

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.04.004

· 论 著 ·

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

林云万, 周 勇, 张 旭, 李晓宁, 赵正阳, 刘 远

(广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440)

[摘要] **目的** 了解广州市重症监护病房(ICU)环境中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)的克隆相关性,明确其基因分型,为预防和控制医院感染提供依据。**方法** 收集广州市 7 所医院 ICU 环境中分离的 39 株 CRAB,采用 K-B 法测定其对 10 种抗菌药物的敏感性,采用聚合酶链反应(PCR)检测菌株的 OXA 基因,采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列分型(MLST)对 CRAB 菌株进行克隆多态性分析。**结果** 39 株 CRAB 对左氧氟沙星耐药率最低,为 56.4%,对其余 9 种抗菌药物耐药率均 >90%。PCR 扩增结果显示,39 株(100%)CRAB 均携带 OXA-51 基因,37 株(94.9%)携带 OXA-23 基因,OXA-24 和 OXA-58 基因未检出。PFGE 技术显示,其中 38 株 CRAB 分为 5 个克隆群,A 群为主要流行克隆;MLST 分析结果显示,CRAB 的主要流行克隆型为 ST195。**结论** 广州市 ICU 环境中存在携带 OXA-23 基因的 CRAB 克隆传播,应加强 ICU 环境的清洁和消毒,减少由 CRAB 引起的医院感染。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;克隆相关性;碳青霉烯酶基因;脉冲场凝胶电泳;多位点序列分型

[中图分类号] R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)04-0294-05

Clone correlation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in environment of intensive care units in Guangzhou City

LIN Yun-wan, ZHOU Yong, ZHANG Xu, LI Xiao-ning, ZHAO Zheng-yang, LIU Yuan
(Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China)

[Abstract] **Objective** To understand the clone correlation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in the environment of intensive care units(ICUs) in Guangzhou City, identify genotypes, and provide basis for prevention and control of healthcare-associated infection(HAI). **Methods** 39 strains of CRAB isolated from environment of ICUs in 7 hospitals in Guangzhou City were collected, susceptibility to 10 kinds of antimicrobial agents was detected by Kirby-Bauer method, OXA gene of strains was detected by polymerase chain reaction (PCR), clone polymorphism analysis was performed with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). **Results** Among 39 strains of CRAB, resistance rate to levofloxacin was the lowest(56.4%), resistance rates to other 9 antimicrobial agents were all >90%. PCR results showed that 39 strains(100%) of CRAB all carried OXA-51 gene, 37(94.9%) carried OXA-23 gene, but OXA-24 and OXA-58 genes were not found. PFGE showed that 38 CRAB strains were divided into 5 clones, group A was the main epidemic clone, MLST analysis showed that the main clone of CRAB was ST195. **Conclusion** Transmission of CRAB clone carrying OXA-23 gene exists in the ICU environment of Guangzhou City, cleaning and disinfection of ICU environment should be intensified, so as to reduce HAI caused by CRAB.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; clone correlation; carbapenemase gene; pulsed-field gel electrophoresis; multilocus sequence typing

[Chin J Infect Control, 2018, 17(4): 294-298]

[收稿日期] 2017-09-09

[基金项目] 广东省医学科研基金项目(A2015426);广东省医学科研基金项目(B2016007)

