

· 基础研究 ·

仪征地区鲍曼不动杆菌碳青霉烯类抗菌药耐药相关酶表型和基因型分析

江培涛^{1,2}, 方敏¹, 刘棵文¹, 马超¹, 王晶晶¹, 严枫^{2*}¹南京鼓楼医院集团仪征医院检验科, 江苏 扬州 211900; ²南京医科大学附属肿瘤医院检验科, 江苏 南京 210009

[摘要] 目的: 研究江苏省仪征地区鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药相关酶表型和基因型的分布情况, 探讨该地区广泛耐药鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药的主要机制。方法: 根据常规药敏试验结果将鲍曼不动杆菌临床分离株分为广泛耐药组和普通组, 分别选取25株和23株用改良EDTA纸片增效法检测金属 β -内酰胺酶; 用碳青霉烯失活法检测碳青霉烯酶; 用双纸片协同试验法和三维试验法分别检测染色体和质粒介导的AmpC酶; 用PCR方法检测耐药基因 bla_{OXA-23} 、 bla_{OXA-24} 、 bla_{TEM} 、 bla_{AmpC} 、 bla_{VIM} 、 bla_{NDM-1} , 对部分阳性产物进行测序比对。结果: 鲍曼不动杆菌广泛耐药组和普通组分别占62.5%和37.5%。广泛耐药组中金属 β -内酰胺酶阳性1株、碳青霉烯酶阳性4株、染色体和质粒介导的AmpC酶阳性分别为1株和23株; 普通组中均未检出上述酶表型。广泛耐药组全部检出耐药基因 bla_{OXA-23} 、 bla_{TEM} 、 bla_{AmpC} , 均未检出 bla_{OXA-24} 、 bla_{VIM} 、 bla_{NDM-1} ; 普通组中 bla_{OXA-23} 、 bla_{OXA-24} 、 bla_{TEM} 、 bla_{AmpC} 分别检出4、5、22、12株, 未检出 bla_{VIM} 、 bla_{NDM-1} 。两组比较, 质粒介导的AmpC酶和 bla_{OXA-23} 、 bla_{AmpC} 基因携带率的差异具有统计学意义(χ^2 分别为40.627、34.183、15.511, $P < 0.001$)。基因测序结果发现部分菌株的序列存在碱基插入或置换的改变。结论: 鲍曼不动杆菌耐药性严重, 产质粒介导的AmpC酶和 bla_{OXA-23} 、 bla_{AmpC} 基因介导的耐药机制是仪征地区鲍曼不动杆菌广泛耐药的主要机制。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯酶; 表型; 基因型**[中图分类号]** R378**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-054-08**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190110

Phenotypic and genotypic analysis of carbapenems associated with antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in Yizheng area

Jiang Peitao^{1,2}, Fang Min¹, Liu Kewen¹, Ma Chao¹, Wang Jingjing¹, Yan Feng²¹Department of Clinical Laboratory, Yizheng Hospital of Nanjing Drum Tower Hospital Group, Yangzhou 211900;²Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Cancer Hospital of NMU, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To study the phenotypic and genotypic distribution of *Acinetobacter baumannii* in Yizheng area to carbapenem drug resistance, and to explore the main mechanism of carbapenem resistance of *Acinetobacter baumannii*. **Methods:** The clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* were divided into two groups according to the results of routine drug sensitivity test. Twenty-five strains of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* (XDRAb) and 23 of common strains were selected to detect metal β -lactamases by modified EDTA disk synergy method. Carbapenem was detected by carbapenem inactivation method, chromosome and plasmide-mediated AmpC enzyme were detected by double disk synergy test and modified three dimensional test, and the resistant genes bla_{OXA-23} , bla_{OXA-24} , bla_{TEM} , bla_{AmpC} , bla_{VIM} , and bla_{NDM-1} were detected by PCR method, and some positive products were sequenced and compared. **Results:** The XDRAb group and the common group accounted for 62.5% and 37.5%, respectively. One strain of metal β -lactamase, 4 strains of carbapenemase, and 1 strain of chromosome and 23 strains of plasmide-mediated AmpC enzyme were positive in the XDRAb group, but none of them were detected in the common group. The genes bla_{OXA-23} , bla_{TEM} , and bla_{AmpC} were detected in all strains of XDRAb, and bla_{OXA-24} , bla_{VIM} , and bla_{NDM-1} were not detected in all of them. In the normal group, 4 strains of bla_{OXA-23} , 5 strains of bla_{OXA-24} , 22 strains of bla_{TEM} and 12 strains of bla_{AmpC} were detected respectively, while bla_{VIM} and bla_{NDM-1} were not detected in all strains.

