

• 临床检验研究论著 •

# 多重耐药鲍曼不动杆菌整合子及菌株同源性分析\*

周万青, 沈 瀚, 秦 芳, 宁明哲, 张之烽<sup>△</sup>, 张 葵  
(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 江苏南京 210008)

**摘 要:**目的 了解该院多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)整合子携带情况及菌株同源性,为临床合理用药及控制院内感染提供依据。方法 收集多重耐药鲍曼不动杆菌 101 株, K-B 纸片法测定其对 12 种抗菌药物的敏感性, 琼脂稀释法测定其对多粘菌素 B 的 MIC; PCR 检测 intI I、intI II 和 intI III 基因及可变区; 基因外重复回文序列( REP)- PCR 分析菌株同源性。结果 101 株 MDRAB 仅对米诺环素和阿米卡星呈现出敏感性, 敏感率分别为 36.6% 和 33.7%, 对其他 10 种药物的敏感率均为 0; 对多粘菌素 B 的 MIC ≤ 2 μg/mL; 96.0% (97/101) 菌株携带 I 类整合酶基因, DNA 测序分析整合子可变区携带基因盒为 aacA4-catB-aadA1 (2 300 bp) 菌株 47 株, 携带基因盒为 aacC1-orfX-orfX'-aadA1 (3 000 bp) 菌株 44 株; REP-PCR 分析显示耐药菌株分为 A~F 型, A 型中又分为 A1~A4, 分别为 21、24、11 和 2 株; B 型分为 B1~B2, 分别为 21 和 12 株, C 型和 D 型各 2 株, F 型 5 株, E 型 1 株。结论 本院 MDRAB 主要携带 I 类整合子, 阳性菌株大多可扩增出可变区耐药基因盒; 本院存在以 A 型和 B 型克隆株为主的感染流行, 必须加强院内感染防控, 切断克隆菌株的传播。

**关键词:** 鲍氏不动杆菌; 抗药性; 细菌; 整合子类

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)24-2953-03

## Study on the integrons and the homology of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strains\*

Zhou Wanqing, Shen Han, Qin Fang, Ning Mingzhe, Zhang Zhifeng<sup>△</sup>, Zhang Kui

(Department of Medical Laboratory, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University  
Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

**Abstract:** **Objective** To study the integrons and the homology in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* for rational use of antibiotics and control of nosocomial infections. **Methods** Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (MDRAB, n=101) were collected from clinical specimens. Antibiotic susceptibility was carried out by K-B agar diffusion and agar dilution methods. Specific PCR and DNA sequence analysis were performed for intI I, intI II, intI III and variable region. The genotyping was investigated by repetitive extragenic palindromic (REP)-PCR. **Results** The sensitive rates of 101 MDRAB isolates to minocycline and amikacin were 36.6% and 33.7%, the MIC to polymyxin B were all lower than 2 μg/mL. Ninety seven strains were positive for intI I, with 47 strains contained aacA4-catB-aadA1 box gene and 44 strains contained aacC1-orfX-orfX'-aadA1. Molecular typing revealed multiple clones, with major clonal types being nosocomially acquired and more than 90% of isolates being related to type A1~A4 and B1~B2. **Conclusion** IntI I with the box of drug resistance gene is a major determinative factor for the resistance in MDRAB. Identifying the MDRAB phenotype with most type A and type B indicates that we should devise strategies to limit the clinical impact of these serious infections.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; drug resistance; bacterial; integrons

鲍曼不动杆菌(AB)是 1 种引起院内感染的常见条件致病菌。该菌可导致广泛的临床感染,例如败血症、泌尿系感染、伤口感染、脑膜炎等,特别是院内机械通气相关性肺炎<sup>[1]</sup>。近年来,随着广谱抗生素的大量应用,多重耐药株(同时耐 3 类及以上抗菌药物)和泛耐药株日益增多,多重耐药菌株(MDR)的出现给临床治疗带来严峻挑战。多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)耐药基因通过整合子、结合性质粒、转座子的水平传递等发生传递。有研究显示, I 类整合子在革兰阴性杆菌多重耐药机制中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。了解本院多重耐药鲍曼不动杆菌中整合子及其可变区基因携带情况,采用 PCR 联合 DNA 序列测定方法对临床分离菌株进行检测,报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集本院 2008 年 9 月至 2011 年 2 月住院患者临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌 101 株。其中痰液 71

