

• 论 著 •

鲍曼不动杆菌的耐药性与 I 类整合子的相关研究

杨丽萍, 陈磊

(烟台毓璜顶医院检验科, 山东烟台 264000)

摘要:目的 了解该院鲍曼不动杆菌的流行趋势以及鲍曼不动杆菌与 I 类整合子的耐药关系。方法 用该院临床常用 22 种抗菌药物来检测临床分离的鲍曼不动杆菌的敏感性。用 PCR 检测鲍曼不动杆菌 I 类整合子酶基因, 再扩增部分 I 类整合子酶基因的可变区, 对整合子可变区进行基因测序分析。结果 鲍曼不动杆菌的耐药现象十分严重, 呈多重耐药性。鲍曼不动杆菌对 CPZ/SB 耐药率为 1.2%, 对替加环素、左氧氟沙星、亚胺培南、比阿培南、阿米卡星等几种抗菌药物的耐药率为 15.4%~69.5%, 对其他抗菌药物均在 71% 以上。102 株中有 72 株菌株含 I 类整合子(阳性率为 70.2%), I 类整合子阳性株的耐药性均高于阴性株, 对 I 类整合子可变区采用双酶切分析产生类似的酶切条带, 说明该院鲍曼不动杆菌具有同源性。I 类整合子基因盒序列分析表明该院鲍曼不动杆菌 I 类整合子携带 aacA4、catB8 和 aadA13 3 种耐药基因。结论 该院 2010~2013 年, 鲍曼不动杆菌对头孢菌素类、广谱青霉素、氨基糖苷类和氟喹诺酮类呈高度耐药及严重的多重耐药现状, 说明治疗鲍曼不动杆菌所致感染的抗菌药物选择已十分有限。I 类整合子与鲍曼不动杆菌多重耐药性密切相关。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 整合子; 整合酶; 多重耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.046

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2398-03

The drug resistance of *Acinetobacter baumannii* and the related research with I class integron

Yang Liping, Chen Lei

(Department of Clinical Laboratory, Yuhuangding Hospital, Yantai, Shandong 264000, China)

Abstract: Objective To learn the prevalence of *Acinetobacter baumannii* and its drug resistance related with I class integron. Methods 22 kinds of antibiotics commonly used in our hospital were used to detect the sensitivity of the clinically separated *Acinetobacter baumannii*. Methods PCR was used to detect I class integron enzyme gene of *Acinetobacter baumannii*, and then parts of variable region of I class integron enzyme gene were amplified and analyzed for gene sequence. Results The drug resistance of *Acinetobacter baumannii* phenomenon was very serious, which was multiple drug resistance. The resistance rate of *Acinetobacter baumannii* to CPZ/SB was 1.2%. And the resistance rates to tigecycline, ofloxacin, imipenem, biapenem, and amikacin were 15.4%—69.5%, but the resistance rates to other antibiotics were above 71%. There were 72 of 102 strains including I class integron (positive rate was 70.2%). The resistance of strains with I class integron was stronger than that of the strains without. The variable area of I class integron produced the same enzyme bands when analyzed with double enzyme, suggesting the *Acinetobacter baumannii* was homologous. The gene sequence analysis of I class integron showed that the I class integron of the *Acinetobacter baumannii* carried kinds of resistant genes such as aacA4, catB8 and aadA13. Conclusion From 2010 to 2013, the *Acinetobacter baumannii* in our hospital is highly resistant to cephalosporins, broad-spectrum penicillin, aminoglycosides and fluoroquinolones and is severely multiple drug resistant. So the antimicrobial drugs for the treatment of infections caused by *Acinetobacter baumannii* are limited. I class integron is closely related to the multiple drug resistance of *Acinetobacter baumannii*.

