

• 论 著 •

广泛耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺酶耐药基因分析郑琳¹, 张帮林¹, 李萌¹, 顾成武²

1. 四川省泸州市中医医院检验科, 四川泸州 646000; 2. 四川省遂宁市中心医院神经内科, 四川遂宁 629000

摘要:目的 了解广泛耐药鲍曼不动杆菌(XDRAb) β -内酰胺酶耐药基因分布情况,为临床防治工作提供依据。方法 选取泸州市中医医院临床送检标本中分离的 102 株鲍曼不动杆菌(Ab),检测其耐药情况。提取 Ab 基因组 DNA 进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳,分析 β -内酰胺酶耐药基因型分布情况。结果 分离的 102 株 Ab 为 XDRAb 菌株,其对亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 74.51%和 70.59%;对氨苄西林、呋喃妥因、头孢唑啉和头孢替坦为全耐药;对替加环素耐药率较低,为 7.84%;多黏菌素 E 的抑菌环直径 97.06%在 11~17 mm,耐药率低。OXA 基因中,OXA-20、23、24、51 阳性率分别为 4.90%、58.82%、24.51%、76.47%,插入序列 ISA-OXA-23 和 ISA-OXA-51 阳性率分别为 63.73%和 21.57%。ESBLs 基因中,TEM 阳性率较高,为 76.47%,SHV 阳性率低,为 9.80%。AmpC 基因中,ADC 阳性率较高,为 85.29%,DHA 阳性率较低,为 23.53%。MBLs 基因中,IMP-4 和 VIM 阳性率分别为 18.63%和 20.59%,CTX-M1 阳性率为 11.76%,PER 和 GES 阳性率低,均为 6.86%,I 类整合基因 INT-1 阳性率为 11.76%。结论 XDRAb 的 β -内酰胺酶耐药基因分布较广泛,存在耐药基因 TEM、OXA-23、OXA-51、ADC 等是其耐药的主要原因。

关键词:广泛耐药鲍曼不动杆菌; β -内酰胺酶; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.12.021

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)12-1499-04

文献标志码:A

Analysis of β -lactamase resistance genes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*ZHENG Lin¹, ZHANG Banglin¹, LI Meng¹, GU Chengwu²

1. Department of Clinical Laboratory, Luzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Neurology, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629000, China

Abstract: **Objective** To understand the distribution of β -lactamase resistance gene of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (XDRAb), and to provide the basis for clinical prevention and treatment. **Methods** A total of 102 strains of *Acinetobacter baumannii* (Ab) isolated from clinical samples submitted by Luzhou Traditional Chinese Medicine Hospital were selected to detect their drug resistance. The Ab genomic DNA was extracted for PCR amplification, and the product was subjected to agarose gel electrophoresis. The distribution of β -lactamase resistance genotype was analyzed. **Results** The 102 Ab isolated were XDRAb, and the resistance rates to imipenem and cefoperazone/sulbactam were 74.51% and 70.59% respectively. Ampicillin, furantoin, cefazolin and cefotetan were all resistant. The drug resistance rate of tigacycline was low, which was 7.84%. The inhibition ring diameter of polymyxin E was 97.06% in the range of 11–17 mm, and the drug resistance rate was low. Among the OXA genes, the positive rates of OXA-20, 23, 24 and 51 were 4.90%, 58.82%, 24.51% and 76.47% respectively. The positive rates of the insertion sequences ISA-OXA-23 and ISA-OXA-51 were 63.73% and 21.57% respectively. In ESBLs gene, the positive rate of TEM was higher (76.47%), and the positive rate of SHV was lower (9.80%). Among AmpC gene, the positive rate of ADC was higher (85.29%), and the positive rate of DHA was lower (23.53%). Among the MBLs gene, the positive rates of IMP-4 and VIM were 18.63% and 20.59% respectively, CTX-M1 was 11.76%, PER and GES were 6.86%, and the positive rate of INT-1 of the I class of integrators was 11.76%. **Conclusion** XDRAb β -lactamase resistance genes are widely distributed, and TEM, OXA-23, OXA-51, ADC and other resistant genes are the main reasons for its drug resistance.

