

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2018.01.004

· 论 著 ·

呼吸 ICU 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因的携带情况及同源性

李天娇¹, 黄涛¹, 吴华¹, 苏屿¹, 符生苗¹, 符惠群¹, 王旭明¹, 龙文芳²

(1 海南省人民医院, 海南 海口 570311; 2 海南医学院公共卫生学院, 海南 海口 570311)

[摘要] **目的** 了解我院呼吸 ICU 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)携带的 β -内酰胺酶的耐药基因及其流行特征。**方法** 收集 2015 年 10—12 月呼吸 ICU 临床患者送检标本分离的 CRAB。试验菌株进行 5 种耐药基因(KPC-2、IMP、VIM、NDM-1、OXA-23)PCR 特异性扩增, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳和测序分析, 并且进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)同源性分析。**结果** 2015 年 10—12 月呼吸 ICU 共分离 CRAB 22 株, 其中 19 株(86.36%)分离于痰。22 株 CRAB 对复方磺胺甲噁唑的耐药率为 59.09%, 对米诺环素的耐药率为 9.09%, 对多粘菌素 B 均敏感, 对其他检测抗菌药物的耐药率均为 80% 以上。PCR 扩增未检出 KPC-2、IMP、NDM-1 三种耐药基因, 而 VIM、OXA-23 阳性率均为 100%。PFGE 同源性分析结果: 22 株菌分为 13 种不同带型, 每种带型包含菌株数为 1~5 株不等, 其中 9 种带型(69.23%)分别只包含 1 株菌, 其他 4 种(30.77%)带型包含菌株数为 2~5 株不等。其中, A5、A7 和 A8 为同一型, A9、A11、A14、A19 和 A22 为同一型, A4、A10 和 A12 为同一型, A16 和 A18 为同一型。**结论** 呼吸 ICU 分离 CRAB 携带的 β -内酰胺酶耐药基因主要为 VIM、OXA-23 型基因。同源性分析证实, 有小部分为同一克隆株, 存在小范围的流行。

[关键词] 耐碳青霉烯酶; 鲍曼不动杆菌; 耐药基因; 同源性分析

[中图分类号] R378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)01-0016-05

Carriage of drug resistance genes and homology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from respiratory intensive care unit

LI Tian-jiao¹, HUANG Tao¹, WU Hua¹, SU Yu¹, FU Sheng-miao¹, FU Hui-qun¹, WANG Xu-ming¹, LONG Wen-fang² (1 Hainan General Hospital, Haikou 570311, China; 2 School of Public Health, Hainan Medical University, Hainan 570311, China)

[Abstract] **Objective** To investigate drug resistance genes and epidemic characteristics of β -lactamase carried by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in the respiratory intensive care unit (RICU) in a hospital. **Methods** Clinically isolated CRAB from RICU patients in October-December 2015 were collected. Five drug resistance genes (KPC-2, IMP, VIM, NDM-1, OXA-23) were specifically amplified by polymerase chain reaction (PCR), amplified products were performed agarose gel electrophoresis and sequencing analysis, the homology was analyzed with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** A total of 22 CRAB strains were isolated in October-December 2015, 19 (86.36%) of which were isolated from sputum. The resistance rate of 22 CRAB strains to compound sulfamethoxazole was 59.09%, resistance rate to minocycline was 9.09%, all were sensitive to polymyxin B, resistance rates to other antimicrobial agents were more than 80%. Three kinds of resistance genes KPC-2, IMP and NDM-1 were not found by PCR amplification, positive rates of VIM and OXA-23 were both 100%. PFGE homology analysis revealed that 22 strains were divided into 13 different types, each type contained 1-5 strains, 9 types (69.23%) contained only 1 strain respectively, the other 4 types (30.77%) contained 2-5 strains. A5, A7, and A8; A9, A11, A14, A19 and A22; A4, A10 and A12; A16 and A18 were of the same type respectively.

