

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.08.009

梅州地区临床分离耐碳氢霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药机制及分子流行病学研究

肖光文¹, 汪雪涛², 乔亚峰¹, 邹尚平³, 叶振东¹

摘要:目的 了解梅州地区临床分离的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药性,探讨其耐药机制及分子流行病学特征。

方法 收集梅州地区5所医院2012年1~12月临床分离的非重复耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌210株,采用K-B法检测药敏性,改良Hodge试验筛选耐碳青霉烯表型,PCR扩增IMP、VIM、OXA-23、OXA-24、OXA-51和OXA-58型碳氢霉烯酶基因,并测序。应用ERIC-PCR分型及同源性分析。**结果** 药敏结果显示,17种药物除多粘菌素B耐药率为0.48%外,其他药敏耐药率都高于60%;改良Hodge试验阳性菌株163株(77.62%)。扩增结果显示Bla-OXA-51的检出率为最高为94.29%(198/210),Bla-OXA-23的检出率次之为78.57%(165/210),Bla-VIM的检出率为4.29%(9/210),Bla-IMP、Bla-OXA-24、Bla-OXA-58均未被检出。210株菌株分为7个ERIC基因型,其中A型97株,B型44株,H型25株,为主要的流行克隆株。**结论** 梅州地区临床分离的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药十分严重;产OXA-51、OXA-23和VIM型碳氢霉烯酶是本地区鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药的重要机制,且耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌存在克隆的流行。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 碳氢霉烯酶; 改良Hodge试验; β -内酰胺酶

中图分类号:R378

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2014)08-0816-05

Resistance mechanism and molecular epidemiological characteristics of isolated clinically carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Meizhou, China

XIAO Guang-wen¹, WANG Xue-tao², QIAO Ya-feng¹, ZOU Shang-ping³, YE Zhen-dong¹

(1. Medical College, Jiaying University, Meizhou 514031, China;

2. Linli People's Hospital, Changde 415200, China;

3. Meizhou People's Hospital, Meizhou 514031, China)

ABSTRACT: In order to survey antibiotic resistance of clinical isolates carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Meizhou and to investigate resistance mechanism and molecular epidemiological characteristics, a total of 210 non-duplicated clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from January 2012 to December 2012 were collected. The K-B disk diffusion method was applied for the drug-susceptibility test, a modified Hodge test was used for the screening of carbapenemase, PCR was used to amplify carbapenemase genes (including IMP, VIM, OXA-23, OXA-24, OXA-51 and OXA-58), and the positive products were sequenced. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) was used for DNA typing and test of homology. Our results on the percentage of strains resistant for antibiotics tested were higher than 60% except for polymyxin B was 0.48%. There were 163 positive strains by the modified Hodge test, accounting for 77.62%. OXA-51 gene was identified in 198 strains (94.29%), OXA-23 in 165 strains (78.57%), and VIM in 9 strains (4.29%), OXA-24, OXA-58 and IMP gene was not identified by PCR amplification. Seven genomic types were included in the 210 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. The major prevalence types were Type A (97 strains), Type B (44 strains) and Type H (25 strains). In conclusion, multiple drug resistance of clinically isolated carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is a serious problem in Meizhou. Production of OXA-51, OXA-23 and IMP carbapenemases is an important mechanism of resistance to carbapenem antibiotics, and there is prevalence of the same clones in these carbapenem-resistant strains.

KEY WORDS: *Acinetobacter baumannii*; carbapenemase; modified Hodge test; Beta lactamase

作者单位:1. 嘉应学院医学院医学检验教研室,梅州 514031;

2. 临澧县人民医院检验科,常德 415200;

3. 梅州市人民医院检验科,梅州 514031;

Email:270591805@qq.com

随着抗菌药物使用而出现的细菌耐药性问题越来越严重,NDM-1超级细菌^[1]越来越受到医学界的关注。鲍曼不动杆菌作为构成超级细菌的重要细菌

之一,对其耐药问题的研究越来越被临床所重视。亚胺培南、美罗培南等碳氢霉烯类抗菌药物是临床治疗多重耐药鲍曼不动杆菌感染疗效最好的药物之一。随着该类药物在临床上的广泛运用,近年来耐药率有升高的趋势。鉴于目前鲍曼不动杆菌的耐药现状,对梅州地区临床分离的耐碳氢霉烯类鲍曼不动杆菌(*Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii*,CRAB)的耐药情况及耐药机制进行研究。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 2012年1—12月从梅州地区1家三级医院,4家二级医院门诊和住院病人的各类临床标本中分离无重复的鲍曼不动杆菌703株,其中CRAB 210株。

