

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.12.004

· 论 著 ·

吴江地区多重耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因携带情况及同源性

朱善军,倪晓艳,吴巧珍,沈国荣,陆静芬,朱同华,沈 昊,马春芳

(南通大学附属吴江区第一人民医院,江苏 吴江 215200)

[摘要] **目的** 了解吴江地区临床分离多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)碳青霉烯酶基因携带情况和同源性。**方法** 收集吴江地区 3 所综合性医院 2010 年 1 月—2013 年 12 月临床分离的非重复 MDRAB 44 株,测定其最低抑菌浓度(MIC);采用聚合酶链反应(PCR)扩增碳青霉烯酶基因 *OXA-51*、*OXA-23*、*OXA-24*、*OXA-58*、*IMP*、*TEM*、*SHV* 和 *GES*,脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析菌株同源性。**结果** 44 株 MDRAB 主要来源标本为痰(占 93.18%),主要分布在重症监护病房(ICU)、呼吸科和神经外科,各占 45.45%、27.27%和 13.64%;MDRAB 对米诺环素和多粘菌素 B 均敏感,对哌拉西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星耐药率均为 100.00%,对亚胺培南和美罗培南耐药率均为 97.73%。44 株 MDRAB 均检出 *OXA-51*、*OXA-23* 和 *TEM* 基因,其中 12 株菌 *GES* 基因阳性,*OXA-58* 和 *SHV* 基因阳性各 1 株,未检测到 *OXA-24* 及 *IMP* 基因;MDRAB 分为 A—G 7 个型别,分别为 19、3、9、3、1、4、5 株。A 型主要来源于吴江地区的两所大型综合性医院(吴江第一人民医院和盛泽医院),吴江第一人民医院未发现 B、D 和 E 型;E 型仅 1 株,分布在永鼎医院,其余型别散在分布。**结论** 吴江地区临床分离鲍曼不动杆菌多重耐药严重,基因 *OXA-23* 和 *TEM* 是鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因,并以 A、C 型为主,呈克隆性传播。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;碳青霉烯酶基因;多重耐药;脉冲场凝胶电泳;PFGE

[中图分类号] R181.3⁺2 R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)12-0913-05

Carriage and homology of carbapenemase genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Wujiang

ZHU Shan-jun, NI Xiao-yan, WU Qiao-zhen, SHEN Guo-rong, LU Jing-fen, ZHU Tong-hua, SHEN Hao, MA Chun-fang (Wujiang First People's Hospital, Nantong University, Wujiang 215200, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the carriage and homology of carbapenemase genes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB) in Wujiang area. **Methods** A total of 44 non-duplicated MDRAB isolated from patients in 3 general hospitals in Wujiang area from January 2010 to December 2013 were collected. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were detected, carbapenemase genes *OXA-51*, *OXA-23*, *OXA-24*, *OXA-58*, *IMP*, *TEM*, *SHV*, and *GES* were amplified with polymerase chain reaction (PCR), homology of strains was detected with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** 44 MDRAB strains were mainly collected from sputum (93.18%), mainly distributed in intensive care unit (ICU), department of respiratory diseases, and department of neurosurgery, accounting for 45.45%, 27.27%, and 13.64% respectively; MDRAB were both sensitive to minocycline and polymyxin B, resistance rates to piperacillin, ampicillin/sulbactam, ceftazidime, gentamicin, amikacin, and ciprofloxacin were all 100.00%, resistance rates to imipenem and meropenem were both 97.73%. 44 MDRAB strains were all detected *OXA-51*, *OXA-23* and *TEM* genes, 12 strains were positive for *GES* gene, 1 strain was positive for *OXA-58* and *SHV* respectively, *OXA-24* and *IMP* genes were not found; MDRAB were divided into 7 types of G-A, which included 19, 3, 9, 3, 1, 4, and 5 strains respectively, type A was mainly from two large gen-

[收稿日期] 2016-03-20

[基金项目] 吴江第一人民医院基金资助项目(201417)

[作者简介] 朱善军(1984-),男(汉族),山东省临沂市人,检验技师,主要从事微生物及肿瘤分子诊断研究。

[通信作者] 马春芳 E-mail:njmacf@163.com

eral hospitals in Wujiang area (Wujiang First People's Hospital and Shengze Hospital), type B, D and E strains were not detected in Wujiang First People's Hospital, type E strain was only 1 isolate and was from Yongding Hospital, the other types were sporadically distributed. **Conclusion** Multidrug resistance of clinically isolated *Acinetobacter baumannii* is serious in Wujiang area, OXA-23 and TEM genes are major causes of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*, the main types are A and C, which present clonal spread.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; carbapenemase gene; multidrug resistance; pulsed-field gel electrophoresis; PFGE [Chin J Infect Control, 2016, 15(12): 913-916, 933]

