160	4	154	152	143
D	31	31	-	31	31	-
E	10	10	-	10	10	-
F	8	8	-	8	8	-
其他	39	39	6	29	24	-
合计	342	342	13	322	318	221

讨 论

近年来非发酵菌在临床分离中呈增加趋势, 其中最主要菌种为不动杆菌属细菌和绿脓假单胞菌, 而不动杆菌中又以鲍曼不动杆菌最为常见。鲍曼不动杆菌已成为继绿脓假单胞菌之后的重要临床分离菌^[1, 2]。不动杆菌为条件致病菌, 可以引起多种医院感染, 在重症监护病房中分离率最高, 主要与患者接受各种介入性操作有关^[2]。

对碳青霉烯类抗生素耐药的鲍曼不动杆菌只有少数抗菌药物可能有较高的敏感性: 含舒巴坦制剂、多粘菌素、MC^[4]。舒巴坦能不可逆地结合不动杆菌PBP₂, 有直接杀菌活性^[10]。本研究中分离的342株亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌对CPS、SAM敏感率分别为19.9%和10.8%, 而中介率分别达到25.8%和21.2%, 部分菌株感染可以根据药敏结果选择敏感或中介的含舒巴坦制剂, 单独或联合其他抗菌药物进行治疗。CO耐药率最低为10.8%, 对多重耐药菌株感染可以选用该药治疗, 并有治疗成功的报道, 但该药肾毒性大。

342 株亚胺培南耐药菌株 PFGE 分型发现有 303 株 (88.6%) 菌株属于 6 个流行的克隆株。其中克隆 E、F 仅分别在一家医院内流行, 克隆 A、B、C、D 菌在不同医院流行, 25 家医院中有 19 家医院检测到至少 1 个克隆的播散, 其中 4 家医院有该 4 个克隆中的 2 个克隆, 2 家医院有 3 个克隆的播散。克隆株在病房内、病房之间、医院之间、地区之间播散已经成为我国鲍曼不动杆菌分离率不断上升、菌株不断增加的最主要原因。因此, 控制院内感染至关重要。

所有 342 株菌株检测到 *bla*OXA-51 组基因, 证实该基因为鲍曼不动杆菌天然携带, 可以作为鲍曼不动杆菌鉴定。314 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌检测到 *bla*OXA-23 型碳青霉烯酶基因, 该酶是介导我国鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药最主要的基因型。326 株菌株检测到插入序列 *ISAbal*, 位于 OXA 型碳青霉烯酶基因上游, 提供强启动子, 在介导我国鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺类抗生素耐药中起重要作用。

本研究表明在 342 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌中筛选到 221 株 *arma* 基因阳性菌株, 阳性率达到 64.6%, 远高于其他国家和地区, 16S rRNA 甲基化酶基因介导的氨基糖苷类抗生素多耐药问题已经相当严重。16S rRNA 甲基化酶基因之所以阳性率高, 与医院内及医院间的克隆播散关系密切, 有 20 家医院检测到至少 1 个克隆的播散, 其中 4 家医院有主要 4 个克隆中的 2 个克隆, 2 家医院有 3 个克隆的播散。

参 考 文 献

- [1] Chastre J, Trouillet JL. Problem pathogens (*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*). *Semin Respir Infect*, 2000, 15 (4): 287-298.
- [2] Simor AE, Lee M, Veomcombe M, et al. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: risk factors for acquisition and management. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2002, 23(5): 261-267.
- [3] Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2241-2245.
- [4] Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (7): 3403-3406.
- [5] Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*, 2006, 14(9): 413-420.
- [6] Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57(3): 373-383.
- [7] Jane FT, Elaina MW, Neil W, et al. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 258(1): 72-77.
- [8] Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob Agent Chemother*, 2000, 44(12): 3249-3256.
- [9] Kurokawa H, Yagi T, Shibata N, et al. Worldwide proliferation of carbapenem-resistant gram-negative bacteria. *Lancet*, 1999, 354(9182): 955.
- [10] Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*, 2003, 362 (9399): 1888-1893.
- [11] Yamone K, Wachino J, Doi Y, et al. Global spread of multiple aminoglycoside resistance gene. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(6): 951-953.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement. Wayne, Pa. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007: M100-S16.
- [13] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [14] Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(4): 1442-1448.
- [15] Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 491-496.
- [16] Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47 (8): 2565-2571.
- [17] Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, et al. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 1632-1639.
- [18] Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(12): 4401-4409.

(收稿日期: 2008-09-03)

(本文编辑: 张林东)