份、分泌物 10 份、腹水 5 份、血液 4 份,导管头和尿液各 3 份、其他 5 份,无重复分离株。分别为重症监护病房(ICU)42 株,老年科病房 21 株,脑外科病房 10 株,呼吸科病房 8 株,其余 20 株。所有菌株均经 ATB 32GN 鉴定条(法国梅里埃公司产品)鉴定。ATCC *Escherichia coli* 25922、ATCC *Pseudomonas aeruginosa* 27853 作为质控菌株。

**1.2 仪器与试剂** Taq DNA 聚合酶、10×buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)、dNTPs 为 TaKaRa 公司产品; DNA 标记物为北京全式金公司产品; PCR 扩增仪为 PE 公司; 凝胶成像分析系统为捷达公司; PCR 引物由英俊公司合成。

**1.3 药敏试验** 药敏纸片购自英国 Oxoid 公司,多粘菌素 B 为辉瑞公司惠赠。按照 CLSI 2009 版文件,采用纸片扩散法检测受试菌对阿米卡星、头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、替卡西林/克拉维

\* 基金项目:南京市卫生局课题资助项目(YKK10061)。 △ 通讯作者, E-mail: njzhangzf@hotmail.com。

酸、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、米诺环素的耐药性;采用琼脂稀释法测定其对多粘菌素 B 的 MIC。

**1.4 细菌 DNA 提取** 挑取纯培养菌落置于 0.5 mL 离心管内(内置 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液 200  $\mu$ L),56  $^{\circ}$ C 水浴 2 h,改 95  $^{\circ}$ C 水浴 10 min,13 000 $\times$ g 离心 30 s。上清液即为基因检测的模板液,置-20  $^{\circ}$ C 冰箱备用。

**1.5 PCR 扩增和测序** 采用 PCR 法扩增 I 类、II 类和 III 类

整合酶基因及可变区,参照文献[3-5]合成引物,引物序列见表 1。总反应体系为 50  $\mu$ L,其中 10 $\times$  buffer(含  $Mg^{2+}$ )5  $\mu$ L,dNTPs(各 2.5 mmol/L)4  $\mu$ L,DNA 模板 2 $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L,Taq DNA 酶 0.3  $\mu$ L,dH<sub>2</sub>O 34.7  $\mu$ L,退火温度为 55  $^{\circ}$ C。PCR 产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳观察。扩增产物送上海美吉公司进行双向测序,测序结果在 GenBank 网上查询。

表 1 靶基因 PCR 引物序列及产物大小

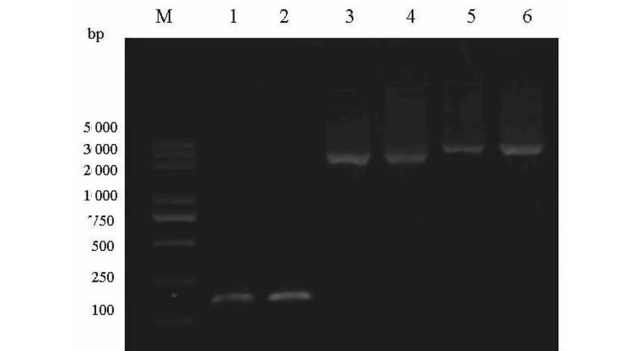
基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
intl I	P1 CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC,P2 CCC GAG GCA TAG ACT GTA	160
intl II	P1 TTG CGA GTA TCC ATA ACC TG,P2 TTA CCT GCA CTG GAT TAA GC	228
intl III	P1 AGT GGG TGG CGA ATG AGT G,P2 TGT TCT TGT ATC GGC AGG TG	600
可变区	P1 GGC ATC CAA GCA GCA AG,P2 AAG CAG ACT TGA CCT GA	—
REP	P1 III GCG CCG ICA TCA GGC,P2 ACG TCT TAT CAG GCC TAC	—

**1.6 基因外重复回文序列(REP)-PCR 分析菌株同源性** REP-PCR 引物见表 1。反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 10 min,然后 94  $^{\circ}$ C 1 min,40  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 16 min。扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳观察。如果主条带位置完全相同则为同一分型,若主条带位置相同而副条带有 1~2 条带不同则为不同亚型,不满足上述条件者为不同分型。

