

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20195350

· 论 著 ·

某院 CRAB 同源性及其生物膜形成能力分析

曾 婷^{1,2}, 曾 凌^{1,2}, 曹先伟³, 邓 琼³, 张 杰⁴

(1. 南昌大学公共卫生学院, 江西 南昌 330006; 2. 江西省预防医学重点实验室, 江西 南昌 330006; 3. 南昌大学第一附属医院医院感染管理科, 江西 南昌 330006; 4. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330006)

[摘要] **目的** 分析某院耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(CRAB)的耐药特性、主要流行克隆型及生物膜形成能力, 为更好地防控 CRAB 感染提供参考。**方法** 收集该院 32 株非重复 CRAB 菌株, 采用全自动微生物分析系统进行药敏检测, 结晶紫染色法检测 CRAB 生物膜形成能力, 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析 CRAB 克隆多态性。**结果** 32 株 CRAB 对四环素的耐药率最低(68.6%), 对其他药物的耐药率均>78%。PFGE 同源性结果显示, 32 株 CRAB 可分为 9 个(A~I 型)不同克隆型, 每个克隆型包括 1~9 株, 主要的流行克隆型是 A 型(9 株)和 E 型(7 株)。32 株 CRAB 中, 14 株(43.8%)有生物膜形成能力且均为弱阳性; 各克隆型间生物膜形成能力比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 6.636, P = 0.659$)。随着生物膜形成能力的增强, 耐药率均有不同程度地升高, 但产膜菌与非产膜菌两组间仅庆大霉素耐药率比较, 差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.879, P < 0.05$)。**结论** 该院 CRAB 存在以 A 型和 E 型为主的不同克隆型传播, 生物膜形成能力的增强能提高菌株的耐药性。

[关键词] 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌; 耐药性; 抗药性, 微生物; 同源性; 生物膜

[中图分类号] R181.3⁺2 R378

Homology and biofilm-forming ability of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a hospital

ZENG Ting^{1,2}, ZENG Ling^{1,2}, CAO Xian-wei³, DENG Qiong³, ZHANG Jie⁴ (1. School of Public Health, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Preventive Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Department of Healthcare-associated Infection Management, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 4. Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the resistance characteristics, main epidemic clones and biofilm formation ability of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in a hospital, and provide reference for better prevention and control of CRAB infection. **Methods** 32 non-repetitive CRAB strains were collected from the hospital, antimicrobial susceptibility was detected by automatic microbiological analysis system, biofilm formation ability was detected by crystal violet staining, polymorphism of CRAB clones was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Resistance rate of 32 CRAB strains to tetracycline was the lowest (68.6%) and to other antimicrobial agents were all>78%. PFGE homology results showed that 32 CRAB strains could be divided into 9 different clone types (type A-I), each clone type consisted of 1-9 strains, the main prevalent clones were type A ($n = 9$) and type E ($n = 7$). Of 32 CRAB strains, 14 (43.8%) had biofilm formation ability and were weakly positive; there was no significant difference in biofilm formation ability among different clones ($\chi^2 = 6.636, P = 0.659$). With the enhancement in biofilm formation ability, antimicrobial resistance rate increased in varying degree, but only gentamicin re-

[收稿日期] 2019-08-10

[基金项目] 江西省科学技术厅重点项目(20152ACG70015); 江西省研究生创新专项资金资助项目(YC2018-S103)

[作者简介] 曾婷(1993-), 女(汉族), 江西省萍乡市人, 研究生, 主要从事医院感染相关研究。

[通信作者] 曹先伟 E-mail: ndyfygk@163.com

sistance rate between biofilm formation strains and biofilm non-formation strains was significantly different ($\chi^2 = 4.879, P < 0.05$). **Conclusion** There are different clonal transmission of CRAB in this hospital, mainly type A and E, enhancement in biofilm formation ability can increase the drug resistance of strains.

