

• 论 著 •

南京市部分地区医院感染鲍曼不动杆菌的耐药基因和分子流行病学研究

张 静¹,赵水娣²,张之峰²

(1.南京市江宁区中医院检验科 211100;2.南京大学医学院附属鼓楼医院检验科,南京 210008)

摘要:目的 了解南京市部分地区医院鲍曼不动杆菌的耐药性及基因分型,探讨不同抗菌药物耐药菌株的分子流行病学特征。**方法** 收集南京市部分地区三级甲等医院 2015 年 5 月至 2016 年 5 月临床分离的 75 株鲍曼不动杆菌,通过微生物鉴定系统进行鉴定,采用 KB 法测定菌株的耐药性,通过脉冲场凝胶电泳判断菌株的基因分型,PCR 法测定菌株中的耐药基因,并进行流行病学研究。**结果** 75 株鲍曼不动杆菌在检测的 16 种抗菌药物中,除替加环素、多黏菌素外,对其他抗菌药物的耐药率均较高,其中对头孢吡肟、头孢他啶、头孢噻肟、头孢泊肟、环丙沙星、四环素的耐性率均达到 90% 以上;菌株主要分为 5 型,其中 A 型和 B 型所占比例分别为 42.67%、37.33%;菌株中基因 OXA-23、OXA-24、TEM、SHV、CTX-M、IMP-1、IMP-2、VIM-2 的阳性携带率分别为 81.33%、9.33%、66.67%、10.67%、42.67%、26.67%、16.00%、21.33%。**结论** 南京部分地区医院鲍曼不动杆菌以 A、B 型株最为流行,且多为多重耐药菌;菌株中携带的主要耐药基因为 OXA-23 和 TEM,可能是导致该菌对碳青霉烯抗菌药物和 β -内酰胺类抗菌药物耐药性高的主要机制。

关键词:鲍曼不动杆菌; 医院感染; 耐药基因; 基因分型; 分子流行病学特征

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0074-04

Study on drug resistance genes and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumanii* in some areas of Nanjing City

ZHANG Jing¹, ZHAO Shuidi², ZHANG Zhi feng²

(1. Department of Clinical Laboratory, Jiangning Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanjing, Jiangsu 211100, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Drum Tower Hospital Affiliated of Nanjing University Medical College, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistance genes of *Acinetobacter baumanii* in some areas of Nanjing City, and to explore the molecular epidemiology characteristics of different antibiotic resistant strains. **Methods** A total of 75 strains of *Acinetobacter baumanii* were isolated from three hospitals of Nanjing city from May 2015 to May 2016 and the strains were identified by microbial identification system. Drug resistances of the strains were determined by KB method. The genotypes of strains were analyzed by pulsed field gel electrophoresis, and PCR was used to amplify the resistance genes. The molecular epidemiology of *Acinetobacter baumanii* was studied. **Results** Seventy five strains of *Acinetobacter baumanii* all had high drug resistance to antibiotics except tigecycline and colistin. The rates of resistance to ceftazidime, cefotaxime, ciprofloxacin, cefotaxime, tetracycline were all higher than 90%. The strains were mainly divided into 5 types, and the proportion of A type and B type accounted for 42.67% and 37.33%. The positive rates of genes OXA-23, OXA-24, TEM, SHV, CTX-M, IMP-1, IMP-2 and VIM-2 were 81.33%, 9.33%, 66.67%, 10.67%, 42.67%, 26.67%, 16.00% and 21.33% respectively. **Conclusion** A type and B type of the *Acinetobacter baumanii* are the most popular in hospitals of Nanjing, and the strains are multiple drug resistance. The expression of main resistance genes OXA-23 and TEM strains may be the main mechanism for the higher resistance of the bacteria to antibiotics and β -amide antibiotics.

