

• 临床检验研究论著 •

血液病患者鲍曼不动杆菌的耐药性分析及其耐药基因检测*

王秀凤¹, 陈祎霏^{2#}, 尹秀云¹, 闫中强^{3△}, 陈建魁^{1▲}(1. 军事医学科学院附属医院检验科, 北京 100071; 2. 北京大学医学部基础
医学院, 北京 100191; 3. 解放军总医院感染控制科, 北京 100853)

摘要:目的 了解血液病患者临床分离鲍曼不动杆菌的耐药表型和多种耐药基因的携带情况。方法 收集 2011 年临床分离的非重复鲍曼不动杆菌 120 株, 采用纸片扩散法进行药敏试验, 试验结果按照 CLSI 2011 年版标准判读, 采用 WHONET 5.6 软件进行数据分析; 应用聚合酶链反应及测序方法检测 10 种耐药相关基因 (blaOXA-51-like、blaOXA-23-like、blaOXA-24-like、blaOXA-58-like、blaTEM、blaampC、armA、ISAbal、intI 1 和 intI 2)。结果 鲍曼不动杆菌对 13 种抗菌药物的耐药率范围为 48.3%~94.2%, 对碳青霉烯类抗菌药物亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 51.7% 和 48.3%; 耐药相关基因 blaOXA-51-like、blaOXA-23-like、blaTEM、blaampC、armA、ISAbal 和 intI 1 的阳性率分别为 100%、60.0%、46.7%、85.8%、75.8%、86.7% 和 85.0%, 而未检出 blaOXA-24-like、blaOXA-58-like 和 intI 2。结论 碳青霉烯类抗菌药物对鲍曼不动杆菌仍具有较好的体外抗菌活性, 鲍曼不动杆菌多重耐药相关基因的携带率较高, 多重耐药现象非常严重, 应加强其耐药性监测, 合理使用抗菌药物。

关键词:不动杆菌属; 抗药性, 微生物; 聚合酶链反应**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.006**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)18-2364-03

Analysis of antibiotic resistance and multidrug-resistant genes in Acinetobacter baumannii isolates from leukemia patients*

Wang Xiufeng¹, Chen Yifei^{2#}, Yin Xiuyun¹, Yan Zhongqiang^{3△}, Chen Jiankui^{1▲}(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China;
3. Department of Infection Control, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To gain a insight into the antibiotic resistance phenotypes and the prevalent resistance genes of *Acinetobacter baumannii* isolates from patients with leukemia. **Methods** 120 *A. baumannii* isolates were collected in 2011. All isolates were subjected to the Whonet 5.6 software to analyze the susceptibility of 13 antimicrobial agents according to CLSI 2011 breakpoints, and to PCR to detect resistance genes of blaOXA-51-like, blaOXA-23-like, blaOXA-58-like, blaTEM, blaampC, armA, ISAbal and intI 1. **Results** The rates of resistance to the majority of antibiotics tested varied between 48.3% and 94.2%, with the exception of imipenem(51.7%), and meropenem(48.3%). This study showed a high distribution of blaOXA-51-like, blaOXA-23-like, blaampC, armA, ISAbal, blaTEM and intI 1 genes, which mediate resistance to structurally unrelated antimicrobials. **Conclusion** Carbapenems still has good antibacterial activity against *A. baumannii*, but the high rates of resistance to most antibiotics in *A. baumannii* is a critical issue. The full-time infection control personnel and physicians should actively participate in the antimicrobial resistance surveillance, appropriately use the antimicrobial agents, and effectively prevent and control of infections caused by *A. baumannii*.

Key words: acinetobacter; drug resistance, microbial; polymerase chain reaction

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要条件致病菌, 近年来引起的医院感染日益突出, 其耐药性也越来越严重^[1]。由于血液病及恶性肿瘤患者免疫力低下, 属于鲍曼不动杆菌院内感染的危险易感人群^[2]。本研究收集了 120 株来自血液病住院患者的鲍曼不动杆菌临床分离株, 对其耐药表型及耐药基因进行了检测分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 2011 年 1~12 月期间收集 120 株不重复鲍曼不动杆菌, 菌株的标本来源包括痰、尿、分泌物、血液、脑脊液等, 所有标本均来自血液科、造血干细胞移植科的住院患者。