1.2 质控菌株 大肠埃希氏菌(ATCC25922),铜绿假单胞菌(ATCC27853)。

1.3 主要仪器与试剂 基因扩增仪、电泳仪为美国Bio-rad公司产品;凝胶成像系统为法国VL公司产品;药敏试验用药敏纸片为英国Oxoid公司产品,MH培养基为杭州天和公司提供。DNA分子标准、PremiX Taq酶等PCR试剂购自日本TaKaPa公司。引物设计由上海生工生物技术有限公司合成,序列分析由北京诺赛基因组研究中心完成。

1.4 药敏试验 按临床微生物学操作规程对标本进行接种培养后,药敏试验采用纸片扩散法进行,部

分医院采用自动化仪器进行。实验结果严格按照2010年版美国临床实验室标准化协会(CLSI)判断标准执行。

1.5 耐碳氢霉烯表型的筛选 用改良的Hodge试验检测碳氢霉烯酶,根据文献^[2]按照CLSI推荐方法进行。将浓度为 1.5×10^8 CFU/mL的大肠埃希菌ATCC25922按照10倍稀释后涂布于M-H平板,中央贴上亚胺培南(10 μg)药敏纸片,接种环调取待检菌自纸片外缘向平板边缘划线接种,过程中注意勿划破平板。35℃培养18 h,亚胺培南抑菌圈处出现矢状生长现象的为产碳氢霉烯酶菌株。

1.6 用PCR法分析主要碳氢霉烯酶基因 煮沸法提取细菌DNA:将培养18 h的待检菌单个菌落于500 μL TE buffer中,沸水浴10 min,10 000 r/min离心5 min,取2 μL上清作DNA模板。PCR扩增反应体系为:反应体系共50 μL,其中每条引物1 μL,MgCl₂ 5 μL,dNTP 4 μL,Tag酶0.5 μL,模板2 μL,H₂O 37 μL。反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min。检测不同类型的碳氢霉烯基因的反应条件可能不同,以文献报道为参考。所用引物见表1。PCR产物在含有EB为1.5%的琼脂糖凝胶上100V恒压电泳50 min后,用凝胶成像系统进行观察并拍照。PCR产物经测序后在GenBank进行同源查询工具分析。

表1 碳氢霉烯酶基因PCR引物序列及扩增片段长度
Tab. 1 Primer sequences for PCR and expected product size of carbapenemase

基因 Gene	引物 Primer	序列5'-3' Sequences 5'-3'	产物长度 Expected product size/bp
Bla-IMP	IMP-F	AACCAGTTTGCCTTACCAT	818
	IMP-R	ATAGCCATCTTGTTCAGCTC	
Bla-VIM	VIM-F	TCTACATGACCGCGTCTGTC	748
	VIM-R	TGTGCTTGACAACGTTGCG	
Bla-OXA-23	OXA-23-F	GATCGGATTGGAGAACAGA	501
	OXA-23-R	ATTTCTGACCGCATTCCAT	
Bla-OXA-24	OXA-24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246
	OXA-24-R	AGTTGAGCGAAAGGGGATT	
Bla-OXA-51	OXA-51-F	TAATGCTTGATCGGCCTTG	353
	OXA-51-R	TGGATTGCACCCATCTTGG	
Bla-OXA-58	OXA-58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599
	OXA-58-R	CCCCTCTGCGCTACATAC	

1.7 采用重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)分析同源性 引物设计为ERIC-F,5'-3':ATGTA-AGCTCCTGGGGATTAC,ERIC-R,5'-3':

AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG。ERIC-PCR体系的组成和反应条件:总反应体系为50 μL,dNTP 4 μL,模板DNA 2 μL,Taq酶0.25 μL,10×

缓冲液 5 μ L, ERIC-F 1 μ L, ERIC-R 1 μ L, H₂O 36.75 μ L; 预变性 95 ℃ 5 min, 循环变性 95 ℃ 45 s, 退火 42 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 1 min, 40 个循环后, 72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μ L 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果并判断同源性。

2 结 果

2.1 药物敏感性试验结果 210 株 CRAB 对抗菌药物的药敏结果见表 2。

表 2 210 株 CRAB 对抗菌药物的敏感率(%)

Tab. 2 Drug susceptibility rates of 210 strains of CRAB (%)

