

中山市两家医院鲍曼不动杆菌耐药性及同源性分析

刘绮明, 仇绮琳, 郑悦康, 林金思, 吴衍恒, 区金结

中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528403

摘要: **目的** 了解中山市两家医院临床分离的鲍曼不动杆菌的耐药性及耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)耐药基因的携带情况,并分析其同源性,为医院感染控制提供实验室依据。**方法** 收集 2018 年 3—8 月中山市两家医院临床分离的 35 株鲍曼不动杆菌,采用最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)法进行 16 种抗菌药物敏感试验,并筛选出 CRAB 菌株,采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增 CRAB 中的耐药基因并测序确认;应用脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技术对 35 株鲍曼不动杆菌进行分子分型。**结果** 35 株鲍曼不动杆菌中有 33 株为 CRAB,其余 2 株对 16 种抗菌药物全敏感。33 株 CRAB 对替加环素和多粘菌素 B 均敏感,对米诺环素的敏感率为 45.45%,而对其他抗菌药物的耐药率均高达 80%以上。33 株 CRAB 均携带 OXA-51 基因,未检测到 IMP 和 VIM 基因。35 株鲍曼不动杆菌共分为 18 个 PFGE 带型;分为 A-F 6 个聚类型别,A 型(9/35, 25.7%)和 B 型(22/35, 62.9%)为主要流行克隆株。**结论** 鲍曼不动杆菌耐药现象严重,携带多种耐药基因可能是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类等多种抗菌药物耐药的重要原因。医院内存在不同克隆株播散以及同一克隆株在医院间流行播散。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 耐药基因; 脉冲场凝胶电泳; 同源性

中图分类号: R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)05-0580-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.05.019

Antibiotic resistance and homology of *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospitals in Zhongshan city

LIU Qi-ming, QIU Qi-lin, ZHENG Yue-kang, LIN Jin-si, WU Yan-heng, QU Jin-jie

Zhongshan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhongshan, Guangdong 528403, China

Abstract: **Objective** To investigate the antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) and the carriage of resistance genes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) isolated from two hospitals in Zhongshan city, to analyze their gene homology, and to provide evidence for nosocomial infection control. **Methods** Thirty-five clinical isolates of *A. baumannii* were collected from two hospitals in Zhongshan city from March to August 2018. Susceptibilities of the *Acinetobacter baumannii* isolates to 16 kinds of antibiotics were detected by minimum inhibitory concentration (MIC) method. The resistance genes for the selected CRAB isolates were determined by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. Molecular genotyping was performed for 35 *Acinetobacter baumannii* isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Thirty-three CRAB isolates were screened from 35 *A. baumannii* isolates, and the other 2 isolates were sensitive to all the 16 kinds of antibiotics. 33 CRAB isolates were sensitive to tigecycline and polymyxin B, and their sensitivity rates to minocycline and other antibiotics were 45.45% and above 80%, respectively. All the 33 CRAB isolates carried OXA-51 gene, but IMP and VIM genes were not detected. 18 PFGE types and 6 clusters (A-F) were identified in the 35 *A. baumannii* isolates. Cluster A (9/35, 25.7%) and cluster B (22/35, 62.9%) were the main prevalent clones. **Conclusions** Antibiotic resistance of the *A. baumannii* isolates in two hospitals in Zhongshan city is serious, and carrying various drug resistance genes may be the important reason for the resistance of *A. baumannii* to carbapenems and other antibacterial drugs. There are different types of clone isolates scattered in the two hospitals and the same clone isolate prevailed and spread between the two hospitals.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; resistance gene; pulsed-field gel electrophoresis; homology

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是一类非发酵革兰阴性杆菌,广泛存在于自然界、医院环境及人

作者简介:刘绮明(1984-),女,本科,主管技师,研究方向:微生物检验。

体皮肤表面,可引起肺部感染、伤口感染、导管相关感染、尿路感染和菌血症等一系列常见的医院感染^[1],是医院获得性感染的常见条件致病菌之一,在非发酵菌中仅次于铜绿假单胞菌^[2]。近年来,随着广谱抗菌药物的大量使用,鲍曼不动杆菌的耐药率呈递增趋势,

