

• 短篇论著 •

哈尔滨地区产 ESBLs 鲍曼不动杆菌流行病学和耐药基因研究*

高春波, 苏丽菊, 柴 森, 张 萌, 郑力辉
(哈尔滨市第一医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150010)

摘 要:目的 对哈尔滨地区临床分离的产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)鲍曼不动杆菌流行情况及其耐药基因进行研究,以指导临床抗感染治疗,预防和控制该地区耐药菌株的产生及传播。方法 收集哈尔滨地区临床分离的鲍曼不动杆菌共 190 株。采用 K-B 纸片扩散法测定 190 株鲍曼不动杆菌对 14 种抗菌药物的耐药情况,同时,筛选出产 ESBLs 的鲍曼不动杆菌菌株。采用聚合酶链反应(PCR)扩增主要的 ESBLs 编码基因,包括 PER-1、SHV-1、TEM-1、VEB、CTX-M、OXA-23 基因型。通过 Gen Bank 进行基因型的序列比对分析。应用脉冲场凝胶电泳分析产 ESBLs 的鲍曼不动杆菌菌株同源性。结果 190 株鲍曼不动杆菌中,对米诺环素、替加环素、头孢哌酮/舒巴坦敏感率最高,分别为 95.3%、93.2%、56.8%。耐药率高于 70.0%的抗菌药物为头孢他啶和派拉西林,其余药物耐药率均高于 50.0%。190 株鲍曼不动杆菌中筛选出产 ESBLs 菌株共 58 株,检出率为 30.5%。PCR 分析结果显示,PER-1 基因型 26 株,TEM-1 基因型 23 株,SHV-1 基因型 1 株,OXA-23 基因型 24 株,其中 37.0%同时携带 PER、TEM、OXA-23 3 种基因型。其余基因型检测结果为阴性。脉冲场凝胶电泳(PFGE)结果显示,58 株产 ESBLs 鲍曼不动杆菌通过 PFGE 分型分为 A、B、C、D、E 型。来自哈尔滨市第一医院的 39 株产 ESBLs 鲍曼不动杆菌菌株分为 A、B、C 型,以 A 型为主,为 35 株,其中 A1 亚型有 27 株,A2 亚型有 5 株,A3 亚型有 3 株;B 型有 3 株;C 型有 1 株。哈尔滨医科大学附属第四医院的 19 株产 ESBLs 鲍曼不动杆菌中,5 株与哈尔滨市第一医院 A1 条带一致;12 株为 D 型,其中 D1 亚型 9 株,D2 亚型 3 株;2 株为 E 型。结论 哈尔滨地区鲍曼不动杆菌耐药情况严重。鲍曼不动杆菌菌株产 ESBLs 酶是耐 β -内酰胺类抗菌药物的主要原因。哈尔滨地区鲍曼不动杆菌流行株存在医院之间交叉感染现象。

关键词:鲍曼不动杆菌; 耐药性; 超广谱 β -内酰胺酶; 脉冲场凝胶电泳

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.025

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2019)05-0605-03

文献标识码:B

鲍曼不动杆菌是引起院内感染的重要条件致病菌^[1],可导致呼吸道感染、败血症、泌尿系感染、脑膜炎、腹膜炎等^[2-5]。近年来,随着抗菌药物的广泛应用和不合理使用,鲍曼不动杆菌对几乎各类化学结构的临床常用抗菌药物呈现高度的天然固有耐药性和获得性耐药性,多重耐药的鲍曼不动杆菌已成为医院感染的重要病原菌^[6]。鲍曼不动杆菌耐药机制非常复杂,其中产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)是主要耐药机制之一^[7]。产 ESBLs 可导致对青霉素类、1~3 代头孢菌素、单环酰胺类药物耐药,部分还可水解第 4 代头孢菌素,给临床抗感染治疗带来了严峻挑战^[8]。因此,本研究探讨哈尔滨地区的产 ESBLs 鲍曼不动杆菌流行情况及基因型,旨在控制其传播并为该类抗菌药物的合理使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2017 年 4—7 月哈尔滨地区 2 家综合性三甲医院(哈尔滨市第一医院和哈尔滨医

科大学附属第四医院)临床分离的鲍曼不动杆菌共 190 株。标本来自血液、痰液、肺泡灌洗液、分泌物等,剔除同一患者同一部位重复分离菌株。采用 VITEK-2 细菌鉴定分析仪进行鉴定。

