

# 多重耐药鲍曼不动杆菌的分子流行特征分析

曹敬荣 魏星 闫中强 沈定霞 罗燕萍

**【摘要】** 目的 研究不同医院分离的鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶的基因型和分子流行特征。方法 采用琼脂稀释法检测 64 株多重耐药鲍曼不动杆菌对抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC); PCR 检测碳青霉烯酶基因、整合酶基因及 *per* 基因,选取不同的耐药克隆菌株进行序列测定;脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析菌株同源关系,确定菌株的分子流行特征。结果 50 株菌(78.1%)携带 *bla<sub>OXA-23-like</sub>* 基因,经测序分析确定为 OXA-23; 1 株菌检测出 *bla<sub>OXA-58-like</sub>* 基因;57 株菌(89.1%)携带 I 类整合子;25 株菌(39.1%)检测出 *bla<sub>PER-1</sub>* 基因。PFGE 图谱显示 64 株菌分为 A、B、C、D、E 等 13 个基因型,三家医院分别以 A 型、B 型和 U 型为主要流行株。结论 三家医院均发现多耐药鲍曼不动杆菌的播散流行,不同医院间和同一医院不同科室间存在同型别流行;三家医院多耐药鲍曼不动杆菌产生的碳青霉烯酶常携带 OXA-23 型酶,同时检测出 *bla<sub>OXA-58</sub>*、I 类整合子和 *bla<sub>PER</sub>* 基因。

**【关键词】** 鲍曼不动杆菌; 多重耐药; 分子流行病学

**Study on the molecular characteristics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*** CAO Jing-rong, WEI Xing, YAN Zhong-qiang, SHEN Ding-xia, LUO Yan-ping. Department of Microbiology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China  
Corresponding author: SHEN Ding-xia, Email: shendx301@yahoo.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate antibiotic resistance, carbapenemase genotype and the molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*(*Aba*) collected from 3 military hospitals in China. **Methods** The minimum inhibitory concentrations(MIC) were examined by ager dilution method. Genotypes of carbapenemases were amplified by multiplex PCR and its products were sequenced. PCR was used to detect *per* gene. Homology of the resistant isolates was analyzed by pulse-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Among the 64 MDRA strains, 78.1%(50) strains possessed *bla<sub>OXA-23</sub>* gene, 89.1%(57) carried Class 1 integrase gene, 39.1%(25) with *bla<sub>PER-1</sub>* gene, and 1 strain with *bla<sub>OXA-58-like</sub>* gene. PFGE showed that 13 (A, B, C, D, E genotype) different clones were identified in these strains. A, B, and U clones were the predominant clones in three hospitals, respectively. **Conclusion** Outbreaks of multidrug-resistant *Aba* occurred at 3 military hospitals with the most prevalent carbapenemase as OXA-23 enzyme. OXA-58 type of carbapenemase and *per-1* in *Aba* were also isolated.

**【Key words】** *Acinetobacter baumannii*; Multidrug-resistant; Epidemiology, molecular

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, *Aba*)是医院感染的主要病原菌之一,近年来随着抗菌药物的广泛应用,多重耐药菌株日趋增多。由于该菌在自然界中分布广泛,医护人员手部亦常带菌,极易造成交叉感染,甚至暴发。为了解军队医院多耐药鲍曼不动杆菌(MDRA)的耐药和分子流行情况,本研究对 2007 年 1—12 月收集自三家医院的 MDRA 的

耐药性、同源性和产酶情况进行了分析。

## 材料与方法

1. 菌株来源:收集 2007 年 1—12 月三家军队医院[解放军总医院(甲),武警总医院(乙),第四军医大学西京医院(丙)]临床分离自患者血液、尿液(细菌计数均 > 10<sup>7</sup> CFU/ml)、无菌体液(胸水、腹水、脑脊液、引流液、关节液等)标本的不重复 *Aba* 77 株;其中甲医院 41 株,主要分布于 ICU、神经外科、急诊科、呼吸科;乙医院 24 株,主要分布于移植病房、ICU、急诊科;丙医院 12 株,主要分布于心外科。以上菌株均经生物梅里埃公司 VITEKII 重新鉴定。大