2 结 果

**2.1 药敏试验结果** 101 株鲍曼不动杆菌对 12 种抗菌药物呈现出多重耐药,仅对米诺环素和阿米卡星敏感,敏感率分别为 36.6%和 33.7%。对其他 10 种检测药物的耐药率均为 100%。对多粘菌素 B 全部敏感(MIC 值均小于或等于 2  $\mu$ g/mL),其中 64 株 MIC=0.5  $\mu$ g/mL,34 株 MIC=1  $\mu$ g/mL,3 株 MIC=2  $\mu$ g/mL。

**2.2 整合子及可变区基因检测结果** 101 株 MDRAB 中有 97 株(96.0%)携带 I 类整合酶基因,91 株可变区扩增出条带,阳性率为 93.8%(91/97),占总数的 90.1%(91/101)。DNA 测序分析整合子可变区携带两种基因盒,分别为 aacA4-catB-aadA1(2 300 bp)47 株和 aacC1-orfX-orfX'-aadA1(3 000 bp)44 株,登录号分别为 HQ880273 和 EF015499。所有菌株均未扩增出 II 类和 III 类整合酶基因。扩增电泳见图 1。

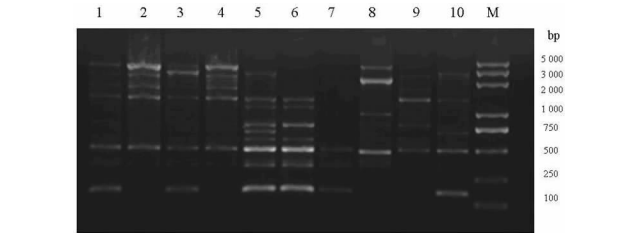


M:DNA 标志物;1~2:intl I ;3~4:aacA4-catB-aadA1(2 300 bp);5~6:aacC1-orfX-orfX'-aadA1(3 000 bp)。

图 1 PCR 产物电泳图谱

**2.3 REP-PCR 分型** 101 株 MDRAB 分为 A(A1~A4),B

(B1~B2),C,D,E,F 六型,分别为 58 株、33 株、2 株、2 株、1 株和 5 株。其中 A 型又可分为 A1(21 株)、A2(24 株)、A3(11 株)和 A4(2 株);B 型分为 B1(21 株)和 B2(12 株)。电泳图谱见图 2。MDRAB 主要分型及科室分布见表 2。



1~10 分别为 A1~A4,B1,B2,C,D,E,F 型分型;M:DNA 标志物。

图 2 REP-PCR 分型电泳图

表 2 REP-PCR 分型科室分布(n)

分型	MDRAB					合计
	ICU	老年科	脑外科	呼吸科	其他	
A1	8	5	2	1	5	21
A2	15	1	2	3	3	24
A3	1	4	1	0	5	11
A4	2	0	0	0	0	2
B1	11	2	0	2	6	21
B2	3	4	0	2	3	12
C	1	1	0	0	0	2
D	0	2	0	0	0	2
E	0	0	0	0	1	1
F	1	2	1	0	1	5
合计	42	21	6	8	24	101

3 讨 论

鲍曼不动杆菌广泛存在于自然界、医院环境、人的体表及上呼吸道,是引起院内感染的一种重要的条件致病菌。在抗菌

药物的选择压力下,使不动杆菌产生广泛的耐药性。目前临床分离的多重耐药菌株越来越多,同时对头孢菌素类、碳青霉烯类、喹诺酮类以及氨基糖苷类耐药,给临床治疗带来了严峻挑战,也对院内感染的防控提出了更高的要求<sup>[1]</sup>。鲍曼不动杆菌的耐药机制比较复杂,主要有以下几种:灭活酶的产生,外膜蛋白的减少、缺失或突变,药物的主动外排机制,药物作用靶位如青霉素结合蛋白改变等<sup>[6]</sup>。耐药菌株一般合并存在几种耐药机制,一些可移动元件如整合子的参与使得其耐药性具有可传递性。

整合子可捕获多个基因盒,因此表现出对抗菌药物的多重耐药性,临床上出现多重耐药的鲍曼不动杆菌与整合子对耐药性的积累是分不开的<sup>[2]</sup>。本文通过对 MDRAB 整合子及其可变区基因盒扩增发现,本院 MDRAB 大多携带 I 类整合酶基因,阳性率达到 96%。可变区阳性菌株携带两种基因盒,分别为 aacA4-catB-aadA1(2 300 bp)47 株和 aacC1-orfX-orfX'-aadA1(3 000 bp)44 株。说明本院分离的 MDRAB 中具有较高的整合子携带率。其中 aacA4 导致阿米卡星、奈替米星和妥布霉素耐药,catB 导致氯霉素耐药,aadA1 导致链霉素和壮观霉素耐药,aacC1 则导致庆大霉素耐药。两种基因盒中均具有氨基糖苷类耐药基因,从耐药基因水平上解释了整合子与氨基糖苷类抗菌药物耐药性的相关性。

