

• 论 著 •

医院内感染碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌的耐药基因及同源性分析

周云题¹, 姜 飞², 陆召军¹, 耿德勤¹, 刘 当¹

(1. 徐州医科大学, 江苏徐州 221002; 2. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221002)

摘 要:目的 分析引起院内感染的碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌(CRAB)耐药基因及同源性。方法 收集 CRAB 40 株, 采用琼脂稀释法检测最低抑菌浓度(MIC); PCR 检测主要的碳青霉烯酶基因, PCR 产物进行 DNA 测序分析; 肠杆菌科基因间重复一致性序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)对耐药菌株进行基因分型及同源性分析, 质粒接合试验探讨耐药基因的可传递性。结果 40 株 CRAB 仅对多黏菌素 B(100%)和头孢哌酮/舒巴坦保持良好的敏感性(57.5%), 对其他药物均产生不同程度耐药; 全部菌株均检测出 OXA-23 和 OXA-51 基因; 同源性分析显示, 按 80% 的聚类相似系数可将 40 株菌株分为 4 个型, A1 型为主要流行株(19 株), 且各科室存在交叉感染; 质粒接合试验未获成功。结论 该院存在 CRAB 的流行传播, 其耐药机制主要与 OXA-23 基因的表达有关; 在合理使用抗菌药物的同时, 应做好隔离及防护措施, 尽量避免医院内交叉感染。

关键词:鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯类; 医院内感染; OXA-23 基因; 同源性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.020 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)15-2105-03

Analysis on drug-resistant genes and homology in nosocomial infection of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

ZHOU Yunti¹, JIANG Fei², LU Zhaojun¹, GENG Deqin¹, LIU Dang¹

(1. Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: **Objective** To analyze the drug resistance genes and homology in nosocomial infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*(CRAB). **Methods** Forty strains of CRAB were collected and the minimal inhibitory concentration(MIC) was detected by the agar dilution method. The main carbapenemase genes were detected by PCR. The PCR products were performed the DNA sequencing. The enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-polymerase chain reaction(PCR) was performed to analyze the genotypes and homology of these strains. The plasmid conjugation experiment was carried out to investigate the transmission of resistant genes. **Results** Forty strains of CRAB maintained the good sensitivity only to polymyxin B (100%) and cefoperazone/sulbactam(57.5%). All of them had different degrees of resistance to other drugs. The OXA-23 and OXA-51 genes were detected by PCR amplified in all of the CRAB strains. The homology analysis showed that the strains could be divided into 4 types according to 80% of cluster similarity coefficient, the type A1 (19 strains) was the major epidemic strain, moreover the various departments had cross infection; the plasmid conjugation experiment failed. **Conclusion** There is an endemic spread of CRAB in our hospital and its resistant mechanism is mainly related with OXA-23 gene expression; in the rational antibiotics use at the same time, the isolation and prevention measures should be done well for avoiding the hospital cross infection.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; carbapenem; nosocomial infection; OXA-23 gene; homology

2012 年以来,徐州医科大学附属医院临床分离的鲍曼不动杆菌耐药性不断上升,特别是对碳青霉烯类药物耐药现象逐渐加重,部分菌株呈现出多重耐药甚至泛耐药现象,给临床治疗带来极大的困扰。近期,临床微生物室所分离出的鲍曼不动杆菌的药敏谱极度相似,耐药菌株主要来源于重症监护病房(ICU),并存在院内多个科室的交叉感染现象,怀疑这些菌株为同一克隆株。本研究拟对临床分离的 40 株碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌(CRAB)的耐药基因及同源性进行分析,以期了解该院 CRAB 的耐药基因携带状况以及是否存在克隆流行,为临床控制耐药菌株的产生和播散提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 40 株 CRAB 为 2014 年 6~10 月临床分离的非重复菌株,筛选标准为对亚胺培南和(或)美罗培南的最小抑菌浓度(MIC)≥4 mg/L。所有分离菌株经美国 BD 公司 Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏分析仪鉴定。质控菌株为大肠埃希菌(ATCC25922)和铜绿假单胞菌(ATCC27853),购自原卫

生部临床检验中心,接合试验受体菌为 *E. coli* 600(利福平耐药),由北京武警总医院胡红焱老师惠赠。

1.2 主要仪器与试剂 Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏分析仪(美国 BD 公司),PCR 扩增仪 ABI2720(美国 ABI 公司),DYY-8C 型电泳仪(北京六一仪器厂),Bioshine GelX1850 凝胶成像分析系统(上海欧翔科学仪器公司),PCR Master Mix 试剂盒(北京百泰克公司),M-H 琼脂(英国 Oxoid 公司);用于 MIC 试验的药物:氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦(珠海联邦公司)、头孢他啶(海南海灵公司)、环丙沙星(广州南新公司)、亚胺培南(默沙东公司)、美罗培南(深圳海滨公司)、庆大霉素(辰欣药业公司)、阿米卡星(齐鲁制药公司)、头孢吡肟(深圳立健公司)、头孢曲松(台湾泛生公司)。

