

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 12. 011

桂西地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药情况和 β-内酰胺酶基因分型分析*

陆青兰, 韦必晓, 李 皇[△], 张耀平

(广西壮族自治区百色市人民医院检验科 533000)

摘 要:目的 探讨桂西地区临床分离鲍曼不动杆菌的耐药情况和碳青霉烯耐药菌株的 β-内酰胺酶基因分型,为临床抗感染治疗和耐药性控制提供参考。**方法** 收集该院临床感染患者标本培养分离出的鲍曼不动杆菌 526 株。采用 K-B 纸片扩散法测定其对 14 种抗菌药物的耐药性;提取细菌 DNA 进行 PCR 扩增,检测耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的基因分布情况。**结果** 526 株鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药率为 11.6% (61/526),对氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星均有不同程度的耐药。61 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌对上述抗菌药物全部耐药,均能检测到 β-内酰胺酶基因。鲍曼不动杆菌基因 ADC、OXA-51、Ampc、OXA-23、TEM、CTX-M-2、PER、SHV、NDM-1 阳性率分别为 96.70%、95.08%、95.08%、72.13%、58.00%、3.28%、1.64%、1.64%、1.64%,未检出的基因为 OXA-24、OXA-58、CTX-M-1、IMP、VIM。**结论** 桂西地区患者感染的鲍曼不动杆菌耐药形势严峻,耐碳青霉烯类菌株能产生不同类型 β-内酰胺酶基因,其中以 Ampc、ADC、OXA-51 为主,OXA-23、TEM 次之。

关键词:鲍曼不动杆菌; β-内酰胺酶; 耐药性; 基因分型

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)12-1665-04

Drug resistance and genotyping of β-lactamase of *Acinetobacter baumannii* resistant to carbapenems in western Guangxi*

LU Qinglan, WEI Bixiao, LI Huang[△], ZHANG Yaoping

(Department of Clinical Laboratory, Baise People's Hospital, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistance of *Acinetobacter baumannii* and the genotyping of β-lactamase gene in the clinical isolates of *Acinetobacter* in western Guangxi, and to provide reference for clinical anti-infection treatment and drug resistance control. **Methods** A total of 526 strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical infected patients in Baise people's hospital were collected. The resistance to 14 antimicrobial agents was determined by K-B disk diffusion method, and the PCR amplification of bacterial DNA was carried out to detect the gene distribution of carbapenems-resistant strains. **Results** The resistance rates of 526 strains of *Acinetobacter baumannii* to imipenem was 11.6% (61/526), and showed different degrees of resistance to SAM, TZP, CAZ, CTX, CRO, SCF, FEP, MEM, AMK, GEN, CIP, LVX, respectively. The β-lactamase gene could be detected in 61 strains of carbapenems resistant strains, almost all of which were resistant to the antibiotics mentioned above. The positive genes rates of ADC, OXA-51, Ampc, OXA-23, TEM, CTX-M-2, PER, SHV and NDM-1 in *Acinetobacter baumannii* were 96.70%, 95.08%, 95.08%, 72.13%, 58.00%, 3.28%, 1.64%, 1.64%, 1.64%, respectively. OXA-24, OXA-58, CTX-M-1, IMP, VIM genes were not found. **Conclusion** The resistance of *Acinetobacter baumannii* in western Guangxi is severe, and carbapenems-resistant strains can produce different types of β-lactamase genes. Among them, Ampc, ADC and OXA-51 are the main genotypes, followed by OXA-23, TEM.

