

• 论 著 •

# 86 株鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因分析及同源性研究\*

刘建华, 李 锐, 钱树坤, 高 媛

首都医科大学附属北京康复医院检验科, 北京 100144

**摘 要:**目的 分析北京康复医院住院患者分离的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的分布特点、耐药性及同源性。方法 收集 2017 年 12 月至 2018 年 12 月北京康复医院临床感染病例中非重复分离的 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌, 采用 Phoenix BD 100 进行菌株鉴定和药敏试验。采用基因组重测序技术检测其携带的耐药相关基因并进行进化树分析, 采用多位点序列分型分析菌株间的同源性。结果 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌均表现为多重耐药。共检出 17 种耐药基因, 全部菌株均携带 OXA-23 型碳青霉烯酶耐药基因; 检出多种  $\beta$  内酰胺酶基因、外排泵相关基因、抗菌药物修饰酶基因等。多位点序列分型得到 15 种 ST 型, 同源性分析提示部分菌株间存在较近亲缘关系。结论 北京康复医院鲍曼不动杆菌耐药情况严重, OXA-23 为主要耐药基因型, 菌株之间存在同源相关性, 应加强医院感染防控。

**关键词:** 鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯酶; 耐药基因; 同源性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.03.011

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2021)03-0301-04

文献标志码: A

## Analysis and homology of carbapenemase resistance genes in 86 strains of *Acinetobacter baumannii*\*

LIU Jianhua, LI Rui, QIAN Shukun, GAO Yuan

Department of Clinical Laboratory, Beijing Rehabilitation Hospital of Capital Medical University, Beijing 100144, China

**Abstract:** **Objective** To analyze the distribution, drug resistance and homology of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from inpatients in Beijing rehabilitation hospital. **Methods** Eighty-six strains of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical infection cases in Beijing Rehabilitation Hospital from December 2017 to December 2019 were collected. Phoenix BD 100 was used for strain identification and drug sensitivity test. The drug resistance genes were analysed by bacterial whole-genome re-sequencing, the homology was investigated by multi-locus sequence typing method. **Results** All 86 carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* strains showed multi-drug resistance. A total of 17 drug-resistant genes were detected, all of them carried OXA-23 carbapenemase resistance genes, and a variety of  $\beta$ -lactamase genes, efflux pump related genes, antimicrobial modifying enzyme genes and so on. Fifteen ST types were obtained by multi locus sequence typing, homology analysis indicated that some strains were closely related. **Conclusion** The drug resistance of *Acinetobacter baumannii* in Beijing rehabilitation hospital is serious, OXA-23 is the main drug-resistant genotype, there is homologous correlation between strains, it is necessary to strengthen the prevention and control of nosocomial infection.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; carbapenemase; drug resistance gene; homology

鲍曼不动杆菌是非发酵需氧革兰阴性杆菌, 分布广泛, 是引起院内感染的重要病原菌之一, 尤其对于老年患者、接受侵入性医疗操作患者及使用广谱抗菌药物治疗患者, 可引起呼吸道、泌尿道、血液、伤口等

感染<sup>[1-4]</sup>。随着碳青霉烯类抗菌药物在临床上的广泛应用, 近年来鲍曼不动杆菌对其耐药率不断上升, 在院内甚至地区间存在播散, 为医院感染防控带来挑战。本研究收集北京康复医院住院患者临床分离的

\* 基金项目: 首都医科大学附属北京康复医院院内课题(2017-029)。

作者简介: 刘建华, 女, 主任技师, 主要从事临床微生物学研究。

本文引用格式: 刘建华, 李锐, 钱树坤, 等. 86 株鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因分析及同源性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42

耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 86 株,采用基因组重测序技术对其所携带的耐药基因及同源性进行分析,为鲍曼不动杆菌的治疗及防控提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 选取 2017 年 12 月至 2018 年 12 月北京康复医院住院患者临床感染病例中分离到的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 86 株,剔除同一患者因长期住院分离的重复菌株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853。86 例患者年龄 18~104 岁;男 66 例(76.7%),女 20 例(23.3%);>60 岁者 56 例,占 65.1%。