尤其是耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB),使临床治疗和医院感染控制面临严峻挑战。本研究收集了两家医院共 35 株鲍曼不动杆菌,采用最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)法检测其体外抗菌药物的敏感性,采用脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技术对菌株进行分子分型分析,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法检测 CRAB 菌株中耐药基因的携带情况。本研究旨在了解本市鲍曼不动杆菌的耐药情况和分子分型特征,为指导临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 收集 2018 年 3—8 月中山市人民医院(简称医院甲)、中医院(简称医院乙)临床分离的鲍曼不动杆菌菌株共 35 株,其中 19 株来自医院甲,16 株来自医院乙,已剔除同一患者的重复标本。标本种类包括:脑脊液 2 株,痰液 24 株,血液 5 株,尿液 1 株,分泌物 1 株,伤口 1 株,其他 1 株。质控菌株为大肠埃希氏菌 ATCC25922,由广东省微生物菌株保藏中心提供。PFGE 实验分子质量标准对照的布伦敦沙门氏菌(*Salmonella braenderup*)H9812 菌株,由广东省疾病预防控制中心微生物检验所提供。

1.1.2 主要仪器和试剂 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析系统(法国生物梅里埃公司),CHEF MAPPER XA 脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad 公司),Gel Doc XR+凝胶成像仪(Bio-Rad 公司),BIOFOSUN 微生物鉴定药敏分析系统(上海星佰生物技术有限公司),CFX96 Real-Time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),QIAxcel Advanced 毛细管电泳仪(德国 Qiagen 公司)等。革兰氏阴性菌鉴定试剂卡和 API 20NE 生化板条购自法国生物梅里埃公司,革兰阴性需氧菌药敏检测板购自上海星佰生物技术有限公司;Apa I 限制性内切酶,Xba I 限制性内切酶和 D Buffer 购自美国 Promega 公司,蛋白酶 K 购自 MercK 公司;PFGE 分型专用琼脂糖 Seakem Gold 购自瑞士 Lonza 公司;Premix Taq™ 酶体系(LA Taq™ Version2.0 plus dye)购自北京宝日生物技术有限公司;引物由广州艾基生物技术有限公司合成。所有试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定及药敏试验 临床收集的 35 株鲍曼不动杆菌均经 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析系统或 API 20NE 生化板鉴定。药敏试验采用微量肉

汤稀释法,检测 35 株鲍曼不动杆菌对 16 种常用抗菌药物的 MIC 值,并参照 2018 年美国临床和实验室标准协会标准,获得相应敏感(sensitive, S)、中度敏感(intermediate sensitive, I)和耐药(resistance, R)结果。

1.2.2 耐药基因检测 采用煮沸法提取 CRAB 基因组总 DNA,对 OXA-23、OXA-51、OXA-58、IMP、VIM 和 TEM 等耐药基因进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。PCR 反应体系为 50 μ l;上下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ l, Premix Taq™ 酶体系 25 μ l,模板 5 μ l, ddH₂O 16 μ l。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min 终止延伸。PCR 产物经毛细管电泳检测分析,阳性产物送广州艾基生物技术有限公司进行双向测序,测序结果在美国国立生物信息技术中心数据库用基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)比对分析。

表 1 耐药基因序列和产物长度

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)	参考文献
OXA-23	F:GAT GTG TCA TAG TAT TCG TCG R:TCA CAA CAA CTA AAA GCA CTG	1 058	[3]
OXA-51	F:TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG R:TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	[4]
OXA-58	F:AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG R:CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	591	[5]
IMP	F:CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT R:ATA ATT TGG CGG ACT TTG GC	488	[6]
VIM	F:ATT GGT CTA TTT GAC CGC GTC R:TGC TAC TCA ACG ACT GAG CG	780	[6]
TEM	F:ATC AGC AAT AAA CCA GC R:CCC CGA AGA ACG TTT TC	516	[4]

1.2.3 脉冲场凝胶电泳 参考《国家致病菌识别网技术规范》的鲍曼不动杆菌 PFGE 实验方法。鲍曼不动杆菌菌株接种于血平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。用棉签刮取适量细菌制成细菌悬浊液,使其浓度为 3.0~3.5 个麦氏单位。制成胶块后,用 40 U 的 Apa I 限制性内切酶于 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。将酶切后的胶块贴于梳齿包埋于 1% Seakem Gold 琼脂糖,待胶凝固后,把胶小心放入含 0.5 \times TBE 缓冲液的电泳槽中,电泳 19 h,核酸片段 30~700 kb,电泳起始转换时间为 5.0 s,最后转换时间为 20.0 s,电压为 6.0 V/cm,电场夹角为 120 $^{\circ}$ 。电泳结束后,用 EB 染色,去离子水脱色。在凝胶成像仪拍照成像。

