

• 论 著 •

攀枝花地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 OXA 基因型及分子流行病学分析*

王俊¹, 王宇^{1,2}, 廖玉凤³, 王书平¹, 彭柿杰¹, 林辉¹, 杨洪余¹, 郑秋冬², 宋清蕾², 刘宁远², 王巧², 陈巧凌²

(1. 攀枝花学院附属医院检验科, 四川攀枝花 617000; 2. 攀枝花学院医学院, 四川攀枝花 617000;

3. 天津医科大学临床医学院, 天津 300270)

摘要:目的 通过研究攀枝花地区临床分离的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药性及碳青霉烯酶 OXA 类型, 了解该地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药机制及分子流行病学特征。方法 收集 2014 年 1 月至 2015 年 5 月攀枝花地区两所三甲医院临床分离的 127 株鲍曼不动杆菌; 采用 KB 法检测 21 种抗菌药物敏感性, 比较碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药组和敏感组的耐药率; 采用聚合酶链反应(PCR)检测 OXA 基因; 最后采用肠杆菌基因间一致重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)进行分子分型及同源性分析。结果 66 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌对多黏菌素 B、米诺环素、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率最低, 分别为 15.2%、22.7%、24.2%, 对其余 18 种抗菌药物耐药率均高于 80.0%, 耐药率明显高于敏感组菌株; OXA-23 和 OXA-51 基因的检出率分别为 92.4%、98.5%, OXA-24 和 OXA-58 基因未检出; ERIC-PCR 分子分型主要可分为 A、B、C、D 4 个型, 以 B 型为主。结论 攀枝花地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药非常严重, OXA-23、OXA-51 基因为该地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌重要基因型, B 型为主要流行株。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 耐碳青霉烯酶; OXA 基因; 分子流行病学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)12-1732-03

Analysis on carbapenemase OXA genotypes and molecular epidemiology of carbapenem-resistant acinetobacter baumannii in Panzhihua area*

WANG Jun¹, WANG Yu^{1,2}, LIAO Yufeng³, WANG Shuping¹, PENG Shijie¹,LIN Hui¹, YANG Hongyu¹, ZHENG Qiudong², SONG Qinglei², LIU Ningyuan², WANG Qiao², CHEN Qiaoling²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China;

2. Medical College of Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China;

3. Clinical Medicine College of Tianjin Medical University, Tianjin 300270, China)

Abstract: **Objective** To understand the resistance mechanisms and the molecular epidemiological characteristics of clinically isolated carbapenem-resistant acinetobacter baumannii in Panzhihua area by studying their drug resistance and oxacillinases OXA genotypes. **Methods** Totally 127 strains of Acinetobacter baumannii clinically isolated from 2 grade 3A hospitals in Panzhihua area from January 2014 to May 2015 were collected. The K-B disk diffusion method was adopted to detect the sensitivity of 21 antimicrobial agents. The drug resistance rates were compared between carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii group and carbapenem-sensitive Acinetobacter baumannii group. The oxacillinases OXA gene was detected by PCR. Finally ERIC-PCR was used for conducting the molecular typing and homology analysis. **Results** The resistance rates of 66 strains of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii to polymyxin B, minocycline, cefoperazone/sulbactam were lowest, which were 15.2%, 22.7% and 24.2% respectively. The resistance rates to other 18 antibiotics were all over 80.0%. The resistance rate of carbapenem-resistant group was obviously higher than that of sensitive group. The detection rates of OXA-23 and OXA-51 genes were 92.4% and 98.5% respectively, but OXA-24 and OXA-58 genes were not detected. These strains were mainly type A, B, C and D, in which type B was the major type. **Conclusion** Resistance of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii is quite severe in Panzhihua area. The gene OXA-23 and OXA-51 are the important genotypes of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in this area. Type B is the major prevalent strain.