**1.2 仪器与试剂** Bact/ALERT 3D 全自动血培养仪及配套血培养瓶,BD Phoenix 100 全自动微生物鉴定仪。血琼脂平板、麦康凯琼脂平板购自郑州安图生物工程股份有限公司。菌种保存管购自天津金章科技发展有限公司。细菌基因组重测序委托杭州联川生物技术股份有限公司完成。

### 1.3 方法

**1.3.1 细菌分离培养与药敏鉴定试验** 严格按照《全国临床检验操作规程》第 4 版<sup>[5]</sup>进行标本采集和培养,采用 BD Phoenix 100 全自动微生物鉴定仪进行菌株鉴定和药敏试验,依据 CLSI M100 文件进行药敏结果判定。使用菌种保存管收集菌株,于-80℃冰箱保存。

**1.3.2 耐药基因及同源性检测** 委托杭州联川生物技术股份有限公司进行耐药基因及同源性检测。采用基因组重测序技术检测其携带的耐药相关基因并进行进化树分析。多位点序列分型分析菌株间的同源性。同时,进行 eBURST 比对分析。

**1.4 统计学处理** 应用 WHONET5.6 统计软件对所有数据进行分析处理。计数资料采用例数和率进行统计描述。

## 2 结果

**2.1 菌株来源分析** 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌标本来源主要以痰液标本为主(66 株,76.7%),其次为尿液标本(18 株,20.9%),分泌物和脑脊液标本各 1 株,分别占 1.16%。86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌主要来自神经康复中心(33 株,38.4%)、老年康复中心(27 株,31.4%)、心脏康复中心(13 株,15.1%),其余科室检出较少。

**2.2 药敏试验结果分析** 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌均表现为多重耐药。对亚胺培南和美罗培南全部耐药;对头孢菌素类、氟喹诺酮类、哌拉西林及哌拉西林/他唑巴坦、四环素等药物耐药率均在 95%以上;氨基糖苷类抗菌药物中,对阿米卡星耐药率为 79.1%,较庆大霉素(86.0%)稍低;对复方磺胺甲噁唑耐药率为 75.6%;对多黏菌素 B 均表现为敏感。见