Key words: *Acinetobacter baumanii*; nosocomial infection; drug resistance gene; genotype; molecular epidemiology

鲍曼不动杆菌是一种常见的氧化酶阴性、不发酵糖类的革兰阴性菌,广泛存在于自然界、医院及人体皮肤中,是一种选择性致病菌。鲍曼不动杆菌对普通的消毒剂不敏感,在医院环境中可以长期存活,对患者尤其是免疫功能低下患者造成严重威胁^[1]。近年来,随着抗菌药物、激素及免疫抑制剂的频繁使用,以及手术或介入治疗在临床的广泛开展,使得鲍曼不动杆菌感染已成为医院感染的主要原因^[2]。据统计数据显示,目前鲍曼不动杆菌的临床检出率已超过铜绿假单胞菌,跃居非发酵菌的第 1 位,且随着多重耐药株的出现,鲍曼不动杆菌的耐药率及耐药广泛性明显升高,成为亟待解决的临床问题^[3-4]。本研究将对南京市部分地区鲍曼不动杆菌的流行病学进行分析并对其耐药基因进行检测,以期为临床防控提供合理参考,具体研

究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 鲍曼不动杆菌 75 株,来源于 2015 年 5 月至 2016 年 5 月南京鼓楼医院、南京江宁区中医院临床收集分离的菌株,同一患者仅留取初次分离株。标本种类包括尿液、痰液、血液、腹水等。质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853),由江苏省临床检验中心提供。

1.2 仪器与试剂 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定仪购自法国生物梅里埃公司,脉冲电泳仪和凝胶成像系统购自美国 BioRad 公司,PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成,PCR mix 反应液购自大连宝生物,琼脂糖购自美国 Amersco 公司,EB、TAE、TBE 均购自康

为世纪有限公司,内切酶 Apa I 购自 NEB 公司。药敏纸片:头孢曲松、头孢西丁、阿米卡星、左氧氟沙星、哌拉西林、四环素、美罗培南、亚胺培南、环丙沙星、阿米卡星、头孢哌酮、头孢他啶、甲氧苄啶、头孢噻肟、头孢吡肟、多黏菌素购自英国 Oxoid 公司。

1.3 菌株鉴定 根据菌落形态及革兰染色对临床分离菌株进行初筛,并采用 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定系统进行菌种鉴定。

1.4 药敏实验 采用纸片扩散法(KB 法)测定菌株对抗菌药物的敏感性。(1)挑取单菌落并用生理盐水稀释至浊度为 0.5 麦氏管浊度;(2)使用无菌棉签蘸取菌液,并挤出多余液体,涂布于 MH 琼脂培养基上;(3)室温静置 5 min,贴上抗菌药物纸片,纸片间距不宜低于 24 mm;(4)置于 37 ℃ 培养箱中孵育 16~18 h;(5)使用游标卡尺测量抑菌圈的直径并参照 2010 年美国实验室标准化协会制定的抗菌判断标准^[5],对菌株药物敏感性进行判定。

1.5 耐药基因检测 采用 PCR 法进行菌液扩增,苯唑西林酶(OXA-23、OXA-24)、β-内酰胺酶(TEM、SHV、CTX-M)、金属酶(IMP-1、IMP-2、VIM、VIM-2)的引物序列如表 1 所示。PCR 扩增程序参数设置为:94 ℃ 预变性 10 min,94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,进行 35 个循环,最后 72 ℃ 延长 7 min。扩增完成后,通过常规 2% 琼脂糖凝胶电泳,并在紫外下拍照记录,检测菌株相关基因的表达情况。

表 1 靶基因引物序列

酶	基因	引物序列(5'-3')	
苯唑西林酶	OXA-23	P1	TGTGCTGGTTATTCAAC
		P2	ATGGCTTCTCCTAGTGTC
	OXA-24	P1	TGACTTTAGGTGAGGCAATG
		P2	AAAGGTAATCGGTTATGTGTC
β-内酰胺酶	TEM	P1	AAGCCATACCAACGACGAG
		P2	ATTGTTGCCGGAAAGCTAGA
	SHV	P1	TCTCCCTGTGACCCCTG
		P2	CCACTGCAGCAGCTGC(A/C)GTT
	CTX-M	P1	CTGCTTAATCAGCCTGTCGA
		P2	TCAGTGCAGATCCAGACGAAA
金属酶	IMP-1	P1	CATGGATAATTGCTGCTC
		P2	CTTTAGACTCGCCTTCA
	IMP-2	P1	GGCAGTCGCCCTAAACAAA
		P2	TAGTTACTTGCGCTGTGATGG
	VIM	P1	AGTCTCCACGCACTTTCAT
		P2	CACAACCACCATAGAGCACA
	VIM-2	P1	ATTGGTCTATTGACCGCGTC
		P2	TGCTACTCAACGACTGAGCG