Key words: acinetobacter baumannii; integron; integrase; multiple drug resistance

在过去 10 年里,因鲍曼不动杆菌导致的多种感染流行或爆发的医院在世界各地广泛报道,尤其引起医药及微生物学界等的关注^[1-3]。鲍曼不动杆菌已是常见的院内感染非发酵革兰阴性杆菌。临床上,常用抗菌药物呈现高度的耐药性,使其抗感染的药物治疗选择极其有限^[4-6],鲍曼不动杆菌引起的院内感染及耐药发展趋势值得高度关注。为了解烟台地区鲍曼不动杆菌中 I 类整合子的分布情况及耐药性,对本院 2010 年 4 月至 2013 年 1 月临床收集的 102 株鲍曼不动杆菌进行耐药分析、I 类整合子检测与序列分析,探讨 I 类整合子与鲍曼不动杆菌的耐药关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集烟台地区医院 2010 年 4 月至 2013 年 1 月住院患者送检标本中分离的鲍曼不动杆菌共 102 株,菌株均经法国梅里埃公司 vitek32 全自动微生物分析鉴定系统鉴定。

质控菌为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 仪器与试剂 抗菌药物纸片购自英国 Oxoid 公司;M-H 琼脂、肉汤培养基购自杭州天和生物有限公司;引物由大连宝生生物科技有限公司合成;三磷酸碱基脱氧核苷酸、聚合酶链式反应(PCR)的缓冲液、氯化镁溶液、Taq 聚合酶购自上海生物工程有限公司;DNA Marker DL2500 (宝生物工程(大连)有限公司);内切酶 Sac I 和 Hind III 均购于大连 Takara 公司;PCR 产物测序由上海英俊公司完成。

1.3 药敏试验 菌株均经法国梅里埃公司 vitek2 Compact 全自动微生物分析系统革兰阴性菌鉴定卡(GN)鉴定,使用 GN13 药敏卡 MIC 法检测菌株对 22 种药物(头孢哌酮/舒巴坦、替加环素、左氧氟沙星、亚胺培南、比阿培南、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、妥布霉素、庆大霉素、替卡西林/克拉维酸、

氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、哌拉西林、头孢噻利、头孢吡肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢呋辛、复方磺胺甲噁唑、氨苄西林、头孢唑林、头孢替坦)的敏感性;质控菌为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.4 细菌处理 挑取纯培养菌落于含有 750 μ L 超纯水的离心管内并充分混匀,95 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后,再-20 $^{\circ}$ C 冰浴 10 min。最后 20 000 r/min 离心 4 min,收集上清液,-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.5 I 类整合子相关耐药基因盒及整合子可变区的扩增 PCR 体系为 20 μ L,2 $\times$ Taq 聚合酶,PCR 引物 10 μ L,1 μ L DNA 模板,10 pmol/L 引物各 1 μ L,灭菌双蒸水 7 μ L。反应条

件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;循环参数为:94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 结束。取 3 μ L 扩增产物与 1 μ L 6 倍浓缩的上样缓冲液混匀,于 1.5% 琼脂糖凝胶检测扩增产物,电泳电压 5 V/cm,电泳 30 min。电泳结束后,置于 0.5 mg/mL 溴化乙锭中染色 30 min,紫外检测仪中观察结果,凝胶成像系统采集图像并保存。对 I 类整合酶阳性菌株再进行可变区的扩增,可变区循环参数 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 95 $^{\circ}$ C 30 s 47 $^{\circ}$ C 40 s 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 个循环最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,凝胶成像系统观察电泳结果,并照相。见表 1。

表 1 PCR 引物序列

引物类型	引物序列	扩增片段大小(bp)	引物出处
I 类整合子酶基因			
intI-F	5'-ACA TGT GAT GGC GAC GCA CGA-3'	675	本试验
intI-R	5'-ATT TCT GTC CTG GCT GGC GA-3'		
I 类整合子可变区			
intC S-F	5'-GGC ATC CAA GCA GCA AG-3	800~3 000	Su 等 ^[7]
intC S-R	5'-AAG CAG ACT TGA CCT GA-3'		

1.6 酶切分析 其步骤为对整合子可变区 PCR 扩增产物相似性条带,采用内切酶 Sac I 和 HindⅢ进行双酶切以确定整合子基因盒类型。酶切反应体系如下:PCR 产物 10 μ L,水 18 μ L,Tango buffer 2 μ L,0.6 μ L 内切酶 Sac I,1.2 μ L 内切酶 HindⅢ,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,酶切产物用含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7 基因测序 随机纯化 1~2 株送上海英俊公司纯化并进行双向测序。测序结果在 GenBank 数据库进行同源性分析(Blast)。

