

耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌基因检测及同源性分析*

陆丹倩¹, 芮勇宇², 杨秋², 顾向明¹, 邓冲¹, 王巧媚¹, 邓聚辉¹

(1. 广东省中山市中医院检验科, 广东中山 528400; 2. 南方医科大学南方医院, 广州 510515)

摘要:目的 临床分离出的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)耐药基因检测及同源性分析。方法 收集中山市中医院2012年7月~2013年12月临床分离40株CRAB,用PCR法对碳青霉烯类基因进行扩增、序列分析;应用ERIC-PCR研究其传播机制。结果 40株CRAB所有菌株且被检测到含有OXA-51-like基因为40株(100%),OXA-23-like基因为38株(95%),未检出NDM,VIM,IPM,OXA-24-like及OXA-58-like基因;ERIC-PCR聚类分析相似大于0.8,可认为是同一克隆群;这40株菌在相似水平被聚为33个类群(克隆株)。结论 临床分离的CRAB主要携带碳青霉烯酶基因型为OXA-23-like,OXA-51-like和ERIC-PCR是进行鲍曼不动杆菌同源性分析的有效方法。

关键词:耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌;碳青霉烯酶;PCR;ERIC-PCR

中图分类号:R378;Q781 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)06-062-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.017

Gene Detection and Homology Analysis of Acinetobacter-Resistant *Acinetobacter Baumannii*

LU Dan-qian¹, RUI Yong-yu², YANG Qiu², GU Xiang-ming¹, DENG Chong¹,

WANG Qiao-mei¹, DENG Ju-hui¹ (1. Department of Clinical Laboratory,

Guangdong Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Zhongshan 528400, China; 2. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To detect and have homology analysis of resistant genes in clinical isolates of resistant *Acinetobacter Bauman* (CRAB). **Methods** Collected 40 clinical isolates of CRAB in Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine from July 2012 to December 2013, using PCR method for the amplification of the gene of carbon, sequence analysis. Application of ERIC-PCR to study the transmission mechanism. **Results** 40 strains of crab all isolates and detected containing oxa-51-like gene for 40 strains (100%), the gene oxa-23-like gene and for 38 strains (95%), were not detected in NDM, VIM, IPM, gene OXA-24-like and OXA-58-like. ERIC-PCR clustering analysis of similarity was greater than 0.8, that was the same colonies. The 40 strains of bacteria at a similar level were clustered into 33 taxa (clone). **Conclusion** The clinical isolates of CRAB mainly carry on the effective method of OXA-23-like, OXA-51-like, and ERIC-PCR for the homology analysis of *Acinetobacter Bauman*.

Keywords: CRAB; carbapenemases; PCR; ERIC-PCR

鲍曼不动杆菌(*acinetobacter baumannii*, Ab)是一种专性需氧的非发酵革兰阴性球杆菌,属于条件致病菌,引起多重耐药并体外生存时间长(数月),易造成流行,对其临床治疗造成较大的困难。鲍曼不动杆菌的耐药机制主要是产碳青霉烯酶水解酶,碳青霉烯酶按 Ambler 法,分为 A、B 和 D 三类,本文主要是中山市中医院 2012~2013 年临床分离出的 40 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)进行 B 类金属酶、D 类苯唑西林酶以及 ERIC-PCR 法聚类分析的研究,以了解我院 CRAB 的耐药机制及流行克隆的情况。

1 材料与方法

1.1 研究对象 40 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆

菌来自我院 2012 年 7 月~2013 年 12 月住院患者送检痰液 29 份、伤口分泌物 9 份、血液及尿液各 1 份标本,其中临床分布 ICU 18 株、内科 10 株、骨科 7 株及外科 5 株,同一患者留取初次分离菌株。

1.2 仪器及试剂 美国 BD 公司 PhoenixTM 100 全自动细菌及药敏鉴定仪,PCR 扩增仪器(德国 Eppendorf),凝胶成像仪(Bio-Rad)。dNTPs TaqDNA 聚合酶、蛋白酶 K 和 DNA Marker 由大连瑞真生物技术有限公司提供。PCR 引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、10% 十二烷基磺酸钠由北京鼎国生物技术有限公司提供。