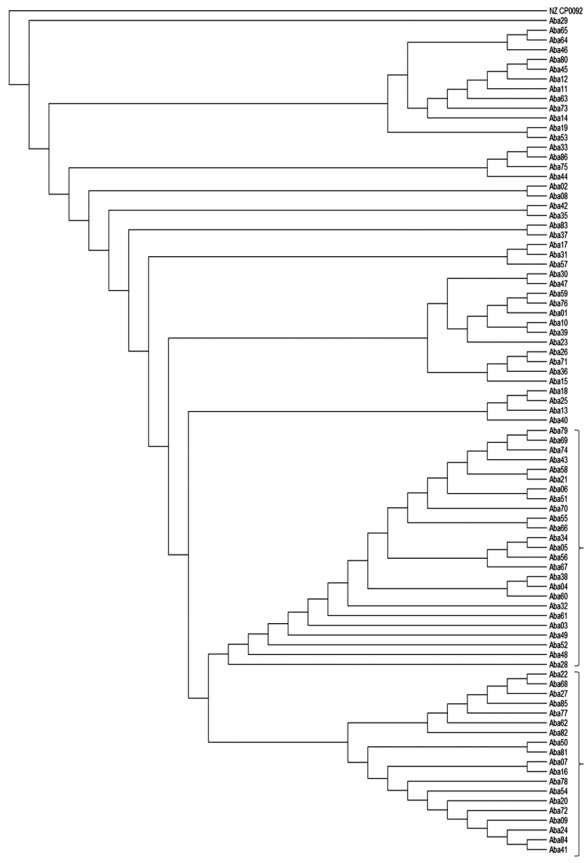
表 1。

抗菌药物	耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌抗菌药物药敏试验结果[n(%)]		
	敏感	中介	耐药
亚胺培南	0(0.0)	0(0.0)	86(100.0)
美罗培南	0(0.0)	0(0.0)	86(100.0)
阿米卡星	17(19.8)	1(1.2)	68(79.1)
庆大霉素	12(14.0)	0(0.0)	74(86.0)
头孢他啶	3(3.5)	0(0.0)	83(96.5)
头孢吡肟	3(3.5)	0(0.0)	83(96.5)
头孢噻肟	0(0.0)	3(3.5)	83(96.5)
环丙沙星	4(4.7)	0(0.0)	82(95.3)
左氧氟沙星	4(4.7)	0(0.0)	82(95.3)
哌拉西林	0(0.0)	1(1.2)	85(98.8)
哌拉西林/他唑巴坦	0(0.0)	1(1.2)	85(98.8)
四环素	3(3.5)	0(0.0)	83(96.5)
复方磺胺甲噁唑	21(24.4)	0(0.0)	65(75.6)
多黏菌素 B	86(100.0)	0(0.0)	0(0.0)

**2.3 耐药基因检测结果分析** 利用基因组重测序技术对 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌进行耐药相关基因检测,共检出 38 种耐药基因,包括 β 内酰胺酶基因、碳青霉烯酶基因及多种外排泵相关基因、抗菌药物修饰酶等。全部菌株均携带 OXA-23 型碳青霉烯酶耐药基因;OXA-66 型 72 株,占 83.7%;OXA-51 型仅 2 株,占 2.3%。其次,检出 ADC 型 AmpC β 内酰胺酶基因 83 株,占 96.5%;TEM-1 型 58 株,占 67.4%。检出外排泵相关基因及抗菌药物修饰酶基因等,其中最多的是氨基糖苷类相关耐药基因 armA(71 株)、APH(6)-I d(67 株)、APH(3'')-I b(67 株)、aac(6')-I b(31 株)、ant(3'')-I a(28 株)、aac(3')-I a(13 株),大环内酯类耐药基因 msrE(69 株)、mphE(67 株),四环素耐药基因 tet(B)(67 株)、APH(3')-I a(54 株),磺胺类抗菌药物耐药基因 sul1(32 株)、sul2(20 株),氯霉素耐药基因 catB8(31 株)等。

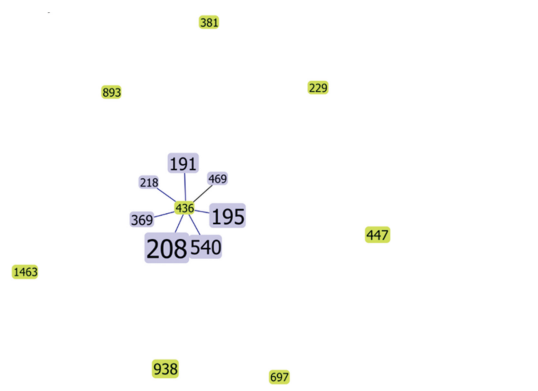
**2.4 多位点序列分型结果** 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌共检出 15 种 ST 型,其中 ST208 有 31 株,占 36.0%;ST195 有 12 株,占 14.0%;ST540 有 8 株,占 9.3%;ST191 有 5 株,占 5.8%。其余 ST 型菌株数较少。

**2.5 同源性分析** 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌中某些菌株之间的亲缘关系较近,如进化树图 1 中 I 和 II 包含的菌株。并且进一步通过与数据库中已有鲍曼不动杆菌序列型进行 eBURST 比对分析,得到 1 个同分型组和 7 个单体组,同一分型组的菌株间具有较近的亲缘关系,见图 2。



注:自上至下菌株顺序为 Aba29、Aba65、Aba64、Aba46、Aba80、Aba45、Aba12、Aba11、Aba63、Aba73、Aba14、Aba19、Aba53、Aba33、Aba86、Aba75、Aba44、Aba02、Aba08、Aba42、Aba35、Aba83、Aba37、Aba17、Aba31、Aba57、Aba30、Aba47、Aba59、Aba76、Aba01、Aba10、Aba39、Aba23、Aba26、Aba71、Aba36、Aba15、Aba18、Aba25、Aba13、Aba40、Aba79、Aba69、Aba74、Aba43、Aba58、Aba21、Aba06、Aba51、Aba70、Aba55、Aba66、Aba34、Aba05、Aba56、Aba67、Aba38、Aba04、Aba60、Aba32、Aba61、Aba03、Aba49、Aba52、Aba48、Aba28、Aba22、Aba68、Aba27、Aba85、Aba77、Aba62、Aba82、Aba50、Aba81、Aba07、Aba16、Aba78、Aba54、Aba20、Aba72、Aba09、Aba24、Aba84、Aba41。

