

• 短篇论著 •

多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性及耐药基因检测*

徐 益, 王 佳[△], 高 辉, 朱雯梅, 姚 瑶, 方 尘

(昆明医科大学附属延安医院/云南心血管病医院检验科, 云南昆明 650051)

摘 要:目的 探讨昆明医科大学附属延安医院多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性及耐药基因分布情况, 为临床合理使用抗菌药物提供参考。方法 收集昆明医科大学附属延安医院 94 株多重耐药鲍曼不动杆菌并检测其耐药性, 提取细菌 DNA, 用 PCR 法扩增检测耐药基因。结果 94 株多重耐药鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物广泛耐药, 对头孢类、青霉素类和碳青霉烯类抗菌药物的耐药率达 100.0%; 对庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、复方磺胺甲噁唑耐药率均超过 90.0%; 对头孢哌酮/舒巴坦、左氧氟沙星、米诺环素的耐药率较高, 分别为 88.3%、87.2% 和 60.7%; 对替加环素保持高度敏感性, 未检测出耐药菌株; 用 PCR 方法分别检测鲍曼不动杆菌的 OXA-23、TEM 耐药基因, 结果显示 OXA-23 基因阳性率为 91.5%, TEM 基因阳性率为 86.2%。产 OXA-23 型、TEM 型耐药基因可能是该院多重耐药鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺类抗菌药物产生耐药的主要原因。结论 通过该研究发现, 多重耐药鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物广泛耐药, 且多数菌株携带 OXA-23、TEM 基因, 其携带耐药基因与耐药表现基本一致, 临床上应加强对多重耐药鲍曼不动杆菌的监测, 控制并减少耐药菌株的产生。

关键词: 多重耐药鲍曼不动杆菌; 耐药率; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.08.024

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)08-0993-03

文献标识码:B

鲍曼不动杆菌是一类条件致病的革兰阴性球杆菌, 是导致医院感染的重要致病菌。近些年来随着广谱抗菌药物的大量使用及医疗侵入性操作的增加, 鲍曼不动杆菌多重耐药及泛耐药菌株的检出率逐年升高, 其感染率及临床致死率日趋严重^[1]。产 β -内酰胺酶是多重耐药鲍曼不动杆菌最重要的耐药机制^[2]。国内外学者对鲍曼不动杆菌的耐药性及耐药基因分布进行了大量研究发现, 由于地区差异性、医院治疗手段不同、从而使细菌面临的选择性压力不同, 导致细菌耐药性的异质性。

本研究主要针对本院临床各科室分离的 94 株多重耐药鲍曼不动杆菌进行耐药性分析及研究耐药基因中具有代表性的 D 类丝氨酸苯唑西林酶中的 OXA-23 型和 A 类超广谱内酰胺酶中的 TEM 型, 检测其阳性率, 分析耐药表型与耐药基因的关系, 以便更好地了解多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药情况及耐药基因在当地分布的流行情况, 及时合理的指导临床用药。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集昆明医科大学附属延安医院 2017 年 7 月至 2018 年 12 月各临床科室分离标本, 筛选出其中的多重耐药鲍曼不动杆菌共 94 株进行试验。

1.2 仪器与试剂 全自动微生物鉴定/药敏测试系统及其配套试剂、抗菌药物纸片, Omega 公司的 Bacterial DNA Kit D3350-01 细菌 DNA 提取试剂盒、Oligo 公司的引物、MASTERMIX、琼脂糖、DNA 标志物, 水浴箱、离心机、电泳仪、PCR 扩增仪、凝胶成像系统。

1.3 细菌鉴定及药敏实验 采用全自动微生物鉴定/药敏测试系统, 适当补充药敏试验(K-B 法和 E-test), 药敏试验判断标准和结果解释参照美国临床和实验室标准协会标准, 并用标准菌株做药敏质量控制。

