

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.03.001

· 论 著 ·

鲍曼不动杆菌 PER 型超广谱 β -内酰胺酶耐药基因研究邓红丽^{1,2}, 刘文恩¹, 陈振华³, 简子娟¹, 李艳明¹

(1 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2 浏阳市人民医院, 湖南 浏阳 410300; 3 湖南省胸科医院, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 目的 探讨某院产 PER 型超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)鲍曼不动杆菌分子流行病学特点及耐药机制。方法 选取该院 2009 年 1—5 月临床分离的非重复鲍曼不动杆菌 129 株, 采用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验, 聚合酶链反应(PCR)扩增 PER 基因并测序, 肠杆菌科基因间重复一致序列(ERIC)-PCR 进行同源性分析。结果 78 株鲍曼不动杆菌携带 PER-1 型基因, 阳性率 60.47%(78/129)。PER-1 阳性鲍曼不动杆菌对亚胺培南、美罗培南、氨苄西林/舒巴坦、米诺环素和头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 46.15%、44.87%、38.46%、10.26% 和 8.97%, 对其余 10 种抗菌药物的耐药率均 $>60\%$; PER-1 阳性菌株对头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率明显高于 PER-1 阴性菌株(均 $P < 0.05$)。78 株 PER-1 阳性菌株包括 7 型, 分别为 A 型(1 株)、B 型(1 株)、C 型(55 株)、D 型(18 株)、E 型(1 株)、F 型(1 株)、G 型(1 株), C 和 D 型为主要的克隆型。结论 C 和 D 型 PER-1 阳性鲍曼不动杆菌为该院最主要的流行株。产 PER-1 型 ESBLs 鲍曼不动杆菌呈多重耐药, 米诺环素、头孢哌酮/舒巴坦可作为该院鲍曼不动杆菌感染治疗的最佳选药。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; PER-1 基因; ERIC-PCR; 超广谱 β -内酰胺酶; 抗药性; 微生物; 多重耐药

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)03-0129-05

Study on drug resistance genes of PER-type extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii*

DENG Hong-li^{1,2}, LIU Wen-en¹, CHEN Zhen-hua³, JIAN Zi-juan¹, LI Yan-ming¹ (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 The People's Hospital of Liuyang, Liuyang 410300, China; 3 Hunan Provincial Chest Hospital, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective** To investigate molecular epidemiological characteristics and antimicrobial resistance mechanism of PER-type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*). **Methods** 129 *A. baumannii* clinical strains isolated from a hospital between January and May 2009 were performed antimicrobial susceptibility testing by Kirby-Bauer disk diffusion method, PER gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), PCR amplified products of PER gene were sequenced, genotypes were identified by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR). **Results** PER-1 gene was detected in 78 of 129 clinical isolates, positive rate was 60.47%(78/129). The resistance rates of PER-1-positive strains to imipenem, meropenem, ampicillin/sulbactam, minocycline and cefoperazone/sulbactam was 46.15%, 44.87%, 38.46%, 10.26% and 8.97% respectively, the resistance rates to the other 10 kinds of antimicrobial agents were all $>60\%$; The resistance rates of PER-1-positive strains to ceftazidime, cefotaxime, cefepime, ciprofloxacin, and levofloxacin were significantly higher than PER-1-negative strains (all $P < 0.05$). 78 PER-1-positive strains were divided into 7 types, including type A(1), B(1), C(55), D(18), E(1), F(1), and G(1), of which the main clones were type C and D. **Conclusion** Type C and D PER-1-positive *A. baumannii* are the main epidemic strains in this hospital. PER-1-type ESBL-producing *A. baumannii* strains are multi-drug resistant, minocycline and cefoperazone/sulbactam are optimal

[收稿日期] 2013-08-30

[基金项目] 湖南省科技厅基金资助项目(08FJ3175)

[作者简介] 邓红丽(1980-), 女(汉族), 湖南省浏阳市人, 主管检验师, 主要从事临床微生物检验研究。

[通信作者] 刘文恩 E-mail: liuwenen@gmail.com

antimicrobial agents for treating *A. baumannii* infection in this hospital.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; PER-1 gene; enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR; extended-spectrum β -lactamase; drug resistance, microbial; multidrug resistance