Key words: Acinetobacter baumannii; carbapenem-resistant; OXA gene; molecular epidemiology

鲍曼不动杆菌为革兰阴性非发酵菌, 分布广泛, 其临床分离率较高、耐药性严重, 尤其是耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的出现, 有学者称其为革兰阴性的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用, 临床分离的鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率呈上升趋势, 2014 年 CHINET 中国耐药监测数据显示分别高达 62.4% 和

66.7%^[1]。耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌常常对多种抗菌药物均耐药, 形成泛耐药(XDR), 甚至全耐药(PDR)。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死亡^[2]。本研究通过对攀枝花地区临床分离的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药性及耐药机制的探讨, 以指导临床合理使用抗生素和控制医院感染的流行。

* 基金项目: 四川省攀枝花市科学技术和知识产权局项目(2014TX-10-5)。

作者简介: 王俊, 女, 主管技师, 主要从事细菌耐药监测研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集攀枝花地区两所三甲医院 2014 年 1 月至 2015 年 5 月临床分离的 127 株鲍曼不动杆菌(剔除重复株),95 株分离自痰液,13 株分离自支气管盥洗液,7 株分离自分泌物,6 株分离自血液,2 株分离自脑脊液,2 株分离自穿刺液,1 株分离自腹腔脓肿,1 株分离自腹水。质控菌株:铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC25922 均购自国家卫生和计划生育委员会临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 VITEK II Compact 全自动鉴定药敏分析仪、GN 鉴定卡为法国梅里埃公司产品;血平板和 MH 平板购自郑州安图生物有限公司;药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司;Bio-Rad iQ5 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪、电泳仪和凝胶电泳成像系统购自美国伯乐生命医学产品有限公司;Taq 酶购于天根公司。PCR 引物由苏州金唯智公司合成,引物序列见表 1。测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

表 1 PCR 引物序列

引物	引物序列(5'-3')	大小(bp)
OXA-23	F:CATCGGATTGGAGAACCAGA	501
	R:ATTTCTGACCGCATTTCCAT	
OXA-24	F:GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246
	R:AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
OXA-51	F:TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353
	R:TGGATTGCACTTCATCTTGG	
OXA-58	F:AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599
	R:CCCCTCTGCGCTCTACATAC	

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定及药敏试验 127 株鲍曼不动杆菌严格按照第 3 版《全国临床检验操作规程》接种血平板复苏后,使用 VITEK II Compact 全自动鉴定药敏分析仪鉴定,同时采用 KB 法进行药敏试验,结果判读参照 2014 年美国临床和实验室标准协会标准。

1.3.2 PCR 法检测耐碳青霉烯类基因 采用煮沸法提取细菌 DNA,严格按照试剂盒说明操作,扩增产物经 100 V 恒压 1% 琼脂糖凝胶电泳 20 min,观察扩增条带。

1.3.3 肠杆菌基因间一致重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)分子分型 采用 ERIC-PCR 对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌进行分子分型。引物 ERIC1: ATGTAAGCTCCTGGG-GATTCAC, ERIC2: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG。PCR 反应体系、反应条件和扩增条带的观察同 1.3.2。

1.4 统计学处理 使用 WHONET5.6 软件分析,SPSS 13.0 软件进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏结果 筛选出对亚胺培南和美罗培南同时耐药菌株 66 株(简称耐药组),对亚胺培南和美罗培南同时敏感菌株 32 株(简称敏感组)。66 株耐药组菌株对多黏菌素 B、米诺环素、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率最低,分别为 15.2%、22.7%、24.2%,其余 18 种抗菌药物耐药率均高于 80.0%。耐药组菌株的耐药率(除头孢替坦和多黏菌素 B 外)明显高于敏感组菌株,见表 2。

2.2 PCR 碳青霉烯类基因检测结果 66 株耐药组菌株中,61 株检测出 OXA-23,65 株检测出 OXA-51。32 株敏感组菌株

中,14 株检测出 OXA-51,24 株检测出 OXA-23。两组菌株均未检出 OXA-24、OXA-58。耐药组的基因检出率明显高于敏感组,差异有统计学意义($P<0.05$),结果见表 3、图 1。

