文章编号：1001-8689(2021)01-0072-04

重症监护病房耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌6种耐药基因检测

徐益　高辉　王佳*　王杨　彭传梅　姚瑶　鲁祥辉
(昆明医科大学附属延安医院/云南心血管病医院检验科，昆明 650051)

摘要：目的　研究医院重症监护病房(intensive care unit，ICU)患者感染鲍曼不动杆菌的耐药性及耐药基因，以指导临床合理用药，控制ICU病房感染暴发流行。**方法**　采用VITEK2-Compact全自动细菌鉴定药敏系统对细菌进行鉴定及药敏试验，用聚合酶链反应(polymerase chain reaction，PCR)方法检测6种常见碳青霉烯酶耐药基因(*bla*$_{IMP}$、*bla*$_{VIM}$、*bla*$_{NDM}$、*bla*$_{OXA-23}$、*bla*$_{OXA-24}$和*bla*$_{OXA-58}$)。**结果**　38株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌对15种临床常用青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、喹诺酮类及β-内酰胺酶抑制剂类抗菌药物全部耐药，对头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素的耐药率分别为92.1%和81.6%，仅对替加环素保持较高敏感性，敏感率为94.7%。38株CRAB中携带*bla*$_{OXA-23}$基因共36株(94.7%)，未检出*bla*$_{IMP}$、*bla*$_{VIM}$、*bla*$_{NDM}$、*bla*$_{OXA-24}$和*bla*$_{OXA-58}$基因。**结论**　我院ICU分离耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物耐药广泛，携带*bla*$_{OXA-23}$基因是可能该院ICU耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因。临床医生应合理使用抗菌药物，加强细菌耐药性监测，防止耐药菌株的产生和进一步传播。

关键词：耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌；重症监护病房；耐药基因
中图分类号：R978.1　　**文献标志码：**A

Detection of six resistance genes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in ICU

Xu Yi, Gao Hui,Wang Jia,Wang Yang, Peng Chuan-mei, Yao Yao and Lu Xiang-hui
(Kunming Medical University Affiliated Yan'an Hospital / Yunnan Cardiovascular Hospital Laboratory, Kunming 650051)

Abstract　**Objective**　To study the drug resistance and drug resistance genes of *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit (ICU) in order to guide clinical rational drug use and control the outbreak of infections in ICU. **Methods**　The VITEK2-compact automatic bacterial identification drug susceptibility system was used for the identification and susceptibility test of bacteria. The polymerase chain reaction (PCR) method was used to detect six common carbapenemase resistance genes (*bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-24}$ and *bla*$_{OXA-58}$). **Results**　38 strains of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* were all resistant to 15 common clinical antibiotics, including penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, quinolones, and β-lactamase inhibitors. The resistance rates of piperidone/sulbactam and minocycline were 92.1% and 81.6%, respectively, and they remained sensitive to tigecycline only, with a sensitivity rate of 94.7%. A total of 36 (94.7%) *bla*$_{OXA-23}$ genes were carried in 38 CRAB strains, and no *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA-24}$, and *bla*$_{OXA-58}$ genes were detected. **Conclusion**　Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from our hospital was widely resistant to commonly used antibiotics in the clinic. The main reason

收稿日期：2020-02-17
基金项目：昆明医科大学研究生创新基金(No. 2019S207)
作者简介：徐益，女，生于1995年，在读硕士研究生，主要研究方向：医学微生物检验，E-mail: 214302773@qq.com
*通讯作者，E-mail: 15893854@qq.com

for carbapenem resistance of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in ICU of our hospital maybe was the strains carrying the bla_{OXA-23} gene. Clinicians should use antibiotics reasonably, strengthen the monitoring of bacterial resistance, and prevent the production and further spread of drug-resistant strains.

Key words　Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; ICU; Drug resistance genes

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*，Ab)是医院感染常见条件致病菌，广泛分布于自然界、医院环境及人体皮肤表面，易导致具有严重基础疾病或者免疫力低下的患者发生严重感染，甚至死亡[1]。近几年，临床医生越来越多地应用碳青霉烯类抗生素治疗感染性疾病，使得耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*，CRAB)逐年增多，且耐药问题严重，多重耐药(Multidrug resistant，MDR)及泛耐药(Extensively drug-resistant，XDR)鲍曼不动杆菌在世界范围内流行，给临床抗感染治疗带来巨大挑战[2-4]。重症监护病房(intensive care unit，ICU)患者疾病种类多，多为多器官功能障碍、脓毒症等，多数患者免疫力低下、又接受较多的侵入性操作、长期应用大量广谱抗生素，是医院暴发感染流行的重要区域[5-6]。本研究通过对我院重症监护病房CRAB分布情况及耐药性进行监测分析，检测其耐药基因，为CRAB的有效治疗及医院制定相应防控措施提供参考。

