

鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型及分子流行病学研究

裘莉佩 潘登 徐炜烽 周华 魏泽庆 俞云松

【摘要】 目的 研究宁波地区 3 家综合性医院临床分离亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌的耐药性、同源性及其碳青霉烯酶基因型。**方法** 收集宁波市李惠利医院、宁波市第一人民医院、宁波市第二人民医院碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌 28 株。琼脂稀释法和 E-test 法测定 14 种抗菌药物的最小抑菌浓度值；脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分析菌株同源性；PCR 及克隆测序分析碳青霉烯酶基因型。**结果** 28 株鲍曼不动杆菌对多粘菌素 E 耐药率最低为 4.7%，头孢哌酮/舒巴坦为 87%，其余抗菌药物耐药率均高于 90% 耐药。PFGE 分型共分为 4 型，以 A、B 两型为主。28 株鲍曼不动杆菌中均产 OXA-23 碳青霉烯酶基因，未检测到 VIM、IMP 型金属酶基因。**结论** 宁波地区碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌均产 OXA-23 型碳青霉烯酶，3 家医院均有克隆播散流行。

【关键词】 鲍曼不动杆菌；脉冲场凝胶电泳；流行病学，分子

Study on the carbapenemase genotype and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* QIU Li-pei*, PAN Deng, XU Wei-feng, ZHOU Hua, WEI Ze-qing, YU Yun-song. *Ningbo Medical Centre Li Hui-li Hospital, Ningbo 315040, China
Corresponding author: QIU Li-pei, Email: nbqlp@163.com

【Abstract】 Objective To investigate antibiotic resistance, clonal relatedness and carbapenemase genotype among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* collected from 3 comprehensive hospitals in Ningbo city, Zhejiang province. **Methods** 28 strains of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* were collected from Ningbo Li Hui-li Hospital, Ningbo First Hospital, and Ningbo Second Hospital. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of these strains were examined by agar dilution and E-test method. Homology of these isolates was analyzed by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and Genotype of carbapenemases were analyzed by PCR and verified by DNA sequencing. **Results** 28 strains of *Acinetobacter baumannii* were highly resistant to all of the antibiotics except polymyxin E. They were classified into 4 clones based on PFGE pattern. Clone A and B had been spreading widely. All of the 28 strains produced carbapenemases which were confirmed as OXA-23 by PCR and sequencing. Metallo-beta-lactamase was not detected in any of the isolates. **Conclusion** All of the carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* collected from Ningbo were producing OXA-23 carbapenemase, suggesting that the transmission of clones had occurred in the 3 hospitals.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii*; Pulsed-field gel electrophoresis; Epidemiology, molecular

不动杆菌因其环境生存能力强，耐受肥皂，已成为院内感染的重要病原菌之一。近年来，由于广谱抗菌药物的广泛应用所形成的选择性压力，多重耐药不动杆菌日趋增多，对碳青霉烯类抗生素的敏感性也在逐年下降，而且这些多重耐药菌株极易在重症监护病房、血液病房等引起暴发流行，所以专家呼吁要密切注视鲍曼不动杆菌的耐药发展趋势，对此类不动杆菌要高度警惕^[1]，为此本研究收集了宁波

地区 3 家综合性医院临床分离的 28 株非重复的亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌，以分析其耐药性、同源性及其碳青霉烯酶基因型，阐明其分子流行病学特征。

材料与方法

1. 菌株来源：收集宁波市李惠利医院、宁波市第一人民医院、宁波市第二人民医院临床分离的亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌 28 株均经生物梅里埃公司 API 鉴定条 20NE 重新鉴定。大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 作为药敏质控菌，大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞作为克隆转化受体菌，质粒 pGEM-Teasy 作为连接载体。

基金项目：国家自然科学基金资助项目 (30370073)