1.6 菌株脉冲场凝胶电泳(PFGE) 菌株复壮后,涂于血液琼脂培养板中 37 ℃ 培养 24 h,挑取单菌落接种于 3 mL 肉汤中,37 ℃ 震荡培养过夜,收集菌液,采用脉冲场凝胶电泳分析菌株同源性。电泳参数设置为:电压 6 V/cm,脉冲时间 20 s,电泳时间 22 h。PFGE 结果参照 Tenover 推荐的方法进行条带分析^[6],同一克隆型:条带完全一致;同一克隆不同亚型:2~6 处

条带位置不同;不同克隆型:7 条及以上条带位置不一致。

2 结 果

2.1 鲍曼不动杆菌感染病例组成 重症 ICU 病房鲍曼不动杆菌的检出率最高,所占比例为 41.33%,另外神经外科和血液科均检出 12 株(16.00%),呼吸内科检出 13 株(17.33%),骨科、胸外科和儿科分别检出 4、2、1 株。见表 2。收集的所有标本中,由痰液中分离得到的菌株所占比例最高为 57.33%,其他依次为分泌物 13 株、血液 12 株、尿液 5 株和脑脊液 2 株。见表 3。

表 2 75 株鲍曼不动杆菌科室分布

科室	株数(n)	构成比(%)
重症 ICU	31	41.33
神经外科	12	16.00
血液科	12	16.00
呼吸内科	13	17.33
骨科	4	5.33
胸外科	2	2.67
儿科	1	1.33

表 3 75 株鲍曼不动杆菌标本来源

标本类型	株数(n)	构成比(%)
痰液	43	57.33
分泌物	13	17.33
血液	12	16.00
尿液	5	6.67
脑脊液	2	2.67

表 4 75 株鲍曼不动杆菌药敏结果[n(%)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药
庆大霉素	13(17.33)	2(2.67)	60(80.00)
左氧氟沙星	9(12.00)	2(2.67)	64(75.33)
亚胺培南	6(8.00)	2(2.67)	67(85.33)
美罗培南	3(4.00)	1(1.33)	71(94.67)
头孢吡肟	0(0.00)	0(0.00)	75(100.00)
头孢他啶	0(0.00)	2(2.67)	73(97.33)
头孢泊肟	3(4.00)	1(1.33)	71(94.67)
头孢噻肟	2(2.67)	1(1.33)	72(96.00)
氨苄西林	6(8.00)	8(10.67)	61(81.33)
美洛西林	10(13.33)	6(8.00)	59(78.67)
哌拉西林	15(20.00)	7(9.33)	53(70.67)
四环素	6(8.00)	5(6.67)	64(85.33)
环丙沙星	6(8.00)	0(0.00)	69(92.00)
多黏菌素	65(86.67)	2(2.67)	13(17.33)
替加环素	47(62.67)	7(9.33)	21(28.00)
妥布霉素	25(33.33)	9(12.00)	41(53.33)

2.2 鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的敏感性 鲍曼不动杆菌

对16种临床常用抗菌药物的耐药情况如表4所示,耐药性从高到低依次为:头孢吡肟、头孢他啶、头孢噻肟、头孢泊肟、美罗培南、环丙沙星、美罗培南、四环素、氨苄西林、庆大霉素、美洛西林、左氧氟沙星、哌拉西林、妥布霉素、替加环素、多黏菌素。