1.3 药敏试验 分离菌株经美国 BD 公司 Phoenix-100 全自动细菌鉴定药敏分析仪检测后,采用琼脂稀释法检测抗菌药物 MIC 值,具体参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐的方法执行^[1]。

1.4 碳青霉烯酶基因检测 煮沸法提取细菌 DNA。PCR 扩增 8 种碳青霉烯酶基因,目的基因引物序列和片段长度见表 1。引物参照文献[2]设计,由上海捷瑞生物公司合成。反应体系共 50 μ L,包括 2 \times PCR Master Mix 25 μ L,10 μ mol/L 的上、下游引物各 3 μ L,灭菌双蒸水 14 μ L,DNA 模板液 5 μ L。反应

参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,经 35 个循环,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延长至 7 min。产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶成像分析系统进行分析,阳性条带送上海捷瑞公司测序。

表 1 目的基因 PCR 引物序列

目的基因	引物序列(5′至 3′)	大小(bp)
KPC	P1:TGT CAC TGT ATC GCC GTC	882
	P2:CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC	
IMP	P1:CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	587
	P2:AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	
VIM	P1:AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	633
	P2:ATG AAA GTG CGT GGA GAC	
NDM-1	P1:ATG GAA TTG CCC AAT ATT, ATG CAC CCG	813
	P2:TCA GCG CAG CTT GTC GGC CAT GCG	
OXA-23	P1:ATG AAT AAA TAT TTT ACT TGC TAT GTG	822
	P2:TTA AAT AAT ATT CAG CTG TTT TAA TGA	
OXA-24	P1:CAA GAG CTT GCA AGA CGG ACT	420
	P2:TCC AAG ATT TTC TAG CRA CTT ATA	
OXA-51	P1:TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG	353
	P2:TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	
OXA-58	P1:TCG ATC AGA ATG TTC AAG CGC	530
	P2:ACG ATT CTC CCC TCT GCG C	

1.5 染色体 DNA 同源性分析 重复一致性序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)分析耐药菌株同源性,参考文献[3],扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,40 $^{\circ}$ C 1 min,65 $^{\circ}$ C 8 min,30 个循环,最后一个循环 65 $^{\circ}$ C 16 min,产物经 1.5% 的琼脂糖电泳后,用凝胶成像分析仪成像分析。

1.6 同源性的判断 根据电泳指纹图谱进行菌株同源性分析,将每个条带转换成二进制数据,“1”代表有,“0”代表无。利用 NTSYS 软件,采用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析并构建树状图。判断标准:聚类相似系数 \geq 80%者为同一型别,若条带大小和位置不同者为同一型别不同亚型; $<$ 80%者为不同型别。

1.7 质粒接合试验 挑取供、受体菌单个菌落接种于 2 mL 新鲜 LB 肉汤中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h,各吸取供、受体菌菌液 0.5 mL 加到 1.5 mL U 型管中,37 $^{\circ}$ C 静置培养 4 h,吸取混合菌液 100 μ L 均匀涂布于含美罗培南(1 mg/L)和利福平(128 mg/L)的 M-H 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 14 h,对生长出的菌落进行生化鉴定和药敏试验。

2 结 果

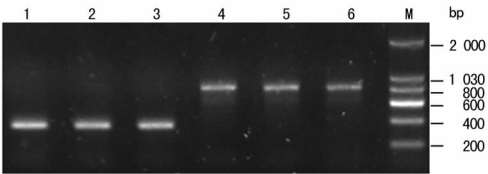
2.1 药敏试验 40 株 CRAB 仅对多黏菌素 B(100%)和头孢哌酮/舒巴坦(57.5%)保持较好的敏感性,对碳青霉烯类抗菌药物耐药的菌株,绝大多数对其他抗菌药物也耐药。药敏结果见表 2。

2.2 耐药基因检测 40 株 CRAB 全部扩增出 OXA-23、OXA-51 基因,未扩增出其他基因。随机选择 PCR 阳性产物进行测序,测序结果经 BLAST 比对,OXA-23、OXA-51 与

GenBank 相关基因同源性均为 100%。见图 1。

表 2 40 株 CRAB 药敏试验结果(mg/L)

抗生素	MIC ₅₀	MIC ₉₀	耐药率(%)	MIC 范围
头孢吡肟	64	128	100	32~512
哌拉西林/他唑巴坦	256	256	100	128~512
头孢哌酮/舒巴坦	32/16	128/64	42.5	8/4~128/64
氮苄西林/舒巴坦	64/32	256/128	100	16/8~256/128
庆大霉素	128	256	100	32~256
阿米卡星	32	64	80	32~64
环丙沙星	128	512	100	64~512
亚胺培南	32	128	100	32~256
美罗培南	64	256	100	32~256
多黏菌素 B	0.5	0.5	0	0.5~1