图 1 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌进化树分析



注:数字越大代表菌株数量越多。

图 2 eBURST 比对分析结果图

### 3 讨 论

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要病原菌,可引起全身各部位的感染。近年来随着碳青霉烯类抗菌药物广泛应用于临床各类治疗中,临床分离的耐碳青霉

烯类鲍曼不动杆菌越来越多,患者病死率增加,碳青霉烯类抗菌药物作为针对革兰阴性菌感染的“最后一道防线”,其临床应用前景面临严峻挑战<sup>[6-7]</sup>。

本研究收集了北京康复医院 2017 年 12 月至 2018 年 12 月住院患者临床感染病例中分离到的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌共 86 株,其中 56 株分离自老年患者(>60 岁),占 65.1%。而且标本来源以痰液标本和尿液标本为主,分别占 76.7%和 20.9%,分布前 3 位的科室是神经康复中心(38.4%)、老年康复中心(31.4%)、心脏康复中心(15.1%)。这与本院作为康复医院收治患者的特点密切相关,住院患者大部分是老年人,尤其上述 3 个科室,患者大多长期住院,自身基础性疾病较多,免疫力低下,大多发生过心脑血管事件,导致需要进行侵入性治疗,长期气管切开或气管插管,留置导尿管,以及广谱抗菌药物的大量使用,容易成为耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的易感对象。同时,由于该菌特殊的生物学特点,容易定植,可以在医院环境中广泛存在并且长期存活,使得其容易在老年患者中暴发流行。

通过对 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的药敏结果进行分析,发现其耐药情况非常严重,对临床常用抗菌药物的耐药性普遍较高。除了对多黏菌素 B 均敏感外,仅有 21 株(24.4%)对复方磺胺甲噁唑敏感,17 株(19.8%)对阿米卡星敏感,12 株(14.0%)对庆大霉素敏感,对其他抗菌药物的敏感率均在 5.0%以下。因此,应当高度重视老年患者发生耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌感染,合理使用抗菌药物。

鲍曼不动杆菌的耐药机制复杂多样,其中主要的耐药机制包括产各种  $\beta$  内酰胺酶,外排泵的过度表达,对药物作用靶点进行修饰,膜通透性下降,产生生物被膜等<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌均携带 OXA-23 型碳青霉烯酶基因, OXA-66 型基因检出率为 83.7%, OXA-51 型基因检出率为 2.3%。提示 OXA-23 型碳青霉烯酶基因为本院临床分离耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌主要携带的基因型,是引起鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因之一,与国内相关报道一致<sup>[6-7,9-10]</sup>。另外, AmpC 型  $\beta$  内酰胺酶基因检出率为 96.5%, TEM-1 基因检出率为 67.4%,提示产生  $\beta$  内酰胺酶是导致 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌对碳青霉烯酶类及头孢菌素类抗菌药物耐药率 >95.0% 的原因之一。

外排泵的过度表达及抗菌药物修饰酶等也是鲍曼不动杆菌产生多重耐药的重要机制<sup>[11-12]</sup>。本研究结果显示,86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌携带氨基糖苷类相关耐药基因 armA(71 株)、APH(6)-I d(67 株)、APH(3'')-I b(67 株)、aac(6')-I b(31 株)、ant



(3'')-I a (28 株)、aac(3')-I a(13 株),大环内酯类耐药基因 msrE(69 株)、mphE(67 株),四环素耐药基因 tet(B)(67 株)、APH(3')-I a(54 株),磺胺类抗菌药物耐药基因 sul1(32 株)和 sul2(20 株),氯霉素耐药基因 catB8(31 株)。以上多种耐药基因的表达可以导致鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类、磺胺类、大环内酯类、四环素类等抗菌药物产生耐药。