[收稿日期] 2017-02-22

[基金项目] 海南省自然科学基金(814307)

[作者简介] 李天娇(1975-), 女(汉族), 海南省海口市人, 主任技师, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 龙文芳 E-mail: hnsea2013@126.com

Conclusion The main types of β -lactamase-resistant genes of CRAB in RICU are *VIM* and *OXA-23*. Homology analysis shows a small parts are of the same clone strains, which reveals epidemic of a small scale.

[Key words] carbapenemase-resistant; *Acinetobacter baumannii*; drug resistance gene; homology analysis

[Chin J Infect Control, 2018, 17(1): 16-20]

耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)已成为医院感染中的重要病原菌之一,常引起严重的感染,特别是在免疫力低下的患者中,甚至可以引起致死性的感染^[1]。碳青霉烯类抗生素是治疗革兰阴性杆菌的最后一道防线^[2],因此,碳青霉烯类抗生素在治疗严重感染、复杂感染、多重耐药菌感染有更好的疗效,但随着该类抗生素的广泛应用,目前 CRAB 菌株日益增多,给临床治疗带来新的挑战。近年来,多地报道了急诊病房及重症监护病房(ICU)鲍曼不动杆菌的医院感染暴发流行^[3-4]。由于我院分离 CRAB 对临床常用的抗菌药物耐药性比较严重,且多来源于呼吸 ICU,因此,本研究收集呼吸 ICU 3 个月来临床患者分离的 CRAB 22 株,分析其耐药情况。碳青霉烯类抗生素耐药的分子机制主要由于外源性获得碳青霉烯酶,主要分为 B 类和 D 类酶, B 类酶又称为金属 β -内酰胺酶(MBLs),目前鲍曼不动杆菌中已被鉴别出获得性的 MBLs 有 IMP、VIM 型酶等, D 类酶为苯唑西林酶(OXA 型酶),在鲍曼不动杆菌中常见有 bla^{-OXA23}、bla^{-OXA24}、bla^{-OXA51}、bla^{-OXA58}^[5];前几年本地区的肠杆菌科细菌耐药酶基因(*NDM-1*, *KPC-2*)调查^[6]结果表明, *NDM-1* 为主要携带酶型,未发现 *KPC-2* 酶型,所以本研究选取 5 种水解碳青霉烯类抗生素常见的耐药酶基因(*KPC-2*、*IMP*、*VIM*、*NDM-1*、*OXA-23*)进行检测,了解我院呼吸 ICU CRAB 耐药酶基因的携带情况,同时利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对分离的 22 株 CRAB 进行同源性分析,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 收集 2015 年 10—12 月呼吸 ICU 临床患者送检标本分离的 CRAB 菌株 22 株(剔除同一患者检出的重复菌株),使用菌株保存管 -70℃ 保存。

1.2 试剂和仪器 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统及配套的药敏卡。PCR 扩增仪使用 E-Cycle TM 96 PCR 扩增仪;琼脂糖电泳仪为北京

六一仪器厂公司电泳仪;琼脂糖电泳成像仪使用 JS-380 自动凝胶成像系统;PCR 扩增试剂使用 2× Power Taq PCR Master Mix(BioTeke, PR1700)试剂盒,琼脂糖电泳 Marker 使用 D2000 DNA Marker (TIANGEN, MD114); PFGE 电泳仪为 Bio-rad, PFGE 图像录入 Bio Numerics 软件包进行处理。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定及药敏试验 临床分离出的细菌先按目标菌进行分纯,分纯后的单个菌落使用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统及配套的药敏卡进行菌种鉴定、药敏试验。测得的 MIC 值以 2015 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)的临界值判定敏感性,药敏结果显示亚胺培南或美罗培南对目标菌 MIC 值 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$,作为 CRAB 目标菌株收集。

1.3.2 细菌 DNA 的提取 将培养 16~18 h 的新鲜培养物悬浮于 100~200 μL 无菌去离子水中,沸水浴 10 min 以上,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液, -20℃ 保存。