作者单位：315040 宁波医疗中心李惠利医院 (裘莉佩、潘登、徐炜烽)；浙江大学医学院附属第一医院 (周华、魏泽庆、俞云松)

通讯作者：裘莉佩, Email: nbqlp@163.com

IMP-4 阳性鲍曼不动杆菌(香港威尔斯亲王医院馈赠)、VIM-2 阳性铜绿假单胞菌为本实验室保存。

2. 抗菌药物:多粘菌素 E、氨苄西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦和哌拉西林/三唑巴坦 4 种抗菌药物 E-test 条购自瑞典 AB Biodisk 公司。其余抗菌药物的标准品均购自卫生部药品生物制品检定所。

3. 主要试剂与仪器:API 鉴定条购自生物梅里埃公司, Taq 酶购自大连宝公司, PCR 纯化试剂盒购自上海申能博彩公司, 质粒抽提试剂盒为 QIAGEN 公司产品, 克隆载体 pGEM-Teasy 购自 Promega 公司, 引物由上海生物工程公司合成, Lambda DNA-PFGE Markers 购自美国 Amersham Biosciences 公司, CHEF-Mapper XA 型脉冲电泳仪和 DNA 扩增仪均为美国 BioRad 公司产品。

4. 药物敏感性测定:用琼脂稀释法测定亚胺培南、美洛培南、头孢吡肟、头孢他啶、哌拉西林、氨曲南、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、米诺环素 10 种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)值。氨苄西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/三唑巴坦、多粘菌素 E 4 种抗菌药物采用浓度梯度法(E-test)测定 MIC 值。多粘菌素 E 根据文献[2]以 4 μg/ml 为折点判定耐药或敏感。其他抗菌药物结果按 2005 年临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI, 原美国国家临床实验标准委员会 NCCLS)的临界值判定敏感、中介、耐药^[3]。

5. 脉冲场凝胶电泳(PFGE):将培养过夜的细菌用低熔点胶灌模, 蛋白酶 K 50℃ 消化 48 h, 限制性内切酶 Apa I 酶切 12 h, 脉冲场凝胶电泳仪用 1% 胶, 0.5 × TBE 缓冲液, 14℃, 6 V/cm, 120°, 脉冲时间 5-20 s, 电泳时间 22 h, 分子量标记物为 λLadder。电泳后 EB 染色, 紫外灯观察结果。

6. PCR 扩增碳青霉烯酶编码基因:包括 OXA-23 组、OXA-24 组、OXA-58 组、IMP 型、VIM 型, 参照文献[4]设计引物, 采用煮沸法制备模板。PCR 反应参数为 94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30 个循环, 72℃ 10 min。引物序列见表 1。

7. PCR 产物的纯化、克隆和测序:PCR 扩增产物经纯化试剂盒纯化, 取 3 μl 与 pGEM-Teasy 载体连接。连接产物转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞, 用含 50 μg/ml 的氨苄西林麦康凯平板筛选。挑取白色菌落, 酶切鉴定后采用 Sanger 末端终止法, 用 ABI377 型自动测序仪进行双向测序。结果在 GenBank 网上查询。

表1 PCR 引物序列

引物	序 列	长度(bp)
OXA-23	P1 GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	1058
	P2 TCACAACAACATAAAAGCACTGT	
OXA-24	P1 ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	825
	P2 TTAAATGATTCCAAGATTTCTAGC	
OXA-58	P1 AAAACCCACATACCAACC	505
	P2 ACGCATTTAGACCGAGCA	
IMP	P1 CATGGTTTGGTGGTTCCTTGT	488
	P2 ATAATTTGGCFFACTTTGGC	
VIM	P1 ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	780
	P2 TGCTACTCAACGACTGAGCG	

结 果

1. 28 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌耐药性:宁波地区 28 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌耐药率最低的为多粘菌素 E(4.3%);米诺环素、氨苄西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦耐药率分别为 91.3%、95.7% 和 87.0%;其余 10 种抗生素均 100% 耐药(表 2)。