[基金项目] 江苏省医学创新团队暨领军人才基金

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yanfeng2007@sohu.com

The difference of plasmid mediated AmpC enzyme, bla_{OXA-23}, and bla_{AmpC} gene carrying rate between the two groups was statistically significant ($\chi^2=40.627, 34.183, 15.511, P < 0.001$, respectively). The results of gene sequencing showed that the sequence of some strains was changed by base insertion or replacement. **Conclusion:** The drug resistance of *Acinetobacter baumannii* to carbapenem is serious in Yizheng area. The main mechanisms of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenem are plasmide-mediated AmpC enzyme, bla_{OXA-23} and bla_{AmpC} gene mediated drug resistance.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; carbapenemase; phenotype; genotype

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):054-061]

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)是医院内获得性感染的重要条件致病菌,可导致医院获得性肺炎、机械通气相关性肺炎、导管相关性血流感染等多种类型的医院内感染。近年来Ab对碳青霉烯类抗菌药物耐药率越来越高,耐药情况不容忽视。中国CHINET细菌耐药监测网数据显示,2005—2014年Ab对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率从31.0%上升至66.7%,2015和2016年Ab对亚胺培南(IPM)和美罗培南(MEM)的耐药率分别为62.0%/70.5%和68.6%/71.4%^[1-3]。介导鲍曼不动杆菌耐药的机制复杂多样,其中与碳青霉烯类耐药相关的主要有灭活酶或钝化酶的产生、药物主动外排泵的作用、膜孔蛋白的异常表达或缺失等^[4]。本研究旨在对江苏省仪征地区(以下简称“本地区”)检出的Ab耐药情况及由碳青霉烯酶介导的碳青霉烯类耐药机制进行分析,为临床治疗和预防Ab感染提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

128株Ab临床分离株分别来自于南京鼓楼医院集团仪征医院和江苏省仪征市人民医院2016年7月—2017年12月的门诊及住院患者,排除同一病患不同时间的重复分离株。其中标本来源:ICU 49株,呼吸内科22株,神经外科32株,其他科室25株;标本类型:痰液标本97株,肺泡灌洗液6株,尿液标本9株,脓液6株,血液标本4株,伤口分泌物3株,胸水3株。药敏质控菌株 *E.Coli* ATCC25922、*P.aeruginosa* ATCC27853 和 *A.baumannii* ATCC19606、*K.pneumoniae* ATCC BAA-1705、1706购自法国梅里埃公司。

1.1.2 主要仪器与试剂

GHP-9270数显隔水式恒温孵育箱(上海精宏医疗器械厂);MicroScan WalkAway 96 Plus细菌鉴定药敏分析仪(贝克曼公司,美国);THERMAL CYCLER 480热循环仪(PERKIN ELMER公司,美国);

天能1600凝胶电泳图像分析系统(上海天能公司);TGL-18R冷冻高速离心机(珠海Hema医学仪器公司);NanoDrop 2000分光光度计(THERMO公司,美国);亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、头孢西丁(FOX)、头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)药敏纸片(Oxoid公司,英国);乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)、磷酸盐缓冲液(PBS)(上海阿拉丁公司);LB肉汤(杭州百思生物技术公司);水解酪蛋白(MH)琼脂(杭州滨河生物技术公司);细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR Master Mix、TaqDNA聚合酶及MgCl₂、dNTPs、10Xbuffer、DNAMarker(北京TIANGEN生化科技公司);琼脂糖(广州赛国生物科技公司)、引物合成与PCR阳性产物测序(南京思普金生物工程公司)。

1.2 方法

1.2.1 鲍曼不动杆菌的鉴定和药敏试验

所有菌株的常规鉴定和药敏试验均由MicroScan WalkAway 96 Plus系统完成。通过PCR方法扩增bla_{OXA-51-like}基因并测序,测序结果经BLAST比对,结合生化反应鉴定结果进而确定为Ab。抗菌药物敏感性试验采用微量肉汤稀释法,结果判断参照CLSI2016版^[5]标准执行。根据《中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识》^[6]将以上菌株中仅对替加环素和(或)多黏菌素敏感的菌株定义为广泛耐药鲍曼不动杆菌(extensively drug resistant *A. baumannii*, XDR-Ab)。进而抽取碳青霉烯类耐药的XDR-Ab 25株(编号为XDR21至XDR45)和碳青霉烯类敏感的普通Ab(NXDR-Ab)23株(编号为N1至N23)进行后续实验。

1.2.2 金属β-内酰胺酶的检测

参照文献[7-9]用改良EDTA纸片增效法检测金属β-内酰胺酶(MBLs),具体步骤如下:用灭菌棉签将0.5麦氏浊度的待检菌悬液均匀涂布于水解酪蛋白(MH)琼脂培养基上,然后贴两片CAZ(30 μg)或IPM(10 μg)药敏纸片,二者间隔10~15 mm;配制0.05 mol/L EDTA溶液,在其中1片上滴加10 μL。