1.1.2 主要试剂 药敏纸片:氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、阿米卡星、环丙沙星、亚胺培南、美罗培南、米诺环素、替加环素、复方磺胺甲噁唑、庆大霉素均购自英国 Oxoid 公司。血琼脂培养基、MH 培养基均购自郑州安图生物有限公司,聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自 Takara 大连宝生物工程有限公司,引物由上海生物工程公司合成。脉冲场级琼脂糖购自美国 Bio-Rad 公司,溴乙锭购自上海 Sangon 公司,PMSF 购自 Merk 公司。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验及 ESBLs 菌株筛选 采用 K-B 纸片扩散法测定鲍曼不动杆菌对以上 14 种抗菌药物的敏感性并进行 ESBLs 菌株筛选。质控菌株为大肠埃

* 基金项目:科技部 863 计划资助项目(2015AA021107)。

本文引用格式:高春波,苏丽菊,柴森,等.哈尔滨地区产 ESBLs 鲍曼不动杆菌流行病学和耐药基因研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(5):.605-607

希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853,购自国家卫生健康委员会临床检验中心。结果参照美国临床实验室标准化委员会(CLSL)2017 年版标准进行判读。

1.2.2 基因检测 采用 PCR 法扩增主要的 ESBLs 编码基因,包括 PER-1、SHV-1、TEM-1、VEB、CTX-M、OXA-23 基因型。引物设计参考文献报道^[9],反应总体积为 25.0 μ L,包括 0.2 μ L Taq 酶 5 U/ μ L,含 MgCl₂ 的 2.5 μ L 10 $\times$ 缓冲液,2.5 μ L dNTP,上下游引物各 1.0 μ L,3.0 μ L DNA 模板,14.8 μ L ddH₂O。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。PCR 产物测序由上海生工有限公司完成。测序结果在 Gen Bank 网上进行序列比对。

1.2.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析菌株同源性

1.2.3.1 制备染色体 DNA 将菌株配至 4 麦氏浓度菌悬液,取 2 mL 菌悬液 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,取 300 μ L 细菌悬浊液于 1.5 mL eppendorf 管中,平衡至 50 $^{\circ}$ C;加入 50 $^{\circ}$ C 等体积 2% Clean-cut 琼脂糖凝胶,充分混匀并迅速灌注模具,4 $^{\circ}$ C 冰箱中凝固 20 min。将胶块置于离心管中,加入溶菌酶液,37 $^{\circ}$ C 水浴箱孵育 2 h,吸出溶菌酶液,无菌水清洗胶块 2 次,然后加入蛋白酶 K 液(终浓度 0.8 mg/mL),50 $^{\circ}$ C 水浴箱中孵育 24 h。清洗胶块,吸掉蛋白酶 K 液,加 1 $\times$ TE 缓冲液 1 mL,室温下轻轻振荡 30 min。吸出清洗液,加入 1 mL 酶终止液(PMSF,浓度为 1 mmol/L)灭活剩余的蛋白酶 K,室温下轻轻振荡 30 min。再加 TE 液重复清洗 3 次,每次 30 min,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3.2 细菌 DNA 限制性酶切 加入 40 U 限制性内切酶 Apa I、10 $\times$ 内切酶切缓冲液、0.1%牛血清白蛋白(BSA)12 μ L,加入去离子水至 120 mL,37 $^{\circ}$ C 水浴箱中孵育过夜。

1.2.3.3 加样和电泳 用 0.5 $\times$ TBE 缓冲液配制 1% 的 PFGE 级琼脂糖胶,在电泳槽中加入 2 L TBE 缓冲液,将消化好的细菌胶块小心放入梳孔中,在空隙处加入融化的琼脂糖凝胶进行密封。电泳条件为 14 $^{\circ}$ C,电场强度 6 V/cm,脉冲角 120 度,脉冲时间 15 s,电泳时间 20 h。电泳结束后,用 0.25 mg/L 的 EB 染色液染色 30 min,蒸馏水清洗 30 min,最后对结果进行图像采集。

1.2.3.4 PFGE 结果判定 PFGE 分子分型依据美国疾病控制和预防中心(CDC)TENOVER 等^[9]推荐的方法判读。图谱完全相同的定义为一个型,彼此之间相差一个带的定为同一型的不同亚型,相差 2~3 个带的认为亲缘关系密切,相差 4~6 个带的认为可能相关,条带相差 7 个及以下的认为无亲缘关系。并随机选择不同的字母如 A、B、C、D 等的字母顺序分型。