1.3.3 PCR 扩增及测序 采用 PCR 法进行基因扩增,各靶基因引物序列和目的产物长度见表 1。*KPC-2* 基因引物设计参考 Genbank 中 DQ 989640.1 合成。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 30 s, 共 25 个循环,最后 72℃ 再延伸 5 min。PCR 扩增完产物经 120 V, 40 min, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察结果、拍照并将 PCR 扩增产物送上海生工生物工程公司进行测序,结果与 BLAST 进行同源性比对。由于没有 *OXA-23* 基因和 *VIM* 基因的阳性对照,为了保证 PCR 体系的完整性,在检测 *OXA-23* 基因 PCR 扩增同批体系时同时增加一个 *KPC-2*(893 bp)标本作为阳性对照(*KPC-2* 菌株由广州呼吸疾病研究所卓超教授惠赠);在 *VIM* 基因 PCR 体系中增加 *NDM-1*(292 bp)作为阳性对照,标本为本实验室保留。

1.3.4 耐药菌株同源性分析 22 株 CRAB 采用 PFGE 法进行同源性分析,实验中所用内切酶、实验条件见表 2。

表 1 CRAB 耐药基因 PCR 扩增引物序列及产物长度

Table 1 Primer sequences and product length of PCR amplification of CRAB drug resistance genes

目的基因	序列(5' - 3')	产物长度(bp)
NDM-1	F: CAGCACACTTCTATCTC	292 ^[7]
	R: CCGCAACCATCCCCTCTT	
IMP	F: TTGACACTCCATTTACTG	139 ^[8]
	R: GATGAGAATTAAGCCACTCT	
OXA-23	F: GATGTGTACATAGTATTTCGTCG	1 058 ^[9]
	R: TCACAACAATAAAAAGCACTG	
VIM	F: GATGGTGTGGTTCGCATA	390 ^[10]
	R: CGAATGCGCAGCACCAAG	
KPC-2	F: ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893
	R: TTTTCAGAGCCTTACTGCC	

表 2 22 株 CRAB PFGE 实验方法与条件

Table 2 Experimental methods and conditions of PFGE of 22 CRAB strains

名称	条件	名称	条件
Run Time 1	19 h	Ramping	linear
Initial Switch Time	5 s	起始电流	135 ma
Final Switch Time	20 s	Marker	H9812
Voltage Gradient	6 V/cm	Marker 内切酶	XbaI
Included Angle	120°	被测菌内切酶	ApaI

1.3.5 PFGE 分析方法 PFGE 图像录入 BioNumerics(Version7.1, Applied maths, Inc.) 软件包进行处理, 识别图像条带, 经统一的分子质量标准进行校准, 标定条带位置, 必要时进行手工校正。每两个图像之间的相似性系数用 Dice 系数 (Dice coefficients, SD) 表示, $SD = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, 其中 n_x 是菌株 x 的总条带数, n_y 是菌株 y 的总条带数, n_{xy} 是菌株 x 和菌株 y 共有的条带数。SD 值反映不同菌株 PFGE 图像之间的相似性程度, 范围在 0~1 之间, 0 代表完全不一样, 1 代表完全相同。出现不同条带即判定为不同的型别, 对每一个型别都进行命名。根据每两个图像之间的相似性系数, 用非加权配对算术平均法 (unweighted pair group average

method, UPGMA) 进行聚类, 构建聚类树。

2 结果

2.1 菌株标本来源分布 2015 年 10—12 月呼吸 ICU 共分离 CRAB 22 株, 其中 19 株 (86.36%) 分离于痰, 2 株 (9.09%) 分离于尿, 1 株 (4.55%) 分离于血。