[Key words] carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; drug resistance, microbial; homology; biofilm

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, AB) 是一种非发酵革兰阴性杆菌,能够引起广泛的医院感染。碳青霉烯类药物具有广泛的抗菌谱和较强的抗菌活性,是治疗 AB 首选药物。随着碳青霉烯类药物的普遍使用,以及 AB 固有的或获得性耐药特性,导致了耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 (carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB) 的克隆广泛流行^[1]。CHINET 监测网监测结果显示,AB 对美罗培南和亚胺培南的耐药率从 2014 年的 66.7% 和 62.4%, 分别上升至 2018 年的 78.1% 和 77.1%^[2]。AB 的耐药与其具有生物膜形成能力有关,研究^[3]显示,42% 的临床分离菌具有生物膜形成能力,且大部分产膜菌为多重耐药菌,生物膜形成能力在不同克隆菌株之间也存在差异^[4],给临床防控 CRAB 带来了更大的挑战。对某院 32 株 CRAB 进行研究,旨在了解 CRAB 主要流行克隆型和生物膜形成能力,以及生物膜形成能力与克隆型、耐药率之间的关系,以期完善 CRAB 的防控措施,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2017 年 2—10 月某三甲综合医院各临床科室送检分离的 32 株非重复 CRAB 菌株,所有菌株均经 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统鉴定。

1.1.2 药敏纸片 抗菌药物纸片主要有头孢哌酮/舒巴坦、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、阿米卡星、哌拉西林、四环素、替卡西林/克拉维酸、头孢他啶、头孢吡肟、环丙沙星、庆大霉素、美罗培南、妥布霉素。

1.1.3 主要仪器与试剂 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪及配套的药敏纸片、恒温培养箱、比浊仪、摇床、PFGE 电泳仪、酶标仪、凝胶成像系统、96 孔聚苯乙烯灭菌板、磷酸盐缓冲液 (PBS)、无水乙醇、1% 结晶紫、限制性内切酶 XbaI 和 ApaI、PFGE 专用琼脂糖凝胶。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 试验菌株纯化后采用 VITEK 2

Compact 全自动微生物分析系统进行药物敏感性检测,参照美国临床实验室标准化协会^[5] (CLSI) 2018 年版制定的标准对检测结果进行判读。大肠埃希菌 ATCC 25922 为质控菌株。

1.2.2 PFGE 同源性分析 将 37℃ 培养过夜的 CRAB 菌落刮置 CSB 缓冲液中,用比浊仪调整菌悬液的浓度,菌悬液经 1% Seakem Gold 琼脂糖凝胶包被、蛋白酶 K 消化和限制性内切酶 ApaI 酶切后在 CHEF-DR II 电泳仪中进行脉冲场凝胶电泳。电泳条件:缓冲液温度 14℃,电场强度 6 V/cm,电场夹角 120 度,脉冲转换时间 2.2~63.8 s,电泳时间 16 h。电泳结束后用 GelRed 核酸染料染色,在凝胶成像系统下观察并拍照保存。参照美国疾病控制与预防中心 (CDC) 研究员 Tenover^[6] 推荐的方法对 PFGE 结果进行判读:条带完全一致定义为同一型别,1~3 条条带存在差异定义为同一型别的不同亚型,3 条以上条带存在差异定义为不同型别。使用 BioNumerics 软件对 PFGE 图谱进行聚类分析,绘制树状图。

1.2.3 结晶紫染色法测定生物膜形成能力 参照相关文献^[7-8],将处于对数生长期的 32 株 CRAB 菌落接种于 96 孔聚苯乙烯灭菌板中,200 μ L/孔,3 孔/株,空白培养基作为阴性对照。将 96 孔板置于 37℃ 恒温箱中培养 48 h 后,小心地将菌液吸出,磷酸盐缓冲液 (PBS) 反复清洗,室温晾干后每孔加入 200 μ L 的 1% 结晶紫染液染色 20 min,灭菌蒸馏水将染液洗净,室温晾干后每孔加入 200 μ L 无水乙醇溶解结晶紫 10 min,用酶标仪测定每孔在 570 nm 处的吸光度 (A) 值,以 3 孔 A 值的平均值为每株菌的最终 A 值。生物膜形成能力结果判定^[9]:测定空白培养基的最终 A 值,定义 $A_c = A + 3S$,将待测菌株的最终 A 值与 A_c 进行比较,阴性 (-): $A \leq A_c$, 无被膜形成;弱阳性 (+): $A_c < A \leq 2A_c$, 弱被膜形成;中等阳性 (++) : $2A_c < A \leq 4A_c$, 中等被膜形成;强阳性 (+++) : $A > 4A_c$, 强被膜形成。