1.4 耐药基因检测

1.4.1 DNA 模板制备 用 Omega 公司的 Bacterial DNA Kit D3350-01 细菌 DNA 提取试剂盒, 按照说明书步骤提取鲍曼不动杆菌 DNA。

1.4.2 PCR 扩增 反应体系: 1 μ L 的上游引物, 1 μ L 的下游引物, 25 μ L MASTERMIX, 2 μ L 的模板, 21 μ L 蒸馏水, 反应体系总体积 50 μ L。引物由北京博迈德基因技术有限公司合成。引物序列: OXA-23 上游 5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3', 下游 5'-ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3', 产物长度 501 bp; TEM 上游 5'-ATC AGC AAT AAA CCA GC-3', 下游 5'-CCC CGA AGA ACG TTT TC-

* 基金项目: 昆明市卫生和计划生育委员会“十百千”项目(2017-sw[后备]-87); 昆明医科大学研究生创新基金项目(2019S207)。

[△] 通信作者, E-mail: 15893854@qq.com。

本文引用格式: 徐益, 王佳, 高辉, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性及耐药基因检测[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8): 993-995.

3',产物长度 516 bp。反应参数为:94 ℃ 预变性 5 min,然后 94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。

1.4.3 PCR 产物分析 扩增完产物经 2% 琼脂糖凝胶,110 V×35 min 电泳,放入凝胶成像系统扫描成像。电泳出现明亮的条带并且该条带与预期产物大小相同者送北京博迈德基因技术有限公司进行测序,测序结果通过 NCBI 网站 Blast 比对分析,从而证实耐药基因。

2 结 果

2.1 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性 多重耐药鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类、头孢类和青霉素类的耐药率高达 100.0%;对氨苄西林/舒巴坦的耐药率为 100.0%,对庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、复方磺胺甲噁唑的耐药率分别高达为 97.6%、92.6%、92.7%和 91.5%,对头孢哌酮/舒巴坦、左氧氟沙星、米诺环素的耐药率分别为 88.3%、87.2%和 60.7%。多重耐药鲍曼不动杆菌对抗菌药物的耐药性说明鲍曼不动杆菌对常规的抗菌药物普遍耐药,只对替加环素保持高度敏感,未检测出耐药菌株。见表 1。

表 1 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药率分布 (%)			
抗菌药物	耐药	中介	敏感
替加环素	0.0	4.6	95.4
米诺环素	60.7	34.0	5.3
阿米卡星	92.7	0.9	6.4
左氧氟沙星	87.2	12.8	0.0
头孢哌酮/舒巴坦	88.3	11.7	0.0
复方磺胺甲噁唑	91.5	0.0	8.5
妥布霉素	92.6	0.0	7.4
庆大霉素	97.9	0.0	2.1
哌拉西林	100.0	0.0	0.0
哌拉西林/他唑巴坦	100.0	0.0	0.0
氨苄西林/舒巴坦	100.0	0.0	0.0
氨苄西林	100.0	0.0	0.0
阿莫西林/克拉维酸	100.0	0.0	0.0
头孢唑林	100.0	0.0	0.0
头孢西丁	100.0	0.0	0.0
头孢曲松	100.0	0.0	0.0
头孢吡肟	100.0	0.0	0.0
氨曲南	100.0	0.0	0.0
亚胺培南	100.0	0.0	0.0
环丙沙星	100.0	0.0	0.0

2.2 耐药基因检测结果 通过观察琼脂糖凝胶成像上的阳性目的条带,计算得出携带 OXA-23 基因的多重耐药鲍曼不动杆菌为 86 株,其阳性率高达 91.5%;携带 TEM 基因的多重耐药鲍曼不动杆菌为 81 株,阳

性率为 86.2%。阳性扩增产物进行测序,测序产物序列使用 BLAST 进行比对,结果显示 PCR 引物扩增出的产物序列与 Genbank 发布的 OXA-23、TEM 基因序列相符。说明本院多重耐药鲍曼不动杆菌多数携带 OXA-23、TEM 型耐药基因。见图 1、2。