作者简介:郑琳,女,主管技师,主要从事微生物检验研究。

本文引用格式:郑琳,张帮林,李萌,等.广泛耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺酶耐药基因分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(12):1499-1502.

Key words:extensive drug-resistance *Acinetobacter baumannii*; β -lactamase; resistance genes

近年来,鲍曼不动杆菌(*Ab*)感染不断增多,且随着广谱抗菌药物和免疫抑制剂的广泛使用,全球各地陆续出现多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR*Ab*)或广泛耐药鲍曼不动杆菌(XDR*Ab*)感染的报道。KARAM-PATAKIS 等^[1]发现,*Ab* 亚胺培南耐药菌株分离率从 2017 年的 27.6%增长至 2018 年的 31.0%。国内王宇航等^[2]近年来的研究发现,桂林地区 *Ab* 对多种类型抗菌药物,如广谱青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类呈现高度耐药及严重的多重耐药现状,耐药率高于 60%。*Ab* 的耐药机制复杂,产 β -内酰胺酶是其耐药的主要机制, β -内酰胺酶根据水解对象不同可分为青霉素酶(OXA)、头孢菌素酶(AmpC)、金属类 β -内酰胺酶(MBLs)和超广谱 β -内酰胺酶(ES-*BLs*)4 种。随着临床 β -内酰胺类抗菌药物的广泛应用、耐药率的不断上升,以及新的 β -内酰胺类抗菌药物的不断开发,对 β -内酰胺酶耐药基因的研究越来越受到重视^[3]。本研究通过探讨 *Ab* 的耐药情况及 XDR*Ab* β -内酰胺酶耐药基因的主要分布情况,以期 为临床预防和治疗 XDR*Ab* 感染提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取泸州市中医医院(以下称本院)临床送检标本中分离的 102 株 *Ab*(非重复菌株),所有菌株经法国生物梅里埃公司生产的 VITEK2 COMPACT 全自动细菌鉴定药敏分析仪鉴定确认,其中来自 ICU 的有 44 株(43.14%),心胸外科 17 株(16.67%),烧伤科 12 株(11.76%),骨伤科 14 株(13.73%),呼吸内科 8 株(7.84%),神经内科 3 株(2.94%),泌尿外科 2 株(1.96%),新生儿科 1 株(0.98%),妇产科 1 株(0.98%);来自痰液标本 62 株(60.78%),脓液标本 20 株(19.61%),血液标本 8 株(7.84%),脑脊液标本 3 株(2.94%),伤口分泌物标本 3 株(2.94%),尿液标本 2 株(1.96%),引流液标本 2 株(1.96%),穿刺液标本 2 株(1.96%)。质控菌株:铜绿假单胞菌 ATCC 27853、大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603(产 ES*BLs* 株)购自中华人民共和国国家卫生健康委员会临床检验中心。肺炎克雷伯菌(IMP-4 基因阳性菌株)由本院微生物室提供,已鉴定并测序。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:VITEK2 COMPACT 全自动细菌鉴定药敏分析仪,PCR 扩增仪,低温离心机,金属浴加热仪,35℃恒温孵育箱,琼脂糖凝胶电泳仪,-80℃和-20℃冰箱,高压灭菌锅,PCR 96 孔反应板,10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 加样枪和枪头,2.0 mL EP 管等。主要试剂:Takara PreMix Taq 购自日本 Takara 公司,DNA Marker II 购自天根生化科技(北

京)有限公司,31 种引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 临床常用抗菌药物(米诺环素除外)采用 VITEK2 COMPACT 全自动细菌鉴定药敏分析仪高通量测序技术检测,分析敏感、中介及耐药率。头孢哌酮/舒巴坦(SCF105)、米诺环素(MH30)、替加环素(TGC15)、多黏菌素 E(CT10)采用纸片扩散(K-B)法检测,量取药物抑菌环直径,结果按照美国临床和实验室标准协会(CLSI)相关标准进行判读(CLSI 未提供头孢哌酮/舒巴坦的 K-B 法判读标准,故其按照头孢哌酮的标准进行判读)。