1　材料与方法

1.1　菌株来源

选取2017年7月至 2019年6月昆明医科大学附属延安医院重症医学科住院患者临床标本分离的38株CRAB，剔除同一患者重复菌株。质控菌株大肠埃希菌ATCC25922、铜绿假单胞菌ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC25923购自卫生部临检中心。

1.2　仪器与试剂

微生物培养箱(美国ThermoFisher Scientific公司)，VITEK2-Compact全自动微生物鉴定仪及其配套试剂(法国Bio-Mérieux公司)，抗菌药物纸片(温州康泰生物科技有限公司)，引物、MasterMix、核酸染料、DNA Marker(北京博迈德基因技术有限公司)，Agarose 琼脂糖、TAE缓冲液(昆明硕阳科技有限公司)，干式恒温器(杭州奥盛仪器公司)，低温高速离心机(美国赛默飞世尔科技公司)，PCR扩增仪(黑马医学仪器公司)、电泳仪(美国Bio-Rad公司)，Gel Doc XR+凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)。

1.3　细菌鉴定及药敏试验

菌株的分离、培养参照《全国临床检验操作规程》(第4版)[7]进行。采用VITEK2-Compact全自动微生物分析仪进行细菌鉴定与药敏试验。其中，氨苄西林/舒巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、阿米卡星、米诺环素、哌拉西林、哌拉西林/三唑巴坦的药敏试验采用纸片扩散法(Kirby-Bauer，KB)，其余均采用最低抑菌浓度法(minimum inhibitory concentration，MIC)。结果判定参照美国临床与实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI)各年的标准。

1.4　耐药基因检测

1.4.1　DNA模板制备

采用煮沸法制备PCR模板。将经过VITEK2-Compact全自动微生物鉴定药敏分析系统鉴定后储存于-70℃低温冰箱的鲍曼不动杆菌转入血平板，经18~24h培养后，挑取适量菌落到300μL蒸馏水中，充分震荡混匀，然后100℃水浴15min，13000r/min离心5min后取上清液作为作为DNA模板，-20℃冰箱保存备用。

1.4.2　PCR扩增

反应体系：总体积50μL，包括MasterMix 25μL，上游引物1μL，下游引物1μL，DNA模板2μL，蒸馏水21μL。引物序列及产物长度见表1，参照文献[8-9]，由北京博迈德基因技术有限公司合成。反应条件为：94℃预变性5min，然后94℃变性30s ，适宜温度退火30s(bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{NDM}和bla_{OXA-58}为58℃，bla_{OXA-23}和bla_{OXA-24}为55℃)，72℃延伸60s，共30个循环，最后72℃延伸5min。

表1　PCR引物序列

Tab. 1　PCR primer sequence

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
B类金属酶基因(MBLs)		
bla_{IMP}	F CTACCGCAGCAGAGTCTTTAC	587
	R AACCAGTTTTGCCTTACCAT	
bla_{VIM}	F AGTGGTGAGTATCCGACAG	261
	R ATGAAAGTGCGTGGAGAC	
bla_{NDM}	F GTTTGGCGATCTGGTTTTC	621
	R CGGAATGGCTCATCACGATC	
D类苯唑西林酶基因(OXAs)		
bla_{OXA-23}	F GATCGGATTGGAGAACCAGA	501
	R ATTTCTGACCGCATTTCCAT	
bla_{OXA-24}	F GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246
	R AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
bla_{OXA-58}	F AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599
	R CCCCTCTGCGCTCTACATAC	

1.4.3　PCR产物分析

扩增完产物经2%琼脂糖凝胶，110V电泳30min，放入凝胶成像系统扫描成像。电泳出现明亮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(National Center for Biotechnology Information)网站Blast比对分析。

2　结果

2.1　标本类型分布

38株CRAB来源于痰标本20株，占52.6%，来源于肺泡灌洗液14株，占36.8%，其余来源于胸水2株，血液1株，脑脊液1株。表明鲍曼不动杆菌主要引起下呼吸道感染。