用FOX(30 μg)和不含抗菌药的空白纸片做阴性及空白对照。36℃恒温培养18~24 h后观察结果,滴加过EDTA的纸片抑菌环直径比不加的扩大3 mm以上,或形成矢状生长的现象即为阳性。

1.2.3 碳青霉烯酶的检测

参照文献[10]采用碳青霉烯失活法(CIM)检测碳青霉烯酶;用*K.pneumoniae* ATCC BAA-1705、1706、生理盐水和LB肉汤浸泡的MEM纸片(10 μg)分别作阳性、阴性、空白和本底对照。结果判断:若Ab产碳青霉烯酶,则纸片上的MEM被水解,失去对ATCC25922的抑制作用,纸片周围形成直径6~15 mm的抑菌圈或直径为16~18 mm但可见抑菌圈内有散在菌落,则判为阳性;反之,纸片上MEM不被水解,ATCC25922生长受抑制而呈现直径≥19 mm抑菌圈,则判为阴性。

1.2.4 染色体和质粒型AmpC酶的检测

双纸片协同试验法检测染色体介导的AmpC酶:将0.5麦氏浊度的待检细菌均匀涂布于MH琼脂培养基上,然后分别贴上含量均为30 μg的FOX和CTX纸片,二者相距15~20 mm。36℃孵育过夜后观察结果,CTX抑菌环邻近FOX侧出现“D”样截平

现象即为阳性。

参照文献[11]用-70℃与37℃反复冻融提取并用三维试验检测质粒型AmpC酶。

1.2.5 耐药基因的检测及测序

按照细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)操作说明提取细菌基因组DNA,检测DNA纯度,波长260 nm和280 nm下吸光度比值在1.7~1.9范围内方可接受。

根据GenBank核酸数据库中耐药基因bla_{OXA-23}、bla_{OXA-24}、bla_{TEM}、bla_{AmpC}、bla_{VIM}、bla_{NDM-1}的序列用Primer5.0软件设计引物,并委托南京思普金生物技术公司合成(表1)。PCR反应体系(20 μL):DNA模板2 μL;上、下游引物(20 μmol/L)各1 μL;2×Taq PCR Master Mix 10 μL;灭菌ddH₂O 6 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃复性20 s,72℃延伸50 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR扩增产物经含0.5 μg/mL溴化乙锭(EB)的1%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下观察结果并拍照。

1.2.6 阳性基因测序

将凝胶电泳明显阳性的PCR扩增产物根据耐药表型检测结果抽取部分送南京思普金生物技术

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

目的基因	引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
bla _{OXA-23}	OXA-23F	ACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGG	606
	OXA-23R	CCAGCCCACTTGTGGTTTTATAT	
bla _{OXA-24}	OXA-24F	GTCCCTGCATCAACATTTAAGATGC	477
	OXA-24R	CACCCAACCAGTCAACCAACCTACCT	
bla _{TEM}	TEM-F	CAGAAACGCTGGTGAAG	701
	TEM-R	AACTACGATACGGGAGGG	
bla _{AmpC}	AmpC-F	GCCTGGTAAGTATTGGAAAG	696
	AmpC-R	CCGAAACGGTTAGTTGAGCC	
bla _{VIM}	VIM-F	CCGTAGAAGAACAGCAAGGG	593
	VIM-R	CCATCGGCAATCTGGTAAAG	
bla _{NDM-1}	NDM-F	CATTGGCGGCGAAAGTCA	921
	NDM-R	CTCGCACCGAATGTCTGGC	
bla _{OXA-51}	OXA-51-F	ATGAACATTAAGCACTCTTAC	825
	OXA-51-R	CAGAATGGGAAAAGGACATGA	

公司进行双向测序,所得序列用工具软件DNA-STAR拼接后与美国生物技术信息中心基因库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中相关序列进行一致性比对,以明确Ab是否携带相关耐药基因,并查找有无错义突变。

1.3 统计学方法

用WHONET5.6软件对Ab临床分离株常规药敏

结果进行分析;用SPSS20.0软件对计数资料率的比较进行χ²检验分析,以P≤0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏试验结果