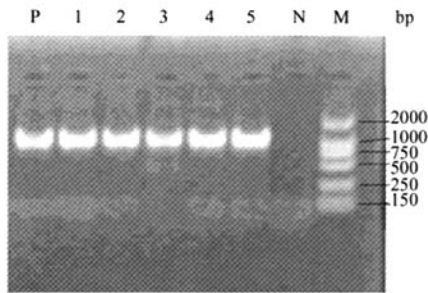
表2 14 种抗菌药物对 28 株碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌体外抗菌活性(μg/ml)

抗生素名称	耐药率 (%)	中敏率 (%)	敏感率 (%)	MIC ₅₀	MIC ₉₀
亚胺培南	100	0	0	128	128
美洛培南	100	0	0	128	128
头孢吡肟	100	0	0	128	128
头孢他啶	100	0	0	128	128
哌拉西林	100	0	0	128	128
氨曲南	100	0	0	128	128
阿米卡星	100	0	0	128	128
庆大霉素	100	0	0	128	128
环丙沙星	100	0	0	128	128
米诺环素	91.3	4.3	4.3	64	128
头孢哌酮/舒巴坦	87.0	13.0	0	96	256
氨苄西林/舒巴坦	95.7	4.3	0	48	256
多粘菌素 E	4.3	0	95.7	0.5	1.5
哌拉西林/三唑巴坦	100	0	0	256	256

2. 碳青霉烯酶基因型:28 株碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌 PCR 扩增 OXA-23 基因均阳性(图 1)。PCR 产物经克隆测序与 GenBank 上 OXA-23 的序列完全一致(GenBank 登录号:AJ132105)。OXA-24 组、OXA-58 组、IMP 型、VIM 型引物扩增 28 株菌株均阴性。

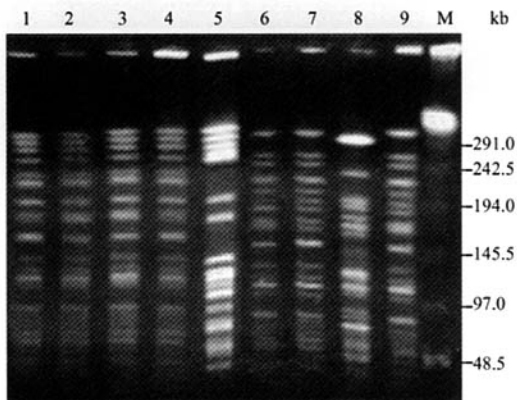
3. 染色体 DNA 同源性:PFGE 分型参照 Tenover 等^[5]进行,酶切图谱差异 3 个条带以上者为不同的类型,3 个条带以下为同一型中不同亚型。所有菌株经 PFGE 分型共分 4 型,A 型 19 株(宁波

李惠利医院 9 株,宁波市第二人民医院 10 株),B 型 6 株(为宁波市第一人民医院菌株),C 型 2 株(为宁波市第一人民医院菌株),D 型 1 株(为宁波市第二人民医院菌株),A、B 两型为主要克隆株。宁波李惠利医院流行株与宁波市第二人民医院流行株同为 A 克隆,PFGE 图形条带完全一致;宁波市第一人民医院流行株为 B 克隆(图 2)。



注:P:阳性对照株;N:阴性对照;M:分子量 Marker

图1 OXA-23 PCR 结果电泳图



注:1~4:克隆 A; 5:克隆 C; 6、7、9:克隆 B; 8:克隆 D; M:分子量 Marker

图2 宁波市 3 家医院部分菌株 PFGE 结果

讨 论

不动杆菌属细菌普遍存在于环境中,是医务工作者经常分离到的革兰阴性菌,已成为院内感染的重要病原菌之一^[6]。近年来,由于广谱抗生素应用所形成的选择性压力,多重耐药不动杆菌日趋增多,碳青霉烯类抗生素是用来治疗多重耐药不动杆菌重症感染的首选抗生素之一,因为在所有 β -内酰胺类抗生素中,碳青霉烯类抗菌谱最广,抗菌活性最强,其对革兰阴性菌产生的超广谱 β -内酰胺酶、AmpC 酶都很稳定^[7]。然而随着碳青霉烯类抗生素的广泛使用,不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的敏感性也在