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要条件致病菌, 其感染日益增多, 仅次于铜绿假单胞菌和大肠埃希菌^[1]。随着广谱抗菌药物、糖皮质激素、免疫抑制剂等的应用, 以及介入性医疗操作的广泛展开, 使多重耐药鲍曼不动杆菌 (multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, MDRAB) 的临床分离率日益增高^[2], 其引起的医院感染已成为全球关注的公共卫生问题^[3]。为了解吴江地区临床分离的 MDRAB 的耐药现状, 探讨其流行趋势、耐药机制及同源性, 对吴江地区 3 所综合性医院临床分离的 44 株 MDRAB 进行相关研究, 以期为控制和预防耐药鲍曼不动杆菌感染提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集 2010 年 1 月—2013 年 12 月吴江地区 3 所综合性医院 (吴江第一人民医院、盛泽医院、永鼎医院) 各类临床标本分离的 44 株非重复的 MDRAB, 所有菌株均经法国梅里埃 API 细菌鉴定系统或 VITEK 2 全自动微生物鉴定系统鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213。

1.1.2 抗菌药物 包括亚胺培南、美罗培南、头孢他啶、头孢吡肟、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、多粘菌素 B、哌拉西林、米诺环素和氨苄西林/舒巴坦。

1.1.3 仪器与试剂 VITEK 2 鉴定仪 (法国生物梅里埃公司)、SDS-PAGE 电泳仪 (美国 Bio-Rad 3000XI 公司)、9600 型基因扩增仪 (美国 PE 公司)、凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)、CHEF-MAPPER 脉冲场凝胶电泳仪 (南京军区南京总医院中心实验室提供); MH 琼脂购自英国 Oxoid 公司, DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, DNA marker 购自大连宝生物公司, 其余均为国产分析纯试剂; 引物由南京生兴生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 采用琼脂稀释法测定 12 种抗菌

药物的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC), 结果判定按美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 2012 年标准^[4]进行。

1.2.2 耐药基因检测 参照文献^[5]合成引物, 见表 1。细菌基因组提取步骤参照试剂盒说明书。PCR 反应体系为: Taq Mix 25 μ L, 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, 用 Rnase Free dH₂O 补足至 50 μ L。扩增参数为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s 进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中拍照。

表 1 目的基因 PCR 扩增引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR amplification for targeted genes

目的基因	引物序列	扩增片段大小 (bp)
OXA-51	P1: 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'	353
	P2: 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	
OXA-23	P1: 5'-TGTGCTGGTTATTCAAAC-3'	216
	P2: 5'-ATGGCTTCTCCTAGTGTGTC-3'	
OXA-24	P1: 5'-TGACTTTAGGTGAGGCAATG-3'	223
	P2: 5'-AAAGGTAATCGTTATGTGC-3'	
OXA-58	P1: 5'-TATGGCAGCATTAGAC-3'	509
	P2: 5'-AAACCCACATACCAACC-3'	
IMP	P1: 5'-CATGGTTTGGTGGTTCTTGT-3'	582
	P2: 5'-ATAATTTGGCGGACTTTGGC-3'	
SHV	P1: 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3'	865
	P2: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'	
GES	P1: 5'-ATTTGCTGATTCGCTCGG-3'	392
	P2: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'	
TEM	P1: 5'-ATCAGCAATAAACCAGC-3'	516
	P2: 5'-CCCCGAAGAACGTTTTC-3'	

1.2.3 脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 分型 将 35 $^{\circ}$ C 培养过夜的细菌用低熔点胶灌模, 蛋白酶 K 消化 48 h, 限制性内切酶 Apa I 酶切 12 h, 电泳条件为 1% 琼脂糖胶, 0.5 \times TBE 缓冲液, 14 $^{\circ}$ C, 6 V/cm, 120 $^{\circ}$, 脉冲时间 5 ~ 20 s, 电泳 22 h 后 EB 染色, 紫外灯下观察结果。判断标准参考 Tenover 分型方法: 大多数流行病学相关带型大小和数量相同的菌株被认为是同一类型;

由于突变、插入、缺失或倒置的遗传改变在电泳带型上与主要表型有 3 个或 3 个以下差别的菌株被认为是同一型别的不同亚型；带型中有 4 或 4 个以上不同之处不能用 1 次或 2 次遗传变化解释的，被认为是不同型别。