128株Ab临床分离株中广泛耐药菌株(XDR-Ab)80株(62.5%),普通菌株(NXDR-Ab)48株

(37.5%),具体耐药情况见表2。

2.2 金属β-内酰胺酶检测结果

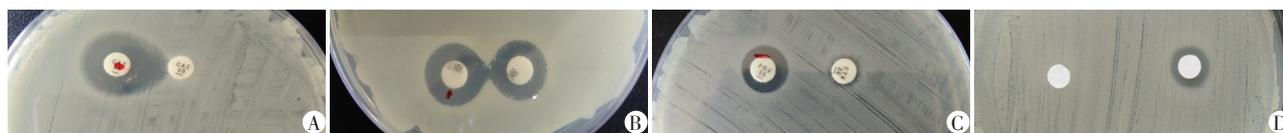
改良EDTA纸片增效法检测MBLs结果显示,编号为XDR21的菌株出现图1A所示滴加EDTA后抑菌圈扩大3 mm以上并形成彗状生长的现象,表现为阳性;其余菌株均为阴性,但可见抑菌圈平均扩大1~2 mm(图1B)。其中10株XDRAb和9株普通Ab采

用IPM纸片,其抑菌圈直径:XDRAb为(16 ± 5)mm,普通Ab为(32 ± 4)mm;14株XDRAb和14株普通Ab采用CAZ纸片,其抑菌圈直径:XDRAb为(9 ± 2)mm,普通Ab为(22 ± 3)mm。对照显示,滴加EDTA的FOX纸片形成直径12 mm的抑菌圈(图1C),滴加EDTA的空白纸片形成直径10 mm的抑菌圈(图1D)。两组结果比较见表3。

表2 128株Ab临床分离株常见药物耐药情况
Table 2 Drug resistance of 128 clinical isolates of Ab (%)

抗菌药物	XDR-Ab(n=80)			NXDR-Ab(n=48)		
	R	I	S	R	I	S
阿米卡星	98.8	0.0	1.2	8.3	0.0	91.7
庆大霉素	100.0	0.0	0.0	33.3	16.7	50.0
亚胺培南	100.0	0.0	0.0	39.6	0.0	60.4
美罗培南	100.0	0.0	0.0	39.6	0.0	60.4
头孢唑林	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
头孢他定	100.0	0.0	0.0	4.2	4.2	91.6
头孢噻肟	100.0	0.0	0.0	4.2	20.8	75.0
头孢吡肟	100.0	0.0	0.0	4.2	0.0	95.8
哌拉西林	100.0	0.0	0.0	4.2	20.8	75.0
哌拉西林/他唑巴坦	100.0	0.0	0.0	4.2	12.5	83.3
多黏菌素	0.0	—	100.0	0.0	—	100.0
复方新诺明	100.0	—	0.0	16.7	—	83.3
环丙沙星	100.0	0.0	0.0	8.3	0.0	91.7
左氧氟沙星	98.8	0.0	1.2	8.3	0.0	91.7
四环素	100.0	0.0	0.0	12.5	0.0	87.5
妥布霉素	100.0	0.0	0.0	16.7	0.0	83.3

S为敏感,I为中介,R为耐药;—为无此折点。



A:滴加EDTA的抑菌圈扩大并形成彗状生长;B:滴加EDTA的抑菌圈直径扩大2 mm;C:滴加EDTA的FOX纸片;D:滴加EDTA的空白纸片。

图1 部分菌株金属β-内酰胺酶检测结果

Figure 1 Detection of metallic β-lactamase in some strains

2.3 碳青霉烯酶的检测结果

25株XDR-Ab中,编号为XDR24、26、43、45的菌株碳青霉烯酶阳性,表现为MEM药敏纸片周围无抑菌圈现象,另23株普通Ab均未检测出碳青霉烯酶,MEM纸片周围形成明显抑菌圈(图2A),但XDR43号菌株MEM抑菌圈直径为12 mm。图2B为生理盐水和LB肉汤对照,两组结果比较见表3。