2.3 PFGE分型结果 75株鲍曼不动杆菌有5种克隆型别,其中A型有4种亚型,B型有5种亚型,如图1所示。A型菌株所占比例最多为42.67%;B型次之为37.33%,C、D、E型菌株所占比例相对较少。见表5。

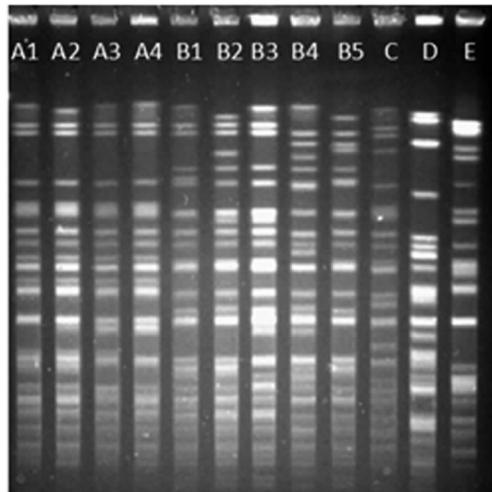


图1 鲍曼不动杆菌PFGE图谱

表5 75株鲍曼不动杆菌PFGE分型

PFGE分型	菌株数(n)	构成比(%)
A	32	42.67
B	28	37.33
C	7	9.33
D	5	6.67
E	3	4.00

表6 75株鲍曼不动杆菌耐药基因检测结果

酶	基因名称	阳性株数(n)	阳性率(%)
苯唑西林酶	OXA-23	61	81.33
	OXA-24	7	9.33
β -内酰胺酶	TEM	50	66.67
	SHV	8	10.67
	CTX-M	32	42.67
	IMP-1	20	26.67
金属酶	IMP-2	12	16.00
	VIM	0	0.00
	VIM-2	16	21.33

2.4 鲍曼不动杆菌耐药基因检测结果 75株鲍曼不动杆菌的基因检测见表6所示,每株鲍曼不动杆菌中至少有一种基因呈阳性表达,大部分菌株携带不止1个基因,结果如表6所示,苯唑西林酶中OXA-23基因阳性率为81.33%,OXA-24阳性率为9.33%; β -内酰胺酶中TEM阳性率为66.67%,SHV阳性率为10.67%,CTX-M阳性率为42.67%;金属酶中IMP-1基因阳性率为26.67%,IMP-2基因阳性率为16.00%,VIM-

2阳性率为21.33%,无菌株携带VIM基因。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌最早是从土壤中分离得到的,属于不动杆菌属细菌,其特点主要是革兰阴性、无动力、严格需氧、氧化酶阴性、触酶阳性。最早报道称该菌在自然界生物圈中普遍存在,随着研究的不断深入,发现不动杆菌属细菌并不是典型的环境微生物,而是与临床环境具有密切相关性。鲍曼不动杆菌大量寄居于病床栏杆、走廊扶手、病房座椅等病房环境中,并通过人员出入或手术器具的使用寄居于患者皮肤表面,进而对免疫力减退或处于较弱生理状态下的患者造成感染,其中重症监护病房的感染最为严重^[7]。肺炎是鲍曼不动杆菌感染人体后最为常见的症状,亦会伴随出现尿路感染、创伤、脑膜炎及菌血症等,在临幊上具有较高的感染率和致病率,是目前医院感染的重大威胁源之一^[8]。分子流行病学研究表明,鲍曼不动杆菌在世界范围内爆发流行。作为一种临幊致病菌,其致病率较高不仅与其生长繁殖能力、扩散能力、环境耐受等能力有关,还与其耐药性日益突出有关。本次研究的75株鲍曼不动杆菌的药敏结果显示,除妥布霉素、替加环素、多黏菌素外,菌株对其他13中抗菌药物均存在较高的耐药性,其中对头孢类和培南类抗菌药物的耐药性达到90%以上,且菌株存在多重耐药性,与国内外大多研究结果一致^[9-10]。本次研究结果同样显示鲍曼不动杆菌对多黏菌素的敏感性较高,耐药性仅为17.33%,与李玮等^[11]的研究结果一致,提示多黏菌素在临床鲍曼不动杆菌感染的治疗中仍是最有效的抗菌药物。