本研究应用多位点序列分型技术对 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌进行分析,发现 15 种 ST 型,其中 ST208 占 36. 0%,ST195 占 14. 0%,ST540 占 9. 3%,ST191 占 5. 8%,其余 ST 型菌株数较少。经过 eBURST 比对分析得到一个同分型组和 7 个单体型组,ST208、ST195、ST540、ST191、ST369、ST469、ST218 为同一分型组,各菌株之间存在同源相关性,提示本院耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌存在一定流行趋势,医院感染防控部门及临床科室应密切关注医院内部耐药菌的传播流行。

综上所述,北京康复医院 2017 年 12 月至 2018 年 12 月分离到的 86 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物普遍耐药,给临床治疗带来巨大挑战。其中 OXA-23 型碳青霉烯酶是引起北京康复医院鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的重要原因,其他多种  $\beta$  内酰胺酶基因及外排泵基因的表达导致其多重耐药情况严重。并且,北京康复医院检出菌株间存在一定的同源相关性。加之北京康复医院收治患者的临床特点,因此,应加强医院感染防控工作,加强各种医疗器械及用品的消毒管理,提高医务人员手卫生意识,严格执行无菌操作及消毒隔离,防止耐药菌在患者间的传播,避免院内感染暴发<sup>[12]</sup>。同时,应根据药敏结果合理使用抗菌药物,延缓耐药菌的产生。

参考文献

[1] PELEG A Y, SEIFERT H, PATERSON D L. Acineto-

(上接第 300 页)

[17] LEHOTSKY J, TOTHOVÁ B, KOVALSKÁ M, et al. Role of homocysteine in the ischemic stroke and development of ischemic tolerance[J]. Front Neurosci, 2016, 10: 538-542.

[18] HARRIS S, RASYID A, KURNIAWAN M, et al. Association of high blood homocysteine and risk of increased severity of ischemic stroke events[J]. Int J Angiol, 2019, 28 (1): 34-38.

[19] KASHANI K, CHEUNG PASITPORN W, RONCO C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from dis-

bacter baumannii: emergence of a successful pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.

[2] ALSHAHNI M M, ASAHARA M, KAWAKAMI S, et al. Genotyping of Acinetobacter baumannii strains isolated at a Japanese hospital over five years using targeted next-generation sequencing[J]. J Infect Chemother, 2015, 21(7): 512-515.

[3] HARDING C M, HENNON S W, FELDMAN M F. Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(2): 91-102.

[4] 黄洪琳, 易斌. 长期住院老年患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2017, 24(4): 454-457.

[5] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 1-10.

[6] 谭坪海, 陈利达, 郭鹏豪, 等. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药机制研究和同源性分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2019, 11(3): 182-188.

[7] 刘秋萍, 徐凌. 鲍曼不动杆菌的耐药机制的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(10): 1179-1187.

[8] 曾松芳, 韩安棣, 郭美丽, 等. 苍南县 75 株医院感染耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因分析[J]. 预防医学, 2019, 31(11): 1131-1135.

[9] 刘恋, 丁银环, 向成玉, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因检测及同源性分析[J]. 山东医药, 2018, 58(10): 69-71.

[10] 吴忠伟, 王珊珊, 赵建平, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药机制及抗菌药物的选择[J]. 医学综述, 2020, 26(1): 138-147.

[11] PU L, JIAN Z Y, PAN F, et al. Comparative genomic analysis and multi-drug resistance difference of Acinetobacter baumannii in Chongqing, China [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 2827-2838.

[12] 张雨晨, 周树生, 王春艳, 等. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌耐药机制研究及多位点序列分型[J]. 医学综述, 2020, 26 (1): 138-147.

(收稿日期: 2020-05-02 修回日期: 2020-08-17)

covery to clinical adoption [J]. Clin Chem Lab Med, 2017, 55(8): 1074-1089.

[20] CANDIDO S, MAESTRO R, POLESEL J, et al. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(6): 1576-1594.

[21] HOCHMEISTER S, ENGEL O, ADZEMOVIC M Z, et al. Lipocalin-2 as an infection-related biomarker to predict clinical outcome in ischemic stroke[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0154797.

(收稿日期: 2020-05-03 修回日期: 2020-09-13)