抗菌药物 Antimicrobial agents	耐药 Drug resistance		敏感 Sensitive	
	株数 No. strains	耐药率 Drug susceptibility rate	株数 No. strains	敏感率 Sensitive rate
哌拉西林 Piperacillin	169	80.48	41	19.52
氨苄西林/舒巴坦 Ampicillin/Sulbactam	173	82.38	37	17.62
哌拉西林/他唑巴坦 Piperacillin/Tazobactam	178	84.76	32	15.24
头孢他啶 Ceftazidime	191	90.95	29	9.05
头孢吡肟 Cefepime	179	85.24	31	14.76
头孢噻肟 Cefotaxime	185	88.10	25	11.90
磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	210	100	0	0
头孢哌酮/舒巴坦 Cefoperazone/Sulbactam	126	60.00	84	40.00
庆大霉素 Gentamicin	198	94.29	12	5.71
妥布霉素 Tobramycin	189	90.00	21	10.00
阿米卡星 Amikacin	174	82.86	36	17.14
四环素 Tetracycline	203	96.67	7	3.33
米诺环素 Minocycline	169	80.48	41	19.52
多西环素 Doxycycline	132	62.86	78	37.14
环丙沙星 Ciprofloxacin	198	94.29	12	5.71
左旋氧氟沙星 Ofloxacin	187	89.05	230	10.95
多粘菌素 Polymyxin b	1	0.48	209	99.52

2.2 碳氢霉烯酶表型筛选结果 在 CRAB 的 210 菌株中, 采用改良 Hodge 试验得到阳性菌株 163 株 (77.62%), 阴性菌株 47 株 (22.38%)。在 163 株阳

性菌株中, 同时对美罗培南和亚胺培南耐药的为 158 株, 仅对美罗培南耐药的为 2 株, 仅对亚胺培南耐药的为 3 株。

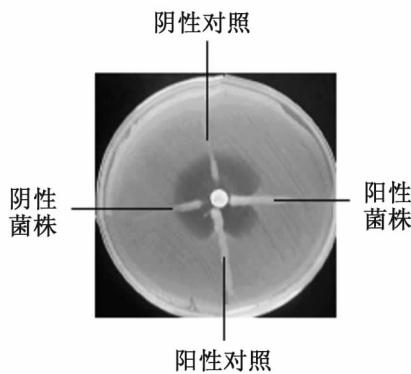


图 1 CRAB 的改良 Hodge 试验结果

Fig. 1 Results of modified Hodge test of CRAB

2.3 用 PCR 法分析主要碳青霉烯基因结果 210 个菌株中, Bla-OXA-51 的检出率为最高为 94.29% (198/210), 其中碳青霉烯酶表型阳性 163 株菌株全部检出 Bla-OXA-51。Bla-OXA-23 的检出率次之为 78.57% (165/210), 其中碳青霉烯酶表型阳性菌株有 158 株检出 Bla-OXA-23, 另外 7 株 Bla-OXA-23 检出菌株为表型阴性。Bla-VIM 的检出率为 4.29% (9/210), 全部为碳青霉烯酶表型阳性。Bla-IMP、Bla-OXA-24、Bla-OXA-58 均未被检出。BLAST 分析结果显示: Bla-OXA-23 扩增产物经 DNA 测序表面序列长度为 502 bp, 经比对其序列符合率为 99.9%; Bla-VIM 扩增产物经 DNA 测序表面序列长度为 756 bp, 经比对其序列符合率为 99.6%; Bla-OXA-51 扩增产物经 DNA 测序表面序列长度为 359 bp, 经比对其序列符合率为 99.8%。(见图 2)

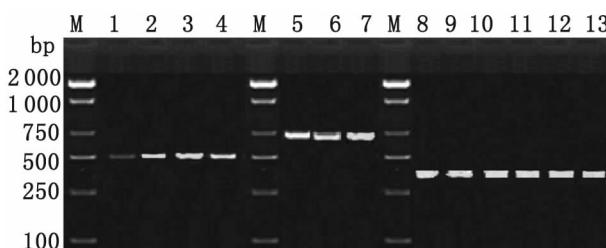


图 2 部分 Bla-OXA-23、Bla-VIM、Bla-OXA-51 PCR 扩增结果

Fig. 2 Representative PCR electropherogram of Bla-OXA-23, Bla-VIM and Bla-OXA-51

M: Marker; 1-4: Bla-OXA-23; 5-7: Bla-VIM; 8-13: Bla-OXA-51.