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.08.017  
基金项目:军队“十一五”课题(06MA294)  
作者单位:100853 北京,解放军总医院微生物科  
通信作者:沈定霞,Email:shendx301@yahoo.com

肠埃希菌 ATCC25922, 铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为药敏试验的质控菌。

2. 抗菌药物: 哌拉西林(PIP)、阿米卡星(AMK)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、头孢哌酮(CFP)、左氧氟沙星(LVX)、环丙沙星(CIP)、米诺环素(MNO)、多粘菌素 B(PB)、亚胺培南(IPM)、克拉维酸(CLA)、哌拉西林+他唑巴坦(TZP)标准品购自中国药品生物制品检定所, 美罗培南(MEM)标准品由日本驻友株式会社提供。

3. 主要试剂与仪器: Mueller-Hinton 培养基购自 Oxoid 公司。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。蛋白酶 K、Apa I 为 New England 公司产品; Seakem Gold 胶、BioRad Megabase 胶为北京元业伯乐公司产品。CHEF Mapper XA 型脉冲电泳仪购自美国 Bio Rad 公司; DNA 扩增仪为美国 PE 公司产品; Tanon GIS100013 成像系统。

4. 药物敏感性试验: 所有细菌采用琼脂稀释法统一测定最小抑菌浓度(MIC)。采用多点接种器定量接种  $10^4$  CFU/ml 细菌, 35℃ 孵育 16~18 h, 根据 CLSI 2008 年标准判断细菌对抗菌药物的敏感性, 计算 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>、敏感率(S, %)、中介率(I, %)和耐药率(R, %)。

5. PCR 检测碳青霉烯酶基因、整合酶基因和 per 基因: 采用煮沸法制备模板, 多重 PCR 测定 bla<sub>OXA-23</sub>、bla<sub>OXA-24</sub>、bla<sub>OXA-51</sub>、bla<sub>OXA-58</sub> 及 int11、int12 基因。PCR 反应体系及引物合成参照文献[1]方法, 反应条件为 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 75 s, 35 个循环; 72℃ 6 min。Per 引物序列: 上游 5' - ATG AAT GTC ATT ATA AAA GC-3', 下游 5' - AAT TTG GGC TTA GGG CAG AA-3'; PCR 反应体系及反应条件参照文献[2]进行。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 紫外灯下照相保存。

6. 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型: 参照文献[3,4]方法, 将培养过夜的细菌用低熔点胶灌模, 蛋白酶 K 55℃ 消化 4 h, 限制性内切酶 Apa I (30 U) 25℃ 酶切 2 h。电泳使用 CHEF Mapper XA 型脉冲电泳仪, 电压 6 V/cm, 夹角 120°, 脉冲参数 5~20 s, 电泳时间 21 h, 电泳温度 14℃, 分子质量标记物为 λ Ladder DNA。EB 染色 30 min, 清水洗 30 min, Tanon GIS100013 成像系统拍照并分析结果。结果判断标准<sup>[5,6]</sup>: 酶切图谱条带完全相同者为同一型别, 相差 3 条以下为同型中不同亚型, 相差 3 条以上为不同型别。流行株图谱定为 A 型, 其余依次命名为 B 型、C 型等, 脚注 1、2、3 等表示不同基因亚型。

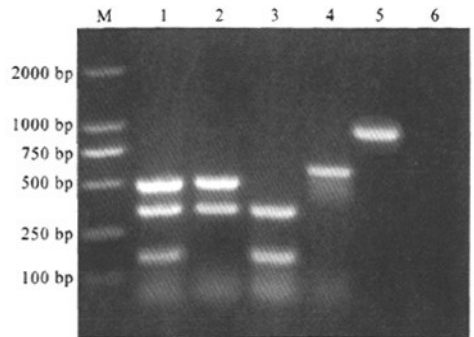
结 果

1. 药敏试验结果: 77 株 Aba 中 64 株为多重耐药菌株, 除对 PB 保持较高的敏感率(98.5%)外, 对 IPM、MEM 及大部分的 β-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类抗菌药物均有较高耐药率(>89%)。见表 1。