1.3 统计方法 应用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,计数资料采用构成比描述, χ^2 检验或秩和检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株来源 32 株 CRAB 分离自 32 例患者,其中男性 26 例(81.3%),女性 6 例(18.7%),平均年龄(51.34 ± 19.54)岁,45~60 岁患者 13 例(40.6%)。CRAB 标本主要分离自痰(46.9%),科室主要分布于新生儿重症监护病房(NICU,43.8%)。见表 1。

2.2 PFGE 电泳结果 PFGE 图谱经聚类分析结果显示,32 株 CRAB 可分为 9 个不同克隆型,分别为 A~I 型,A 型为主要克隆型(9 株),E 型 7 株,B 型和 C 型各 4 株,D 型、F 型和 G 型各 2 株,H 型和 I 型各 1 株。见图 1。

2.3 生物膜形成结果 阴性对照组 $A_c = A + 3S = 0.080 + 3 \times 0.007 = 0.101$,将 32 株 CRAB 的最终 A 值与 A_c 值比较,结果显示有 14 株具有生物膜形成能力,占 43.8%,且均为弱阳性。

2.4 生物膜形成能力与不同克隆型的分析 将不同克隆型内各菌株最终 A 值与 A_c 值比较,各克隆型菌株的生物膜形成能力见表 2。各克隆型间生物膜形成能力比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 6.636, P = 0.659$)。

表 1 32 例 CRAB 感染患者基本特征

Table 1 Basic characteristics of 32 patients with CRAB infection

项目	例数	构成比(%)
性别		
男	26	81.3
女	6	18.7
年龄(岁)		
0~	2	6.3
18~	9	28.1
45~	13	40.6
≥60	8	25.0
标本来源		
痰	15	46.9
血	6	18.7
脑脊液	5	15.6
引流液	2	6.3
其他标本	4	12.5
科室分布		
NICU	14	43.8
ICU	5	15.6
烧伤科	5	15.6
神经外科	2	6.3
其他科室	6	18.7