1.3.2 DNA 模板制备 采用煮沸法,将细菌在麦康凯培养基上复苏培养 12 h,用棉签挑取适量菌落于 2.0 mL EP 管中(预先加入 1.5 mL 生理盐水),12 000 r/min 离心 2 min,去除部分上清,混匀,100℃煮沸 20 min,12 000 r/min 低温离心 10 min,所得上清液即为所需 DNA 模板液。

1.3.3 DNA PCR 扩增 细菌 DNA 与引物进行 PCR 扩增,各种靶基因 PCR 扩增体系均为正向引物、反向引物各 1 μ L(10 mmol/L),Takara PreMix Taq 10 μ L,超纯水 5 μ L,模板液 3 μ L,总反应体积 20 μ L。PCR 反应参数如下:94℃预变性 4 min,94℃变性 60 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,共循环 35 次,最终 72℃延伸 5 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后在紫外凝胶成像仪下观察、记录并拍照。部分基因引物序列见表 1。

表 1 部分基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度 (bp)
TEM	F:AGGAAGAGTATGATTCAACA	535
	R:CTCGTCGTTTGGTGATGGC	
SHV	F:TGCGCAAGCTGCTGACCAGC	305
	R:TTAGCGYTGCCAGTGCTCGA	
CTX-M1	F:ATGGTTAAAAAATCACTGCGYCA GTTC	876
	R:TCACAAACCGTYGGTGACGATTTTAGCCGC	
KPC	F:ATGTCACTGTATCGCCGTCTA	882
	R:TTACTGCCCGTTGACGCCCAA	
PER	F:AGTCAGCGGCTTAGATA	978
	R:CGTATGAAAAGGACAATC	
GES	F:ATGCGCTTCATTACGCAC	846
	R:CTATTGTTCGTGCTCAGG	
VEB	F:GCGGTAATTAAACCAGA	961
	R:GCCTATGAGCCAGTGTT	

续表 1 部分基因引物序列		
基因	引物序列(5′-3′)	长度 (bp)
CARB	F:AAAGCAGATCTTGTGACCTATTC	588
	R:TCAGCGCGACTGTGATGTATAAAC	
LAP	F:ATGAAAAAGATCCGCCTTATTATAA	858
	R:TTACCAGTTCTTAATTACTGAATC	
OXA-20	F:TTGATAATCCGATTTCCTAGCAC	801
	R:CTAGTTGGGTGGCAAAGCAT	
OXA-23	F:GATGTGTCATAGTATTCGTCG	1 067
	R:TCACAACAATAAAAGCACTG	
IMP	F:CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	587
	R:ATAATTGGCGACTTTGGC	
VIM	F:ATTGGTCTATTTGACCGCGCGTC	633
	R:TGCTACTCAACGACTGAGCG	

注:F 为正向引物,R 为反向引物。

1.4 统计学处理 采用 Excel 2010 进行数据统计与分析。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 分离的 102 株 Ab 对临床常用的抗菌药物中除米诺环素的耐药率较低(32.35%)外,对其他抗菌药物的耐药率均较高,为 XDRAb 菌株。其中亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 74.51%和 70.59%;对氨苄西林、呋喃妥因、头孢唑啉和头孢替坦为全耐药;对替加环素耐药率较低,为 7.84%。多黏菌素 E 因无 K-B 法的 CLSI 判读标准,故根据抑菌环直径来判断耐药性,其抑菌环直径 97.06%在 11~17 mm,耐药率低。见表 2。

表 2 药敏试验结果						
抗菌药物	敏感		中介		耐药	
	菌株数	敏感率	菌株数	中介率	菌株数	耐药率
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
氨苄西林	0	0.00	0	0.00	102	100.00
呋喃妥因	0	0.00	0	0.00	102	100.00
环丙沙星	22	21.57	1	0.98	79	77.45
头孢唑啉	0	0.00	0	0.00	102	100.00
头孢替坦	0	0.00	0	0.00	102	100.00
头孢曲松	4	3.92	20	19.61	78	76.47
氨苄西林/舒巴坦	24	23.53	1	0.98	77	75.49
头孢吡肟	23	22.55	0	0.00	79	77.45
庆大霉素	16	15.69	0	0.00	86	84.31
亚胺培南	25	24.51	1	0.98	76	74.51
左氧氟沙星	23	22.55	28	27.45	51	50.00
氨基南	0	0.00	14	13.73	88	86.27