2.4 染色体和质粒型AmpC酶的检测结果

2.4.1 双纸片协同试验结果

在25株XDR-Ab中编号为XDR39的菌株出现

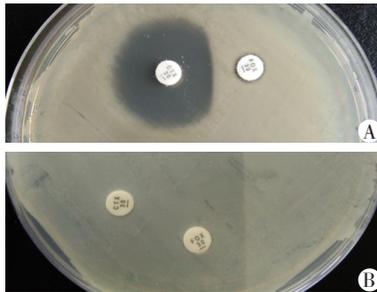


A:碳青霉烯酶阳性和阴性结果;B:生理盐水和LB肉汤空白对照。

图2 部分菌株碳青霉烯酶的检测结果

Figure 2 Detection results of carbapenemase of some strains

如图3A所示的截平现象,表现为阳性。另24株XDR-Ab及23株普通Ab对CTX和FOX均表现为耐药且未出现抑菌圈,表现为阴性(图3B)。两组结果比较见表3。



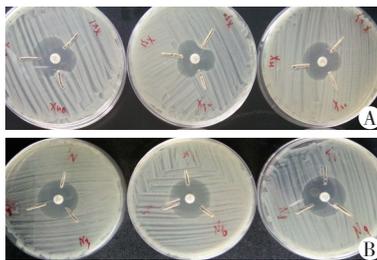
A:CTX靠近FOX侧出现截平现象;B:CTX和FOX双纸片试验阴性。

图3 部分菌株双纸片协同试验结果

Figure 3 Results of double disk synergistic test of some strains

2.4.2 三维试验结果

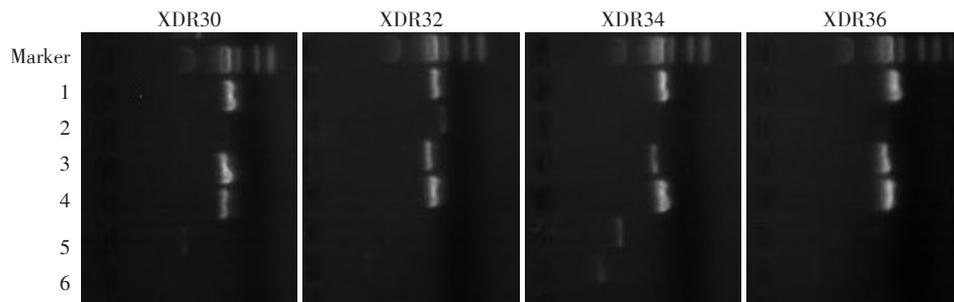
在25株XDR-Ab中,编号为XDR21和XDR39的2株在FOX抑菌圈边缘与切缝交界处未出现缺损,表现为阴性;其余23株XDR-Ab均表现为阳性(图4A)。另23株普通Ab均未出现缺损,表现为阴性(图4B)。两组结果比较见表3。



A:XDR-Ab三维试验结果;B:普通Ab三维试验阴性结果。

图4 部分菌株三维试验结果

Figure 4 Three dimensional test results of some strains



25株XDR-Ab组中编号为XDR30、32、34、36的4个样本第1到6对引物扩增结果,1~6分别对应 bla_{OXA-23} 、 bla_{OXA-24} 、 bla_{TEM} 、 bla_{AmpC} 、 bla_{VIM} 、 bla_{NDM-1} ;Marker大小为2 000 bp,各条带碱基数(bp)从左至右依次为2 000、1 000、750、500、250、100。

图5 部分菌株的耐药基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 5 Agarose gel electrophoresis of PCR products of drug resistance genes in some strains

2.5 耐药基因的检测及测序结果

2.5.1 碳青霉烯酶相关的6个目的基因的PCR检测结果

在25株XDR-Ab和23株普通Ab中,均未检出MBLs相关耐药基因 bla_{VIM} 、 bla_{NDM-1} ,其余4个目的基因的检测结果见表3。部分菌株的耐药基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果见图5。

表3 Ab各类酶表型及相关基因型检测结果

Table 3 Detection of enzyme phenotypes and related genotypes of Ab

检测项目	XDR-Ab (n=25)	普通Ab (n=23)	χ^2 值	P值
MBLs	阳性	0	—	1.000*
	阴性	23		
碳青霉烯酶	阳性	0	2.193	0.139
	阴性	23		
染色体介导	阳性	0	—	1.000*
	阴性	23		
AmpC酶	阳性	0	40.627	<0.001
	阴性	23		
bla_{OXA-23}	阳性	4	34.183	<0.001
	阴性	19		
bla_{OXA-24}	阳性	5	3.961	0.047
	阴性	18		
bla_{TEM}	阳性	22	—	0.479*
	阴性	1		
bla_{AmpC}	阳性	12	15.511	<0.001
	阴性	11		

*表示此数据为Fisher精确概率法计算所得;—表示无卡方值。

2.5.2 碳青霉烯酶相关的4个阳性基因PCR产物测序及比对结果

选取编号为XDR22、XDR24、XDR25、XDR43的菌株进行 bla_{OXA-23} 基因测序发现编号XDR22的菌株

在第8位碱基(G)插入;选取编号为N9、N11、N12、N13的菌株进行bla_{OXA-24}基因测序发现编号N12的菌株在第457位碱基(G)插入;选取编号为XDR21、XDR39、N1、N2的菌株进行bla_{TEM}基因测序未发现碱基序列改变;选取编号为XDR39、XDR43、N16、N17的菌株进行bla_{AmpC}基因测序发现编号XDR43的菌株在第673位出现碱基G-C置换,编号N17的菌株总共出现14处碱基置换。其余基因序列未发现碱基改变(编号为N17的菌株bla_{AmpC}基因测序及比对结果见图6~8)。