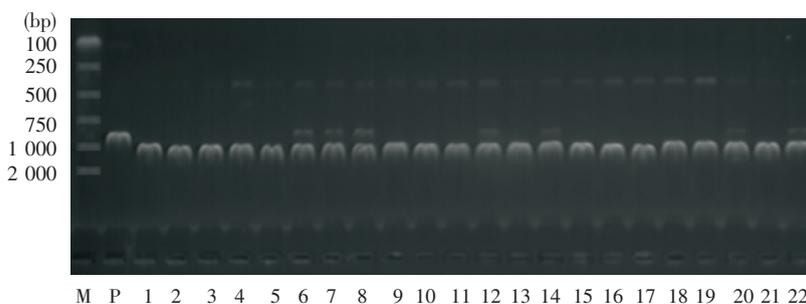
2.2 药敏试验结果 22 株 CRAB 对复方磺胺甲噁唑的耐药率为 59.09%, 对米诺环素的耐药率为 9.09%, 对多粘菌素 B 均敏感, 对其他检测抗菌药物的耐药率均在 80% 以上, 见表 3。

表 3 22 株 CRAB 的耐药结果

Table 3 Antimicrobial resistance results of 22 CRAB strains

抗菌药物	耐药株数	耐药率 (%)
氨苄西林/舒巴坦	18	81.82
哌拉西林/他唑巴坦	21	95.45
替卡西林/克拉维酸	22	100.00
头孢他啶	22	100.00
头孢吡肟	22	100.00
阿米卡星	18	81.82
庆大霉素	20	90.91
米诺环素	2	9.09
左氧氟沙星	21	95.45
环丙沙星	21	95.45
复方磺胺甲噁唑	13	59.09
多粘菌素 B	0	0.00

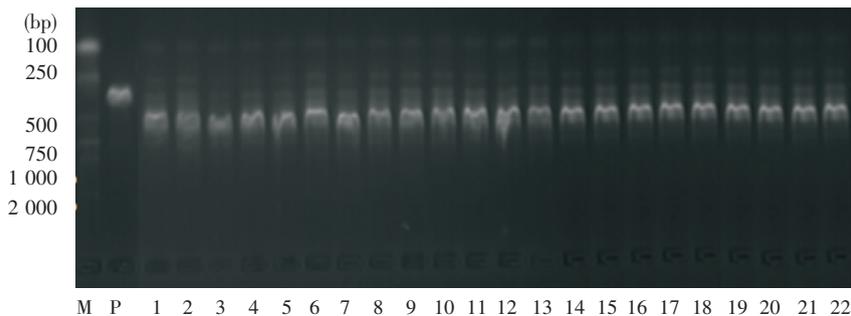
2.3 PCR 扩增及测序结果 对 22 株 CRAB 进行 PCR 扩增 *KPC-2*、*IMP*、*VIM*、*NDM-1*、*OXA-23* 基因, 结果 *KPC-2*、*IMP*、*NDM-1* 无特异性条带出现, 均为阴性; *OXA-23* 基因扩增目的条带在 1 058 处全部出现特异性条带, 阳性率为 100%; *VIM* 基因也全部出现特异性条带, 阳性率为 100%。PCR 产物送至上海生工生物工程公司进行测序, 结果在 GenBank 进行 BLAST 比对确认为 *OXA-23* 基因和 *VIM* 基因。见图 1~2。



M: marker; P: KPC-2(893 bp) 阳性对照; 1~22: 待测菌株

图 1 22 株 CRAB *OXA-23* 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR amplification results of *OXA-23* genes of 22 CRAB strains



M: marker; P: NDM-1(292 bp)阳性对照; 1~22: 待测菌株

图 2 22 株 CRAB VIM 基因 PCR 扩增电泳图

Figure 2 Electrophoresis map of PCR amplification results of VIM genes of 22 CRAB strains

2.4 PFGE 电泳结果与分析 22 株 CRAB 进行 PFGE 分型、酶切后部分 PFGE 电泳图见图 3。PFGE 图像录入 BioNumerics 软件包进行处理, 根据相似度 100% 的为同一 PFGE 型别的原则, 22 株菌分为 13 种不同带型。每种带型包含菌株数为

1~5 株不等[其中 9 种带型(69.23%) 分别只包含 1 株菌, 其他 4 种(30.77%) 带型包含菌株数为 2~5 株]。其中 A5、A7 和 A8 为同一型, A9、A11、A14、A19 和 A22 为同一型, A4、A10 和 A12 为同一型, A16 和 A18 为同一型。聚类树图结果见图 4。