1.2 仪器与试剂 药敏试验纸片及 M-H 琼脂均为英国 Oxoid 公司产品, 抗菌药物包括: 亚胺培南 (IMP)、哌拉西林 (PRL)、哌拉西林/他唑巴坦 (TZP)、头孢哌酮/舒巴坦 (SCF)、头孢噻肟 (CTX)、头孢他啶 (CAZ)、头孢吡肟 (FEP)、环丙沙星 (CIP)、阿米卡星 (AMK)、复方磺胺甲恶唑 (SXT)、美洛培南

(MEM)、阿莫西林/克拉维酸 (AMC)、头孢呋辛 (CXM)。PCR 实验所用的 TaKaRa Ex Taq (Code: DRR100A) 和 dNTP Mixture (TaKaRa Code: D4030A) 均由宝生物工程 (大连) 有限公司提供; DNA 标记物采用 GeneRuler™ 100bp Ladder (Fermentas Lot: 00014461)。主要的仪器包括: Vitek II 全自动微生物分析仪 (生物梅里埃公司); VeritiTM PCR 扩增仪; Tanon GIS-100013 数码凝胶图像处理系统; K10CD 干式恒温器 (杭州蓝焰科技公司); 离心机 (广州深华赛默飞世尔 Thermo)。

1.3 细菌鉴定与药敏试验 细菌分离、培养、鉴定和药敏试验均严格按照《全国临床检验操作规程》(第三版) 进行。所有菌株采用 Vitek II 全自动微生物分析仪进行临床常规鉴定; 采用 K-B 法 (纸片扩散法) 测定 13 种抗菌药物的敏感性, 铜绿假单胞菌 ATCC27853 为质控菌株, 根据美国 CLSI 2011 年版标准进行敏感性判断。

* 基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项 (2012YQ18011708)。 # 作者简介: 王秀凤, 女, 主管技师, 主要从事实验诊断研究。 # 共同第一作者。 ▲ 通讯作者, E-mail: zhongqiangyan@yahoo.com.cn; ▲ 通讯作者, E-mail: pla307lab@126.com。

1.4 DNA 模板的提取 用煮沸法制备 DNA 模板。将在 MH 平板上培养过夜的细菌菌落混悬于 2 mL 的 8.5 g/L 的 NaCl 中,使成 5 个麦氏单位,12 000 r/min,离心 2 min,沉淀重悬于 200 μL 无菌去离子水,并转移至无菌的 1.5 mL EP 管,置于 K10CD 干式恒温器 10 min 后,12 000 r/min,离心 5 min,取上清液保存于 -20 °C,备用。

1.5 引物合成及 PCR 扩增 多种耐药基因引物设计参照文献[3-4](见表 1,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。PCR 反应体系:10×Ex Taq Buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L

dNTP 2 μL,5 U/μL TaKaRa Ex Taq 0.125 μL,10 μmol/L Primer Mix 1 μL,2 ng/μL 模板 DNA 5 μL,用去离子水补足至 25 μL。多种耐药基因 PCR 扩增条件参照文献[3-4]进行,扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色,在紫外灯上观察结果并用凝胶成像系统记录电泳结果,每次 PCR 检测均设阴性对照。抽取 3 株相关耐药基因的阳性扩增产物并进行测序,结果在 GenBank(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行比对分析。

表 1 PCR 引物序列

引物	序列(5'~3')	靶基因	扩增子大小(bp)
OXA-51-like F	TAA TGC TTT GATCGG CCT TG	<i>bla</i> _{OXA-51-like}	353
OXA-51-like R	TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG		
OXA-23-like F	GAT CGG ATT GGA GAA CCAGA	<i>bla</i> _{OXA-23-like}	501
OXA-23-like R	ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT		
OXA-24-like F	GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA	<i>bla</i> _{OXA-24-like}	246
OXA-24-like R	AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT		
OXA-58-like F	AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG	<i>bla</i> _{OXA-58-like}	599
OXA-58-like R	CCCCCTCTGCGCTCTACATAC		
Int I 1F	CAG TGG ACA TAA GCC TGT TC	<i>intI</i> 1	160
Int I 1R	CCC GAG GCA TAG ACT GTA		
Int I 2F	TTG CGA GTA TCC ATA ACC TG	<i>intI</i> 2	288
Int I 2R	TTA CCT GCA CTG GAT TAA GC		
ISAbal-F	CAC GAA TGC AGA AGT TG	ISAbal	549
ISAbal-R	CGA CGA ATA CTA TGA CAC		
armA-F	TGC ATC AAA TAT GGG GGT CT	armA	214
armA-R	GGA TTG AAG CCA CAA CCA AA		
ampCP1	TAA ACA CCA CAT ATG TTC CG	<i>bla</i> _{ampC}	663
ampCP2	ACT TAC TTC AAC TCG CGA CG		
TEM1	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G	<i>bla</i> _{TEM}	860
TEM4	TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G		