1.8 统计学处理 用 SPSS13.0 软件对 I 类整合子阳性和阴性菌株的耐药率进行 χ^2 检验比较,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 结果 对烟台地区临床分离的 102 株鲍曼不动杆菌通过 PCR 扩增来检测 I 类整合子,其中有 72 株阳性,检出率为 70.2%,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。对部分 I 类整合酶基因阳性的菌株使用 I 类整合子可变区引物 intC S-F 和 intC S-R 扩增整合子可变区,共有 70 株阳性(97.2%)。片段大小相近,其中片段 1、2、3、5、6、8、9、10 均为 2 500 bp 左右,片段 4、7 经测序后两条带为非特异扩增杂带,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。双酶切的主要目的是看可变区一致性条带的相似型,鲍曼不动杆菌同大小的可变区 PCR 产物(2 500 bp)用 Rsa 和 Hind I 双酶切后,表现为完全相似的酶切图谱,可以确定为一致性条带,显示均为同一条带整合子,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 药敏结果 对 I 类整合子阳性(72 株)和 I 类整合子阴性(30 株)鲍曼不动杆菌进行耐药分析,表明其对头孢哌酮/舒巴坦的耐药性为 1.2%、对替加环素、左旋氧氟沙星、亚胺培南、比阿培南等几种抗菌药物的耐药性在 15.4%~69.9%之间。对其他抗菌药物耐药率均在 70% 以上。说明鲍曼不动杆菌对头孢菌素类、氨基糖苷类、和氟喹诺酮类呈现多重耐药性,烟台地区鲍曼不动杆菌所引起感染治疗的抗菌药物选择已十

分有限。I 类整合子阳性菌株和阴性菌株的耐药情况分析发现,对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率很低故此种药物不纳入比较范围;对替加环素和左旋氧氟沙星的耐药率之间没有显著性差异;对其余多种抗菌药物的耐药率有显著差异。本实验显示出 I 类整合子在鲍曼不动杆菌多重耐药中起到重要作用,且与多重耐药性密切相关,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 测序结果 鲍曼不动杆菌约 2 500 bp,为完全相似的酶切图谱,可以确定为同一条带。随机纯化一个 PCR 产物测序,实际片段为 2 313 bp,经 GenBank 数据库进行同源性分析(Blast)发现可变区含有 3 个耐药基因,为 aacA4-catB8-aadA1。其 DNA 序列与 GenBank 登录号 HQ880273 序列具有同源性,见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

3 讨 论

本研究药敏结果显示,烟台地区医院分离的 102 株鲍曼不动杆菌对所测试的头孢哌酮/舒巴坦耐药率最低,为 1.2%,其次是碳青霉素类的替加环素,耐药率为 15.4%,耐药率达 90% 以上的有头孢唑啉和头孢替坦,其余药物的耐药率在 49.4%~81.8%之间。显示出该菌对头孢菌素类、广谱青霉素、氨基糖苷类和氟喹诺酮类呈现高度耐药及严重的多重耐药现状,说明鲍曼不动杆菌的抗菌药物选择已十分有限。烟台地区临床分离的鲍曼不动杆菌耐药情况与国内其他地区报道基本一致^[7]。

在本次实验中,鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺酶抑制剂复合制剂头孢哌酮/舒巴坦的耐药率明显低于其他抗菌药物,显示出头孢哌酮/舒巴坦对鲍曼不动杆菌相对良好的抗菌活性,说明头孢哌酮/舒巴坦可作为本院鲍曼不动杆菌感染治疗的首选药物。本实验中鲍曼不动杆菌对替加环素的耐药率仅为 15.4%,敏感率为 53.8%,但菌株的最小抑菌浓度值为 30.8%,提示可能需要通过安全范围内加大剂量来提高疗效。