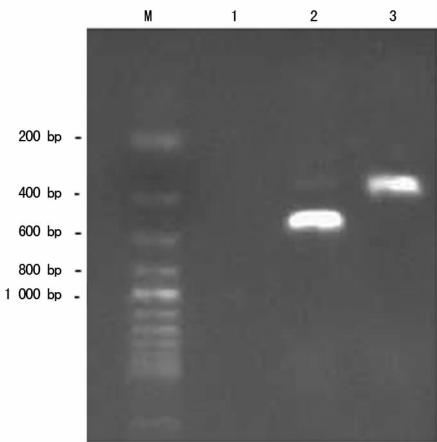
表 2 耐药组和敏感组对 21 种抗菌药物耐药率比较[n(%)]

抗菌药物	耐药组(n=66)	敏感组(n=32)	χ^2	P
氨苄西林	64(97.0)	21(65.6)	18.403	0.000
头孢哌酮/舒巴坦	16(24.2)	0(0.0)	9.271	0.002
氨苄西林/舒巴坦	65(98.5)	4(12.5)	76.475	0.000
哌拉西林/他唑巴坦	65(98.5)	6(18.8)	68.643	0.000
头孢唑啉	66(100.0)	32(100.0)	/	/
头孢他啶	65(98.5)	9(28.1)	57.693	0.000
头孢曲松	66(100.0)	8(25.0)	66.654	0.000
头孢吡肟	65(98.5)	9(28.1)	57.693	0.000
头孢替坦	66(100.0)	31(96.9)	2.084	0.149
阿米卡星	56(84.8)	9(28.1)	31.047	0.000
庆大霉素	65(98.5)	8(25.0)	61.242	0.000
妥布霉素	65(98.5)	8(25.0)	61.242	0.000
环丙沙星	66(100.0)	8(25.0)	66.654	0.000
加替沙星	66(100.0)	8(25.0)	66.654	0.000
左氧氟沙星	64(97.0)	8(25.0)	57.268	0.000
复方磺胺甲噁唑	63(95.5)	8(25.0)	53.594	0.000
多黏菌素 B	10(15.2)	5(15.6)	0.004	0.951
呋喃妥因	66(100.0)	32(100.0)	/	/
多西环素	64(97.0)	8(25.0)	57.268	0.000
米诺环素	15(22.7)	0(0.0)	8.587	0.003
四环素	63(95.5)	9(28.1)	50.122	0.000

注:/表示耐药率相同,不进行统计学分析。

表 3 耐药菌组和敏感菌组 OXA 基因检测比较[n(%)]

项目	n	OXA-23	OXA-51
耐药组	66	61(92.4)	65(98.5)
敏感组	32	24(75.0)	14(43.8)
χ^2		5.687	41.311
P		0.017	0.000



注:M 为 DNA 标志物;1 为阴性对照;2 为 OXA-23;3 为 OXA-51。

图 1 PCR 扩增 OXA-23、OXA-51 基因结果

2.3 ERIC-PCR 分析同源性结果 66 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌主要有 A、B、C、D 4 个型, A 型 10 株, B 型 52 株, C 型 2 株, D 型 2 株。见表 4。

表 4 耐药组各基因型在科室的分布 (n)

型别	重症医学科	神经科	呼吸科	肝胆科	肿瘤科	急诊科	普外科	消化内科	骨科	合计
A 型	5	1	3	0	0	0	1	0	0	10
B 型	25	14	5	3	1	1	0	1	2	52
C 型	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
D 型	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
合计	33	16	8	3	1	1	1	1	2	66