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

鲍曼不动杆菌是一种革兰阴性非发酵菌,广泛分布于自然界、人体和医院中^[1]。随着 β-内酰胺类抗菌药物的大量使用和选择性压力的不断增加,多重耐药

鲍曼不动杆菌的分离率逐年上升,已成为医院内感染的重要病原体之一^[2]。有研究者连续 7 年对鲍曼不动杆菌的耐药性变迁进行追踪发现,该病菌对亚胺培

* 基金项目:广西壮族自治区百色市人民医院基金项目(Z2014006)。

作者简介:陆青兰,女,主管技师,主要从事微生物分子诊断方面的研究。△ 通信作者,E-mail:309174299@qq.com。

南的耐药率从 2005 年的 5% 上升至 2011 年 87%, 有显著的上升趋势^[3]。临床各科室特别是重症监护病房、脑外科、呼吸科、骨伤科等都已 有 鲍 曼 不 动 杆 菌 耐 药 株 病 例, 特 别 是 耐 碳 青 霉 烯 类 鲍 曼 不 动 杆 菌 对 目 前 的 几 乎 所 有 抗 菌 药 物 耐 药, 给 患 者 的 临 床 治 疗 带 来 很 大 的 困 难。本 研 究 旨 在 了 解 本 院 耐 碳 青 霉 烯 类 鲍 曼 不 动 杆 菌 耐 药 的 情 况 及 其 与 β -内 酰 胺 类 耐 药 基 因 的 相 关 性, 为 临 床 抗 感 染 治 疗 和 耐 药 性 控 制 提 供 参 考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月 临 床 标 本 分 离 的 鲍 曼 不 动 杆 菌 共 526 株, 所 有 菌 株 均 经 VITEK 2-Compact 全 自 动 微 生 物 鉴 定 系 统 鉴 定, 其 中 耐 碳 青 霉 烯 类 鲍 曼 不 动 杆 菌 共 61 株 (剔 除 重 复 分 离 自 同 一 患 者 菌 株)。61 例 耐 碳 青 霉 烯 类 鲍 曼 不 动 杆 菌 感 染 者 中 男 48 例, 女 15 例; 年 龄 1~84 岁, 中 位 年 龄 55.6 岁; 菌 株 来 自 痰 液 标 本 45 例, 创 面 10 例, 尿 液 6 例; 来 自 颅 脑 外 科 10 例, 重 症 监 护 病 房 40 例, 呼 吸 内 科 1 例, 骨 外 科 1 例, 肛 肠 外 科 6 例, 康 复 科 2 例, 感 染 科 1 例。经 VITEK 2-Compact 药 敏 系 统 与 K-B 纸 片 扩 散 法 确 认 菌 株 均 对 亚 胺 培 南 或 者 美 罗 培 南 耐 药。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 药敏试验采用 K-B 纸片扩散法; 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853, 均购自原卫生部临床检验中心。结果判断根据 2015 年美国临床和实验室标准协会 (CLSL) 制定的标准判断结果。MH 琼脂和药敏纸片分别为安图生物科技有限公司和英国 OXOID 公司产品。

1.2.2 细菌 DNA 模板制备 采用上海生工 DNA 提取试剂盒, 挑选纯培养菌落置于 0.5 mL 离心管内 (内置 50 μ L 裂解液和蛋白酶 K 的混合物), 在 PCR 仪上 55 $^{\circ}$ C 消化 1 h 后 95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 以破坏裂解液内的蛋白酶 K, 随后每管补充 200 μ L 蒸馏水, 得到 DNA 模板液, 置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.3 基因检测 采用 PCR 法检测各 β -内酰胺酶基因, 包括 TEM、PER、SHV、CTX-M-1、CTX-M-2、Ampc、ADC、OXA-23、OXA-24、NDM-1、IMP、VIM、OXA-51、OXA-58, 靶基因引物序列见表 1。各靶基因 PCR 引物序列和阳性对照 DNA 均由上海生工生物工程股份有限公司提供, 总反应体积 25 μ L (其中模板液 5 μ L)。PCR 扩增热循环参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 60 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 之后在紫外凝胶电泳成像仪下观察记录结果。

表 1 靶基因 PCR 引物序列及扩增结果 (n=61 株)

目的基因		引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
TEM	P1	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1 080	55
	P2	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		
PER	P1	ATGAATGTCATTATAAAAGC	925	45
	P2	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA		
SHV	P1	GGTTATGCGTTATATCGCC	865	55
	P2	TTAGCGTTGCCAGTGTTT		
CTX-M-1	P1	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG	946	50
	P2	GGCCCATGGTTAAAAAATCACTGC		
CTX-M-2	P1	ATGATGACTCAGAGCATTCG	866	55
	P2	TGGGTTACGATTTTCGCCGC		
Ampc	P1	CGACAGCAGGTGGAT	513	51
	P2	GGTTAAGGTTGGCATG		
ADC	P1	GGTATGGCTGTGGGTGTTATTC	445	54
	P2	CTAAGACTTGGTCGAAAGGT		
OXA-23	P1	GATGTGTCATAGTATTTCGTCGT	1 058	50
	P2	TCACAACAATAAAAGCACTGT		
OXA-24	P1	TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC	1 058	50
	P2	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC		
NDM-1	P1	GGCGGAATGGCTCATCACGA	287	45
	P2	CGCAACACAGCCTGACTTTC		
IMP	P1	CATGGTTTGGTGTTCTTGT	678	50

续表 1 靶基因 PCR 引物序列及扩增结果 (n=61 株)

目的基因		引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)
VIM	P2	ATAATTTGGCGGACTTTGGC	780	50
	P1	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC		
	P2	TGCTACTCAACGACTGAGCG		
OXA-51	P1	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	50
	P2	TGCATTGCACTTCATCTTGG		
	P1	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG		
OXA-58	P1	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	843	55
	P2	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		

1.2.4 阳性基因测序 选择各基因阳性产物 1~2 株,委托上海生工生物工程股份有限公司使用美国应用生物系统公司的 ABL 3730 型毛细管全自动测序仪进行测序。