[作者简介] 林云万(1979-),男(汉族),广东省广州市人,副主任技师,主要从事医院感染控制工作。

[通信作者] 林云万 E-mail: linyunwan@163.com

鲍曼不动杆菌是引起医院感染的重要致病菌,可引起包括败血症、肺炎、脑膜炎、心内膜炎、创口感染和尿路感染等在内的多种医院感染。随着广谱抗菌药物的广泛使用,耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)已经在全球流行,给临床医生抗感染治疗带来严峻挑战。重症监护病房(intensive care unit, ICU)患者多重耐药菌感染已成为医院感染控制工作的重点。由于感染患者或定植者可将病原菌,尤其是多重耐药菌经多个途径排出体外,污染其居住或活动的周围环境。若日常的清洁与消毒不到位,残留的病原体可以在环境表面长期存活,并通过直接接触污染的表面或借助医务人员的手,在医院内传播^[1]。环境表面是病原体的储藏库,鲍曼不动杆菌在医院环境中流行情况和流行方式还不清晰,本研究对广州市 ICU 环境中分离的 CRAB 进行碳青霉烯酶 OXA 基因检测,并通过脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术对环境分离株进行克隆相关性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2013 年 3—7 月采集广州市 7 所医院(医院规模为 600~2 200 床位)ICU 环境样本和医务人员手样本共 156 份,从其中 7 所医院 ICU 分离鉴定出 39 株 CRAB。

1.1.2 主要仪器 VITEK 2 Compact 微生物分析系统及配套的细菌鉴定卡、Bio-rad 脉冲场凝胶电泳仪、Bio-rad 紫外线投射凝胶成像系统、Bio-rad PCR 仪。

1.1.3 主要试剂 PFGE 专用琼脂糖凝胶、限制性内切酶 *ApaI* 和 *XbaI*、*TadDNA* 聚合酶等生化试剂为宝生物工程(大连)有限公司产品;碳青霉烯酶 OXA 基因的特异性引物参照文献^[2-3]合成,7 个管家基因 *gltA*、*gyrB*、*gdhB*、*recA*、*cpn60*、*gpi* 和 *rpoD* 的特异性引物采用鲍曼不动杆菌 MLST 数据库的推荐引物(<http://pubmlst.org/abaumannii/info/primers.shtml>),均由上海生工生物工程技术有限公司合成。药敏试验所用抗菌药物为法国生物梅里埃公司生产。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 选取 ICU 患者或医务人员手接触频繁的物体表面,如气管插管、床栏、仪器按钮等,将无

菌棉签蘸取中和剂后采用涂抹法采集样本;医生、护士手采用涂抹法采集样本;采用空气采集器采集 ICU 大厅和隔离病房空气样本于磷酸盐缓冲液中。

1.2.2 细菌鉴定和药敏试验 细菌培养按照临床微生物学检验规定的常规试验操作进行,使用梅里埃 VITEK 2 全自动微生物分析仪鉴定出鲍曼/醋酸钙不动杆菌复合体,并通过 16S-23S rRNA 间区扩增片段的比对,进一步鉴定出鲍曼不动杆菌。采用 K-B 法检测鲍曼不动杆菌对常见药物的敏感性,药敏结果判读标准依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)2015 年标准。大肠埃希菌 ATCC 25922 为质控菌株。对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌可判定为 CRAB。

1.2.3 碳青霉烯酶 OXA 基因检测 采用煮沸法提取细菌 DNA,应用聚合酶链反应(PCR)技术检测 OXA 基因,具体操作参照试剂盒说明,扩增产物经 100V 恒压、1%琼脂糖凝胶电泳后观察扩增条带。

1.2.4 PFGE 分型 菌悬浮液经琼脂糖凝胶包被、蛋白酶 K 消化和限制性内切酶 *ApaI* 酶切后,用 1%琼脂糖凝胶、电压 6 V/cm 进行电泳,EB 染色后成像。PFGE 结果按美国疾病控制与预防中心 Tenover 等^[4]推荐的方法判读,图谱完全一致定为同一型,有 1~3 个条带不同者为同一型的不同亚型,差异 3 个条带以上者为另一型。

1.2.5 MLST PCR 反应体系参照试剂盒说明。纯化后的 PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司进行双向测序,利用 DNA star 软件对测序结果进行序列校正、拼接。测序结果提交至 Genbank,将 7 个管家基因序列与鲍曼不动杆菌 MLST 数据库上相应的等位基因进行比对分析,获得每个等位基因的数值,然后将每株细菌按照 *gltA*、*gyrB*、*gdhB*、*recA*、*cpn60*、*gpi* 和 *rpoD* 的顺序排列成等位基因谱,对每株细菌进行序列分型。