3 讨 论

医院分离的鲍曼不动杆菌已对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类以及碳青霉烯类抗菌药物广泛耐药^[3]。在医院内感染位列第 3 位,在非发酵菌中的地位已高于铜绿假单胞菌^[1]。因不同地区、不同医院、不同时间消毒措施以及使用抗菌药物的种类与频率的不同,使得鲍曼不动杆菌的耐药特征存在明显差异。本研究显示攀枝花地区临床分离的鲍曼不动杆菌对各类抗菌药物的耐药性十分严重,对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 65.4%和 66.9%,与 2014 年 CHINET 中国耐药监测数据接近^[1]。127 株鲍曼不动杆菌中,66 株同时对亚胺培南和美罗培南耐药,占 51.9%,除多黏菌素 B、米诺环素、头孢哌酮/舒巴坦的耐药率小于 30.0%,其余抗菌药物耐药率均高于 80.0%。对亚胺培南和美罗培南耐药的菌株中,17 种抗菌药物的耐药率明显高于敏感组,说明耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌易获得更多的耐药性。本研究显示,攀枝花地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的治疗中,多黏菌素 B、米诺环素和头孢哌酮/舒巴坦可作为经验治疗的首选抗菌药物,但应加以保护,以防耐药性迅速增加。

鲍曼不动杆菌的主要耐药机制:(1)产碳青霉烯酶;(2)药物主动外排过度表达;(3)膜孔通道蛋白缺失;(4)青霉素结合蛋白改变等^[4]。产碳青霉烯酶是其耐药的主要机制。碳青霉烯酶分为 A、B、D 类,不动杆菌以 D 类酶(OXA 型)为主,主要有 OXA-21、OXA-23 ~ OXA-27、OXA-40、OXA-51、OXA-58 等^[5]。本研究结果显示 OXA-23 检出 61 株,检出率为 92.4%,其次是 OXA-51 检测 65 株,检出率最高为 98.5%,未检出 OXA-24、OXA-58。且耐亚胺培南和美罗培南的菌株 OXA-23 和 OXA-51 基因的检出率明显高于敏感组菌株,提示攀枝花地区鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类抗生素主要因素是 OXA-23 和 OXA-51 基因,与邢丽丹^[6]的报道一致。有研究报道,OXA-23 和 OXA-51 基因上游或下游的插入序列 ISA bal 可为耐药基因提供一个强启动子,导致耐药基因的高度表达,引起碳青霉烯类抗菌药物的耐药^[7]。本研究中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药性和敏感组菌株中仍有 OXA-23 和 OXA-51 基因的检出,可能与插入序列 ISA bal 相关,还需进一步研究。

耐药菌株的同源性分析对流行病学调查具有十分重要的意义。目前常用基因分型的方法有脉冲场凝胶电泳、ERIC-PCR 和随机扩增 DNA 多态性。ERIC-PCR 具有分辨率高,重复性好,稳定性高的优点,已成为目前国内外用于鲍曼不动杆菌基因分型的常用方法^[8]。本研究采用 ERIC-PCR 将攀枝花地区耐亚胺培南和美罗培南的鲍曼不动杆菌分为 4 型, B 型为本地区的主要流行型别,主要分布在重症医学科和神经科,可

能是这两个科室患者病情较重,抗菌药物使用较多,各类侵入性操作频繁的缘故。研究显示攀枝花地区三甲医院存在 B 型克隆株的播散。克隆株在病房的广泛传播使细菌耐药率不断上升,给临床治疗带来了极大挑战。因此,控制医院感染尤为重要,临床应合理使用抗菌药物、及时做好各类器械消毒、手消毒和隔离措施。

综上所述,攀枝花地区的鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物耐药率普遍较高,多重耐药情况严重,OXA 基因型是本地区鲍曼不动杆菌耐药的重要机制。各大医院应加强对鲍曼不动杆菌的耐药性监测,以防医院内和医院之间的克隆播散和流行。

参考文献

[1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(5):401-410.

[2] 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(9):e764-e769.

[3] 魏艳艳,熊自忠,王中新. 141 株临床分离鲍氏不动杆菌耐药性检测[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(2):223-224.

[4] 应春妹,翁文浩. 鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展[J]. 检验医学,2007,22(2):208-212.

[5] Poirer 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.

[6] 邢丽丹. 鲍曼不动杆菌的耐药机制及感染防治的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(18):2422-2424.

[7] Peymani A, Higgins PG, Nahaei MR, et al. Characterisation and clonal dissemination of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, northwest Iran[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39(6):526-528.

[8] Ferreira AE, Marchetti DP, Da Cunha GR, et al. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp from hospital in Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011, 44(6):725-730.