2.2　药敏试验结果

38株CRAB对20种抗菌药物中的15种全部耐药，均为多重耐药菌株。对头孢哌酮/舒巴坦及米诺环素亦无敏感菌株，耐药率分别超过90%和80%，我院ICU分离CRAB仅对替加环素保持较高敏感性，耐药率为0，有部分中介菌株，见表2。

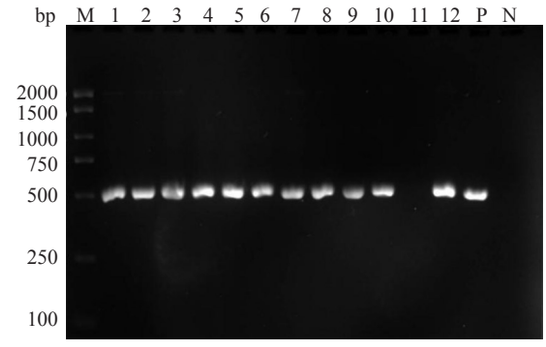
表2　耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌对临床常用抗生素耐药率

Tab. 2　Resistance rate of CRAB to clinical antibiotics

抗生素	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
亚胺培南	100.0%	0	0
阿米卡星	100.0%	0	0
左氧氟沙星	100.0%	0	0
环丙沙星	100.0%	0	0
复方磺胺甲噁唑	100.0%	0	0
妥布霉素	100.0%	0	0
庆大霉素	100.0%	0	0
哌拉西林	100.0%	0	0
哌拉西林/三唑巴坦	100.0%	0	0
氨苄西林/舒巴坦	100.0%	0	0
氨苄西林	100.0%	0	0
阿莫西林/克拉维酸	100.0%	0	0
头孢曲松	100.0%	0	0
头孢吡肟	100.0%	0	0
氨曲南	100.0%	0	0
头孢哌酮/舒巴坦	92.1%	7.9%	0
米诺环素	81.6%	18.4%	0
替加环素	0	7.1%	94.7%

2.3　耐药基因检测结果

38株CRAB中36株检出$bla_{\text{OXA-23}}$基因(94.7%)，bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{NDM}、$bla_{\text{OXA-24}}$和$bla_{\text{OXA-58}}$基因均无特异性条带出现，检测结果为阴性。部分$bla_{\text{OXA-23}}$基因的PCR产物电泳结果见图1。



M：Marker；1~10、12：阳性标本；11：阴性标本；P：阳性对照；N：阴性对照

图1　$bla_{\text{OXA-23}}$基因扩增产物电泳图

Fig. 1　Electrophoresis of $bla_{\text{OXA-23}}$ gene amplification products

3　讨论

据2014年CHINET中国细菌耐药性监测报告显示，鲍曼不动杆菌在医院内感染病原菌位列第三位，在非发酵菌中的地位已超过铜绿假单胞菌[10]。世界卫生组织(World Health Organization，WHO)于2017年公布的新型抗生素研发重点病原体清单中，CRAB被列为革兰阴性菌中的首位，究其原因，CRAB不仅可造成较高的病死率、医疗保健和社区负担，而且带来抗药性、传播性以及社区环境可预防性等方面的严峻挑战[11-12]。由于ICU患者病情危重，患者多长期卧床、免疫力低下，而鲍曼不动杆菌营养需求极低，生命力极其顽强，可黏附于各类物体表面，对紫外线、湿热、化学消毒剂等因素并不敏感，同时具有极强的获得性耐药和克隆性传播的能力，因此鲍曼不动杆菌在ICU中的检出率越来越高，前期研究表明，我院ICU已成为鲍曼不动杆菌检出率最高科室[13]。

耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌常常对多种抗菌药物均耐药，形成泛耐药，甚至全耐药[14]。本研究中，38株对亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌，同时对青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、喹诺酮类及β-内酰胺酶抑制剂类抗菌药物均耐药。对头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素亦无敏感菌株，耐药率分别为92.1%和81.6%，远高于其他地区相关报道。本院CRAB仅对替加环素保持较高敏感性，耐药率为0，提示替加环素可作为本院ICU鲍曼不动杆菌治疗的第一选择。此药敏试验结果表明，我院ICU鲍曼不动杆菌耐药极其严重，临床可供选择的治疗药物极其有限。医院应加强细菌耐药性检测，制定抗菌药物分级管理使用规则，临床医生应严格依照药敏试验结果，加强抗菌药物合理使用，否则临床治疗将面临无药可用的境地。