3 讨论

鲍曼不动杆菌是一种广泛存在于病房环境和人体皮肤以及呼吸道的不发酵糖类的专性需氧革兰氏阴性球杆菌,是引起医院感染尤其是各类ICU患者获得性感染的重要病原菌。近年来Ab的耐药趋势越来越严重,本研究收集的菌株中碳青霉烯类耐药的XDR-Ab占临床分离Ab的62.5%,碳青霉烯

类敏感的普通Ab占37.5%,该结果与国内多中心联合调查结果一致^[1-3]。本研究未发现全耐药Ab(PDR-Ab)。

β-内酰胺酶是很多细菌产生的一种通过裂解β-内酰胺环而使抗生素的抗菌活性减弱或消失的灭活酶。MBLs的活性中心含金属Zn²⁺离子,属于Ambler分子结构分类法中的B类。本研究用改良EDTA双纸片增效法检测MBLs结果显示,XDR-Ab和普通Ab两组差异无统计学意义(精确概率法P=1.000)。据此推测在介导本地区广泛耐药Ab的碳青霉烯类耐药机制中,产MBLs并不起主要作用。另外本研究通过比较MBLs阴性株IPM抑菌圈的大小以及空白对照,发现滴加EDTA的抑菌圈比未滴加的平均增大2~3 mm,这说明EDTA本身具有一定抑菌作用。

碳青霉烯酶是能够水解至少一种碳青霉烯类抗菌药的一类β-内酰胺酶,按前述结构分类法包括A、B、D等3类。其中A类酶常见于一些肠杆菌科细

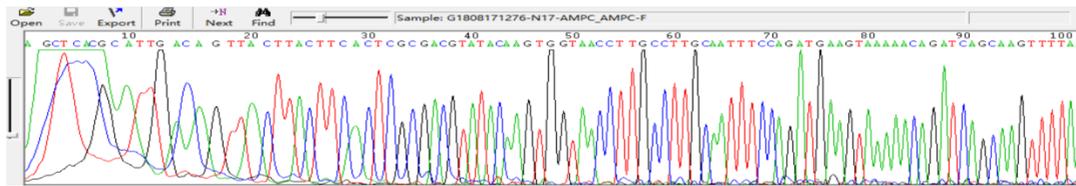


图6 编号为N17的菌株bla_{AmpC}基因正向测序部分峰图

Figure 6 Partial peak map of bla_{AmpC} gene forward sequencing of N17 strain

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1175 bits(636)	0.0	664/678(98%)	0/678(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAAAGAACAATAAAAAATACACCGATTGACCAAGTTAACTTACTTCAACTCGCGACGTATAC	60		
Sbjct 2076732	GAAAGTGTCTAAAAAATACACCGATTGACCAAGTTAACTTACTTCAACTCGCGACGTATAC	2076791		
Query 61	AAGTGGTAACCTTGCCTTGCATTTCCAGATGAAGTAAAAACAGATCAGCAAGTTTTAAC	120		
Sbjct 2076792	AAGTGGTAACCTTGCCTTGCATTTCCAGATGAAGTAAAAACAGATCAGCAAGTTTTAAC	2076851		
Query 121	TTTTTTTAAAGACTGGAAACCTAAAAAACAATCGGTGAATACAGACAATATTCAAATCC	180		
Sbjct 2076852	TTTTTTTCAAAAGACTGGAAACCTAAAAAACAATCGGTGAATACAGACAATATTCAAATCC	2076911		
Query 181	AAGTATTGGCCTATTTGGAAAAGTTGTAGCTTTGTCTATGAATAAACCTTTCGACCAAGT	240		
Sbjct 2076912	AAGTATTGGCCTATTTGGAAAAGTTGTAGCTTTGTCTATGAATAAACCTTTCGACCAAGT	2076971		
Query 241	CTTAGAAAAAACAATTTTTCCGGCCCTTGGCTTAAAACATAGCTATGTAATGTACCTAA	300		
Sbjct 2076972	CTTAGAAAAAACAATTTTTCCGGCCCTTGGCTTAAAACATAGCTATGTAATGTACCTAA	2077031		