逐年下降,其耐药菌株引起的医院感染的暴发流行已成为日益严重的医疗事件和公共卫生问题^[8]。本研究收集的 28 株亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌的 MIC 结果显示:一旦鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药,就意味着对现有的常用广谱抗菌药物几乎全部耐药,除了肾毒性很大的多粘菌素 E 还保有较高的敏感性(95.7%)外,复合制剂氨苄西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦也只有 4.3% 和 13.0% 的中介率,米诺环素的耐药率也高达 91.3%。这使临床治疗陷入困境,多粘菌素 E 成为最后无奈的选择。

不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制主要是由于产生了碳青霉烯酶。碳青霉烯酶是指能够水解亚胺培南或美罗培南的一类 β -内酰胺酶,它包括 Ambler 分子分类中的 A、B、D 类酶^[6]。不动杆菌属中最重要的碳青霉烯酶是 D 类酶。目前,水解碳青霉烯类抗生素的 D 类酶按同源性可分为 8 组,OXA-23 组、OXA-24 组、OXA-58 组最常见^[9]。不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制还包括外膜蛋白通透性降低、外排泵的激活及青霉素接合蛋白改变等^[10]。本研究所收集的 28 株菌株均检出 OXA-23 碳青霉烯酶,未检出 VIM 型、IMP 型酶和 OXA-24、OXA-58 组酶,OXA-23 是宁波地区碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌中主要碳青霉烯酶基因型。

近年来越来越多的文献报道了耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌的院内暴发。巴西、韩国、法国等相继出现过报道^[4,9,11],国内北京、广州、上海也都报道了产 OXA-23 碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌耐药克隆株的播散流行^[6-8]。通过 PFGE,本研究同样证实:宁波地区 3 家医院碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌绝大多数为同一克隆。同一克隆株可以在同一病房内,不同病房间,甚至不同医院间(李惠利医院和宁波市第二人民医院为同一克隆株)造成克隆传播。因此细菌室一旦发现高耐药株,应迅速与临床、院感科联系,切实做好各项预防措施,防止耐药克隆株的播散流行。

(致谢:宁波市第一人民医院、宁波市第二人民医院黄志刚、许小明老师协助收集菌株)

参 考 文 献

- [1] 王金良. 密切注视鲍曼不动杆菌的耐药发展. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 355-356.
- [2] Arroyo LA, Garcia-Curiel A, Pachon-Ibanez ME, et al. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol,

2005, 43:903-905.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

[4] Byung-Chan J, Jeong SH, Bae KI, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. J Clin Microbiol, 2005, 43:2241-2245.

[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, 33:2233-2239.

[6] 王辉,孙宏莉,廖康,等. 北京和广州地区四家医院不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究. 中华检验医学杂志,2005,28:636-641.

[7] 应春妹,汪雅萍,李菁菁,等. 产 OXA-23 型碳青霉烯水解酶鲍曼不动杆菌基因研究. 检验医学,2004,19:483-486.

[8] 张永,唐英春,陆坚,等. 鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药分子机

制的研究. 中国抗生素杂志,2005,30:217-221.

[9] Thierry N, Marc L, Claire H, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a Tertiary Care Hospital of Papeete, French Polynesia. J Clin Microbiol, 2005, 43:4826-4829.

[10] German B, Gonzalo C, Dominguez MA, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem Resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. J Clin Microbiol, 2000, 38:3299-3305.