2 结果

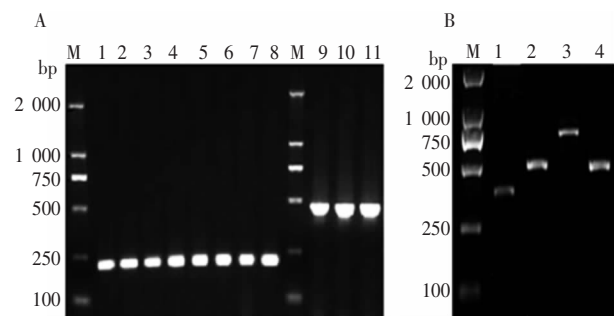
2.1 MDRAB 来源标本及科室 MDRAB 标本来源

表 2 44 株 MDRAB 对 11 种抗菌药物的药敏试验结果

Table 2 Susceptibility testing results of 44 MDRAB isolates to 11 kinds of antimicrobial agents

抗菌药物	R(%)	I(%)	S(%)	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC 范围
哌拉西林	100.00	0.00	0.00	256	1 024	256~2 048
氨苄西林/舒巴坦	100.00	0.00	0.00	64	128	32~256
头孢他啶	100.00	0.00	0.00	256	256	128~256
头孢吡肟	88.64	11.36	0.00	32	64	16~128
亚胺培南	97.73	0.00	2.27	32	128	4~128
美罗培南	97.73	0.00	2.27	32	32	2~128
庆大霉素	100.00	0.00	0.00	128	256	64~>512
阿米卡星	100.00	0.00	0.00	256	>512	128~>512
米诺环素	0.00	0.00	100.00	0.5	1	0.5~2
环丙沙星	100.00	0.00	0.00	128	128	32~256
多粘菌素 B	0.00	0.00	100.00	0.5	1	0.5~2

2.3 耐药基因检测结果 44 株 MDRAB 均检出 *OXA-51*、*OXA-23* 和 *TEM* 基因，其中 12 株菌 *GES* 基因阳性，*OXA-58* 和 *SHV* 阳性各 1 株，未检测到 *OXA-24* 及 *IMP* 基因。见图 1。



M: DNA marker; A1—8 泳道: *OXA-23* 基因阳性; A9—11 泳道: *OXA-51* 基因阳性; B1—4 泳道分别为 *GES*、*TEM*、*SHV*、*OXA-58* 基因阳性

图 1 MDRAB 耐药基因 PCR 扩增电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR amplification products of MDRAB drug-resistant genes

2.4 PFGE 分型 MDRAB 分为 A—G 7 个型别，分别为 19、3、9、3、1、4、5 株。A、C 型可分成 2 个亚

源; 41 株 (93.18%) 来源于痰标本，其余 3 株分别来自脑脊液、导管和胸腔积液。MDRAB 主要分布于重症监护病房 (ICU)、呼吸科、神经外科和急诊科，分别占 45.45%、27.27%、13.64%、9.09%。

2.2 药敏结果 MDRAB 对米诺环素和多粘菌素 B 均敏感，对哌拉西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星耐药率为 100.00%，对亚胺培南和美罗培南均为 97.73%。见表 2。

型，A1 亚型 11 株，A2 亚型 8 株，C1 亚型 5 株，C2 亚型 4 株。A 型主要来源于吴江地区的两所大型综合性医院 (吴江第一人民医院和盛泽医院)，吴江第一人民医院未发现 B、D 和 E 型，E 型仅 1 株，分布在永鼎医院，其余型别散在分布。见图 2、表 3。

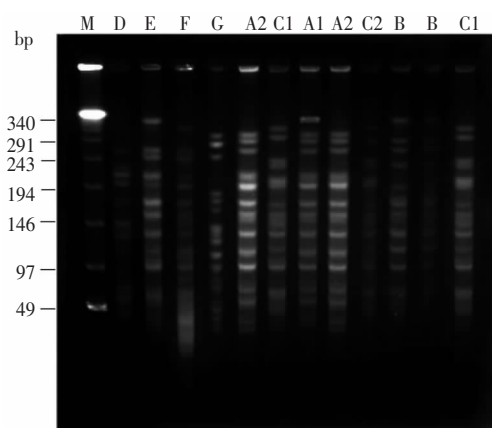


图 2 部分 MDRAB 的 PFGE 结果

Figure 2 PFGE results of partial MDRAB strains

表 3 44 株 MDRAB PFGE 分型结果及分布

Table 3 PFGE genotyping and distribution of 44 MDRAB strains

医院	PFGE 型别(株)								
	A1	A2	B	C1	C2	D	E	F	G
吴江第一人民医院	5	6	0	3	2	0	0	2	1
盛泽医院	5	2	1	1	0	2	0	1	3
永鼎医院	1	0	2	1	2	1	1	1	1
合计	11	8	3	5	4	3	1	4	5