续表 2 药敏试验结果						
抗菌药物	敏感		中介		耐药	
	菌株数	敏感率	菌株数	中介率	菌株数	耐药率
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
头孢他啶	18	17.65	4	3.92	80	78.43
妥布霉素	31	30.39	0	0.00	71	69.61
哌拉西林/他唑巴坦	24	23.53	5	4.90	73	71.57
头孢哌酮/舒巴坦	19	18.63	11	10.78	72	70.59
米诺环素	24	23.53	45	44.12	33	32.35
替加环素	37	36.27	57	55.88	8	7.84

2.2 β-内酰胺酶耐药基因检测结果 OXA 基因中, OXA-20、23、24、51 阳性率分别为 4.90%、58.82%、24.51%、76.47%,插入序列 ISA-OXA-23 和 ISA-OXA-51 阳性率分别为 63.73%和 21.57%,未检测出 OXA-58 基因。ESBLs 基因中,TEM 阳性率较高,为 76.47%,SHV 阳性率低,为 9.80%。AmpC 基因中, ADC 阳性率较高,为 85.29%,DHA 阳性率较低,为 23.53%。MBLs 基因中,IMP-4 和 VIM 阳性率分别为 18.63%和 20.59%,CTX-M1 阳性率为 11.76%,PER 和 GES 阳性率低,均为 6.86%,I 类整合基因 INT-1 阳性率为 11.76%。其余 MBLs 基因 CTX-M2、CTX-M8、CTX-M9、CTX-M25、KPC、VEB、CARB、LAP、SCO、SIM、SPM、GIM、AIM、NDM 均未检出。存在 3 种以上不同类型基因阳性的菌株有 76 株,占 74.51%。见表 3。

表 3 β-内酰胺酶耐药基因阳性率分布		
基因型	阳性(n)	阳性率(%)
TEM	78	76.47
SHV	10	9.80
CTX-M1	12	11.76
PER	7	6.86
GES	7	6.86
IMP-4	19	18.63
VIM	21	20.59
INT-1	12	11.76
OXA-20	5	4.90
OXA-23	60	58.82
OXA-24	25	24.51
OXA-51	78	76.47
ISA-OXA-23	65	63.73
ISA-OXA-51	22	21.57
DHA	24	23.53
ADC	87	85.29

3 讨 论

Ab 是引起医院感染的病原菌之一,可引起呼吸道、血液、泌尿道、伤口等多部位感染,有较高的病死

率^[4-5]。Ab 耐药率高, 耐药性强, 同时耐药性可克隆传播, 临床治疗较为困难^[6-7]。本研究 62 株 Ab 来自痰液标本, 占 60.78%。丁丹^[8]连续 7 年的监测结果显示, Ab 以感染下呼吸道为主(76.00%)。结合本研究结果, 提示 Ab 最常见的感染部位为呼吸道。药敏试验结果显示, 本院分离到的 Ab 耐药率高, 且耐药广泛, 对氨苄西林、呋喃妥因、头孢唑啉和头孢替坦为全耐药, 对亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦和头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 74.51%、71.57% 和 70.59%, 为 XDRAb 菌株。出现该结果可能与抗菌药物的广泛应用和 Ab 的耐药机制复杂密切相关^[9-10]。基因检测结果显示, XDRAb 的 β -内酰胺酶耐药基因分布较广, 以 TEM、OXA-23、OXA-51 及 ADC 为主, 表明本院分离的 XDRAb 对 β -内酰胺类抗菌药物耐药主要与 TEM、OXA-23、OXA-51 及 ADC 基因表达有关。本研究也检测到以往检出率较低的 MBLs 基因中的 IMP-4 和 VIM, 阳性率分别为 18.63% 和 20.59%。本研究 3 种以上不同类型基因阳性的菌株有 76 株, 占 74.51%, 故认为本院分离的 XDRAb 耐药与同时携带多种耐药基因也有关。本研究根据 IMP 阳性质控菌株与 PCR 扩增产物电泳条带分析, 检出 IMP 的 19 株 Ab 均为 IMP-4 阳性, 但电泳条带显示某些菌株还存在其他长度的 IMP 基因型, 可能为 IMP 基因的某种亚型, 有待进一步对产物进行测序分析。另外, 某些菌株 OXA-23 和 ISA-OXA-23 的电泳结果中除目的产物外, 还出现 1 或 2 个条带, 但根据设计引物的产物长度, 这些条带显示出与目的产物相差较大, 可能是由于引物设计的特异度不高导致非特异性扩增所致, 也可能是 OXA-23 的变异产物, 结果有待进一步分析及研究验证。