[Chin Infect Control, 2014, 13(3): 129-133]

多重耐药鲍曼不动杆菌易造成医院感染发生和流行,是临床抗感染治疗的难点^[1-2]。PER 型超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)命名源自于该型在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中最早的发现者(Patrice, Esthel, and Roger)。PER 型 ESBLs 属于 Ambler 分子结构分类中的 A 类、Bush 功能分类的 2be 亚群,为丝氨酸 β -内酰胺酶,可水解氧亚氨基抗菌药物,如第一~四代头孢菌素及氨基糖苷类等,其活性可被克拉维酸抑制,但对氯唑西林和 EDTA 不敏感。PER 型 ESBLs 具有 ESBLs 的一般特点,底物谱广泛,往往多重耐药。研究^[3]表明,PER 型 ESBLs 易造成医院感染暴发流行,PER 阳性菌株预示着不良临床结果。本研究收集我院临床标本中分离的鲍曼不动杆菌,初步探讨产 PER 型 ESBLs 菌株的分子流行病学特点及耐药机制,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取本院 2009 年 1—5 月临床分离的非重复鲍曼不动杆菌 129 株,菌株均采用 VITEK-2 型全自动微生物鉴定仪 GN 鉴定卡进行鉴定。药敏质控菌株为 ATCC 27853、ATCC 25922 和 ATCC 35218,均购自卫生部临床检验中心。产 PER-1 型 ESBLs 标准菌株由上海华山医院蒋晓飞教授惠赠。质粒标准菌株 NCTC 50192、NCTC 50193 由英国伯明翰大学医学院 Peter Hawkey 教授馈赠。

1.2 主要试剂及仪器 DNA 提取试剂、质粒碱裂解法提取试剂盒和聚合酶链反应(PCR)扩增试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,引物由上海生工生物技术有限公司合成;VITEK-2 型全自动微生物鉴定仪购自法国生物梅里埃公司,药敏纸片均为英国 Oxoid 公司产品;ABI2720 基因扩增仪购自美国 ABI 公司;采用英潍捷基(上海)生物技术有限公司 ABI3730 测序仪对 PCR 产物进行测序。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 根据美国临床实验室标准化研究所(CLSI)^[4]2012 年标准,采用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验。药敏纸片包括哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、头孢噻肟、

头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星和米诺环素 15 种。

1.3.2 PER 型 ESBLs 基因检测 采用煮沸法提取基因组 DNA。参照文献^[5-6]设计引物,扩增 PER 型 ESBLs 基因,反应体系和反应条件见参考文献^[5-6]。扩增产物 927 kb。

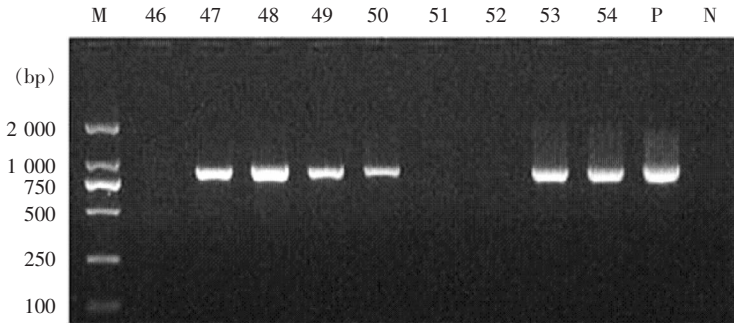
1.3.3 同源性分析 采用肠杆菌基因间一致重复序列(ERIC)-PCR 法进行同源性分析。参照文献^[7]设计引物:ERIC1:5'-ATGTAAGCTCCTGGG GATTAC-3';ERIC2:5'-AAGTAAGTGACTGGG GTGAGCG-3'。反应体系:反应总体积为 25 μ L,包括 1 μ L DNA 模板,12.5 μ L MasterMix,引物各 1 μ L(浓度为 100 pmol/ μ L),灭菌 DDW 9.5 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物以 1.2% 琼脂糖电泳分离,凝胶成像后,应用 BioNumerics V 5.01,选择 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)方法^[8],对图谱进行分析。