2.4 ERIC-PCR 分析同源性结果 210 株 CRAB ERIC-PCR 分型结果显示, 主要有 7 个型别, 其中 A 型 97 株, A1 型 53 株, A2 型 44 株; B 型 44 株, B1 型 40 株, B2 型 20 株; 其他为 C 型 6 株, D 型 7 株, E 型 9 株, F 型 6 株, H 型 25 株。(见图 3)

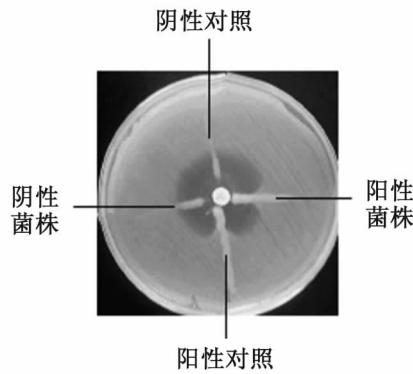


图 3 部分 CRAB 的 ERIC-PCR 结果

Fig. 3 ERIC-PCR result of parts of the CRAB

M: Marker; 1-16: Clinical isolates

3 讨 论

近年来,随着碳青霉烯类抗生素在临床上的广泛运用,对其耐药的细菌越来越多,且往往对临床很多常用抗菌药物也耐药而成为泛耐药株,鲍曼不动杆菌就是这些细菌的典型代表之一。这种耐药往往导致临床患者住院时间的延长而加重患者的经济及心理负担,甚至严重的可引起患者的死亡^[3]。本研究对梅州地区临床 CRAB 对常规药物的研究表明: CRAB 对常规药物除多粘菌素 B 外,对其他的抗菌药物的耐药率都在 60% 以上。其中对头孢哌酮/舒巴坦和多西环素的耐药率在 60% 左右外,其余 14 种耐药率都超过了 80%,磺胺甲噁唑甚至是 100% 耐药。这比 2010 年中国 CHINET 对临床分离的鲍曼不动杆菌耐药性监测数据^[4]明显增高。说明鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药容易出现多重耐药甚至泛耐药。近年来,多粘菌素 B 治疗多重耐药,特别是对鲍曼不动杆菌取得了较好的疗效,引起了临床的关注。本研究表明多粘菌素 B 对 CRAB 敏感率达到 99.52%,可以作为本地区治疗 CRAB 的重要药物。

目前,多重耐药鲍曼不动杆菌主要的耐药机制有:产生碳青霉烯酶,药物主要外排系统的过度表达,外膜孔蛋白的改变及与青霉素结合蛋白(PBPs)的亲和力下降等^[5]。细菌耐药性的产生往往是一种或几种机制共同作用所致^[6],CRAB 的耐药机制尤以质粒或染色体介导的各类碳青霉烯酶明显重要。本研究中,163 株(77.62%)的菌株采用改良的 Hodge 试验呈阳性结果,说明这些菌株可以产生碳青霉烯酶。而 47 株(22.38%)呈现阴性,但基因检测有检出 Bla-OXA-51 及 Bla-OXA-23,提示改良 Hodge 试验检测碳青霉烯酶有漏检现象,这可能是不同菌株产生碳青霉烯酶对碳青霉烯类抗生素水解

能力的差异导致出现的矢状生长区域大小不同。这与雷红等^[7]报道的改良 Hodge 试验(亚胺培南纸片法)阳性率为 66.7% 接近。

碳氢霉烯酶主要有 A、B、D 3 类 β 内酰胺酶，其中 A 和 D 类均为丝氨酸酶，前者主要存在于肠杆菌科细菌中，鲍曼不动杆菌主要见于后者。D 类 β 内酰胺酶即 OXA 酶，可以灭活碳青霉烯类抗生素，不动杆菌中发现的主要有 OXA-21、OXA-23~OXA-27、OXA-40、OXA-58 等^[8]，可分为 4 组，分别以 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58 为代表。B 类为金属 β 内酰胺酶目前检出率低于 OXA 酶，但对碳氢霉烯类抗生素的水解活性是其 10~1 000 倍^[9]，主要有 IMP 型、VIM 型和 SIM 型，不动杆菌中发现的主要为 IMP 型和 VIM 型。所以本研究选取了 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58、IMP 和 VIM 6 个基因进行检测。结果显示，Bla-OXA-51 检出率最高为 94.29%，其次为 Bla-OXA-23 为 78.57%，Bla-VIM 的检出率为 4.29%，Bla-IMP、Bla-OXA-24、Bla-OXA-58 均未被检出。提示梅州地区鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药主要由 OXA-51 型和 OXA-23 型酶引起，这与国内梁伟^[2]的报道是一致的，而低于孙立颖^[10]的报道。Bla-VIM 的检出率为 4.29%，说明梅州地区 2012 年出现了产 VIM 型金属 β 内酰胺酶型鲍曼不动杆菌的感染，经追查为同一家医院的住院病人，据此我们可以推断有可能来自同一耐药菌株的克隆传播。