CRAB的耐药机制非常复杂，主要包括以下几个方面：①产生药物水解酶碳青霉烯酶；②外膜孔蛋白表达下调或缺失；③抗菌药物作用靶位改变；④主动外排泵活性增加；⑤生物膜的形成；⑥可移动遗传元件(如插入序列、质粒、整合子、转座子)快速传播细菌的耐药性等[15]。其中最主要的是碳青霉烯酶的产生。碳青霉烯酶是指能够明显水解亚胺培南或美罗培南的一类β-内酰胺酶，在鲍曼不动杆菌中主要为D类苯唑西林酶(OXAs)和B类金属β-内酰胺酶(MBLs)。D类酶按照氨基酸的同源性可分为8组，在鲍曼不动杆菌中报道的主要是OXA-23、OXA-24、OXA-51和OXA-58这4组[16]，B类酶包括有IMP、VIM、和NDM等型。由于各个国家和地区使用的抗菌药物存在差异，不同地区的鲍曼不动杆菌耐药性也不同，其所携带的耐药基因构成比亦不相同。大部分文献报道显示$bla_{\text{OXA-51}}$基因为鲍曼不动杆菌天然携带，其对鲍曼不动杆菌耐药性的贡献主要是由其上游插入序列介导，故本研究检测了6种主要碳青霉烯酶基因，结果显示，38株CRAB中36株(94.7%)检出bla OXA-23型基因，未发现bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{NDM}、$bla_{\text{OXA-24}}$和$bla_{\text{OXA-58}}$基因，提示$bla_{\text{OXA-23}}$是该院ICU分离CRAB主要携带的基因型别，是引起鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药的主要原因之一，与国内相关报道[17]一致。本次研究未检出B类金属β-内酰胺酶基因，虽然此类酶水解活性较强，但本次研究结果表明该酶不是本院ICU鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药的主要原因。另外，本研究中鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药率达100%，却有2株CRAB未检出上述耐药基因，提示可能存在外膜蛋白缺失或主动外排泵过度表达等其他耐药机制。

综上所述，本院重症监护病房CRAB耐药情况严重，临床医生面临极大困境，产OXA-23型酶可能是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因。医务人员应重视鲍曼不动杆菌的耐药性情况，及时将耐药谱变迁情况进行反馈，积极开展鲍曼不动杆菌耐药基因检测，分析鲍曼不动杆菌耐药特征与主要流行型别，从而为临床治疗提供强有力的科学依据，减少耐药菌的产生和传播，预防和控制院内感染暴发流行。

参考文献

[1] 胡宇晴, 马新然, 冒文君, 等. 鲍曼不动杆菌血流感染预后不良的危险因素[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(04): 329-334.

[2] Al-Gethamy M M, Faidah H S, Adetunji H A, *et al*. Risk factors associated with multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections at a tertiary care hospital in Makkah, Saudi Arabia - a matched case-control study[J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(3): 1181.

[3] Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016(2): 2475067.

[4] 王明贵译. 广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制: 中国专家共识[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(1): 82-92.

[5] 李连红, 胡慧敏, 周立英, 等. ICU耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌医院感染暴发调查[J]. 中华疾病控制杂志, 2016, 20(10): 1076-1078.

[6] 高树芳. ICU疑似泛耐药鲍曼不动杆菌肺部感染暴发调查分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(2): 27-29.

[7] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4版. 南京: 东南大学出版社, 2015: 827-831.

[8] Cheikh H B, Domingues S, Silveira E, *et al*. Molecular characterization of carbapenemases of clinical *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex isolates from a University Hospital in Tunisia[J]. *BioTech*, 2018, 8(7): 297.

[9] 张广慧, 曹雪萍, 俞静, 等. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌临床分离株的流行病学与耐药机制研究[J]. 检验医学, 2015, 30(01): 53-57.

[10] 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.

[11] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, *et al*. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3): 318-327.

[12] 郭静, 冯丽娜, 陈浩俊, 等. 临床科室ICU碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌的分子流行病学研究[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2019, 12(2): 91-97.

[13] 王佳, 高辉, 徐益, 等. 鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药变迁[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(11): 1955-1957.

[14] 王俊, 王宇, 廖玉凤, 等. 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[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(12): 1732-1734.

[15] 蔡果果, 王春艳. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药机制及治疗研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(2): 234-237.

[16] 贺毅. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐酶机制及临床治疗的研究进展及其对策[J]. 抗感染药学, 2017, 14(4): 725-729.

[17] 曾松芳, 韩安棣, 郭美丽, 等. 苍南县75株医院感染耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因分析[J]. 预防医学, 2019, 31(11): 1131-1135.