2 结果

2.1 CRAB 来源 7 所医院 ICU 环境和医务人员标本分离 CRAB 情况见表 1。

2.2 药敏结果 39 株环境分离的 CRAB 均表现为多重耐药,耐药情况见表 2。

2.3 碳青霉烯酶基因检测结果 39 株(100%) CRAB 均携带 OXA-51 基因,37 株(94.9%)携带 OXA-23 基因,OXA-24、OXA-58 基因均未检出。

2.4 PFGE 分型结果 运用 PFGE 方法对 39 株 CRAB 的克隆多态性进行分析,结果显示其中 38 株

CRAB 可分为 5 个型,包括 A 型 28 株,B 型 4 株, C、D、E 型各 2 株,另有 1 株为偶发株。见图 1。

表 1 7 所医院 ICU 医务人员和环境标本 CRAB 分离情况

Table 1 Isolation of CRAB from health care workers and environmental specimens in ICUs of 7 hospitals

医院	医务人员		环境	
	手标本 (份)	咽拭子 (份)	标本数	CRAB 株数
F	6	5	14	10
J	3	3	14	8
H	4	0	12	7
G	3	3	12	6
I	3	3	10	4
D	6	5	14	2
E	10	10	16	2
合计	35	29	92	39

2.5 MLST 结果 7 个管家基因的 PCR 扩增结果经测序比对后显示,39 株 CRAB 的 *gltA* 等位基因位点相同,为 1;*gyrB*、*gdhB*、*recA*、*cpn60*、*rpoD* 各有 2 个等位基因位点,分别为 3 和 15、3 和 2、2 和 28、2 和 61、3 和 32;每个 ST 型的 *gpi* 各有 1 个等位基因位点,分别为 96、154、59、16、153、107、97、140。39 株 CRAB 分为 8 个 ST 型,其中 ST195 共 19 株,占 48.7%;ST829 共 5 株,占 12.8%;ST365 和 ST136 各有 4 株,ST457 共 3 株,ST229 共 2 株,ST208 和 ST17 各 1 株。见表 3。