图 3 22 株 CRAB 的 PFGE 电泳图

Figure 3 Electrophoresis map of PFGE of 22 CRAB strains

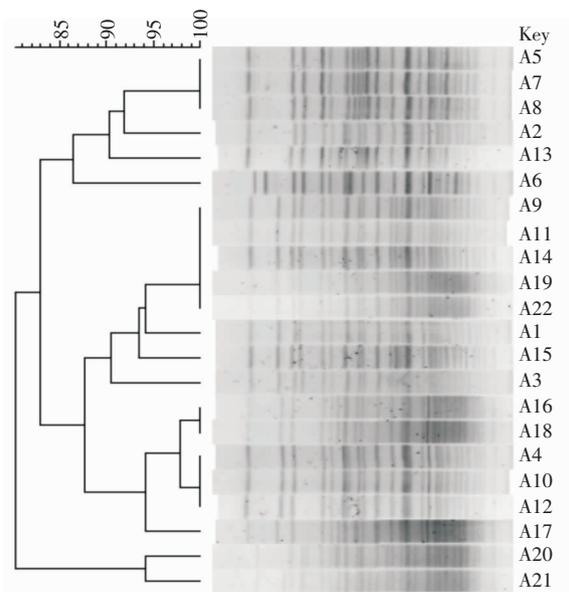


图 4 22 株 CRAB 的 PFGE 聚类树图

Figure 4 Dendrogram based on PFGE of 22 CRAB strains

3 讨论

CRAB 已成为我国医院感染最重要的病原菌, 吸痰器、呼吸机、空调、输液系统均可被污染而将病原菌传播给患者, 鲍曼不动杆菌以下呼吸道感染最为常见^[11]。我院呼吸 ICU 分离的 CRAB 也主要来源于下呼吸道, 对临床常用的抗菌药物耐药性比较严重, 除了对多粘菌素 B 均为敏感和对米诺环素的耐药率为 9.09% 外, 对大多抗菌药物的耐药率均 > 80%, 特别是对 β -内酰胺类的药物均耐药, 因此, 治疗 CRAB 感染的抗菌药物选择非常有限。

近年来, 鲍曼不动杆菌成为继铜绿假单胞菌之后的分离最多的非发酵菌, 是引起医院感染的重要条件病原菌。而 CRAB 对抗菌药物耐药的机制具有多样性和繁复性, 据文献^[12] 报道, 耐药机制主要

是抗菌药物诱导细菌产生 β -内酰胺酶的水解酶,能够水解亚胺培南或美罗培南中的 β -内酰胺环,使酰胺键断裂而失去抗菌活性,出现了耐碳青霉烯类的多重耐药菌。为了进一步了解我院 CRAB 的耐药机制,本实验选取 KPC-2、IMP、VIM、NDM-1、OXA-23 共 5 种耐药及介导耐药基因进行检测,结果未检测到 KPC-2、IMP、NDM-1 基因,OXA-23 基因和 VIM 基因阳性均为 100%。OXA-23 型酶和 VIM 型酶能水解头孢菌素类及碳青霉烯类抗生素,据研究^[13]报道 OXA-23 型酶是引起鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因之一,全国 12 所三级甲等医院 2007 年 7 月—2008 年 6 月 CRAB 的 OXA-23 阳性率为 80.4%;四川省某医院对 48 株 CRAB 进行耐药基因检测,其中 OXA-23 占比 70.8%,VIM 携带率为 31.3%^[14];天津市第三中心医院的一次院内调查结果也表明 CRAB 的耐药基因 OXA-23 为 80.3%^[15]。本次实验 22 株 CRAB 携带的 OXA-23 基因和 VIM 基因总检出率是 100%,比上述国内其他地区报道的携带的 OXA-23、VIM 耐药基因阳性率均高,特别是 VIM 耐药基因阳性率也达 100%,远高于四川某医院报道的 31.3%,可能为地域之间的差异或是菌株数较少而造成统计上的局限性,但提示 OXA-23 和 VIM 型酶仍是我院 CRAB 的主要流行酶型。