菌株同源性检测结果显示,101 株菌株以 A1(21 株)、A2(24 株)、A3(11 株)、B1(21 株)和 B2(12 株)为主要流行株。克隆株的播散已成为 MDRAB 分离率不断上升的主要原因<sup>[7]</sup>。在 ICU 这种克隆播散现象十分明显,42 株待测菌株主要分为 A1 型 8 株、A2 型 15 株和 B1 型 11 株,占总数的 81.0%。因此,控制院内感染至关重要。医护人员勤洗手、严格无菌操作、对感染或定植患者的及时发现和隔离等措施对控制感染的流行十分重要。另外,对于携带不同基因盒的菌株同源性分析显示,携带基因盒为 aacA4-catB-aadA1 菌株主要分为 A1 型 18 株、A2 型 8 株、A3 型 9 株和 B2 型 9 株;携带基因盒为 aacC1-orfX-orfX'-aadA1 主要为 A2 型 12 株、B1 型 18 株、B2 型 3 株和 F 型 5 株。携带不同基因盒的菌株在同源性上存在一定的差异。

综上所述,克隆株的播散是造成本院 MDRAB 流行的主要传播形式,因此加强院内感染控制至关重要,简单有效的方

法就是医护人员做好无菌操作、及时发现和隔离患者等。整合子在本 MDRAB 中具有较高的检出率,主要携带氨基糖苷类耐药基因<sup>[8-10]</sup>。因此,对于氨基糖苷类耐药流行区整合子在鲍曼不动杆菌中的分布特点调查,对合理应用氨基糖苷类抗菌药物,延缓耐药的产生具有重要意义。

参考文献

[1] Mak JK, Kim MJ, Pham J, et al. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. J Antimicrobiol Chemother, 2009, 63(1): 47-54.

[2] 阳大庆,唐银,李太存,等. 鲍曼不动杆菌 I 类整合子系统与其耐药性关系的研究[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(5): 338-340.

[3] Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl MW, et al. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 8-13.

[4] 糜祖煌,秦玲. 多药耐药鲍氏不动杆菌 5 类抗菌药物耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(7): 761-764.

[5] Snelling AM, Gerner-Smidt P, Hawkey PM, et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR(REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(5): 1193-1202.

[6] Vila J, Martí S and Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(6): 1210-1215.

[7] 朱冰泉,沈萍,俞云松,等. 对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌同源性及其碳青霉烯酶基因型研究[J]. 浙江医学, 2008, 30(5): 459-462.

[8] 王英田,傅爱玲,于翠香,等. 多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类耐药相关基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24): 5111-5113.

[9] 张强,陆炜方,朱晓珏. 多药耐药鲍氏不动杆菌中氨基糖苷类修饰酶基因的分析研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(22): 4654-4657.

[10] 陈鹏,丁进亚. 鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(15): 2463-2466.

(收稿日期:2012-06-12)

(上接第 2952 页)

代谢及空腹血糖受损和糖耐量低减的影响[J]. 广东医学, 2010, 31(18): 2408-2410.

[6] 彭易清,林婉媚,聂伟明,等. 长期危险饮酒与脂代谢糖耐量变化及动脉硬化的关系[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(4): 197-199.

[7] 樊雪英,任昭,韦君丽,等. 饮酒对血脂的影响及与脑血管病的关系[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(14): 1503-1504.

[8] Pownall HJ, Ballantyne CM, Kimball KT, et al. Effect of moderate alcohol consumption on hypertriglyceridemia: a study in the fast-

ing state[J]. Arch Intern Med, 1999, 159(9): 981-987.

[9] 阮勇,王静,阮芸,等. 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝病关系的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2009, 17(1): 44-45.

[10] 戚文威,黄建凤,李建新,等. 中国人群饮酒与代谢综合征发病关系的前瞻性研究[J]. 中华健康管理学杂志, 2012, 6(2): 75-80.

[11] 俞慧宏,沈薇. 饮酒与代谢综合征[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(9): 671-673.

(收稿日期:2012-06-12)