鲍曼不动杆菌的耐药机制主要有以下几点:(1)耐药酶如 β -内酰胺酶、苯唑西林水解酶、金属酶、AmpC酶的产生,能够分解抗菌药物或调节细胞内基因蛋白的合成感染抗菌药物发挥抗性;(2)菌株中膜孔蛋白的表达减少,膜通透性发生改变,抗菌药物进入下接受阻进而导致耐药;(3)菌体自身存在的抗菌药物结合位点发生改变,使得抗菌药物不能正常与菌株结合发挥药效;(4)产生氨基糖苷类修饰酶或16s rRNA甲基化酶,感染抗菌药物在机体中的正常调控;(5)DNA旋转酶的基因突变使得喹诺酮类抗菌药物无法调控该类酶发挥杀菌作用,产生耐药性^[12-13]。其中产生 β -内酰胺酶是鲍曼不动杆菌的主要耐药机制,该酶按照Ambler分类可分为:A类超广谱 β -内酰胺酶(SHV、TEM、CTX、PER等)、B类金属 β -内酰胺酶(IMP、VIM)、C类头孢菌素酶(AmpC)、D类苯唑西林酶(OXA-23、OXA-24、OXA-51等),其中A类主要以灭活头孢菌素和单环抗菌药物抗菌药物为特征,B类和D类主要介导碳青霉烯类抗菌药物的耐药性^[14-15]。结合本研究药敏结果,重点针对A、B、D类基因进行检测,结果显示75株菌株中携带TEM基因的菌株有50株,阳性率为66.67%,携带OXA-23基因的有61株,阳性率为81.33%,所占比例明显高于其他基因;杨燕等研究结果同样显示,该院分离的多重耐药鲍曼不动杆菌中OXA-23和TEM的携带率分别为72.73%、54.55%,是导致该院不动杆菌对 β -内酰胺酶类抗菌药物耐药的主要机制。

综上所述,鲍曼不动杆菌在本地区主要以A、B型为主,而OXA-23和TEM基因可能导致鲍曼不动杆菌耐药性的主要原因,在临床用药中应合理使用抗菌药物。目前尚缺乏有效灭活鲍曼不动杆菌的药物,医院应加强防控力度,最大限度减少鲍曼不动杆菌的感染。

参考文献

- [1] 邝咏云,周建明,高冬花.2010—2014年鲍(下转第79页)

研究报道^[8-9],孕妇摄碘不足或过量、家族史及部分环境致畸因子均为先天性甲减的高危因素,临床应予以充分的重视。在本研究中单纯高 TSH 患儿达 37 例,以 TSH 高于 10.00 mU/L 居多,TSH 由垂体产生,其生理功能主要调节甲状腺激素的分泌,新生儿存在较多单纯高 TSH 血症,这主要与新生儿下丘脑、垂体、甲状腺轴发育不完善相关,但其高 TSH 呈脉冲性、一过性,多受寒冷、饥饿等因素影响^[10],患儿多在 48 h 内恢复正常。

本研究对新生儿疾病筛查 TSH 切值的确立 3 种常用的方法进行了比较, P_{99} 百分位法与 ROC 曲线法召回率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 灵敏度均为 100.0%, 试剂盒虽然召回率有所降低, 但出现了漏诊, 灵敏度、特异度均不理想, 综合各评价指标 P_{99} 百分位法稍占优。新生儿疾病筛查 TSH 切值的合理建立为一长期的工作, 随着方法学的不断改进, 筛查人数的不断增多, TSH 切值需做出合适的调整。使之更科学、更规范的指导临床的新生儿疾病筛查工作。