鲍曼不动杆菌具有在体外长期存活的能力,易引起克隆播撒,由于 CRAB 对包括碳青霉烯类的大多数抗菌药物耐药,同一克隆株在同一病区及不同病区间的播散是其容易暴发的主要原因^[16]。为明确我院呼吸 ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌是否有暴发的趋势,本研究重点收集呼吸 ICU 的 22 株 CRAB 进行同源性分析,22 株菌分为 13 种不同带型。每种带型包含菌株数为 1~5 株不等,其中 9 种带型(69.23%)分别只包含 1 株菌,其他 4 种(30.77%)带型包含菌株数为 2~5 株不等。其中 A5、A7 和 A8 为同一型,A9、A11、A14、A19 和 A22 为同一型,A4、A10 和 A12 为同一型,A16 和 A18 为同一型。总体来看,所有菌株的相似度较高,相似度均大于 80%,可能是菌株大多来源于痰的原因。对于 100%相似的菌株,可以考虑为同一克隆株,说明呼吸 ICU 有 CRAB 小范围的暴发流行。由于 CRAB 常常通过医护人员的手、污染的医疗器械和空气等途径引起医院感染的暴发流行,病死率高,所造成的经济损失大,后果严重,应引起医院感染管理部门、临床微生物室及其他医院相关管理部门的高

度重视^[17],加强医院感染管理,合理应用抗菌药物,医护人员严格无菌操作、加强消毒隔离措施,预防耐药菌株在医院内大范围的暴发流行。

[参 考 文 献]

- [1] 凌月明,蔡媛媛,王建福,等.鲍曼不动杆菌临床分布、易感因素及耐药情况分析[J].检验医学与临床,2014,11(2):212-213.
- [2] 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.
- [3] 伍国强,梁海云,李朝阳,等.急诊住院病房多重耐药鲍曼不动杆菌医院内感染暴发的原因调查及控制对策[J].现代医药卫生,2014,30(9):1322-1324.
- [4] 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.
- [5] Brown S, Amyes S. OXA(beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(1): 1-3.
- [6] 李天娇,李成学,陈淑萍,等.海南 9 株携带 blaNDM-1 基因肠杆菌科细菌的分离和确认[J].中华检验医学杂志,2014,37(1):36-40.
- [7] 郑波,吕媛,李耘.携带 blaNDM-1 基因泛耐药肠杆菌科细菌的检测方案[J].中国临床药理学杂志,2010,26(11):845-848.
- [8] Xiong J, Alexander DC, Ma JH. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(8): 3775-3782.
- [9] 余琳,苏丹虹,江凤茹,等.多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因分析与同源性分析[J].实用医学杂志,2013,29(12):2018-2021.
- [10] 唐慧琴,陈定强,吴爱武.耐亚胺培南铜绿假单胞菌的金属 β -内酰胺酶检测[J].中国卫生检验杂志,2014,24(6):831-833.
- [11] 吴震宇,方玉才,洪钟亮.鲍曼不动杆菌的临床分布特征及耐药性分析[J].临床合理用药杂志,2014,7(9):17-18.
- [12] Chen Y, Lu Y, Yin Y, et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant blaOXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* ST381 isolate from China[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2015, 3(4): 300-301.
- [13] 马序竹,吕媛,张佳,等.耐亚胺培南鲍曼不动杆菌耐药性及 OXA 碳青霉烯酶检测[J].中国临床药理学杂志,2011,27(4):268-271.
- [14] 李光荣,宋敏,杨建波,等.碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌耐药基因的研究[J].中国全科医学,2014,17(26):3083-3087.
- [15] 段樱,张健东,王军,等.PCR 检测鲍曼不动杆菌的耐碳青霉烯 OXA-23 基因[J].广东医学,2011,32(9):1169-1171.
- [16] 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.
- [17] 胡必杰,宗志勇,顾克菊,等.多重耐药菌感染控制最佳实践[M].上海:上海科学技术出版社,2012:21-22.