3 讨论

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要病原菌,由该菌引起的医院感染和暴发事件不断增多^[6]。本研究结果显示,3 所医院分离的 MDRAB 主要来源于痰标本,3 所医院患者主要为 MDRAB 引起的下呼吸道感染,与国内相关报道^[7]一致;ICU 的所占比率最高,可能与患者病情多危重,常并发严重感染,免疫防御功能低下,且长期或联合使用广谱抗菌药物及接受侵入性操作(如气管插管、静脉置管)等有关。

本研究收集的 44 株 MDRAB 对米诺环素和多粘菌素 B 均敏感,对哌拉西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星全耐药,对碳青霉烯类药物耐药率>97%,耐药情况严重;对氨苄西林/舒巴坦全耐药可能与舒巴坦复方制剂的临床应用增多有关^[8]。

鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制十分复杂,其中产碳青霉烯酶是最主要的耐药机制。鲍曼不动杆菌中发现的碳青霉烯酶主要为 A、B 和 D 三类酶。其中 A 类碳青霉烯酶包括 SHV 型和 GES 型;B 类碳青霉烯酶包括 IMP 型;D 类碳青霉烯酶又称 OXA 型碳青霉烯酶,该类酶又根据其核苷酸序列特点可分为 4 个型,分别为基因 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58,因此本研究主要对上述基因进行检测。44 株 MDRAB 均携带 OXA-23、OXA-51 和 TEM,其携带率高于其他文献报道^[9-11],其次携带率较高的是 GES 基因,OXA-58 和 SHV 基因阳性菌株均仅 1 株,说明本地区流行的 MDRAB 可同时产生多种 β-内酰胺酶,上述基因可能是本地区鲍曼不动杆菌多重耐药的重要机制之一,但研究中的产酶株是否伴有其他耐药机制,仍有待进一步实验证实。

PFGE 分型是目前国际上公认的病原菌同源分析的金标准。PFGE 条带结果显示,44 株 MDRAB

菌株有 7 种基因型,以 A 型(19 株)和 C 型(9 株)为主,其余型别以散发形式存在。由于 ICU 住院患者具有病情重、自身免疫力低下和侵入性操作多等特点,易出现医院感染暴发流行。在研究期间,A 型克隆株为 ICU 主要流行菌株,A1 亚型存在时间跨度最长,从 2010 年 5 月第 1 次分离,到 2013 年 2 月仍有此亚型的临床分离株出现,提示该克隆株可能长期存在于 ICU,并通过某种途径造成交叉感染。本研究未能获取环境标本,未及时进行追根溯源工作。工作中应及时对仪器、环境消毒灭菌,严格执行手卫生,条件允许时开展对医院暴发感染的及时追踪、分析并切断传播途径,减少和杜绝医院感染。此外,本研究发现,3 所医院均检出 A1 型克隆,可能与鲍曼不动杆菌带菌患者到多所医院就诊,导致传播有关。结合临床资料显示,吴江第一人民医院有 2 例 A1 克隆株患者曾于 2012 年 11 月 2 日在盛泽医院 ICU 住院,有 1 例 A1 克隆株患者曾于 2013 年 4 月 23 日在永鼎医院 ICU 住院。此时期 3 所医院存在某种 MDRAB 的暴发流行,并可能以克隆株的形式在病房内、病房间,甚至医院间进行传播。

综上所述,克隆播散是 MDRAB 的主要传播方式,同时携带 OXA-23 和 TEM 多种耐药基因是鲍曼不动杆菌多重耐药的主要原因,临床 MDRAB 泛耐药情况严重且存在院内和院间流行,应加强医护人员在日常工作中的无菌观念,防止交叉感染,避免克隆株流行。

[参 考 文 献]

- [1] 毛璞,傅威,杨淳,等. ICU 分离的多重耐药鲍曼不动杆菌 PFGE 分型及 I 型整合子介导的耐药研究[J]. 中国感染控制杂志,2012,11(6):417-421.
- [2] 杨启文,王辉,徐英春,等. 2009 年中国 13 家教学医院院内感染病原菌的抗生素耐药性监测[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(5):422-430.
- [3] Falagas ME, Bliiziotis IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? [J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 29(6):630-636.
- [4] Wikler MA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement, vol. 26: Clinical and Laboratory Standards Institute[M]. 2012.
- [5] Jeong SH, Bae IK, Park KO, et al. Outbreaks of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing carbapenemases in Korea[J]. J Microbiol, 2006, 44(4):423.
- [6] 方艳平,张耀康,江凌晓,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌医院感染同源性分析[J]. 实用医学杂志,2013,29(20):3409-3411.