1.3 统计学处理 采用 WHONET5.6 软件统计,应

用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数和率表示,组间率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鲍曼不动杆菌的耐药性分析 190 株鲍曼不动杆菌中,对米诺环素、替加环素、头孢哌酮/舒巴坦敏感率最高,分别为 95.3%、93.2%、56.8%。耐药率高于 70.0% 的抗菌药物为头孢他啶和派拉西林,其余药物耐药率均高于 50.0%。见表 1。

表 1 190 株鲍曼不动杆菌对 14 种抗菌药的药敏结果(%)

抗菌药物	耐药率	中介率	敏感率
氨苄西林/舒巴坦	50.5	8.4	41.1
头孢他啶	70.8	7.1	22.1
亚胺培南	51.6	11.6	36.8
美罗培南	50.0	3.2	46.8
环丙沙星	67.4	0.5	32.1
头孢吡肟	59.5	4.2	36.3
哌拉西林/他唑巴坦	63.7	3.1	33.2
庆大霉素	61.6	17.3	21.1
头孢哌酮/舒巴坦	23.2	20.0	56.8
复方磺胺甲噁唑	55.3	0.0	44.7
阿米卡星	52.6	1.1	46.3
米诺环素	2.6	2.1	95.3
替加环素	6.8	0.0	93.2
哌拉西林	71.2	6.5	22.3

2.2 产 ESBLs 鲍曼不动杆菌的基因型 190 株鲍曼不动杆菌中筛选出产 ESBLs 菌株共 58 株,检出率为 30.5%,PCR 分析结果显示 PER-1 基因型 26 株,TEM-1 基因型 23 株,SHV-1 基因型 1 株,OXA-23 基因型 24 株,其中 37.0% 同时携带 PER-1、TEM-1、OXA-23 这 3 种基因型。其余基因型检测结果为阴性。

2.3 PFGE 同源性分析 通过分析 PFGE 电泳图谱,58 株产 ESBLs 鲍曼不动杆菌主要分为 5 型,分别用 A、B、C、D、E 表示,来自哈尔滨市第一医院的 39 株产 ESBLs 鲍曼不动杆菌菌株分为 A、B、C 型,以 A 型为主,为 35 株,其中 A1 亚型有 27 株,A2 亚型有 5 株,A3 亚型有 3 株;B 型有 3 株;C 型有 1 株。哈尔滨医科大学附属第四医院的 19 株产 ESBLs 鲍曼不动杆菌中,5 株与哈尔滨市第一医院 A1 条带一致;12 株为 D 型,其中 D1 亚型 9 株,D2 亚型 3 株;2 株为 E 型。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌为非发酵革兰阴性杆菌,该菌在医院的环境中分布很广且可长期存活,对危重患者威胁很大,可引起全身系统各个器官的感染,是引起院内感染高发病率和病死率的重要原因^[10]。近年来,由于抗菌药物的广泛应用和抗菌药物的滥用,多重耐药性鲍曼不动杆菌日益严峻,尤其是 ESBLs 介导的 β -内酰胺类抗菌药物耐药,给临床治疗带来极大困难^[11]。

本研究中,在分离的 190 株鲍曼不动杆菌中,对米诺环素、替加环素、头孢哌酮/舒巴坦敏感率最高,分别为 95.3%、93.2%、56.8%。耐药率高于 70.0% 的抗菌药物为头孢他啶和派拉西林,其余药物耐药率均高于 50.0%,耐药情况比较严重。

近年来,鲍曼不动杆菌院内感染和耐药性已成为全球性防治难题^[12]。研究表明,随着广谱 β -内酰胺类抗菌药物在临床的广泛应用和抗菌药物使用模式的不同,近年来,又出现了许多新的 β -内酰胺类耐药基因型,且因地域不同,特点也不尽相同^[13-15]。本研究发现,本地区鲍曼不动杆菌中 ESBLs 基因检出率为 30.5% (58 株),其中,以 PER-1 基因型为主,检出 26 株,证实 PER-1 型在本地区为流行株。37.0% 同时携带 PER、TEM、OXA-23 基因型。