1.2.4 聚类分析 采用 Bio Numerics 7.6 软件对全染色体 DNA 酶切图谱进行聚类分析。聚类算法为非加权配对平均法,条带位置差异容许度设为 1%,带型间的相似度用 Dice 系数表示,相似度 100% 认定为同一 PFGE 带型,得到聚类图。按照 Tenover 等^[7]推荐的方法判读,将具有 85% 以上相同条带(相似性系数>

0.85)的菌株定义为相同菌株,归入同一聚类。

2 结 果

2.1 药敏结果 35 株鲍曼不动杆菌中有 2 株对 16 种抗菌药物全敏感,其余 33 株均对亚胺培南或美罗培南耐药,为 CRAB。33 株 CRAB 对替加环素和多粘菌素 B 均敏感,对米诺环素的敏感率为 45.45%,而对其他抗菌药物普遍耐药,耐药率均超过 80%;对氨苄西林/舒巴坦、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南和美罗培南均 100% 耐药。见表 2。

表 2 33 株 CRAB 对 16 种抗菌药物的耐药情况表(n,%)

抗菌药物	S	I	R
米诺环素	15(45.45)	18(54.55)	0(0.00)
哌拉西林/他唑巴坦	0(0.00)	2(6.06)	31(93.94)
头孢哌酮/舒巴坦	0(0.00)	5(15.15)	28(84.85)
氨苄西林/舒巴坦	0(0.00)	0(0.00)	33(100.00)
头孢噻肟	0(0.00)	0(0.00)	33(100.00)
头孢他啶	0(0.00)	0(0.00)	33(100.00)
头孢吡肟	0(0.00)	0(0.00)	33(100.00)
阿米卡星	2(6.06)	0(0.00)	31(93.94)
庆大霉素	0(0.00)	1(3.03)	32(96.97)
环丙沙星	1(3.03)	0(0.00)	32(96.97)
左氧氟沙星	1(3.03)	0(0.00)	32(96.97)
亚胺培南	0(0.00)	0(0.00)	33(100.00)
美罗培南	0(0.00)	0(0.00)	33(100.00)
复方新诺明	3(9.09)	0(0.00)	30(90.91)
替加环素	33(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
多粘菌素 B	33(100.00)	0(0.00)	0(0.00)

2.2 耐药基因检测结果 33 株 CRAB 中,均检出 OXA-51,31 株(93.93%) 检出 OXA-23 基因,1 株(3.03%) 检出 OXA-58 基因,31 株(93.93%) 检出 TEM 基因,未检出 IMP 和 VIM 基因。其中 30 株携带 3 种基因,另外 3 株各携带 2 种基因,见表 3。将 PCR 扩增产物纯化后进行双向测序,测序结果经 BLAST 比对,OXA-23、OXA-51、OXA-58、TEM 与 NCBI 相应基因相似度分别为 100.00%、98.59%~100.00%、99.32%、99.04%~100.00%。

表 3 33 株 CRAB 耐药基因检测分布情况

基因名称	菌株数	占比(%)
OXA-23+OXA-51+TEM	30	90.91
OXA-51+TEM	1	3.03
OXA-23+OXA-51	1	3.03
OXA-51+OXA-58	1	3.03

2.3 PFGE 分型结果 按照 100%的相似系数进行分型,35 株鲍曼不动杆菌可分为 18 种 PFGE 带型,分别命名为 P1~P18,各型包含 1~9 株菌,菌株之间的相似系数为 52.6%~100%。按照 90%以上的相似程度,35 株鲍曼不动杆菌分为 6 个聚类(A~F)。聚类 A 和聚类 B 为主要簇型,分别包含 9 株(9/35,25.7%)和 22 株(22/35,62.9%)菌株,另外 4 株为散在不成簇的菌株,为 C~F 型。见图 1。