参考文献

- [1] 邓耀明,宋兵文,杨白兰,等.株洲地区新生儿先天性甲状腺功能减低症筛查 TSH 切值的建立[J].中国优生与遗传杂志,2012,20(7):83-85.
- [2] 熊丰.新生儿先天性甲状腺功能减低症的诊断与治疗[J].实用儿科临床杂志,2012,27(8):642-644.
- [3] 周婧瑶,欧明才,罗晓菊,等.四川省新生儿 CH 筛查切值

(上接第 76 页)

- 曼不动杆菌 772 株的耐药性变迁[J].临床合理用药杂志,2016,9(4):92-93.
- [2] Ahmed MU, Farooq R, Al-Hawashim N, et al. Sensitive, resistant and multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* at Saudi Arabia hospital eastern region[J]. Pak J Pharm Sci, 2015, 28(3):825-832.
- [3] 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.
- [4] 曹芹芹,余连香,汪红萍.鲍曼不动杆菌医院感染的临床分布及耐药性研究[J].中国消毒学杂志,2015,32(2):144-145.
- [5] 杨沙沙,王喜仁,韩杰.美国 CLSI 抗菌药物敏感试验操作标准(2010 年版)部分变更内容[J].中国感染控制杂志,2010,9(4):303-304.
- [6] 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.
- [7] 赵剑,黎昆,李科,等.639 株鲍曼不动杆菌分布及耐药性分析[J].中国执业药师,2015,12(8):7-9.
- [8] 谭守勇,黎燕琼.重视鲍曼不动杆菌院内感染[J].广东医

的探讨[J].中国妇幼健康研究,2013,24(5):638-640.

- [4] 马庆祥.2011—2013 年某区新生儿疾病筛查情况分析研究[D].济南:山东大学,2015.
- [5] 张悠然.过去二十年中国减少新生儿死亡实践进程评价[D].合肥:安徽医科大学,2014.
- [6] 石祖亮,易松,刘旭,等.湖北省新生儿先天性甲状腺功能低下症 TSH 筛查切值的研究[J].中国优生与遗传杂志,2010,18(5):89-90.
- [7] 范歆,陈少科,林彩娟,等.广西先天性甲状腺功能减退症新生儿筛查分析及切值的探讨[J].中国儿童保健杂志,2012,20(3):248-250.
- [8] 赵妍,樊欣,甘文玲.重庆市 338 126 例新生儿先天性甲状腺功能低下症筛查结果分析与随访[J].中国妇幼保健,2014,29(3):417-419.
- [9] 刘鸿丽,李凤侠.2008-2012 年陕西省新生儿疾病筛查中心筛查结果分析[J].中国新生儿科杂志,2014,29(2):115-117.
- [10] Sun Q, Chen YL, Yu ZB, et al. Long-term consequences of the early treatment of children with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening in Nanjing, China: A 12-year follow-up study[J]. J Trop Pediatr, 2012, 58(1):79-80.

(收稿日期:2016-09-11 修回日期:2016-11-30)

学,2015,36(12):1797-1798.

- [9] 梁伟,邹明祥,邬靖敏,等.长沙地区临床分离碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌的分子流行病学特征[J].中南大学学报(医学版),2012,37(5):521-526.
- [10] 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.
- [11] 李玮,侯芳,彭浩,等.来自医院感染患者标本的鲍曼不动杆菌耐药性分析[J].山东医药,2015,55(31):39-41.
- [12] Kamolvit W, Sidjabat HE, Paterson DL. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance of *acinetobacter* spp. in Asia and oceania[J]. Microbial Drug Resistance, 2015, 21(4):424-434.
- [13] 刘青松,孙静娜,代丽丽,等.鲍曼不动杆菌的耐药机制研究进展[J].中国微生态学杂志,2015,27(1):108-111.
- [14] 李茜,李智,曲彦,等.对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌外膜蛋白表达及其分子流行病学的研究[J].中华危重病急救医学,2015,27(7):611-615.
- [15] 杨燕,肖慈然,邹玖明,等.多重耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺类耐药基因研究[J].中国感染控制杂志,2015,14(10):658-662.

(收稿日期:2016-08-01 修回日期:2016-10-21)