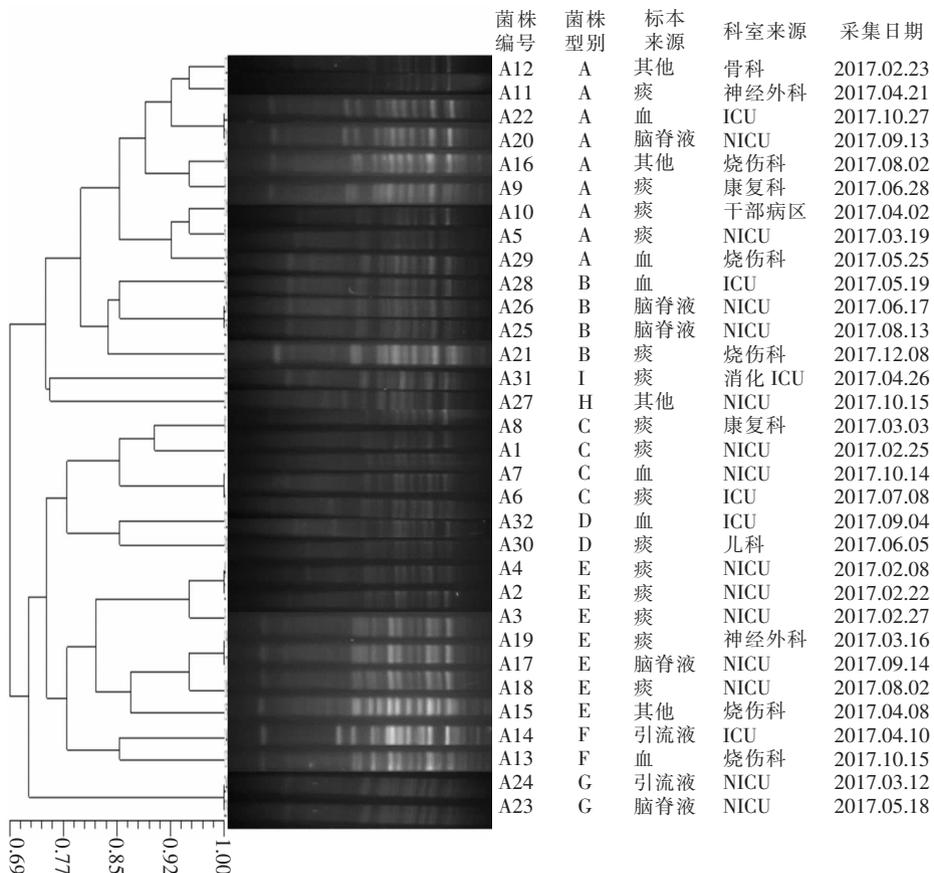


图 1 32 株 CRAB 的 PFGE 聚类分析结果

Figure 1 PFGE cluster analysis on 32 CRAB strains

表 2 不同 CRAB 克隆型生物膜形成能力分布

Table 2 Distribution of biofilm formation ability of different CRAB clones

克隆型别	生物膜形成能力	
	阴性	弱阳性
A	6	3
B	1	3
C	3	1
D	1	1
E	4	3
F	1	1
G	2	0
H	0	1
I	0	1
合计	18	14

表 3 32 株 CRAB 生物膜形成能力与耐药性分析

Table 3 Analysis on biofilm formation ability and drug resistance of 32 CRAB strains

抗菌药物	生物膜阴性组 ($n=18$)		生物膜弱阳性组 ($n=14$)		χ^2	P
	耐药	耐药率 (%)	耐药	耐药率 (%)		
哌拉西林	16	88.9	14	100.0	0.305	0.581
替卡西林/克拉维酸	16	88.9	14	100.0	0.305	0.581
头孢哌酮/舒巴坦	14	77.8	13	92.9	0.455	0.500
庆大霉素	11	61.1	14	100.0	4.879	0.027
阿米卡星	14	77.8	12	85.7	0.013	0.909
四环素	10	55.6	12	85.7	2.078	0.149
左氧氟沙星	15	83.3	13	92.9	0.073	0.788
复方磺胺甲噁唑	13	72.2	14	100.0	2.743	0.098

3 讨论

AB 对外界环境适应能力强,能够长期存在于空调、病床、导管、呼吸机等环境中,可引起血流感染、泌尿系统感染和医院获得性肺炎等^[10]。目前,AB 因多重耐药和高检出率被认为是威胁全球卫生保健系统的七大病原体之一^[11],引起了人们的广泛关注。本研究 32 例 CRAB 患者平均年龄为(51.34 ± 19.54)岁,标本主要分离于痰,提示呼吸系统是 CRAB 最容易感染的部位。32 株 CRAB 均为多重耐药菌,对常用抗菌药物的耐药率均高于 65%,限制了其感染临床治疗的药物选择。

PFGE 具有结果稳定、重复性好、分辨率高、易于标准化等优点,是国际上公认的分子生物学分型

技术的“金标准”,被广泛用于鉴定感染暴发或追踪流行^[12]。PFGE 研究结果显示,32 株 CRAB 可分为 9 个不同克隆型,分别为 A~I 型,A 型为主要克隆型(9 株),E 型 7 株,B 型和 C 型各 4 株,D 型、F 型和 G 型各 2 株,H 型和 I 型各 1 株。E 型的 A2 菌株和 A3 菌株均为 NICU 患者,且住院时间有交叉,提示在 NICU 出现了同型别 CRAB 的感染,造成此现象可能与共用医疗器械相关。A 型菌株传播的时间跨度最长,从 2017 年 2 月 23 日首次检测到 2017 年 10 月 27 日末次检出长达 8 个月,提示 A 型菌株长期存在于医院,并通过某些途径造成了交叉感染,但当时并未及时追踪溯源。为减少 CRAB 的交叉感染,应进一步加强医院环境的清洁与消毒,严格执行手卫生,完善接触隔离制度,医务人员应严格遵守无菌操作和感染控制规范^[13]。

2.5 生物膜形成能力与耐药性分析 32 株 CRAB 对 13 种药物均具有较高的耐药率,其中耐药率最低的是四环素(68.6%),对妥布霉素、美罗培南、头孢他啶、环丙沙星、头孢吡肟的耐药率均为 100%。CRAB 对庆大霉素、阿米卡星、复方磺胺甲噁唑、头孢哌酮/舒巴坦、左氧氟沙星、哌拉西林、替卡西林/克拉维酸的耐药率分别为 78.1%、81.3%、84.4%、84.4%、87.5%、93.8%、93.8%,随着生物膜形成能力的增强,耐药率均有不同程度地升高,但两组间仅庆大霉素耐药率比较,差异具有统计学意义($\chi^2 = 4.879, P < 0.05$)。见表 3。