1.3.4 PCR 扩增产物测序 从每组 ERIC-PCR 分型中,各随机抽取 1 株 PER-1 型 ESBLs 阳性菌株的 PCR 产物进行正反双向测序;采用 BLAST 进行序列比对,确定基因型。

2 结果

2.1 PER 型 ESBLs 基因 PCR 扩增结果 129 株鲍曼不动杆菌中,78 株 PER-1 型基因扩增阳性,阳性率为 60.47%。PCR 扩增产物电泳图见图 1。

2.2 鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的耐药率 PER-1 阳性鲍曼不动杆菌对亚胺培南、美罗培南、氨苄西林/舒巴坦、米诺环素和头孢哌酮/舒巴坦的耐药率分别为 46.15%、44.87%、38.46%、10.26% 和 8.97%,对其余 10 种抗菌药物的耐药率均 >60%; PER-1 阳性菌株对头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率明显高于 PER-1 阴性菌株(均 $P < 0.05$)。见表 1。



M:DL2000 DNA Marker; Negative specimens:46,51,52; Positive specimens:47,48,49,50,53,54; P: Positive control; N: Negative control

图 1 鲍曼不动杆菌 PER-1 基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 PCR results of PER-1 gene of *A. baumannii*

表 1 鲍曼不动杆菌对 15 种抗菌药物的耐药率(%,耐药株数)

Table 1 Resistance rates of *A. baumannii* to 15 kinds of antimicrobial agents(%, No. of drug-resistant isolates)

Antimicrobial agent	PER-1-positive strain(n=78)	PER-1-negative strain(n=51)
Piperacillin	84.62(66)	70.59(36)
Piperacillin/tazobactam	61.54(48)	60.78(31)
Ampicillin/sulbactam	38.46(30)	33.33(17)
Ceftazidime*	85.90(67)	52.94(27)
Cefotaxime*	97.44(76)	64.71(33)
Cefepime*	74.36(58)	45.10(23)
Cefoperazone/sulbactam	8.97(7)	5.88(3)
Imipenem	46.15(36)	45.10(23)
Meropenem	44.87(35)	43.14(22)
Gentamycin	71.79(56)	70.59(36)
Tobramycin	79.49(62)	64.71(33)
Amikacin	70.51(55)	54.90(28)
Ciprofloxacin*	87.18(68)	54.90(28)
Levofloxacin*	61.54(48)	43.14(22)
Minocycline	10.26(8)	11.76(6)

* :Comparison of antimicrobial resistance rate, the difference was statistically significant (all $P < 0.05$)

2.3 同源性分析 经 ERIC-PCR 凝胶成像分析, 78 株 PER-1 阳性菌株分为 7 型, 分别为 A 型(1 株)、B 型(1 株)、C 型(C 型 30 株, C' 型 25 株)、D

型(18 株)、E 型(1 株)、F 型(1 株)、G 型(1 株)。相似度值 $> 80\%$, 则为同一亚型; C' 与 C 相似度值为 90.9% , 代表同一克隆株, 见图 2。