1.3 方法

* 基金项目:中山市科技局基金项目(2014A1FC052)。

作者简介:陆丹倩(1972-),女,学士,主任技师,从事临床微生物学研究,Tel:0760-89980781,E-mail:ludanqian@163.com。

1.3.1 细菌 DNA 模板制备:用 SDS-蛋白酶 K-酚-氯仿方法提取,加入适量缓冲液 III(10 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1 mmol/L EDTA)溶解 DNA 沉淀, -20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 方法检测常见碳青霉烯酶基因:PCR 分别检测 B 类金属酶基因 NDM, VIM, IMP^[1], 多重 PCR 同时扩增 D 类 OXA 类酶基因 OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, OXA-58-like 4 个基因^[2]。

1.3.3 ERIC-PCR:进行 ERIC-PCR 基因分型^[3]。

1.5 g/dl 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。利用

Quantity one 软件进行 ERIC-PCR 图谱的分析。

2 结果

2.1 碳青霉烯酶基因检测结果 40 株 CRAB 中, OXA-51-like 阳性 40 株占 100%, OXA-23-like 阳性 38 株占 95%, 未检出 NDM, VIM, IMP, OXA-24-like 及 OXA-58-like。电泳结果见图 1。

2.2 ERIC-PCR 基因分型结果 相似性聚类分析结果, 40 株菌相似水平大于 80% (图中虚线所示), 可认为是同一克隆群。这 40 株菌在相似水平被聚为 33 个类群(克隆株)。见图 2。

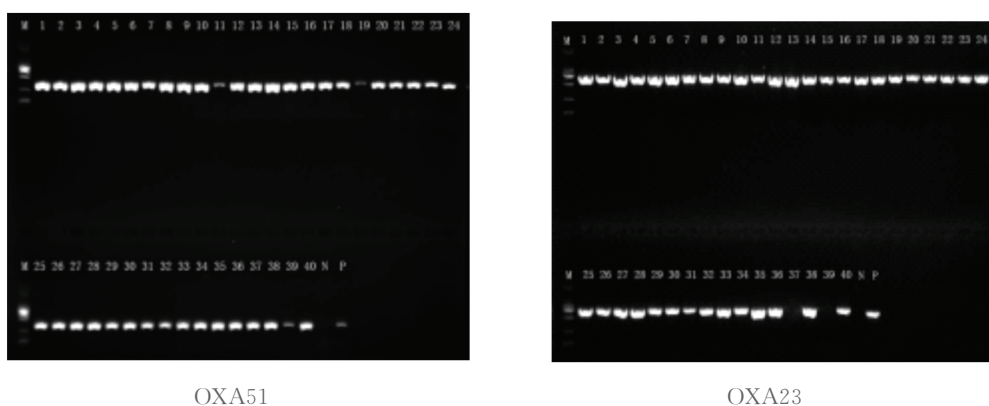


图1 碳青霉烯酶电泳结果

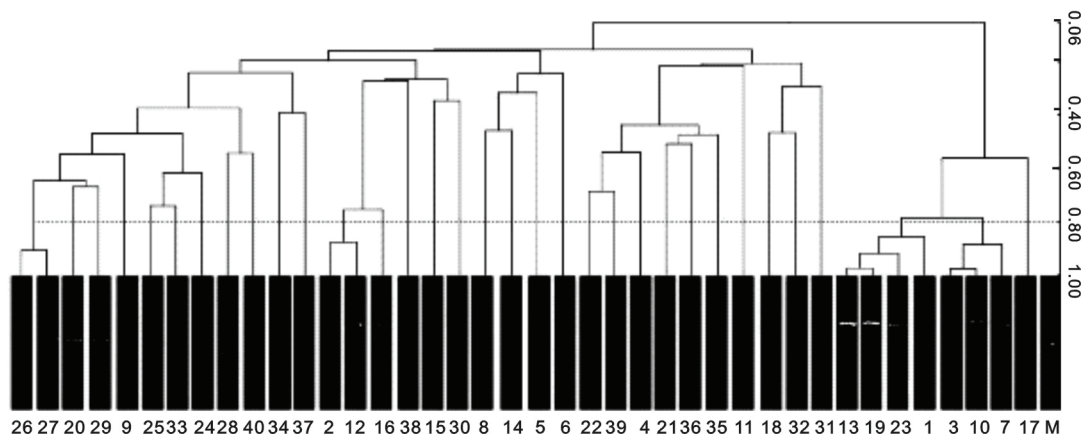


图2 ERIC-PCR 基因分型电泳图谱及聚类图

3 讨论 目前,由于广谱抗菌素在临床广泛应用,导致鲍曼不动杆菌引起的感染检出率逐年升高,随多重耐药、泛耐药、全耐药的鲍曼不动杆菌的出现^[4,5],已成为全球性临床治疗的难题。鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶是它的主要耐药机制,碳青霉烯酶主要包括 A, B 和 D 三类酶,本文主要针对 B 类金属酶,目前常见的 NDM, VIM 及 IMP, D 类苯唑西林酶,鲍曼不动杆菌常见 OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like 及 OXA-58-like 进行检测。