表 1 64 株 MDR A 对 12 种抗菌药物药敏试验结果

抗菌药物	R(%)	I(%)	S(%)	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC 范围
MEM	93.8	1.5	4.6	64	128	0.5~128
IPM	90.2	0.0	9.8	128	128	0.25~128
CAZ	96.9	1.5	1.5	256	>256	1~256
CTX	100.0	0.0	0.0	>256	>256	64~512
FEP	93.8	3.1	3.1	256	>256	256~512
CFP	55.4	33.8	10.8	64	128	16~512
PIP	98.5	1.5	0.0	>256	>256	32~1024
TZP	100.0	0.0	0.0	256	>256	128~1024
CIP	96.9	1.5	1.5	64	128	0.5~256
LVX	92.3	4.6	3.1	8	16	0.125~64
AMK	89.2	4.6	6.2	256	>256	4~512
MNO	61.5	16.9	21.5	16	16	1~64
PB	1.5	0.0	98.5	1	2	0.06~8

2. PCR 扩增及测序结果(图 1): 所有菌株均检测出 bla<sub>OXA-51-like</sub> 基因; 50 株菌(78.1%)携带 bla<sub>OXA-23-like</sub> 基因, 经测序并与 GenBank 中已知的基因序列(EU977574)比对, 同源率为 99%, 确定为 OXA-23; 1 株菌检测出 bla<sub>OXA-58-like</sub> 基因; 57 株菌(89.1%)携带 I 类整合子; 25 株菌(39.1%)检测出 bla<sub>PER-1</sub> 基因。未检测出携带 bla<sub>OXA-24-like</sub> 和 int12 基因型的菌株。



注: M: Marker DL2000; 1: bla<sub>OXA-51-like</sub> + bla<sub>OXA-23-like</sub> + int11; 2: bla<sub>OXA-51-like</sub> + bla<sub>OXA-23-like</sub>; 3: bla<sub>OXA-51-like</sub> + int11; 4: bla<sub>OXA-58-like</sub>; 5: per-1; 6: negative control

图 1 多重 PCR 和单一 PCR 扩增碳青霉烯酶和整合酶基因及 per 基因电泳结果

3. PFGE 分型同源性分析(图 2): 64 株 Aba 菌经

PFGE 分为 A、B、C、D、E 等 13 个基因型,其中 A 型 24 株,主要分布在甲医院(21 株),A1 型 8 株来自甲医院和丙医院;A2 型 13 株均来自甲医院;A3 型 2 株分别来自甲医院和乙医院;A4 型 1 株来自丙医院心外科。B 型 18 株,主要分布于乙医院(15 株),其中 B1 型 12 株来自乙医院和甲医院;B2 型 5 株来自乙医院和甲医院;B3 型 1 株来自甲医院。U 型 7 株,其中 6 株分布于丙医院心外科,1 株来自甲医院急诊科。C 型 2 株,来自甲医院骨科。D 型 3 株,来自甲医院 ICU 和肝胆外科。E、F、O、P、Q、W、X 型各 1 株,分布

于甲医院神经外科、乙医院移植病房、肿瘤科及丙医院的儿科和神经外科。鲍曼不动杆菌 PFGE 分型与医院科室分布见表 2。

### 讨 论

近年来研究表明<sup>[7]</sup>,由 *Aba* 引起的感染在院内感染中所占比重明显增加,尤其重症病房(ICU、移植病房、心外科等)MDRA 的不断增多,给临床治疗带来巨大挑战。2006 年军队微生物耐药监测(MARS)结果显示 MDRA 占 42%,2007 年上升至 64%,因此