PFGE 技术是近年来发展起来的一种重要的分离大分子量线性 DNA 的电泳技术^[16]。在普通的凝胶电泳中,大的 DNA 分子(>10 kb)移动速度接近,很难分离形成足以区分的条带,PFGE 的发明正好解决了这一难题,它可以用来分离大小从 10 kb 到 10 Mb 的 DNA 分子,具有高分辨力、重复性好的优点,使 PFGE 的应用范围已涉及到几乎所有生物基因组结构的研究,并被誉为细菌分子学分型技术的“金标准”^[17]。本研究采用 PFGE 技术对本地区产 ESBLs 鲍曼不动杆菌进行流行病学分析。通过分析 PFGE 电泳图谱,58 株产 ESBLs 鲍曼不动杆菌主要分为 5 个克隆株,A1 型为主要克隆株,在医院内、医院间传播,成为本地区鲍曼不动杆菌不断增加,耐药率不断上升的原因。因此,加强对鲍曼不动杆菌耐药监测,及时发现和隔离,规范抗菌药物的使用和管理,做好院内感染,有效预防和控制本地区耐药菌株的产生及传播,具有很重要的意义和价值。

综上所述,哈尔滨地区鲍曼不动杆菌耐药情况严重。鲍曼不动杆菌菌株产 ESBLs 酶是耐 β -内酰胺类抗菌药物的主要原因。产 ESBLs 鲍曼不动杆菌以 PER-1 基因型为主,本地区鲍曼不动杆菌流行株存在医院之间交叉感染现象。

参考文献

- [1] YEOM J K, SHIN J H, YANG J Y, et al. 1H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in acinetobacter baumannii [J]. PLoS One, 2013, 8 (3): 1656-1652.
- [2] KARAGEORGOPOULOS DE, KELESIDIS T, KELESIDIS I. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) Acinetobacter infections: a review of the scientific evidence [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62 (1): 45-55.
- [3] NOORI M, KARIMI A, FALLAH F, et al. Prevalence of bla NDM, bla PER, bla VEB, bla IMP, and bla VIM genes among acinetobacter baumannii isolated from two hospi-

- tals of Tehran [J]. Scientifica, 2014, 2014: 245162.
- [4] SAFARI M, SAIDIJAM M, BAHADOR A, Et al. High prevalence of multidrug resistance and metallo-beta-lactamase (MBL) producing Acinetobacter baumannii isolated from patients in ICU wards, Hamadan, Iran [J]. J Res Health Sci, 2013, 13 (2): 162-167.
- [5] 庞菲, 郑光敏, 李玮, 等. 鲍曼不动杆菌院内感染调查及耐药性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36 (10): 1408-1409.
- [6] PEREZ F, HUJER A M, HUJER K M, et al. Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51 (10): 3471-3484.
- [7] 吴倩, 蒋敏, 赵清. 多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药机制研究 [J]. 重庆医学, 2015, 44 (21): 2961-2965.
- [8] NOWAK P, PALUCHOWSKA P. Acinetobacter baumannii: biology and drug resistance role of carbapenemases [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2016, 54 (2): 61-74.
- [9] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, 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.
- [10] GIANNOULI M, ANTUNES L C, MARCHETTI V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 2013, 33 (9): 2233-2239.
- [11] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16 (6): 685-694.
- [12] ANTUNES L C, VISCA P, TOWNER K J. Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen [J]. Pathog Dis, 2014, 71 (3): 292-301.
- [13] 闫中强, 沈定霞, 罗燕萍, 等. 多重 PCR 方法检测多耐药鲍曼不动杆菌基因型 [J]. 临床检验杂志, 2008, 26 (6): 422-424.
- [14] 汤凤珍, 张伟红, 陈惠玲. 碳青霉烯类抗菌药物耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 39 (5): 354-356.
- [15] 许亚丰, 耿先龙, 王春新, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺酶、膜孔蛋白及 β -内酰胺类靶位编码基因研究 [J]. 中国抗菌药物杂志, 2014, 39 (1): 58-64.
- [16] PERRETEN V, KADLEC K, SCHWARZ S, et al. Clonal spread of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius in Europe and North America: an international multicentre study [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65 (6): 1145-1154.
- [17] HIGUCHI W, MIMURA S, KUROSAWA Y, et al. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 clone in a Japanese child, demonstrating multiple divergent strains in Japan [J]. J Infect Chemother, 2010, 16 (4): 292-297.