本实验检测 40 株 CAAB 的结果显示以痰标本最多^[6,7],成为呼吸系统感染的主要致病菌^[8]。

而分布的科室主要是以 ICU 为主^[9,10],这可能与 ICU 病区多为老年患者且住院时间长病情严重、机体免疫力差,多有严重基础疾病,大量使用广谱抗生素及各种侵入性检查和治疗等有关。

碳青霉烯酶基因检测结果显示未检出 B 类金属酶 NDM, VIM 及 IMP,提示本地区鲍曼不动杆菌可能未携带此 3 种耐药基因。D 类苯唑西林酶,检出 40 株 OXA-51-like 阳性占 100%, 38 株 OXA-23-like 阳性占 95%, 未检出 OXA-24-like 及 OXA-58-like。说明本地区鲍曼不动杆菌的基因型是以 OXA-51-like 和 OXA-23-like 为主,与王丽娟等^[11]

报道一致。OXA-51 是鲍曼不动杆菌的重要标志,它是鲍曼不动杆菌的固有基因^[12],以区别于其他不动杆菌属,水解碳青霉烯酶类药物能力较弱,并不能水解头孢菌素类药物。OXA-23 能介导细菌耐碳青霉烯类药物,它是目前流行传播最广的 D 类碳青霉烯类基因,与国内外报道一致^[13~15]。

为了了解本院近两年临床分离出的 40 株 CRAB 是否存在医院感染流行及暴发,对临床分离出的 40 株 CRAB 进行 ERIC-PCR 基因分型,研究其传播机制。ERIC-PCR 是肠杆菌科基因重复序列为引物进行 PCR 扩增出多态性 DNA 图谱。它操作简便、快速经济、重复性较好,是研究多重耐药、泛耐药及全耐药菌传播机制的首选方法。检测的 40 株菌均能扩增出条带,分辨率高,40 株 CRAB 菌相似水平大于 80% (图中虚线所示),可认为是同一克隆群。这 40 株菌在相似水平被聚为 33 个类群(克隆株)^[16]。

碳青霉烯酶基因检测及 ERIC-PCR 基因分型的检测结果均显示,本院近两年临床分离出的 40 株 CRAB 具有高度的相似性,亲缘关系紧密,可认为是同一克隆群,提示本院存在 CRAB 的克隆现象可能已经发生,且携带 OXA-23-like 及 OXA-51-like 基因是引起其耐碳青霉烯类药物的主要原因之一,而且也是造成 CAAB 不断增加的原因。因此,应规范临床合理使用抗菌药物,加强对本地区 CRAB 耐药性及耐药机制的监测及关注,加强手卫生,患者隔离,环境清洁消毒等感控措施,避免在医院内的进一步传播,这对指导临床合理用药及避免 CA-AB 医院感染暴发流行具有重要意义。

参考文献:

- [1] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.
- [2] 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.
- [3] Wei Q, Hu Q, Li S, et al. A novel functional class 2 integron in clinical proteus mirabilis isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(4): 973-976.
- [4] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-330.
Wang F, Zhu DM, Hu FP, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China in 2012[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2013, 13(5): 321-330.
- [5] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 365-374.
Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China in 2013[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2014, 14(5): 365-374.
- [6] 阿孜古丽·阿布都热合曼, 阿尔孜古力·吐尔逊. 临床鲍曼不动杆菌生物膜检测及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(4): 116-118.
Arzigul·Abramovich, Aertziguli·tursun. Biofilm detection and drug resistance analysis of clinical *Bauman Acinetobacter*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(4): 116-118.
- [7] 秦智谦, 常毅, 郝万鹏. 乌鲁木齐地区鲍曼不动杆菌感染的临床分布及耐药性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(4): 77-79.
Qin ZQ, Chang Y, Hao WP. Analysis of clinical distribution and drug resistance of *Acinetobacter infection* in Urumqi area[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(4): 77-79.
- [8] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(2): 76-85.
Chen BY, He LX, Hu BJ, et al. Expert consensus on diagnosis and control of *Acinetobacter infection* in China Bauman[J]. Natl Med J Chin, 2012, 92(2): 76-85.
- [9] 毛璞, 李建春, 邱桂霞, 等. 重症监护病房耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌耐药机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(3): 253-256.
Mao P, Li JC, Qiu GX, et al. Mechanism of carbapenem resistance in the *Acinetobacter baumannii* isolates from an intensive care unit[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2015, 15(3): 253-256.
- [10] 郭洁, 徐杰, 王丽丽, 等. 耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌的耐药谱分析[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1): 107-109.
Guo J, Xu J, Wang LL, et al. Antibiotics resistance profiles of carbapenem-resistant *Acinetobacter Baumannii* isolates[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(1): 107-109.
- [11] 王丽娟, 季萍, 张朝霞. 乌鲁木齐地区耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型及同源性分析[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(3): 72-75.
Wang LJ, Ji P, Zhang ZX. Study on the homology and carbapenemases genotypes of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from Urumqi region[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(3): 72-75.
- [12] 钟敏, 黄文芳. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌产 OXA 酶的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(1): 122-125.
Zhong M, Huang WF. Research advances of oxacillinase in carbapenem-resistant *Acinetobacter Baumannii*[J]. Chinese Journal of Microecology, 2013, 25(1): 122-125.
- [13] 马传玲, 张环, 徐春泉, 等. 鲍曼不动杆菌 bla_{OXA-23} 和 armA 等耐药基因的检测和流行特性研究[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(4): 210-214.
Ma CL, Zhang H, Xu CQ, et al. Detection and epidemiology of drug resistance related bla_{OXA-23} and armA

- genes of *Acinetobacter Baumannii*[J]. Chinese Journal of Infectious Diseases, 2015, 33(4): 210-214.
- [14] 杨正海, 李小宁. 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.
- Yang ZH, Li XN. Study on genes of oxacillinase in carbapenem-resistant *Acinetobacter Baumannii*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(3): 203-207.
- [15] 卜劲松, 王 勇. 耐碳青霉烯类药物鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶、整合酶基因型研究[J]. 检验医学, 2015, 30(6): 626-630.
- Bu JS, Wang Y. Study on carbapenemase and integrase genotypes of carbapenem-resistant *Acinetobacter Bauman*[J]. Laboratory Medicine, 2015, 30(6): 626-630.
- [16] 余 清, 罗 君, 蒋 维. 院内鲍曼不动杆菌耐药谱分析及相关 β -内酰胺酶基因分布情况调查[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(6): 60-63.
- Yu Q, Luo J, Jiang W. Study on the characteristic of drug resistance and β -lactamase genes in *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(6): 60-63.
- 收稿日期: 2016-07-26 修回日期: 2016-09-19