图7 编号为N17的菌株bla_{AmpC}基因部分碱基序列比对图

Figure 7 Alignment of partial Base sequence of bla_{AmpC} gene of N17 strain

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
464 bits(1194)	2e-165	Compositional matrix adjust.	224/224(100%)	224/224(100%)	0/224(0%)	+2
Query 2	KELKNTPIDQVNLQLLATYTSGNLALQFPDEVKTDQQVLTFFKDWKPKNSIGEYRQYSNP	181				
Sbjct 118	KELKNTPIDQVNLQLLATYTSGNLALQFPDEVKTDQQVLTFFKDWKPKNSIGEYRQYSNP	177				
Query 182	SIGLFGKVVVALSMNKPFDQVLEKTIFFPALGLKHSYVNVPKTQMQNYAFGYNQENQPIRVN	361				
Sbjct 178	SIGLFGKVVVALSMNKPFDQVLEKTIFFPALGLKHSYVNVPKTQMQNYAFGYNQENQPIRVN	237				
Query 362	PGPLDAPAYGVKSTLPDMLSF IHANLNPQKYPADIQRAINE THQGFYQVNTMYQALGWEE	541				
Sbjct 238	PGPLDAPAYGVKSTLPDMLSF IHANLNPQKYPADIQRAINE THQGFYQVNTMYQALGWEE	297				
Query 542	FSYPATLQTL LLDNSSEQIVMKPNKVT AISKEPSVKMYHKTGSTN	673				
Sbjct 298	FSYPATLQTL LLDNSSEQIVMKPNKVT AISKEPSVKMYHKTGSTN	341				

图8 编号为N17的菌株bla_{AmpC}基因编码氨基酸序列比对图

Figure 8 Sequence alignment of amino acid sequence encoding bla_{AmpC} gene of N17 strain

菌,与D类同为丝氨酸酶,B类为金属酶,可由转座子、质粒或染色体介导。本研究用CIM法检测碳青霉烯酶:XDR-Ab组4株表现为阳性,而普通Ab组均为阴性,二者差异无统计学意义($\chi^2=2.139$ $P=0.139$)。

AmpC酶属于上述分类法中的C类,故又称AmpC β -内酰胺酶,通常由细菌的染色体或质粒介导。其特点是能水解头孢菌素但棒酸不能抑制其活性。AmpC酶可根据产生方式分为3类:与 β -内酰胺类抗生药的存在无关但可持续少量产生的持续低产酶;与 β -内酰胺类抗生药的存在有关的诱导型高产酶,该酶通常由染色体介导;与 β -内酰胺类抗生药的存在无关但可持续大量产生的持续高产酶。持续高产AmpC酶的产生通常是由于细菌质粒介导产生去阻遏突变,该突变使调控基因编码的蛋白质功能表达异常,进而引起AmpC酶的大量表达^[12-13];该酶可引起耐药菌株在临床流行,而且此类病原菌往往表现为多重耐药,治疗起来相当棘手。故检测AmpC酶对于临床诊断和治疗此类细菌感染以及流行病学调查具有重要意义。本研究用三维试验检测质粒型AmpC酶,结果显示25株XDR-Ab中,除编号为XDR21、XDR39的菌株外均产生质粒型AmpC酶;结合改良EDTA纸片增效法和双纸片协同试验结果发现XDR21产MBLs而XDR39产生染色体型AmpC酶;23株普通Ab组染色体和质粒型AmpC酶均为阴性。在上述两种AmpC酶中,两组菌株在质粒型AmpC酶的检出率差异有统计学意义($\chi^2=40.627$, $P<0.001$),说明质粒型AmpC酶是本地区Ab广泛耐药的主要机制。结合本研究菌株来源分布主要以ICU等科室为主,而且XDR-Ab的检出率高达62.5%,推测由质粒介导并持续高产AmpC酶是目前本地区Ab主要的流行方式和耐药机制。

TEM-1型酶在我国Ab中普遍存在,导致包括IPM在内的 β -内酰胺类抗生药发生高耐药率^[14]。OXA型D类碳青霉烯水解酶在Ab中最常见,包括固有的OXA-51型水解酶和获得性水解酶OXA-23、24、58及143型^[15]。在Ab中发现的MBLs酶主要有VIM、IMP和SIM型,NDM-1近几年才被陆续报道^[16-17]。本研究在检测碳青霉烯酶相关表型的基础上分析与其相关的6个耐药基因,结果显示TEM基因在XDRAb和普通Ab两组中的携带率分别为100.0%和95.7%($P=0.479$),差异无统计学意义,表明TEM基因介导的超广谱酶虽然广泛流行于各类Ab中,但不是导致其形成广泛耐药的主要机制。