了解军队医院 MDRA 的耐药谱、产酶情况和分子流行特征对指导军队医院合理用药及防止耐药菌流行有重要意义。

本研究通过对 *Aba* 的耐药谱分析结果显示,64 株 MDRA 除对 PB 保持较高的敏感率(98.5%)外,对其他 11 种抗菌药物的耐药率均较高(55%~100%),对碳青霉烯类的 IPM 和 MEM 的耐药率分别高达 90.2%和 93.8%,应引起各医院重视。临床在治疗 MDRA 引起的感染时,可考虑联合用药。

碳青霉烯酶是能水解至少 1 种碳青霉烯类抗菌药物的一类  $\beta$ -内酰胺酶,与 *Aba* 多重耐药相关的碳青霉烯酶主要为 Ambler 分类的 D 类酶,目前发现的 D 类酶包括 OXA-23、OXA-24、OXA-25、OXA-26、OXA-27、OXA-40 等<sup>[8,9]</sup>,其中以 OXA-23 型酶最常见,而 OXA-51 作为 *Aba* 的固有基因可进行该菌的鉴定。另外,整合酶在 *Aba* 多重耐药方面亦发挥重要作用。本研究应用多重 PCR 对 *bla*<sub>OXA-23</sub>、*bla*<sub>OXA-24</sub>、*bla*<sub>OXA-51</sub>、*bla*<sub>OXA-58</sub> 及 *int1*、*int2* 酶基因进行扩增,发现 64 株 *Aba* 菌均检测出 *bla*<sub>OXA-51</sub> 基因<sup>[1]</sup>;78.1%的菌检出 *bla*<sub>OXA-23</sub> 基因,其中甲医院、乙医院和丙医院分别有 29 株、15 株和 6 株,不同克隆株 PCR 产物经序列测定并与 GenBank 中已知 OXA-23 基

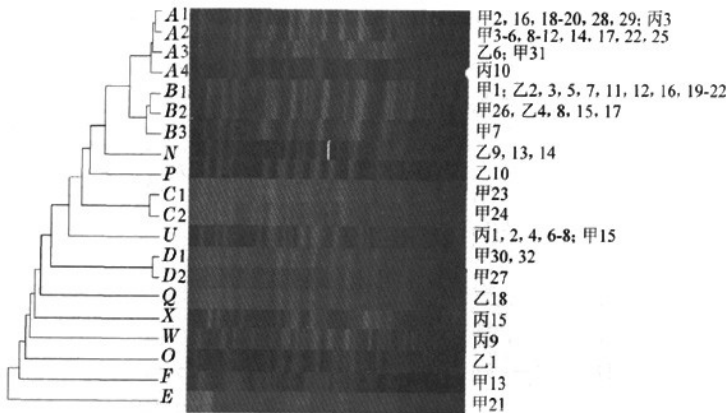


图 2 *Aba* PFGE 同源性分析

表 2 *Aba* PFGE 分型结果与分布

PFGE 型	医院 (菌株数)	部 门	OXA-23 酶基因	<i>per-1</i> 基因	
A(24)	A1	甲(7) 神经外科、急诊科、消化科、ICU、心研所 丙(1) 心外科	P N	N(6)P(1) P	
	A2	甲(13) 神经外科、呼吸科、消化科、ICU、心研所	P	N	
	A3	甲(1) 心外科 乙(1) 移植病房	P P	N N	
	A4	丙(1) 心外科	N	P	
	B1	乙(11) 移植病房、ICU 甲(1) ICU	P P	N N	
	B(18)	B2	乙(4) 急诊科、烧伤病房、ICU 甲(1) ICU	P(3)N(1) P	P(2)N(2) P
		B3	甲(1) 急诊科	P	P
		C1	甲(1) 骨科	N	P
	C(2)	C2	甲(1) 骨科	N	P
		D1	甲(2) 移植病房、ICU	P	P
D(3)	D2	甲(1) ICU	P	P	
E(1)	甲(1) 神经外科	N	N		
F(1)	甲(1) 神经外科	P+OXA-58	N		
N(3)	乙(3) 移植病房	P(2)N(1)	N(2)		
O(1)	乙(1) 移植病房	N	P		
P(1)	乙(1) 移植病房	N	P		
Q(1)	乙(1) 肿瘤内科	N	P		
U(7)	丙(6) 心外科 甲(1) 急诊科	P P	P P		
	W(1)	丙(1) 儿科病房	N	P	
X(1)	丙(1) 神经外科	N	N		