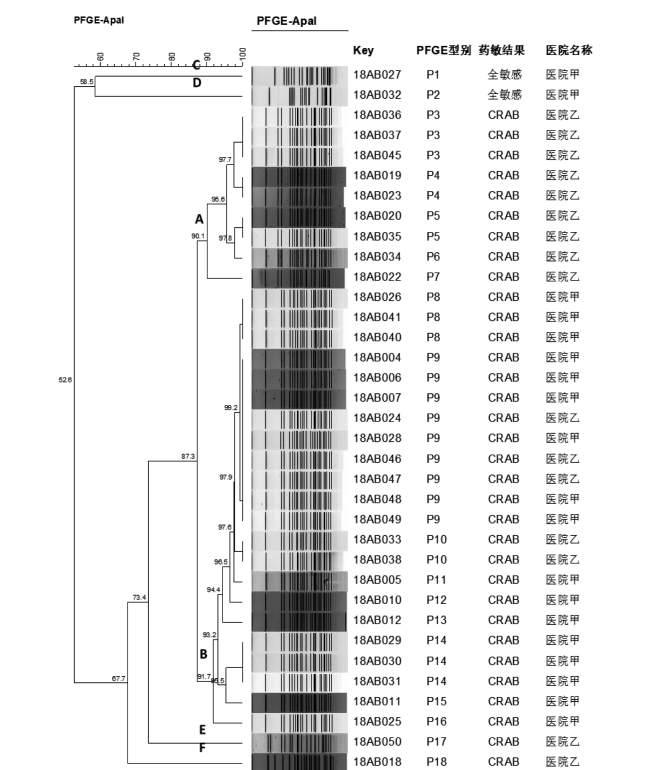


图 1 35 株鲍曼不动杆菌 PFGE 聚类分析图

3 讨 论

鲍曼不动杆菌系条件致病菌,临床分离率逐年增高,已成为医院感染的重要病原菌之一,极易造成暴发流行。本文收集的 35 株鲍曼不动杆菌除了 2 株对 16 种抗菌药物全敏感,其余 33 株为 CRAB。33 株 CRAB 对替加环素和多粘菌素 B 均敏感,除对米诺环素较为敏感外,对其余 13 种抗菌药物耐药率均高达 80% 以上。特别是 β-内酰胺酶抑制剂(氨苄西林/舒巴坦)、第 3、4 代头孢菌素类(头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟)和碳青霉烯类(亚胺培南、美罗培南)均耐药。实验结果显示,CRAB 对复方新诺明的耐药率达 90.91%,远高于侯娟娟等[8]和陈璐等[9]的报道结果。值得注意的是,CRAB 对米诺环素的耐药率为 0,但中介率处于较高水平(54.55%),提示部分菌株处于临界耐药。以上数据表明,分离于两家医院 33 株 CRAB 耐药形势极为严峻,治疗 CRAB 感染的抗菌药物选择十分有限,给临床治疗带来很大困难。

鲍曼不动杆菌对抗菌药物耐药机制具有多样性和复杂性,其中抗菌药物诱导细菌产生 β-内酰胺酶为其主要机制[10]。按 Ambler 分类,β-内酰胺酶可分为:① A 类酶(超广谱 β-内酰胺酶),主要有 TEM、CTX-M、SHV、KPC。② B 类酶(金属酶),主要有 IMP、VIM、SIM。③ D 类酶(苯唑西林酶,OXA 型酶),包括 OXA-23、OXA-51、OXA-58、OXA-24 等。为揭示两家医院

CRAB 的耐药机制,本研究选取 OXA-23、OXA-51、OXA-58、IMP、VIM 和 TEM6 种 β -内酰胺酶基因进行检测,未检测到 IMP 和 VIM 基因。33 株 CRAB 中均携带 OXA-51 基因,该基因可作为鲍曼不动杆菌的标志性基因,具有较高的种属特异性^[11]。研究^[12]曾证明 OXA-23 可通过插入序列、转座子、整合子等多种机制介导对碳青霉烯类抗菌药物耐药,在鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药中起着重要作用。PCR 结果显示,33 株 CRAB 中共检出 OXA-23 基因 31 株(93.94%),检出率与我国多地^[5,9,13-14]报道产 OXA-23 酶型 CRAB 高检出率的结果基本一致。在本研究中,31 株(93.94%)CRAB 携带 TEM 基因,其携带率接近江苏省^[4]报道的 100%,而远高于四川省^[15]报道的 33.33%,推测可能是由于不同地区抗菌药物的使用情况不同,基因型存在地域性差异或者菌株数量造成统计上的局限性。另外,本研究发现 30 株 CRAB 同时携带 3 种基因(OXA-23、OXA-51 和 TEM),1 株 CRAB 同时携带 OXA-51 和 TEM 基因,1 株 CRAB 同时携带 OXA-23 和 OXA-51 基因,1 株 CRAB 同时携带 OXA-51 和 OXA-58 基因,说明携带多种耐药基因是 CRAB 对抗菌药物耐药的原因。本研究 CRAB 均检出 OXA-51 基因,OXA-23 和 TEM 基因检出率高,其余基因阳性率低甚至无阳性,提示 OXA-51、OXA-23 和 TEM 是本地区两家医院 CRAB 的主要流行酶型,且 CRAB 可同时产生多种 β -内酰胺酶,携带多种耐药基因是本地区鲍曼不动杆菌多重耐药的重要机制之一。但研究中的产酶株是否伴有其他耐药机制(如质粒携带耐药基因并在细菌间传递等),仍有待进一步实验证实。