AmpC基因两组中的携带率分别为100.0%和52.2%($\chi^2=15.511$, $P<0.001$),差异有统计学意义,说明AmpC基因介导的耐药机制是本地区XDRAb对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制之一。该结果也进一步印证了双纸片协同试验法和改良三维试验法检测Ab染色体和质粒型AmpC酶得出的结论。OXA-23基因在两组中的表达率分别为100.0%和17.4%($\chi^2=34.183$, $P<0.001$),OXA-24基因在两组中的表达率分别为0.0%和21.7%($\chi^2=3.961$, $P=0.047$),差异均有统计学意义,该结果说明在获得性碳青霉烯水解酶介导的耐药机制中,OXA-23基因编码的水解酶起主要作用,这与文献^[15,18-19]报道一致。综合比较CIM方法检测碳青霉烯酶表型和PCR方法检测OXA基因型结果,可以发现两组Ab中表型检测的阳性率均明显低于基因型,甚至会得出相互矛盾的结论,分析其原因可能与CIM方法检测肠杆菌科细菌KPC型碳青霉烯酶的敏感性高,而检测Ab等其他菌属OXA型、NDM型碳青霉烯酶时敏感性低有关^[5]。因此,在检测不动杆菌等非发酵菌碳青霉烯酶表型时,不推荐用CIM方法。在两组Ab中,均未检出MBLs相关耐药基因VIM、NDM-1,而编号为XDR21的菌株MBLs表型阳性,推测该菌株所产生的MBLs为IMP或SIM型之一,该结果也说明MBLs介导的耐药机制在本地区Ab对碳青霉烯类耐药过程中不起主导作用。这与丁梦珊^[20]等所报道徐州地区MBLs相关耐药基因IMP检出率高达86.8%差异较大。导致地区差异的原因可能与实验技术或菌株自身的遗传学差异有关,尚有待进一步研究。

根据碳青霉烯酶表型及基因型检测结果挑选16株Ab进行相关基因测序并与GenBank相应核酸序列比对发现同源性均达98%~100%。bla_{OXA-23}基因测序发现编号XDR22的菌株在第8位碱基(G)插入,提交基因库比对氨基酸序列显示位于第3位的甘氨酸被丝氨酸所取代;bla_{OXA-24}基因测序发现编号N12的菌株在第457位碱基(G)插入,比对氨基酸序列未发现改变;bla_{TEM}基因测序未发现碱基序列改变,同源性为100%;bla_{AmpC}基因测序发现编号XDR43的菌株在第673位出现碱基G-C置换,比对氨基酸序列发现使第225位氨基酸由甘氨酸改变为精氨酸;编号N17的菌株总共出现14处碱基置换,比对氨基酸序列未发现改变。比较两组菌株氨基酸序列结果发现,XDR-Ab组氨基酸改变明显多于普通Ab组,进而推测耐药基因编码氨基酸的改变程

度可能与其耐药性的增强呈正相关。

[参考文献]

- [1] 胡付品. 2005—2014年CHINET中国细菌耐药性监测网5种重要临床分离菌的耐药性变迁[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(1):93-99
- [2] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2015年CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(6):685-694
- [3] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2016年中国CHINET细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(5):481-491
- [4] Rumbo C, Gato E, López M, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11):5247-5257
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-sixth informational supplement (M100 - S26) [S]. CLSI, 2016
- [6] 陈佰义,何礼贤,胡必杰,等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. 中华医学杂志,2012,92(2):76-85
- [7] 何友华,姚庆完. EDTA纸片增效试验检测鲍曼不动杆菌金属 β -内酰胺酶[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(5):579-580
- [8] Lee K, Lim YS, Yong D, et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10):4623-4629
- [9] Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem - EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10):3798-3801
- [10] van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods [J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0123690
- [11] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5):1791-1796
- [12] Zorgani A, Daw H, Sufya N, et al. Co-occurrence of plasmid-mediated AmpC β -lactamase activity among *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*[J]. Open Microbiol J, 2017, 11(1):195-202
- [13] Babouee FB, Ellington MJ, Hopkins KL, et al. The differential importance of mutations within AmpD in cephalosporin resistance of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 48(5):555-558
- [14] 刘赫,多丽波. 鲍曼不动杆菌A类碳青霉烯酶的研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2015,40(4):318-324
- [15] 陈艺升,高晶,张灏旻,等. 质粒介导的鲍曼不动杆菌bla_{OXA-23}耐药基因研究[J]. 中华检验医学杂志,2017,40(1):36-40
- [16] Ghazawi A, Sonnevend A, Bonnin RA, et al. NDM-2 carbapenemase - producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab emirates [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(2):E34-E36
- [17] Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6):1255-1259
- [18] Kuo SC, Huang WC, Huang TW, et al. Molecular Epidemiology of emerging bla_{OXA-23}-Like- and bla_{OXA-24}-Like-carrying *Acinetobacter baumannii* in Taiwan [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(3):e0121517
- [19] Hajjar SM, Dahdouh E, Daoud Z, et al. Phenotypic and genotypic detection of β -lactamases in *Acinetobacter* spp. isolates recovered from Lebanese patients over a 1-year period [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2018, 12:107-112
- [20] 丁梦珊,蔡蕊,花璇,等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶耐药基因及整合子检测与分析[J]. 临床检验杂志,2016,10(34):795-797

[收稿日期] 2018-10-06