因序列(EU977574)对比, 同源性99%, 确定为OXA-23酶。甲医院有1株菌检测出 $bla_{OXA-58}$ 基因。89.1%的菌检测出I类整合酶基因, 上述三家医院分别检出28株、21株和8株; 均未检测出携带 $bla_{OXA-24-like}$ 和 $intI2$ 基因型的菌株。可见, 本研究中三家医院绝大部分MDRA携带 $bla_{OXA-23}$ 和I类整合子基因, 与国内报道一致<sup>[9]</sup>。

PER-1是超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的一种, 主要对青霉素类、头孢类、单环类抗菌药物耐药。本研究中三家医院共有25株(39.1%)菌 $bla_{per-1}$ 基因阳性, 其中甲、乙医院检出率分别为28.1%(9/32)和31.8%(7/22), 低于Wang等<sup>[9]</sup>报道的77.8%, 而丙医院检出率较高为90.0%(9/10), 可能与不同地区、不同医院的用药品种和用药习惯有关, 表现出地域性特点。本研究检测结果可见, 产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的MDRA在三家军队医院已经存在, 虽不是流行株, 但同时携带其他耐药基因( $bla_{OXA-23}$ )表现多重耐药, 各医院应注意该基因的传播, 加强监测。

PFGE结果表明, 64株细菌分为A、B、C、D、E等13个基因型。占分析菌株总数最多的型别为A型(24株), 主要分布在甲医院(21株), 分布科室包括神经外科、神经内科、ICU、呼吸科、消化科、心研所和急诊科及丙医院的心外科和乙医院移植病房。B型18株主要分布在乙医院(15株), 分布于乙医院移植病房、ICU、普外科、急诊科和烧伤病房以及甲医院的ICU、急诊科。U型7株主要分布于丙医院心外科(6株), 1株来自甲医院急诊科。C型2株, 来自甲医院骨科。D型3株, 来自甲医院ICU和肝胆外科。E、F、O、P、Q、W、X型各1株, 分别来自甲医院神经外科、乙医院移植病房、肿瘤科及丙医院的儿科和神经外科。可见三家医院间及同一医院的不同科室间存在同基因型别MDRA流行, 且部分科室存在不同克隆的散发, 各医院应加强细菌耐药性的监测, 同

时采取有效措施控制医院内耐药菌的进一步播散。

## 参 考 文 献

- [1] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. J Antimicrob Agents, 2006, 27(5): 351-353.
- [2] Leonardo AS, Aynur K, Antonella D, et al. PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. Med Sci Monit, 2004, 10(6): CR180-184.
- [3] 魏星, 沈定震, 闫中强, 等. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的传播和分子特征. 中华流行病学杂志, 2008, 29(3): 277-281.
- [4] 袁莉佩, 潘登, 徐炜烽, 等. 鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型及分子流行病学研究. 中华流行病学杂志, 2007, 28(4): 381-384.
- [5] 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 Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [6] Harald S, Lucilla D, Raffaella B, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4328-4335.
- [7] Qi C, Malczynski M, Parker M, et al. Characterization of genetic diversity of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains collected from 2004 to 2007. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 1106-1109.
- [8] Afzal-Shah M, Woodford N, Livmore CM. Characterization of OXA25, OXA26, OXA27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistant in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(2): 583-588.
- [9] Wang H, Guo P, Sun HL, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(11): 4022-4028.

(收稿日期: 2009-01-21)

(本文编辑: 尹廉)