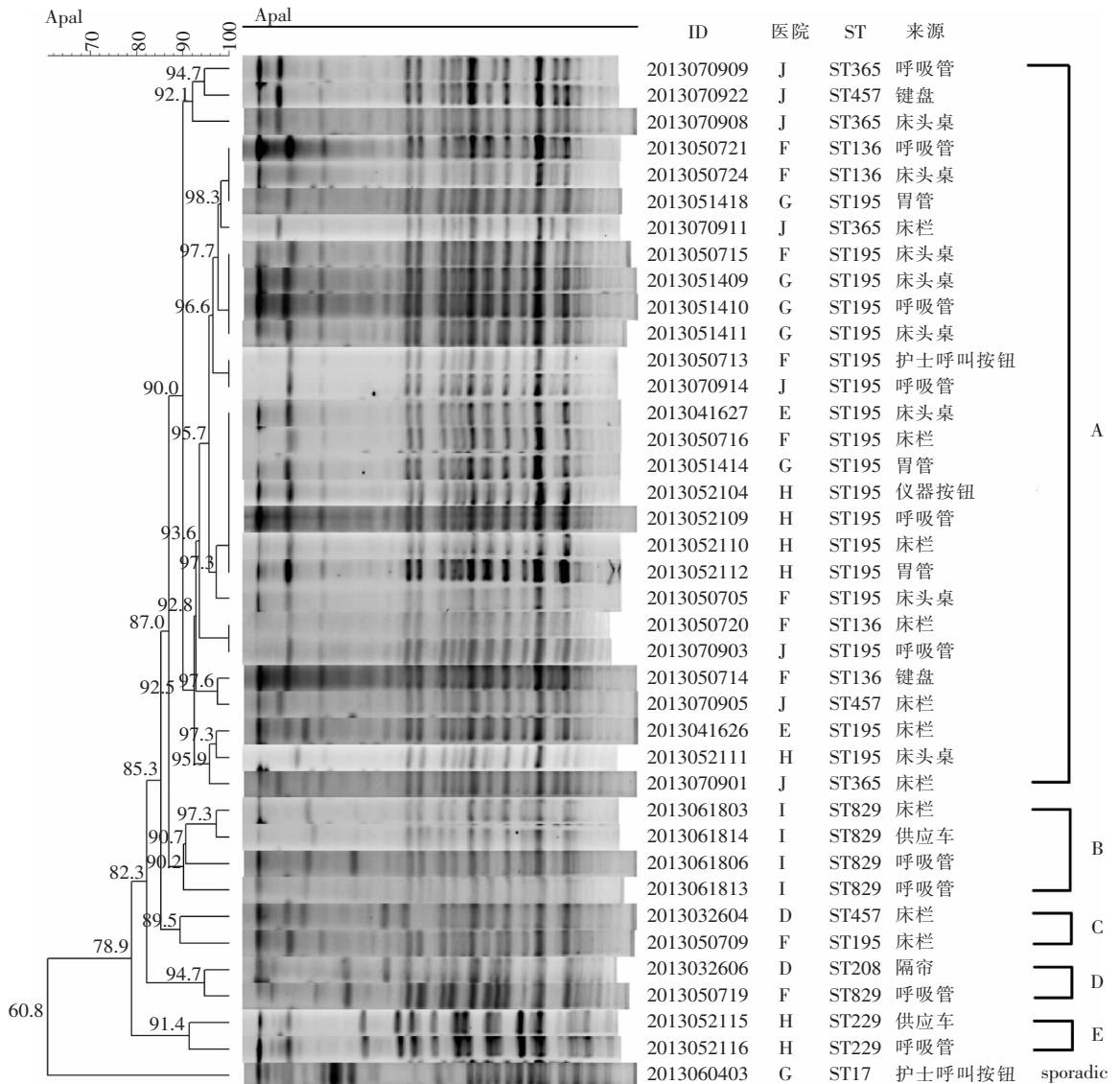


图 1 39 株 CRAB 的 PFGE 聚类分析结果

Figure 1 PFGE cluster analysis of 39 strains of CRAB

表 2 39 株 CRAB 环境株对抗菌药物的耐药率(%)

Table 2 Antimicrobial resistance rates of 39 CRAB strains from environment(%)

抗菌药物	耐药率(%)
氨苄西林/舒巴坦	100.0
替卡西林/克拉维酸	100.0
哌拉西林/他唑巴坦	94.9
头孢他啶	100.0
亚胺培南	100.0
庆大霉素	97.4
妥布霉素	94.9
环丙沙星	100.0
左氧氟沙星	56.4
复方磺胺甲噁唑	92.3

表 3 39 株 CRAB 等位基因型及 ST 型分型结果

Table 3 Allele types and sequence types of 39 strains of CRAB

ST 型	株数	等位基因位点						
		<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cpn60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>
ST195	19	1	3	3	2	2	96	3
ST829	5	1	3	3	2	2	154	3
ST365	4	1	15	3	2	2	59	3
ST136	4	1	3	3	2	2	16	3
ST457	3	1	15	3	2	2	153	3
ST229	2	1	15	2	28	61	107	32
ST208	1	1	3	3	2	2	97	3
ST17	1	1	3	3	2	2	140	3

3 讨论

鲍曼不动杆菌生存能力强,可在环境表面长期定植,是 ICU 医院获得性感染的主要致病菌。侯铁英等^[5]发现,鲍曼不动杆菌在感染患者和环境间存在相互传播。对 ICU 环境中 CRAB 进行分子分型研究,有利于我们了解其流行情况和流行方式,从而指导我们对 CRAB 感染的预防和控制。

碳青霉烯类抗生素对鲍曼不动杆菌有较好的抗菌活性,是治疗其重症感染的首选药物。鲍曼不动杆菌一旦对碳青霉烯类抗生素耐药,将给临床抗感染治疗带来严峻挑战^[6]。中国耐药监测网显示,2004—2014 年鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药率从 13.3% 上升至 70.5%,泛耐药鲍曼不动杆菌检出率从 11.1% 上升至 60.4%^[7]。本研究中收集的 CRAB 来源于 ICU 环境,所有菌株均表现为多重耐药,部分甚至出现泛耐药,与国内报道^[8]的临床分离株耐药情况基本一致。

鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药主要是由于产碳青霉烯酶、主动外排系统、膜孔蛋白的缺失

和青霉素结合蛋白的改变等,其中最主要的原因因为产碳青霉烯酶。碳青霉烯酶包括 Ambler 分类的 A、B 和 D 类,不动杆菌属细菌以 D 类酶(OXA 型)为主,根据氨基酸序列的同源性可将鲍曼不动杆菌的 D 类苯唑西林酶分为 OXA-23、OXA-24、OXA-51 和 OXA-58^[9]。OXA-23 是全球流行最广泛的碳青霉烯酶,且产 OXA-23 的鲍曼不动杆菌是引起医院感染暴发的主要病原菌^[10]。国内报道较多的也为 D 类的 OXA-23。OXA-51 型基因被认为是鲍曼不动杆菌天然固有的碳青霉烯酶基因,OXA-51 型碳青霉烯酶除了水解青霉素,也能水解碳青霉烯类抗生素,但作用非常弱。在鲍曼不动杆菌鉴定时,PCR 检测 OXA-51 基因作为一种新方法可以缩短鉴定时间^[11]。本组 39 株 CRAB,100% 携带 OXA-51 基因,94.9% 携带 OXA-23 基因,未发现 OXA-24 和 OXA-58 基因。可见,广州地区 ICU 环境中的 CRAB 可能主要是由 OXA-23 基因编码产生的碳青霉烯酶引起。

PFGE 技术被认为是细菌分子流行病学分析的“金标准”。通过该方法可将 38 株 CRAB 分为 5 个克隆(90% 以上的相似性),另有一株为偶发菌株。其中 A 克隆有 28 株菌,来自 5 所三级甲等医院 ICU,此 5 所医院分布于海珠、天河、白云三个区,区域跨度大,皆处于人口稠密地段,提示广州地区 ICU 环境可能存在较大范围的 A 克隆 CRAB 定植;此 5 所医院 ICU 采样时间分布在 4~7 月,其中,4 月份采样的 E 医院有 2 株,5 月份的 F、G 和 H 医院分别有 8、5 和 5 株,7 月份的 J 医院有 8 株,整体上 CRAB 分离株数量呈增长趋势,此时间段广州气候由潮湿多雨过渡到干燥炎热,A 克隆 CRAB 在 ICU 环境中的定植是否与气候变化存在联系,有待进一步研究。此外,B 克隆 4 株菌来自越秀区的另一所医院,说明广州地区 ICU 环境主要流行 A 克隆 CRAB 外,也存在小范围的其他克隆群的定植情况。

1998 年 Maiden 等^[12]提出的 MLST 技术,能较好的发现细菌的变异信息,国际上已有大型公共数据库网站可供结果比对。39 株 CRAB 共分为 8 个 ST 型,其中 ST195 占 48.7%,为主要流行型别,该型分布于 5 间医院的 ICU 环境中,主要定植于床单元的高频接触物品表面。此外,通过克隆复合体的分析发现,除了 ST229 外,其余 7 个 ST 型均属于同一个克隆复合体 CC92。CC92 是世界上分布最广泛的鲍曼不动杆菌克隆复合体,其祖先为 ST92。目前,诸如 ST195、ST208、ST75 等 ST92 的单基因变异型

(SLVs)已成为我国某些地方特有的基因型^[13-14]。有文献^[15-16]报道,广州市医院临床分离的鲍曼不动杆菌 ST 型主要为 ST195、ST136 和 ST208,与本研究 7 所医院 ICU 环境中分离的耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌 ST 型的主要分布具有相似性。

在我国,许多流行病学研究已经证实 CC92 克隆复合体高频率携带 OXA-23 基因^[14-15]。最近有文献^[17]报道,广州某 2 所医院 ICU 存在 ST195 (CC92)菌株的感染传播,菌株皆携带 OXA-23 基因。本研究中,ICU 环境中 CRAB 的主要型别 ST195 均携带 OXA-23 基因,与前面的临床分离株结果相同。同时,PFGE 分型的主要型别 A 克隆也均携带 OXA-23 基因。