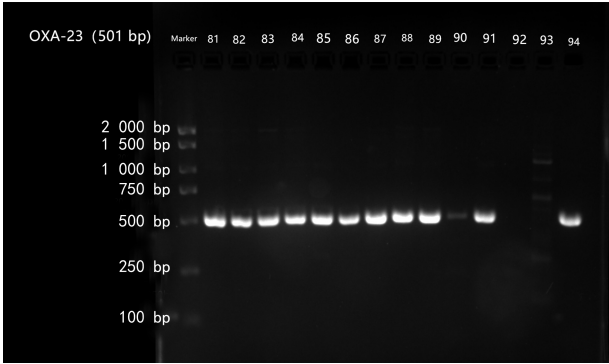


图 1 OXA-23 基因扩增产物电泳图像

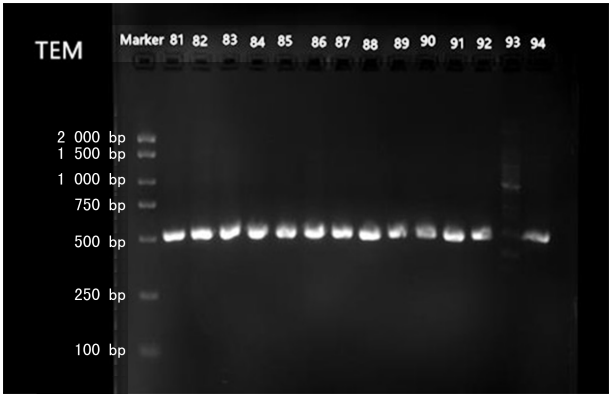


图 2 TEM 基因扩增产物电泳图像

2.3 耐药表型与耐药基因相关性 94 株多重耐药鲍曼不动杆菌全部对碳青霉烯类、头孢类抗菌药物耐药,检测耐药基因 OXA-23 型为 86 株,未携带 OXA-23 基因的为 8 株,其阳性率高达 91.5%;携带 TEM 基因为 81 株,未携带 TEM 基因的为 13 株,阳性率为 86.2%。耐药表型和耐药基因检出情况基本一致。见表 2。

表 2 耐药菌株耐药基因分布情况			
耐药基因类型	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
OXA-23	86	8	91.5
TEM	81	13	86.2

3 讨 论

鲍曼不动杆菌是一类非发酵革兰阴性杆菌,在医院环境及人体皮肤黏膜表面或与外界相通的腔道中广泛分布,因其具有极强的生存力和黏附力,常定植于医院的床旁仪器、被褥等非生物表面,可通过医务人员及器械传播,成为医院获得性感染的重要病原菌^[3]。鲍曼不动杆菌的耐药性日趋严重,特别是随着多重耐药鲍曼不动杆菌的出现,更是增加了临床选择抗

菌药物方面的困难。中国 2018 年 CHINET 数据显示:不动杆菌属(鲍曼不动杆菌占 92.9%)对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别是 73.7% 和 75.6%,而细菌对碳青霉烯类耐药即意味着对其他抗菌药物基本耐药,给临床抗感染治疗带来巨大挑战。本研究中,昆明医科大学附属延安医院 94 株多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性数据显示,这些鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物广泛耐药,与文献[4-5]报道一致。对头孢类、青霉素类和碳青霉烯类抗菌药物的耐药率高达 100.0%;对庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、复方磺胺甲噁唑基本耐药,耐药率均超过 90.0%,对头孢哌酮/舒巴坦、左氧氟沙星、米诺环素的耐药率较高,分别为 88.0%、87.5% 和 60.2%,多重耐药鲍曼不动杆菌只对替加环素保持高度敏感性,未检测到耐药菌株。抗菌药物中碳青霉烯类抗菌药物是抗菌谱广、抗菌活性强的一类抗菌药物,曾被作为是治疗多耐药鲍曼不动杆菌的首选药物^[6],但从本研究得出的数据,碳青霉烯类的耐药率已经达到了 100.0%。仅有新型抗菌药物替加环素对其敏感性较高,但由于替加环素高昂的价格及其临床疗效不确定性,导致其并不能在临床治疗中广泛使用。