(上接 61 页)含有一种或多种肿瘤标志物,因此单项检测某一种肿瘤标志物可能缺乏特异度和灵敏度,容易出现漏诊和误诊。联合检测多种肿瘤标志物可以明显提高肿瘤阳性率的检出^[10]。在本研究中,联合两项或三项肿瘤标志物检测诊断肺癌的敏感度明显提高,但同时造成特异度的降低。近来国内有学者对国内 13 种血清肿瘤标志物对肺癌的诊断价值进行了 Meta 分析,提出最优的联合诊断标志物为 CEA+CA125+CYFRA21-1^[11]。值得注意的是,不同标志物在不同病理类型的肺癌中的水平和阳性率有所不同,因此采用何种组合的联合检测能够提高肿瘤检出率的同时也有较高的特异度,或是采用不同组合的联合检测能对不同病理类型的肿瘤进行初步鉴别诊断^[7],这些都还需要进一步的研究,从而为肺癌的诊断提供更有价值的临床依据。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 朱金凤. 肺癌肿瘤标志物研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2011, 26(3): 321-326.
- Zhu JF. The Advances in Lung Tumour Markers[J]. Journal of Practical Oncology, 2011, 26(3): 321-326.
- [3] Wang B, He YJ, Tian YX, et al. Clinical utility of haptoglobin in combination with CEA, NSE and CYFRA21-1 for diagnosis of lung cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(22): 9611-9614.
- [4] 张 萍, 王红义, 杨迎桂, 等. 血清 CEA, ProGRP, NSE 和 CYFRA21-1 联合检测在肺癌诊断中的应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(2): 56-59.
- Zhang P, Wang HY, Yang YG, et al. Clinical application of combined detection of CEA, ProGRP, NSE and CYFRA21-1 in diagnosis of lung cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(2): 56-59.
- [5] 杨忠明, 丁显平, 梅 琳, 等. CEA, NSE, SCC-Ag 和 CYFRA21-1 在肺癌化疗前后表达水平的分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2014, 51(1): 177-182.
- Yang ZM, Ding XP, Mei L, et al. Analysis of serum CEA, NSE, SCC-Ag and CYFRA21-1 expression level before and after chemotherapy in lung cancer[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2014, 51(1): 177-182.
- [6] Zhao WX, Luo JF. Serum neuron-specific enolase levels were associated with the prognosis of small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2013, 34(5): 3245-3248.
- [7] 邸玉玮, 阳 霞, 段 玮, 等. ROC 曲线评价 NSE, CEA, CYFRA21-1 辅助肺癌诊断效能[J]. 循证医学, 2015, 15(4): 237-241.
- Di YW, Yang X, Duan W, et al. Diagnostic value analysis of serum NSE, CEA, CYFRA21-1 for lung cancer based on ROC curve and logistic regression[J]. The Journal of Evidence-Based Medicine, 2015, 15(4): 237-241.
- [8] 陈 燕, 彭 伟, 黄艳芳, 等. 治疗前血清神经元特异性烯醇化酶水平在预测晚期非小细胞肺癌脑转移及预后中的意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 37(7): 508-511.
- Chen Y, Peng W, Huang YF, et al. Significance of serum neuron-specific enolase before treatment in predicting brain metastases and prognosis of advanced non-small cell lung cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2015, 37(7): 508-511.
- [9] 凌存保, 郭广宏, 向 荣, 等. 三种血清标志物在肺癌中的应用价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2010, 17(4): 209-211.
- Ling CB, Guo GH, Xiang R, et al. Clinical significance of three serum tumor markers in lung cancer[J]. Labeled Immunoassays & Clinical Medicine, 2010, 17(4): 209-211.
- [10] Molina R, Marrades RM, Auge JM, et al. Assessment of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(4): 427-437.
- [11] 彭 瑛, 邓正华, 温先勇. 国内 13 种血清肿瘤标志物对肺癌诊断价值的 Meta 分析[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1): 96-100.
- Peng Y, Deng ZH, Wen XY. Diagnostic value of thirteen types of serum tumor markers for lung cancer in china: a meta-analysis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(1): 96-100.
- 收稿日期: 2016-06-13 修回日期: 2016-11-10