2 结 果

2.1 鲍曼不动杆菌对 13 种抗菌药物的敏感率和耐药率 鲍曼不动杆菌对各种抗菌药物的耐药率和敏感率见表 2。该菌对碳青霉烯类抗菌药物亚胺培南和美洛培南的耐药率分别为 51.7% 和 48.3%;对抗菌药物的耐药率范围为 48.3% ~ 94.2%。

表 2 120 株鲍曼不动杆菌对 13 种抗菌药物的敏感率和耐药率[n(%)]

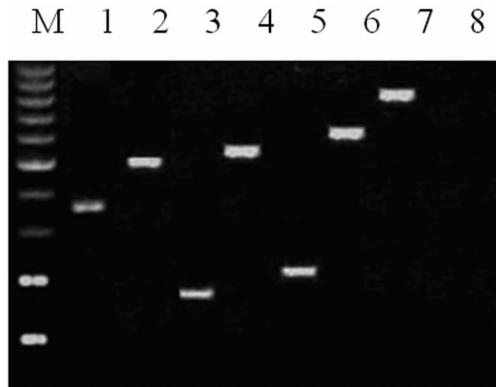
抗菌药物	敏感	中介	耐药
哌拉西林	10(8.3)	10(8.3)	100(83.3)
哌拉西林/他唑巴坦	20(16.7)	3(2.5)	97(80.8)
头孢呋辛	3(2.5)	7(5.8)	110(91.7)
头孢吡肟	23(19.2)	5(4.2)	92(76.7)
头孢噻肟	3(2.5)	22(18.3)	95(79.2)
亚胺培南	58(48.3)	0(0.0)	62(51.7)
阿米卡星	31(25.8)	0(0.0)	89(74.2)

续表 2 120 株鲍曼不动杆菌对 13 种抗菌药物的敏感率和耐药率[n(%)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药
环丙沙星	22(18.3)	1(0.8)	97(80.8)
复方磺胺甲恶唑	20(16.7)	0(0.0)	100(83.3)
头孢哌酮/舒巴坦	32(26.7)	8(6.7)	80(66.7)
阿莫西林/克拉维酸	7(5.8)	0(0.0)	113(94.2)
美洛培南	62(51.7)	0(0.0)	58(48.3)
头孢他啶	29(24.2)	2(1.7)	89(74.2)

2.2 鲍曼不动杆菌多重耐药相关基因谱的分布 单一 PCR 扩增产物的电泳结果见图 1。*bla*_{OXA-51-like} 在所有菌株中均为阳性,除了 *bla*_{OXA-24-like}、*bla*_{OXA-58-like} 和 *intI* 2 基因为阴性外,其余耐药相关基因均有阳性扩增产物,并且测序结果与 GenBank 库中的已知序列具有高度的一致性,同源性均在 99% 以上。耐药相关基因的阳性检出率见表 3。ISAbal、*intI* 1、*bla*_{ampC} 和 *armA* 检出率均高于 75%,而 *bla*_{OXA-23-like}

和 blaTEM 的检出率分别为 60.0% 和 46.7%。



M: 标记物, 其分子量大小从上到下依次为 1 000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp 和 100 bp。1~8 淘选: blaOXA-51-like、blaOXA-23-like、intI 1、ISAbal、armA、blaampC、blaTEM 和阴性对照。

图 1 PCR 扩增产物电泳图

表 3 鲍曼不动杆菌相关耐药基因的检出情况

耐药基因	阳性菌株数(n)	检出率(%)
ISAbal	104	86.7
intI 1	102	85.0
bla _{OXA-23-like}	72	60.0
armA	91	75.8
bla _{ampC}	103	85.8
bla _{TEM-1}	56	46.7

3 讨论

恶性血液病患者由于放、化疗后中性粒细胞数量减少和功能减退, 以及机体免疫功能低下, 极易发生院内获得性感染。恶性血液病患者由于广谱抗菌药物的长期大量使用, 可诱导细菌耐药产生, 导致感染的难治性, 甚至危及生命。所有分离自血液科病房的鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物亚胺培南和美罗培南的耐药率较低, 分别为 51.7% 和 48.3%, 而对其他抗菌药物的耐药率较高, 大于 65%, 具体范围为 66.7%~91.7%。长期以来, 碳青霉烯类抗菌药物被当作治疗多重耐药鲍曼不动杆菌感染的“最后手段(last-resort)”, 但是近年来, 随着此类抗菌药物的广泛应用, 出现耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的多重耐药株日益增多, 2010 年中国 CHINET 调查结果显示, 该菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 62.1% 和 63.6%^[5], 如此高的碳青霉烯类耐药率, 给临床治疗的选择带来挑战。