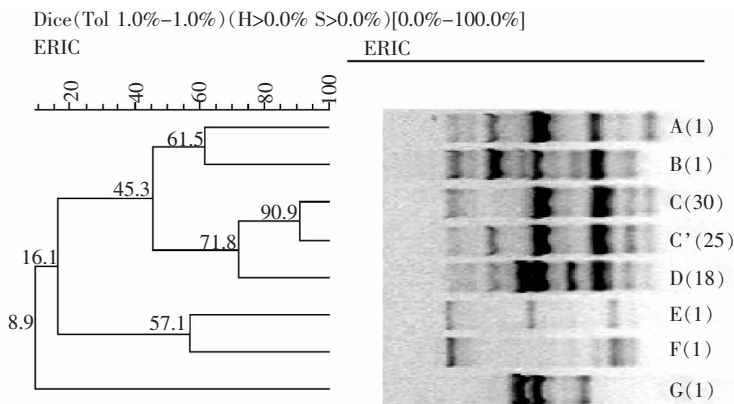


图 2 PER-1 阳性鲍曼不动杆菌基因型聚类图

Figure 2 ERIC-PCR profile and similarity matrix of PER-1-positive *A. baumannii*

2.4 基因测序结果 7 株 PER-1 阳性菌株编码的基因序列与 Z21957 (GenBank 登录号) 同源率为 100%。

3 讨论

本院临床分离的 78 株 PER-1 阳性鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物耐药严重,除对米诺环素和头孢哌酮/舒巴坦的敏感率较高,对亚胺培南、美罗培南、氨苄西林/舒巴坦保持一定的活性外,对其余 10 种抗菌药物耐药率均 >60%。PER-1 阳性菌株对头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率明显高于 PER-1 阴性菌株 (均 $P < 0.05$)。PER-1 阳性菌株对第三、四代头孢菌素的耐药率都高于 PER-1 阴性菌株,这与 PER-1 基因分子结构密切相关^[9]。根据本组药敏结果,对于本院多重耐药鲍曼不动杆菌感染患者,宜采用头孢哌酮/舒巴坦联合米诺环素治疗。

本组 129 株鲍曼不动杆菌中,78 株产 PER-1 型 ESBLs,阳性率高达 60.47% (78/129),在国内外罕见^[10-12]。本组未检出产 PER-2 型 ESBLs 阳性菌株,PER-2 型 ESBLs 仅在南北美洲检出^[13-14],其他地区尚未见报道。

经聚类分析,78 株产 PER-1 型 ESBLs 鲍曼不动杆菌分为 7 型,其中 55 株属于 C 型,18 株为 D 型,剩余 5 株分别为独立型 (A、B、E、F、G 型各 1 株),C 和 D 型克隆株为本院最主要的流行株。临床资料显示,同一病区相邻病床均为同一 C 型克隆株感染。C 型克隆最先分离自重症监护室 (ICU) 一名脑外伤患者支气管分泌物,随后广泛播散到本院各个科室,引起医院内大范围流行,其播散时间横跨整个研究阶段。而 D 型克隆最先于 1 月 19 日分离自 ICU 一名脑外伤患者的痰液,2 月 8 日在同一科室另一名脑外伤患者的痰液中又分离到此克隆株,2 月 15 日波及到神经内科,随后到神经外科、儿科、呼吸科和烧伤科,播散时间也横跨整个研究阶段。A、B、E、F 和 G 型克隆均为散发菌株。研究^[8,15]表明,PER-1 可位于复合转座子上,可经克隆、质粒传播;I 类整合子可以促使 PER-1 在菌株间的扩散。本研究中 PER-1 基因是否位于转座子或整合子等可移动元件上,有待进一步研究。

PCR 扩增阳性产物纯化后双向测序,经 BLAST 比对分析表明,7 株 PER-1 型阳性菌株编码的基因序列与 Z21957 同源性达 100%,均为

PER-1 型 ESBLs 基因。目前,已发现 7 类 PER 型 ESBLs^[16]。PER-3、PER-4、PER-5 和 PER-7 是 PER-1 点突变的衍生物;PER-2 和 PER-6 相差 22 个氨基酸,与 PER-1 具有 85% 的氨基酸同源性^[17]。有学者报道^[18],在 2 株豚鼠气单胞菌中发现 PER-3 型 ESBLs,经 Southern 杂交证实,此基因可位于染色体和质粒上。PER 型 ESBLs 的分型虽远不及 TEM、SHV、OXA 等其他型 ESBLs 丰富,但由于其耐药谱广泛,往往呈多重耐药,会导致临床经验用药治疗失败,应引起广大医务工作者的重视。

[参考文献]