鲍曼不动杆菌耐药机制非常复杂,目前主要包括四方面:(1)产生抗菌药物的相关酶类;(2)膜通道蛋白的缺失或渗透性下降;(3)外排泵的过度表达;(4)药物作用靶位的改变^[7-8]。鲍曼不动杆菌的耐药性常常是由其中一种或几种机制共同作用而导致^[9]。本研究所检测的 OXA-23 和 TEM 分别属于产 β -内酰胺酶中的 D 类酶苯唑西林酶和 A 类超广谱内酰胺酶中最具代表性的酶类,同时 OXA-23 和 TEM 也属于多重耐药鲍曼不动杆菌中阳性率最高的酶^[10]。研究结果显示检测的 94 株多重耐药鲍曼不动杆菌中,携带 OXA-23 基因菌株为 86 株,未携带 OXA-23 基因为 8 株,OXA-23 阳性携带率为 91.5%。根据抗菌药物敏感性实验,亚胺培南耐药率为 100.0%,推测本院多重耐药鲍曼不动杆菌中携带 OXA-23 基因可能是导致亚胺培南耐药的原因;而检测 TEM 基因阳性菌株为 81 株,未携带 TEM 基因为 13 株,阳性率为 86.2%。结合其耐药表型结果,推测本院多重耐药鲍曼不动杆菌中携带 TEM 基因可能是导致哌拉西林和头孢类耐药的原因。多重耐药鲍曼不动杆菌对一线抗菌药物头孢类、青霉素类和碳青霉烯类抗菌药物的耐药率已经达 100.0%,耐药情况严重。本院多重耐药鲍曼不动杆菌多数携带 OXA-23、TEM 型耐药基因,其耐药基因与细菌耐药表型基本一致。但是由于鲍曼不动杆菌耐药机制的复杂性,其余未携带 OXA-23 与 TEM 基因导致的耐药可能与其他耐药机制有

关,如膜通道蛋白的缺失或渗透性下,细胞外排泵过度表达等。

通过本研究发现,多重耐药鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物广泛耐药,且多数菌株携带 OXA-23、TEM 基因,其携带耐药基因与耐药表现基本一致。鲍曼不动杆菌检出率不断增长,耐药形势日益严峻,临床上必须做好鲍曼不动杆菌的隔离及防护感控措施,并加强鲍曼不动杆菌耐药菌株的耐药性监测,才能减少耐药菌株的产生。对于本地多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性及耐药基因的研究还在不断的进展中,课题组将继续检测其他耐药基因,分析出耐药基因在当地分布流行情况,从而指导临床及时、合理有效的用药。

参考文献

- [1] HUANG L, SUN L, YAN Y. Clonal spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* ST92 in a Chinese Hospital during a 6-year period[J]. J Microbiol, 2013, 51(1): 113-117.
- [2] ZARRILLI R, GIANNOULI M, TOMASONE F, et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities[J]. J Infect Dev Ctries, 2009, 3(5): 335-341.
- [3] CHIU C H, LEE H Y, TSENG L Y, et al. Mechanisms of resistance to ciprofloxacin, ampicillin/sulbactam and imipenem in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(4): 382-386.
- [4] 童金英, 耿文娟. 2011—2013 年某院鲍曼不动杆菌临床分布与耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(4): 240.
- [5] 孟芝君. 2012—2014 年我院鲍曼不动杆菌临床分布与耐药性分析[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(7): 980.
- [6] WOODFORD N, ELLINGTON M J, COELHO J M, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp[J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 27(4): 351-353.
- [7] 罗湘蓉, 李恒翠, 袁军等. ICU 患者分离的耐亚胺培南鲍曼不动杆菌同源性及耐药机制[J]. 中国医科大学学报, 2014, 43(7): 612-614.
- [8] 段佳佳. 多重耐药鲍曼不动杆菌相关耐药基因检测及分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [9] ESPINAL P, MARTI S, VILA J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces[J]. J Hosp Infect, 2012, 80(1): 56-60.
- [10] 张吉生, 赵永鑫, 王英, 等. 我院耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌基因型分析[J]. 中华全科医学, 2019, 17(1): 25-28.