生物膜是指不可逆地黏附在物体表面,并被细菌自身基质包裹的细菌群落^[14]。本研究使用结晶紫染色法对 32 株 CRAB 进行检测,发现其中 14 株具有生物膜形成能力且均为弱阳性。不同克隆型间生物膜的形成能力差异无统计学意义,与尹珍等^[4]研究结果不一致,可能是不同地区间 CRAB 的传播差异所致。将生物膜阴性组和阳性组比较,发现阳性组的耐药率均有不同程度地升高,与相关研究^[15-16]结果一致。具有生物膜形成能力的 CRAB 可通过以下两种机制提高细菌耐药性^[17-18]:(1)生物膜的渗透限制,生物膜中高密度的细菌可以产生阻碍抗菌药物渗透的细胞外基质;(2)生物膜的营养限制,生物膜中的细菌维持在低代谢和缓慢生长的状态,使其对外界刺激如抗菌药物不敏感。掌握 CRAB 生物膜的产生与否,以及产膜菌的耐药模式,有助于完善抗菌药物使用政策。临床上应提高生物膜检测水平,更合理的选择抗菌药物,减少耐药发生^[19]。

综上所述,该院 CRAB 耐药形势严峻,且存在以 A 型和 E 型为主的不同克隆型传播,生物膜形成能力的增强能提高菌株的耐药性,治疗时应优先选择具有清除生物膜作用的抗菌药物,减少 CRAB 医院感染的发生。

[参 考 文 献]

- [1] 林云万,周勇,张旭,等.广州市 ICU 环境中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的克隆相关性[J].中国感染控制杂志,2018,17(4):294-298.
- [2] 全国细菌耐药监测网.鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药变迁[EB/OL]. [2019-08]. <http://www.chinets.com/Data/GermYear>.
- [3] Gurung J, Khyriem AB, Banik A, et al. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit[J]. *Indian J Crit Care Med*, 2013, 17(4): 214-218.
- [4] 尹珍,黄文祥,杨均均,等.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌流行克隆株生物被膜形成能力分析[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(2):184-189.
- [5] Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. CLSI, M100: 2018.
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, 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.
- [7] 王政,刘丁,黄冬梅,等.鲍曼不动杆菌临床分离株生物被膜形成能力与耐药性的研究[J].中国病原生物学杂志,2010,5(6):405-407,396.
- [8] 赖其伟,黄丽芳.鲍曼不动杆菌生物被膜与耐药性的相关性分析[J].国际检验医学杂志,2016,37(2):153-154.
- [9] Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, et al. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 38(5): 428-432.
- [10] 李天娇,黄涛,吴华,等.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[J].中国感染控制杂志,2018,17(1):16-20.
- [11] Qi L, Li H, Zhang C, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 483.
- [12] 何磊,邱景富.62 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的同源性分析[J].中国感染控制杂志,2018,17(4):299-303.
- [13] 陈佰义,何礼贤,胡必杰,等.中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J].中国医药科学,2012,2(8):3-8.
- [14] Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13: 47.
- [15] Rao RS, Karthika RU, Singh SP, et al. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2008, 26(4): 333-337.
- [16] Badave GK, Kulkarni D. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*; an emerging challenge [J]. *J Clin Diagn Res*, 2015, 9(1): DC08-DC10.
- [17] 韩欣欣,李庆淑,申丽婷,等.鲍曼不动杆菌生物膜形成能力与生物膜相关基因及耐药性之间的关系[J].中华危重病急救医学,2014,26(9):639-643.
- [18] Liu H, Wu YQ, Chen LP, et al. Biofilm-related genes: Analyses in multi-antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Mainland China [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 1801-1807.
- [19] 商安全,魏军,张伟,等.颅内感染的鲍曼不动杆菌耐药性与生物膜相关性分析[J].现代预防医学,2016,43(20):3768-3771,3840.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:曾婷,曾凌,曹先伟,等.某院 CRAB 同源性及其生物膜形成能力分析[J].中国感染控制杂志,2019,18(9):814-818. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20195350.

Cite this article as: ZENG Ting, ZENG Ling, CAO Xian-wei, et al. Homology and biofilm-forming ability of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a hospital [J]. *Chin J Infect Control*, 2019, 18(9): 814-818. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195350.