- [1] 鲁朝学,黄英.多重耐药鲍曼不动杆菌感染调查[J].中国感染控制杂志,2013,12(3):219-220.
- [2] 王莉,周凤萍.ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌医院感染暴发流行病学调查[J].中国感染控制杂志,2013,12(2):113-116.
- [3] Endimiani A, Luzzaro F, Pini B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase[J]. BMC Infect Dis, 2006, 6:52.
- [4] Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; the twenty-second informational supplement[S]. 2012, M100-S22, 32(3): 64-65.
- [5] Danel F, Hall L M, Gur D, et al. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Antimicrob Chemother, 1995, 35(2):281-294.
- [6] Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, et al. Spread of bla (CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(5):975-978.
- [7] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [8] Eraç B, Gülay Z. Molecular epidemiology of PER-1 extended-spectrum β -lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital[J]. Folia Microbiol (Praha), 2007, 52(5):535-541.
- [9] Bouthors A T, Delettré J, Mugnier P, et al. Site-directed mutagenesis of residues 164, 170, 171, 179, 220, 237 and 242 in PER-1 beta-lactamase hydrolysing expanded-spectrum cephalosporins[J]. Protein Eng, 1999, 12(4):313-318.
- [10] Yin X L, Hou T W, Xu S B, et al. Detection of drug resistance-associated genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Microb Drug Resist, 2008, 14(2):145-150.
- [11] Naas T, Nordmann P, Heide A. Intercountry transfer of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania[J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 29

(2):223-232.

- [12] Szabó D, Szentandrassy J, Juhász Z, et al. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2008, 7:12.
- [13] Pasteran F, Rapoport M, Petroni A, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(9):3222-3224.
- [14] Power P, Di Conza J, Rodriguez M M, et al. Biochemical characterization of PER-2 and genetic environment of blaPER-2 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(7):2359-2365.
- [15] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14

(suppl 1):75-81.

- [16] Lahey Clinic. β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes[EB/OL](2013-02-26)[2013-03-02]. <http://lahey.org/studies>.
- [17] Bonnin R A, Poirel L, Licker M, et al. Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(10):1524-1528.
- [18] Wu C J, Chuang Y C, Lee M F, et al. Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Aeromonas spp.* at a medical center in Southern Taiwan[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(12):5813-5818.

(本文编辑:左双燕)

· 学术动态 ·

2008—2012 年中国手足口病流行病学特征(摘要)

易盼盼 译, 吴安华 校

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

背景 手足口病是一种常见的由肠道病毒引起的儿童传染病。这一疾病在亚洲东部及东南部地区已经造成越来越沉重的社会负担。为更好地利用疫苗接种或其他预防措施, 笔者在加强监督的同时分析了我国手足口病的流行病学特点。

方法 调查 2008 年 1 月 1 日—2012 年 12 月 31 日上报中国疾病预防控制中心的所有手足口病病例, 采集其流行病学、临床以及实验室数据, 并收集气候、地理及人口方面的相关信息。所有的数据均按年龄、疾病严重程度、实验室确诊与否、肠道病毒血清型指标进行分层分析。

结果 2008 年 1 月 1 日—2012 年 12 月 31 日间, 监测系统共有 7 200 092 例疑似手足口病患者, 其中实验室确诊 267 942 例(3.7%), 死亡 2 457 例(0.03%)。2010—2012 年, 每年手足口病的发病率为 1.2 例/1 000 人年。12~23 月龄小儿的发病率及病死率最高, 经统计, 2012 年此年龄段的疾病发生率为 38.2 例/1 000 人年, 死亡率为 1.5 例/100 000 人年; 从起病到确诊的时间平均为 1.5 d (IQR 0.5~2.5), 起病至死亡的时间平均为 3.5 d (IQR 2.5~4.5); 出现心肺疾病或神经系统疾病等

并发症的病例数绝对值为 82 486 (即危重率为 1.1%), 其中 2 457 例死亡(病死率为 3.0%)。实验室确诊的死亡人数为 1 737 人, 其中 1 617 人(93%)与肠道病毒 71 型有关。在中国北方地区, 手足口病的发病高峰为每年 6 月; 而在南方地区, 有 2 个高峰, 分别为每年 5 月及每年 9~10 月。另外, 发现地理差异与气候、人口因素的关系不大(相关系数分别为 8%~23%, 3%~19%)。

结论 该研究分析了中国手足口病的流行病学特点, 是至今为止最大的关于该疾病的人群研究。手足口病已经给我们的社会带来了各方面的压力, 因此在制定未来的防控措施时需高度重视这一现状。目前还有其他的流行病学及血清学方面的研究在进行, 旨在明确我国手足口病的传播动力学及免疫学模型, 优化疾病防控措施。

摘译自: Xing W, Liao Q, Viboud C, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(4):308-318.

(本文编辑:任旭芝)