耐药菌株的克隆传播是鲍曼不动杆菌耐药率不断上升的重要原因^[16],对菌株进行基因分型可以分析不同基因型之间的同源性关系,在细菌传染性监测及调查医院感染的暴发流行中具有重要意义^[17]。PFGE 分型是目前国际上公认的细菌分子生物学分型技术的金标准^[18]。分析结果显示,100%相同 PFGE 带型 P9 的菌株来源不同,其中菌株 18AB004、18AB006、18AB007、18AB028、18AB048、18AB049 来自医院甲,菌株 18AB024、18AB046、18AB047 来自医院乙;其余 PFGE 带型相同的菌株来自同一家医院。表明同一基因型在同一家医院及两家医院间存在着交叉感染。按 90%聚类分析,35 株临床分离的鲍曼不动杆菌可分为 6 个聚类(A、B、C、D、E、F),其中聚类 A 和聚类 B 为主要流行克隆株(均为 CRAB 耐药株),A 型的 9 株均来自医院乙;B 型的 17 株来自医院甲,5 株来自医院乙,提示医院内存在不同克隆株播散以及同一克隆株在医

院间流行播散。其余 4 个型别仅分别包含 1 株菌株(为散发不成簇的菌株,包含 2 株全敏感株和 2 株 CRAB 耐药株),与李永丽等^[19]和龚燕飞等^[20]报道存在散发菌株的研究结果相似。全敏感株与 CRAB 耐药株 PFGE 分型距离较远,提示两者亲缘关系较远。另外,携带不同组合耐药基因的菌株分布在不同的聚类类型别,表明 PFGE 聚类型与耐药基因有一定关联。本研究表明目前主要流行的克隆株 A 型和 B 型在两家医院流行播散,且携带多种耐药基因,应严格控制抗生药物的应用,制定合理的用药策略,加强院内感染防控措施,预防耐药菌株的暴发流行。

参考文献

- [1] Chiu CH, Lee HY, Tseng LY, et al. Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(4):382-386.
- [2] 阳央,王静,李芳芳. 鲍曼不动杆菌临床易感因素及耐药性分析[J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(9):1203-1206.
- [3] 余琳,苏丹虹,江凤茹. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因分析与同源性分析[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(12):2018-2021.
- [4] 朱善军,倪晓艳,吴巧珍,等. 吴江地区多重耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因携带情况及同源性[J]. 中国感染控制杂志, 2016, 15(12):913-916,933.
- [5] 钱敏健,张莉. 某院碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因分析[J]. 广西医学, 2015, 37(11):1668-1670.
- [6] 李光荣,宋敏,杨建波,等. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌耐药基因的研究[J]. 中国全科医学, 2014, 17(26):3083-3087.
- [7] 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]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239.
- [8] 侯娟娟,李娟,杨君. 庆阳地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因检测及其同源性分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(12):1292-1296.
- [9] 陈璐,李凌竹,冷应蓉,等. 重症监护病房医院感染耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因的研究与分析[J]. 中国药物应用与监测, 2016, 13(1):52-55.
- [10] 杨彬艺,姚冬梅. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究及进展[J]. 实用预防医学, 2019, 26(6):766-768.
- [11] 邓德耀,袁文丽,刘春林. OXA-51 型 β 内酰胺酶的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5):451-454.
- [12] 谷秀梅,陈瑶,刘文恩,等. 产 OXA-23 鲍曼不动杆菌可移动遗传元件研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(25):11-15.
- [13] 丁梦珊,蔡蕊,花璇,等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因及整合子检测与分析[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(10):795-797.
- [14] 施腾飞,陈惠瑜,刘银环. ICU 鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(3):356-358.
- [15] 汤雪梅,黄海波,殷琳,等. 我院重症医学科鲍曼不动杆菌耐药性及分子流行病学研究[J]. 中国药房, 2018, 29(18):2520-2524.
- [16] Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(11):4022-4028.
- [17] 周玉,曲芬,龚美亮,等. 老年住院患者感染鲍曼不动杆菌克隆相关性及其耐药表型分析研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(3):14-17.
- [18] Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6):1661-1669.
- [19] 李永丽,应春妹,陈艺升. ERIC-PCR 技术在鲍曼不动杆菌基因分型中的应用评估[J]. 检验医学, 2013, 28(7):621-624.
- [20] 龚燕飞,曾强,刘湘林,等. 亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学及耐药基因研究[J]. 实用预防医学, 2014, 21(1):28-31.

收稿日期:2019-08-27