[11] Libera MD, Juliana MC, Helena APHMS, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J Clin Microbiol, 2003, 41:3403-3406.

(收稿日期:2006-08-30)

(本文编辑:王多春)

· 疾病控制 ·

广西壮族自治区吸毒人群血清抗-HIV 阳性及其与 ABO 血型关系分析

刘海燕 栾苑 覃巍巍 卢毅 张明德

ABO 血型反映不同个体不同内在遗传特性,可影响某些疾病的易感性。为探索抗-HIV 与 ABO 血型分布关系,对 2005 年广西壮族自治区(广西区)某 2 所劳教所广西籍在押吸毒人员进行了相关调查。2 所劳教所广西籍吸毒人员抗-HIV 阳性 273 例,男性 225 例,女性 48 例。血清抗-HIV 阴性对照人群与血清抗-HIV 阳性者源于同一人群。血验证实抗-HIV 阴性共 1841 人,其中男性 1104 人,女性 737 人。抗-HIV 检测为 ELISA 法,初筛阳性送广西区疾病预防控制中心 HIV 确证实验室确证。ABO 血型常规鉴定。

结果与分析:调查 2114 人,抗-HIV 阳性 273 例,阳性率 12.91%,男性阳性率 18.31%,女性阳性率 5.42%,两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 75.93, P < 0.01$)。血型分布见表 1。273 例抗-HIV 阳性以 O 型血所占比例最高,其血型分布特点为 O>B>A>AB,阴性对照组血型分布特点亦为 O>B>A>AB,二者似乎一致,均以 O 型血比例最高,但经统计学处理后发现, $\chi^2_{(3)} = 8.57, P < 0.05$ 。抗-HIV 阳性者无论男女其血型分布特点均为 O>B>A>AB。男女组各型比较均无显著差异。相对危险率:OR = Pd(1 - Pc)/Pc(1 - Pd);Pd 为 HIV 阳性血型频率,Pc 为对照血型频率;得出 OR_A = 0.76;OR_B = 1.41^[1];OR_O = 0.99;OR_{AB} = 0.62。B 型血相对危险性较大,O 型次之,AB 型相对较小。本次调查对象均为广西籍人员。该群体抗-HIV 总阳性率为 12.91%,明显高于

不同地区同类人群,如四川、深圳等地区^[2,3]。但广西籍人群 HIV 感染率高于其他省市籍同类人群却是不争的事实。本文调查人群 HIV 阳性率男女间存在显著差异,其血型分布特点以 O 型血阳性率比例最高,感染者 ABO 同型血间无性别差异。由于 HIV 感染是一个复杂的病理生理改变过程,其与诸多影响因素有关,均需进一步探讨。本调查同时显示,吸毒人群是 HIV 感染高发人群,是重点监测和行为干预人群。由于 B 型、O 型血感染 HIV 的危险性最大,对该人群要注意监测,在被暴露后的预防用药以及在筛检 B 型、O 型血源时也应注意。

表 1 广西区吸毒人群抗-HIV 阳性与阴性对照
血型分布比较

组别	例数	血型分布			
		A	B	O	AB
抗-HIV 阳性	273	52(19.05)	89(32.60)	122(44.69)	10(3.66)
阴性对照	1841	435(23.63)	471(25.58)	828(44.98)	107(5.81)

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分比(%)

参 考 文 献

[1] 彭德仁. 10 308 例胃癌与 ABO 血型关系(国内有关资源分析). 中国肿瘤临床,1986,13(3):154-156.

[2] 奚弟荣,张宗辉,李天蓉,等. 注射吸毒人群 HIV、HCV 和梅毒检测分析. 预防医学情报杂志,2006,22(1):85-86.

[3] 秦光明,刘刚,梁妹,等. 四川省 2003 年 HIV/AIDS 监测结果分析. 预防医学情报杂志,2004,31(5):738.

(收稿日期:2006-08-24)

(本文编辑:尹廉)