1.2.5 测序结果比对分析 采用 Chromas 读序工具软件,所得测序结果采用 Chromas 直接作 BLAST 比对分析。

2 结 果

2.1 药敏试验分析结果 所分离 526 株鲍曼不动杆菌和耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的药敏情况见表 2。

表 2 526 株鲍曼不动杆菌药敏试验结果 (%)

抗菌药物	受试菌株 (n=526)		耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 (n=61)	
	耐药率	中介率	耐药率	中介率
SAM	20.7	4.0	84.5	14.4
TZP	16.9	4.4	80.8	16.2
CAZ	24.0	8.6	99.0	0.0
CTX	30.8	22.2	86.5	13.5
CRO	26.8	53.6	100.0	0.0
SCF	8.0	4.0	56.5	10.6
FEP	20.5	5.7	89.9	10.1
IPM	11.6	0.0	100.0	0.0
MEM	11.6	0.0	100.0	0.0
AMK	17.5	1.3	81.3	9.9
GEN	24.3	0.4	98.0	2.0
CIP	25.5	0.8	99.0	0.0
LVX	23.0	1.1	94.9	0.0
MH	4.2	0.8	18.5	1.5

注: SAM 为氨苄西林/舒巴坦, TZP 为哌拉西林/他唑巴坦, CAZ 为头孢他啶, CTX 为头孢噻肟, CRO 为头孢曲松, SCF 为头孢哌酮/舒巴坦, FEP 为头孢吡肟, IPM 为亚胺培南, MEM 为美罗培南, AMK 为阿米卡星, GEN 为庆大霉素, CIP 为环丙沙星, LVX 为左氧氟沙星, MH 为米诺环素

2.2 耐药基因检测 对 61 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药基因进行检测,每株耐药菌株均能检出不同类型的 β -内酰胺酶基因。结果显示, ADC、OXA-51、Ampc、OXA-23、TEM、CTX-M-2、PER、SHV、

NDM-1 阳性率分别为 96.70%、95.08%、95.08%、72.13%、58.00%、3.28%、1.64%、1.64%、1.64%,未检出的基因为 OXA-24、OXA-58、CTX-M-1、IMP、VIM。

在 61 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌中,50 株检出 OXA-51 基因,26 株检出 OXA-23 基因,同时携带 OXA-51 和 OXA-23 基因的有 10 株。

对各类酶基因阳性株 PCR 产物进行 DNA 测序,并进行 BLAST 比对分析,均与 Genbank 中已登记的序列一致。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌具有很强的生存适应能力,由于抗菌药物选择性压力,其很快发展成为一种多重耐药菌。有研究发现,桂西地区鲍曼不动杆菌对头孢他啶耐药率为 1.0%,对庆大霉素耐药率为 18.9%,然而未发现亚胺培南耐药株的存在^[4]。本研究中发现鲍曼不动杆菌亚胺培南耐药株的存在,且对亚胺培南的耐药率为 11.6%。除此之外,本研究还发现鲍曼不动杆菌对 TZP、SCF 耐药率分别为 16.9%和 8.0%,对 CAZ 耐药率为 24.0%,对 AMK 和 GEN 耐药率分别为 17.5%和 24.3%,对 LVX 耐药率为 23.0%,对其他 β -内酰胺类抗菌药物耐药率均在 20.0%以上。上述结果表明,鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药率保持在较低水平,CAZ 耐药率较高。此外,本研究还发现,耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌除对 MH 和 SCF 耐药率分别为 18.5%和 56.5%外,对其他 β -内酰胺类抗菌药物耐药率高达 80.0%以上,对 GEN 耐药率更高达 98.0%,耐药率远高于非碳青霉烯耐药株。

鲍曼不动杆菌耐药机制非常复杂,且耐药种类繁多,临床治疗十分困难。已有文献报道,鲍曼不动杆菌的耐药机制涉及药物灭活酶和修饰酶的结合、细胞外膜通透性的改变、抗菌药物作用靶位改变、生物膜的形成、主动外排泵的表达及耐碳青霉烯酶的产生等^[5]。碳青霉烯酶是指能够水解 IPM 和 MEN 的一种 β -内酰胺酶,包括 IMP、VIM 型金属酶和苯唑西林酶,以及新型金属酶 NDM-1^[5-6]。与这些研究相似的是,本研究所有菌株均未检出 IPM 与 VIM 金属酶基

因,但检出了 1 例携带有 NDM-1 金属酶和超广谱 CTX-M-2 基因的菌株,该菌株为来自神经内科患者的尿液分离标本。国内东部地区在耐碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌中检测出 NDM-1 基因,该基因是一种新型超级耐药基因并能编码水解除氨曲南以外所有 β -内酰胺酶类抗菌药物的高效酶,携带有 NDM-1 基因,表现为泛耐药^[7-8]。虽然全球范围内该菌检出率不高,但因 NDM-1 超级细菌可以通过质粒在细菌间自由复制、移动和传播,在细菌之间传递,在人员之间接触传播,其水平传播能力很强,甚至可引起院内的感染流行^[9-12]。本地区检出 NDM-1 说明其不存在地域限制,需要引起足够重视。

耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌携带有大量的 β -内酰胺酶类耐药基因,如 TEM、ADC、OXA-23 和 OXA-51 基因等,且鲍曼不动杆菌的各耐药基因之间有着极其密切的关系,不排除其他耐药机制或耐药基因的存在,比如 OXA-66、DHA 基因等^[13]。TEM 基因是产超广谱 β -内酰胺酶菌株最常见的基因型,主要引起细菌对青霉素类抗菌药物的耐药,超广谱 β -内酰胺酶的广泛存在与头孢菌素耐药性密切相关。而鲍曼不动杆菌的 ADC 基因来自特殊的 β -内酰胺酶家族,也是所有鲍曼不动杆菌固有的染色体编码的 Ampc 酶,与头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物耐药性密切相关^[14]。虽然本研究中 OXA-51 的检出率高达 95.08%,但 OXA-51 基因被认为是鲍曼不动杆菌的固有基因,与碳青霉烯类抗菌药物耐药性并不相关^[15],因此本地区碳青霉烯酶耐药基因型应以 OXA-23 为主,其分离阳性率为 72.13%,与国内多数报道相一致^[16-17]。

本研究中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌检出以重症监护病房为主,可能与重症监护病房患者免疫力低、常患有严重的基础疾病、长期使用抗菌药物、接受有创治疗等有关。因此,对于免疫力低下的易感人群,尤其是医疗器械和传播媒介等,应加强消毒隔离管理,还要尽量减少侵入性操作,以防止鲍曼不动杆菌在医院的感染及交叉传播。对于鲍曼不动杆菌的感染应尽可能进行培养鉴定,合理选用敏感抗菌药物治疗;如果检测出全耐药菌株,应立即停止用药,采用支持治疗,提高患者免疫力,避免抗菌药物的过度使用,影响正常菌群。

参考文献

- [1] 张岩岩,朱婉,张静萍,等.多重耐药鲍曼不动杆菌血流感染危险因素分析[J].中国感染与化疗杂志,2017,17(2):134-139.
- [2] 曹银洁.ICU 病房鲍曼不动杆菌的耐药表型及 β -内酰胺酶基因型检测[J].山东医药,2011,51(30):111-112.
- [3] 赵心懋,任琳,宁永忠,等.某医院连续 7 年监测医院感染鲍曼不动杆菌耐药性变迁[J].中国消毒学杂志,2014,31

(1):42-44.

- [4] 宋晓萍,兰翠霞,王健,等.青岛市 ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性及 β -内酰胺酶基因的检测[J].中国药房,2013,24(34):3209-3212.
- [5] 李荆萍.鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺类药物的耐药性及相关耐药基因的研究[J].氨基酸和生物资源,2016,38(2):32-36.
- [6] COELHO J, WOODFORD N, AFZAL-SHAH M, et al. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(2):756-758.
- [7] YONG D, TOLEMAN M A, GISKE C G, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12):5046-5054.
- [8] 陈娇,吴秀珍,刘康,等.江西地区鲍曼不动杆菌 NDM-1 及其他碳青霉烯酶基因检测研究[J].中国感染控制杂志,2017,16(2):109-114.
- [9] 明德松,许钰颖,邓勇.我国鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类药物机制的 Meta 分析[J].中国病原生物学杂志,2013,8(4):358-360.
- [10] SUNG J Y, KWON K C, PARK J W, et al. Dissemination of IMP-1 and OXA type beta-lactamase in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Korean J Lab Med*, 2008, 28(1):16-23.
- [11] EL-AGEERY S M, AL-HAZMI S S. Microbiological and molecular detection of VIM-1 metallo beta lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(7):965-970.
- [12] LEE K, YUM J H, YONG D, et al. Novel acquired Metallo- β -Lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11):4485-4491.
- [13] 郭萍,曹彬,尹玉东,等.亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶基因及同源性分析[J].解放军医学院学报,2011,32(7):690-694.
- [14] 李珩.鲍曼不动杆菌的耐药性分析及 AmpC β -内酰胺酶介导的耐药机制研究[D].广州:中山大学,2010.
- [15] TURTON J F, WOODFORD N, GLOVER J, et al. Identification of *acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(8):2974-2976.
- [16] 周铁丽,李响新,陆红,等.5 年间鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶特性与耐药相关性研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2008,28(1):40-43.
- [17] 张琪,程训民,沈继龙.碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶和整合子的检测[J].中国抗生素杂志,2015,40(5):377-381.

(收稿日期:2018-12-12 修回日期:2019-02-04)