注:1~3 为 OXA-51 基因;4~6 为 OXA-23 基因;M 为 DNA 分子标志物。

图 1 OXA-51、OXA-23 基因 PCR 产物电泳结果

2.3 染色体 DNA 同源性分析结果 ERIC-PCR 同源性分析显示,按照 80% 的聚类相似系数,40 株 CRAB 可分为 A、B、C、D 4 型,除 D 型外,A、B、C 型中均包含不同亚型,其中 A1 型为主要流行株,共 19 株,且存在 ICU、神经内科、神经外科、呼吸内科、内分泌科等多个科室,有交叉感染现象。40 株 CRAB 主要分离自痰液标本,ICU 病区存在多种克隆菌株的混合感染,成为医院内感染的主要科室。

2.4 质粒接合试验结果 将 OXA-23 阳性菌株进行质粒接合试验,结果美罗培南和利福平的双抗平板均未见菌落生长,显示本组检测出的 OXA-23 基因不能通过质粒接合转移给受体菌。

3 讨论

碳青霉烯酶耐药鲍曼不动杆菌克隆株的传播是造成中国医院感染鲍曼不动杆菌增加的重要原因^[4]。据该院微生物室统计资料显示,2013 年鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率达到近 70%,且耐药菌株临床分离率不断上升。本研究分离的 40 株 CRAB 中绝大多数分离自 ICU 患者的痰液标本,这说明 CRAB 主要引起呼吸系统感染,这可能与 ICU 患者疾病严重,免疫力低下,长期使用广谱抗生素及接受各种机械治疗,进而发生感染概率增加有关。药敏结果显示,本组 CRAB 的药敏谱极度相似,仅对多黏菌素 B 和头孢哌酮/舒巴坦有较好的敏感性,其在对碳青霉烯类抗生素耐药的同时,对其他类抗生素也存在高水平耐药,从而呈现出多重耐药甚至泛耐药现象。因此,探究其耐药机制对于指导临床合理用药、控制由耐药菌株播散引起的院内感染有重要意义。

产碳青霉烯酶是革兰阴性杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制。在鲍曼不动杆菌中,碳青霉烯酶主要是 B 类酶(金属酶)和 D 类酶(苯唑西林酶)^[5-8]。本研究 40 株 CRAB 经 PCR 检测全部扩增出 OXA-51 和 OXA-23 两种 D 类碳青霉烯酶基因,未发现 B 类碳青霉烯酶基因。OXA-51 基因被认为是鲍曼不动杆菌染色体携带的天然基因^[9]。因此,该院鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类抗菌药物机制主要由 OXA-23 基因表达碳青霉烯酶所致。本研究 CRAB 中 OXA-23 基因的检出率为 100%,高于国内其他研究的报道^[10-11],说明不同地区不同医院耐药基因的检出率存在一定的差别,这可能与各地区各医院的用药习惯以及抗生素使用的监控程度不同有关。ERIC-PCR 同源性分析显示,40 株 CRAB 可分为 A、B、C、D4 型,A、B、C 均出现亚型,D 型为散在流行株。其中 A1 型克隆株达 19 株,来源于 ICU、呼吸内科等多个科室,说明其在该院存在多个科室的交叉感染。选取携带 OXA-23 基因的耐药菌株进行质粒接合试验,阴性结果未能证明该基因可通过接合性质粒进行传播,分析其可能并非定位于接合性质粒上,引起的传播流行可能是耐药菌株的传播而非耐药基因的传播。

研究表明该院存在 CRAB 流行株的院内交叉感染,其耐药机制主要为产 OXA-23 型碳青霉烯酶。控制和防止 CRAB 在院内交叉感染甚至暴发流行,需要医院感染管理部门、临床医生和临床微生物工作者的共同努力,除了合理使用抗生素之

外,做好隔离及防护措施,建立健全临床分离菌株的耐药性监测亦是必不可少的重要举措。

参考文献

- [1] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; MS23-M100[S]. Wayne, PA; CLSI, 2013.
- [2] 王春新,耿先龙,许亚丰,等. 泛耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺类耐药机制研究[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(5): 329-334.
- [3] 陈轶坚,胡付品,黄海辉,等. 耐碳青霉烯类抗生素不动杆菌属的同源性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(2): 110-112.
- [4] Zhou H, Yang Q, Yu YS, et al. Clonal spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* among different cities of China [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 4054-4057.
- [5] Khorsi K, Messai Y, Hamidi M, et al. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like and blaNDM-1 in Algiers hospitals [J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(6): 438-446.
- [6] Cicek AC, Saral A, Iraz M, et al. OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(5): 410-415.
- [7] Jones LS, Toleman MA, Weeks JL, et al. Plasmid carriage of bla NDM-1 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates from India [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(7): 4211-4213.
- [8] Zhang R, Hu YY, Yang XF, et al. Emergence of NDM-producing non-baumannii *Acinetobacter* spp. isolated from China [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(5): 853-860.
- [9] Turton JF, Woodford N, Glover J, et al. Identification of *acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2974-2976.
- [10] 邢丽丹,糜祖煌,徐鑫鑫,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌中 β -内酰胺酶基因的检测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(1): 54-57.
- [11] 毛璞,邱桂霞,叶丹,等. 重症监护病房碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌耐药机制及同源性分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(6): 449-452.