对耐药菌株进行基因同源性分析,从流行病学角度对有效抑制耐药菌株的扩散具有重要的意义。本研究对 210 株 CRAB 进行 ERIC-PCR 分型发现,主要有 7 种基因型,流行株以 A 型、B 型和 H 型为主,其他型为散发流行。A 型、B 型一直是临幊上比较常见的基因型^[11],在本地区各医院都有分布。对 H 型的追踪发现,主要出现在 3~5 月份一家医院的 ICU 科,且全部为 Bla-OXA-51、Bla-OXA-23 阳性,说明该院在 3~5 月 ICU 科暴发了 H 型株的流行。当发暴发流行后,立即启动了紧急措施进行了有效控制,随后几个月的监测表明该次暴发得到了有效的控制。

综上所述,梅州地区CRAB对临床常用抗菌药物的耐药现象比较严重,OXA型碳氢霉烯酶是本地区耐药的重要机制,并伴随也克隆株的流行。所以,对本地区医院CRAB监测,预防其暴发流行已经刻不容缓。

参考文献

- [1] Yang Y, Wang HZ, Zhang L. The research progress of superbugs of new carry blaNDM-1 gene[J]. Int J Lab Med, 2013, (18): 2440-2441. (in Chinese)

杨艳,王厚照,张玲. 新型携带 blaNDM-1 基因的超级细菌的研究进展[J]. 国际检验医学,2013,(18):2440-2441.

[2] Liang W, Zou MX, Wu JM, et al. Molecular epidemiological characteristics of clinically isolated carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Changsha[J]. J Central South Univ: Med Sci, 2012, 37(5): 521-526. (in Chinese)

梁伟,邹明祥,邬靖敏,等. 长沙地区临床分离碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的分子流行病学特征[J]. 中南大学学报: 医学版,2012,37(5):521-526.

[3] Sheng WH, Liao CH, Landezdale TL, et al. A multicenter study of risk factors and outcome of hospitalized patients with infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Int J Infect Dis, 2010, 14: 764-769.

[4] Xi FM, Xu YC, Zhu DM, et al. CHINET 2010 surveillance of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* in China[J]. Chin J Infect Chemother, 2012, 12(2): 352-356. (in Chinese)

习慧明,徐英春,朱德妹,等. 2010 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(2):352-356.

[5] Zhong M, Huang WF. Research advances of oxacillinase in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Chin J Microecol, 2013, 1(25): 122-125. (in Chinese)

钟敏,黄文芳. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌产 OXA 酶的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2013,1(25):122-125.

[6] Bennett JW, Mende K, Herrera ML, et al. Mechanisms of carbapenem resistance among a collection of Enterobacteriaceae clinical isolates in a Texas City[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 4: 445-448.

[7] Lei H, Dong M, Zhao L, et al. Detection of carbapenemases from imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by modified Hodge test[J]. Labeled Immunoassays Clin Med, 2012, 6 (19): 364-366. (in Chinese)

雷红,董梅,赵利,等. 改良 Hodge 试验对鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶检测效果的比较[J]. 标记免疫分析与临床,2012,6 (19): 364-366.

[8] Poirel L, Marque S, Heritier C, et al. OXA-58 a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (1): 202-208.

[9] Walsh TR. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(Suppl 6): S2-S9.

[10] Sun LY, Huang L, Xu GB. Characteristics of antimicrobial resistance and molecular epidemiology in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2012, 7(30): 553-556. (in Chinese)

孙立颖,黄磊,徐国宾. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌耐药特征和分子流行病学研究[J]. 临床检验杂志,2012,7(30):553-556.

[11] Xiong Y, Su XY, Li XF, et al. Homology and resistance mechanism of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2012, 6(30): 463-465. (in Chinese)

熊樱,苏小燕,李小凤,等. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌同源性及耐药机制研究[J]. 临床检验杂志,2012,6(30):463-465.