鲍曼不动杆菌的耐药机制比较复杂, 整合子、OXA 类碳青霉烯酶、插入序列、AmpC 酶、ESBLs 酶等在鲍曼不动杆菌的多重耐药机制方面发挥重要的作用^[6-7]。并且, 多种耐药基因的共同作用使鲍曼不动杆菌表现出多重耐药性, 耐药基因谱和耐药表型有一定的相关性。72 株鲍曼不动杆菌携带有 blaOXA-23-like 基因, 其携带率为 60.0%, 这与本研究菌株对碳青霉烯类的耐药率接近(表 2), 同时与国内外学者报道的耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌以产 OXA-23 型碳青霉烯酶为主相一致。整合子可作为一种分子流行标记, 通过检测整合酶基因来筛查和鉴定鲍曼不动杆菌的多重耐药性。在 102 株鲍曼不动杆菌中可检出 I 类整合酶基因, 未能检出 II 类整合酶基因, 说明该

菌的整合子主要是 I 类, 其检出率为 85.0%。在 46.7% 的菌株中检出 blaTEM 基因, 85.8% 的菌株中检出 blaampC 基因, 可见, 对于血液病患者分离的鲍曼不动杆菌, AmpC 和 TEM-1 酶为其耐头孢菌素类抗菌药物的主要机制。本研究中插入序列 ISAbal 的检出率高达 86.7%; 在鲍曼不动杆菌中, ISAbal 通过提供启动子序列来增强 β 内酰胺酶的表达^[8]。ADC AmpC β 内酰胺酶和 OXA 型碳青霉烯酶基因的上游, 经常发现存在有 ISAbal。16S rRNA 甲基化酶基因 armA 与阿米卡星的耐药性密切相关^[9-10], 120 株实验菌株中 75.8% 的菌株携带有此基因。armA 基因绝大多数位于整合子、质粒等可移性遗传元件上, 易于在细菌间传播, 应引起医务人员的足够关注。

目前鲍曼不动杆菌对多种抗菌药物呈现不同程度耐药, 且有上升趋势, 甚至出现多重耐药, 值得加以重视^[11-12]。对于血液病患者, 尤其要监控鲍曼不动杆菌的感染, 科学预防和控制鲍曼不动杆菌的传播。在有效预防和控制鲍曼不动杆菌流行克隆株传播的同时, 结合多重耐药鲍曼不动杆菌的表型耐药谱和本地区的用药特点综合考虑来合理用药, 从而科学预防和控制鲍曼不动杆菌医院感染的发生。

参考文献

- [1] 李平, 金炎, 郭凤琴, 等. 临床微生物室主要病原菌和耐药性及抗菌药物应用调查[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2379-2381.
- [2] 尹秀云, 陈建魁, 于农, 等. 恶性肿瘤及血液病患者血流感染的病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(19): 4210-4212.
- [3] 闫中强, 沈定霞, 罗燕萍, 等. 多重 PCR 方法检测多耐药鲍曼不动杆菌基因型[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(6): 422-424.
- [4] 董喆, 徐雅萍, 美亮, 等. 高龄住院患者鲍曼不动杆菌多重耐药相关基因的监测[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(3): 234-237.
- [5] 习慧明, 徐英春, 朱德妹, 等. 2010 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(2): 98-104.
- [6] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.
- [7] 张之烽, 周万青, 曹小利, 等. 亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌外膜蛋白与外排泵基因 adeB 分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(23): 2817-2818.
- [8] Mugnier PD, Poirel L, Nordmann P. Functional analysis of insertion sequence ISAbal, responsible for genomic plasticity of Acinetobacter baumannii[J]. J Bacteriol, 2009, 191(7): 2414-2418.
- [9] 宋彩虹, 陈维贤. 鲍曼不动杆菌多重耐药机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1856-1858.
- [10] Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, et al. Genetic basis of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(11): 3837-3843.
- [11] Cardoso T, Ribeiro O, Aragao IC, et al. Additional risk factors for infection by multidrug-resistant pathogens in healthcare-associated infection: a large cohort study[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12(1): 375.
- [12] Migliavacca R, Espinal P, Principe L, et al. Characterization of resistance mechanisms and genetic relatedness of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolated from blood, Italy[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(2): 180-186.