越长,医院感染的发生率也会随之增加^[8]; (3)透析患者普遍存在营养不良的情况,致患者免疫功能低下,因此增加了患者医院感染发生的风险^[9]; (4)患者同时合并多种疾病时抵抗力下降,也是影响血液透析患者发生医院感染的因素之一^[10]。

血液透析患者医院感染的发生受到多种因素的影响。多因素分析结果可知:低龄与高龄、合并多种疾病、住院时间长、透析时间长、两个及以上置管部位和置管时间长均为发生医院感染的危险因素,与国内外学者报告^[11-12]一致。基于以上危险因素我们针对性的制定了以下干预措施:(1)在静脉穿刺过程中严格遵循无菌原则,注意留置静脉针的定期消毒;(2)加强置管护理,减少留置管堵塞;(3)针对高龄患者加强营养支持治疗,及时补充蛋白质,提高免疫功能^[13]; (4)加强血液透析患者的健康教育。

综上所述,医院感染可以增加患者的经济负担,并且多种因素影响医院感染的发生,建议采取预防控制措施,减少医院感染的发生。

[参 考 文 献]

- [1] Thomas-Hawkins C, Flynn L. Patient safety culture and nurse-reported adverse events in outpatient hemodialysis units[J]. Res Theory Nurs Pract, 2015, 29(1):53-65.
- [2] 王书会,邓钰,李士雪,等. ICU 病房不同部位医院感染的经济损失研究[J]. 中国卫生经济,2012,31(6):58-60.
- [3] 孙吉花,邢敏,张霞,等. 某三级医院医院感染相关经济损失分析[J]. 中华医院管理杂志,2014,30(10):766-767.

- [4] Cardoso T, Almeida M, Friedman ND, et al. Classification of healthcare-associated infection: a systematic review 10 years after the first proposal[J]. BMC Medicine, 2014, 12:40.
- [5] 李海峰,车飞,夏娟,等. 医院感染直接经济损失的病例对照研究[J]. 中国卫生经济,2011,30(1):94-96.
- [6] 王书会,鲜万华,王海燕,等. 血液透析患者医院感染直接经济损失调查研究[J]. 中国卫生经济,2013,32(3):43-44.
- [7] 陈辉乐,徐昌隆,金颌微,等. 老年肾衰竭患者血液透析感染的危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(4):911-913.
- [8] 毛艳卿. 慢性肾功能衰竭血液透析患者发生医院感染的临床特点及相关危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,22(13):2807-2809.
- [9] 王文静,张燕,唐伟华,等. 血液透析患者导管相关性血流感染的影响因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(16):4004-4006.
- [10] 战榕,陈菁. 福建省 41 所医院血液透析室医院感染管理现状分析[J]. 中华医院管理杂志,2010,26(5):351-354.
- [11] Gołębiowski T, Kusztal M, Watorek E, et al. Consider use of a collateral venous circuit before abandoning the arteriovenous fistula-the experience of a complex vascular access case[J]. Ann Vasc Surg, 2014, 28(5):1320.
- [12] 李慧芳. 血液透析患者医院感染分析与护理措施[J]. 中国现代药物应用,2015,9(8):218-219.
- [13] Askarian M, Hajiabadi MJ, Kashkooli YA, et al. Improving infection prevention methods in hemodialysis units: a multi-center survey[J]. Am J Infect Control, 2014, 42(2):193-194.

(本文编辑:孟秀娟)

(上接第 916 页)

- [7] 李茜,李庆淑,李智,等. 青岛两所医院鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因及同源性分析[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(7):437-442.
- [8] 马明远,徐杰,于娜,等. 综合 ICU 内鲍曼不动杆菌的耐药性和相关因素分析[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(11):686-689.
- [9] 姚庆完,何友华. 江苏省昆山地区耐亚胺培南鲍曼不动杆菌的耐药性及碳青霉烯酶基因型分析[J]. 山东医药,2014,54(15):46-48.

- [10] 邢丽丹,糜祖煌,徐鑫鑫,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌中 β 内酰胺酶基因的检测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(1):54-57.
- [11] 孟小斌,张国雄. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌感染暴发的分子流行病学研究[J]. 中国感染控制杂志,2013,12(3):173-177,181.

(本文编辑:豆清娅)