近年来, 由于广谱抗菌药物的广泛使用, 由 Ab 引起的医院感染逐年增多, 该菌的分离率及耐药率也呈逐年上升趋势^[11], Ab 感染已成为难以治疗和控制的院内获得性感染类型^[12]。本院分离的 XDRAb 耐药严重, 对抗菌药物敏感率低, 其 β -内酰胺酶耐药基因分布较广泛, 常见耐药基因阳性率高, 且同时携带多种 β -内酰胺酶耐药基因。了解 XDRAb 感染的危险因素, 研究其耐药机制, 对防治 XDRAb 感染及减少医院感染、交叉耐药尤为重要。

综上所述, 本院分离的 Ab 为 XDRAb 菌株, β -内酰胺酶耐药基因分布较广泛, 存在耐药基因 TEM、OXA-23、OXA-51、ADC 等是其耐药的主要原因, 医

院应加强对 XDRAb 感染的防控, 减少医院交叉感染。

参考文献

- [1] KARAMPATAKIS T, TSENGOULI K, IOSIFIDIS E, et al. Impact of active surveillance and infection control measures on carbapenem-resistant Gram-negative bacterial colonization and infections in intensive care[J]. J Hosp Infect, 2018, 99(4):396-404.
- [2] 王宇航, 蔡芸. 鲍曼不动杆菌对多黏菌素类抗菌药物耐药现状及机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(9):1015-1019.
- [3] 李飞, 陈丹娜, 李丽娟, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及产金属 β -内酰胺酶基因型分析[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(4):447-450.
- [4] 王黎一, 史利克, 王悦. ICU 是多重耐药鲍曼不动杆菌下呼吸道感染的高危场所[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(8):725-731.
- [5] 周娇娇, 朱惠莉. 老年患者多药耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学和耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(12):1786-1790.
- [6] CHAKRAVARTY B. Genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in *Acinetobacter baumannii*: background, challenges and future prospects[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(5):4037-4046.
- [7] 喻凯航, 陈栎江, 方人驰, 等. VI 型分泌系统在鲍曼不动杆菌致病及耐药性中的作用[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(4):231-236.
- [8] 丁丹. 2011—2017 年河南中医药大学第三附属医院心血管科鲍曼不动杆菌的分布及耐药性分析[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(1):257-260.
- [9] 葛苗苗, 罗立, 杜帅先, 等. 某医院 8 年间鲍曼不动杆菌耐药与抗菌药物用量的相关性分析[J]. 安徽医药, 2020, 24(3):623-626.
- [10] 蒙光义, 彭评志, 周丽娟, 等. 鲍曼不动杆菌耐药性变迁与抗菌药物用药频度相关性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(11):1454-1458.
- [11] 郭雪, 施雅文, 贾双荣, 等. 2013—2017 年鲍曼不动杆菌医院感染分布特征及耐药性变迁[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(2):145-148.
- [12] AYDEMIR H, TUZ H I, PISKIN N, et al. Risk factors and clinical responses of pneumonia patients with colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus [J]. World J Clin Cases, 2019, 7(10):1111-1121.

(收稿日期:2020-12-02 修回日期:2021-02-10)