本研究同时应用 PFGE 和 MLST 方法对 CRAB 菌株进行了分子分型,均得到了一个主要的流行克隆,分别为克隆 A 和 ST195。ST195 菌株绝大部分属于克隆 A,而 MLST 将克隆 A 分成 5 个 ST 型。J 医院的 8 株 CRAB 皆属于 A 克隆,而通过 MLST 技术可分成 ST365、ST195 和 ST457,究其原因,可能是 CRAB 在繁殖或进化过程中发生碱基突变、重组等变异,该变异正好发生在用于 MLST 分型的 7 个管家基因中的某一个或几个基因的某些位点。PFGE 通过脉冲场凝胶电泳分离大的酶切 DNA 片段,比较指纹图谱来确定细菌的分型,主要用于短期内、较小范围的菌株分析,如医院感染暴发时耐药菌的同源性分析,而 MLST 通过直接测定多个管家基因的核苷酸序列来确定细菌的 ST 型,较好地反映出进化和族群生物学变异,两种分型方法在原理和主要目的方面均存在较大差异,故分型结果可能会存在较大不同。

综上所述,广州市医院 ICU 环境中存在携带 OXA-23 基因的 CRAB 克隆传播,应加强细菌耐药监测,采取有效的消毒隔离措施,减少由 CRAB 引起的医院感染。

[参 考 文 献]

[1] Hardy KJ, Openheim BA, Gossain S, et al. A study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patients' acquisition of MRSA[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006, 27(2): 127-132.

[2] Chen Y, Zhou ZH, Jiang Y. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6): 1255-1259.

[3] Khorsi K, Messai Y, Hami M, et al. High prevalence of mul-

tidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase encoding genes *blaOXA-23*-like, *blaOXA-24*-like and *blaNDM-1* in Algiers hospitals[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(6): 438-446.

- [4] 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.
- [5] 侯铁英,黄德弘,陈子龙,等. ICU 耐亚胺培南鲍氏不动杆菌的分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(16): 2371-2374.
- [6] Chang KC, Kuo HY, Tan CY, et al. Transcriptome profiling in imipenem selected *Acinetobacter baumannii* [J]. BMC Genomics, 2014, 15(3): 815.
- [7] Gao L, Lyu Y, Li Y, et al. Trends in drug-resistance of *Acinetobacter baumannii* over a 10-year period: nation wide data from the China surveillance of antimicrobial resistance program [J]. Chin Med J(Engl), 2017, 130(6): 659-664.
- [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] Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(2): 233-238.
- [10] Mugnier PD, Poirel L, Naas T, et al. Worldwide dissemination of the *blaOXA-23* carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1): 35-40.
- [11] Akbari M, Niakan M, Taherikalani M, et al. Rapid identification of Iranian *Acinetobacter baumannii* strain by single PCR assay using BLA *oxa-51*-like carbapenemase and evaluation of the antimicrobial resistance profiles of the isolates[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2010, 57(2): 87-94.
- [12] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within population of pathogenic microorganisms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [13] Wang Y, Yang XU. CHINET surveillance of antimicrobial resistance among *A. baumannii* isolates in China during 2004-2005. China[J]. Infect Chemother, 2007, 7(5): 279-282.
- [14] Chang YW, Luan G, Xu Y, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a Chinese teaching hospital[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 910.
- [15] Ruan Z, Cheng Y, Jiang Y, et al. Wide distribution of CC92 carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in multiple provinces of China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(4): 322-328.
- [16] 苏运钦,叶聪秀,车玉传,等. 多位点序列分型技术在鲍曼不动杆菌同源性分析中的应用[J]. 中国抗生素杂志,2013,38(5): 360-362.
- [17] Zhou Y, Wu X, Zhan X, et al. Genetic characterization of ST195 and ST365 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring *blaOXA-23* in Guangzhou, China [J]. Microb Drug Resist, 2015, 21(4): 386-390.