鲍曼不动杆菌的耐药机制有很多方面,其中整合子-基因盒系统是他的一个重要耐药机制。一方面整合子可通过捕获

和剪切基因盒使其发生移动,另一方面整合子的移动可通过转座子、质粒上可移动基因元件使其发生移动,这样由于整合子的作用,使得拥有整合子的细菌具有多重耐药。整合子基本结构由 5'保守末端、中间的可变区以及 3'保守末端构成。5'保守末端是整合子的基本结构,它包括编码整合酶的基因、整合子重组位点 attI 和整合子可变区启动子^[8];3'保守末端包括 3 个开放读码框:磺胺耐药基因,季铵盐化合物及溴乙啶的耐受基因及功能不明的开放读码框(ORF5)^[9];中间的可变区含编码各种抗菌药物的耐药基因盒。整合子捕获基因盒是由整合酶催化反应来完成的。整合酶识别位点有 2 个:attI 部位和基因盒的 attC 位点。游离的基因盒以环状结构存在,通过整合酶的基因催化后以线性结构结合于特异位点,进行位点特异重组,精确插入到整合子中^[10]。由于整合酶催化的重组反应不仅可发生与 attC 和 attI 之间,也可发生于 2 个 59be 和 2 个 attT 之间,但 attI 与 59be 之间的重组效率最高。因此整合的线性基因盒可被重新切下,恢复环状结构,并通过 59be 与 attI 之间的位点特异性重组整合于其他整合子中,使耐药基因从一个整合子传递向另一个整合子,完成整合子中耐药基因的积累重排和流动。当然也有文献报道存在非特异整合,其整合位点发生在非特异交换位点(又称第 2 位点)^[11]。根据整合酶基因序列的不同,将整合子可以分为 6 类,目前对 I、II、III 类整合子研究比较多,并且与耐药性有明确的关系。I 类整合子在临床中分布最广,对 I 类整合子进行分析检测具有重要意义。

本试验对烟台地区分离出的 102 株鲍曼不动杆菌进行了 I 类整合酶基因的检测,并对可变区进行耐药基因盒检测。结果阳性检出率为 70.6%,高于国外的检测率^[12],这可能与整合子的播散速度加快以及地区差异有关。对鲍曼不动杆菌的耐药情况进行分析,鲍曼不动杆菌对头孢哌酮/舒巴坦敏感,对替加环素可在安全范围内加大剂量来提高敏感性。其余所测试的药物均表明 I 类整合子阳性与阴性菌株的耐药性差别具有明显的统计学意义($P<0.05$),显示出 I 类整合子在鲍曼不动杆菌多重耐药中起到重要作用。对 I 类整合子可变区序列测序分析,显示其所携带耐药基因为 aadA1、aacA4 和 catB8,其中 aadA1 编码氨基糖苷核苷转移酶,aacA4 编码 6'-N-氨基糖苷乙酰转移酶,catB8 编码氯霉素乙酰转移酶。测序说明 aacA4-catB8-aadA1 是近两年烟台地区鲍曼不动杆菌中最流行的一类整合子,提示烟台地区感染管理处应对临床医生合理使用抗菌药物进行加强管理,避免长期性习惯性使用大量抗菌药物,以减少细菌多重耐药的发生。加强对整合子及整合子耐药基因的监测,以便预测并控制细菌的耐药性。

(上接第 2397 页)

[10] Grunt TW. Targeting fatty acid synthase, ErbB/HER and PI3K in ovarian cancer[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(suppl): 24.
[11] Chen MC, Esquivel S, Reber HA, et al. Eicosapentaenoic acid decreases fatty acid synthase through an Akt-dependent pathway in pancreatic cancer cells[J]. Pancrease, 2011, 40(8): 1316.
[12] 闻晨涛, 韩路, 江勇, 等. 结直肠癌患者血清脂肪酸合成酶水平的检测及其临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(8): 622-625.
[13] 林洁, 戴海峰. 胃癌患者血清脂肪酸合酶表达水平的诊断意义[J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(5): 475-477.
[14] 王梅, 孟华, 刘晓颖. AFP、CEA、CA199、CA724 联合检测在消化道恶性肿瘤中的临床价值[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20

参考文献

[1] 王辉, 孙宏莉, 宁永忠, 等. 不动杆菌属多重耐药及泛耐药的分子机制研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(1): 17-22.
[2] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.
[3] 李显志, 凌保东. 2006 年细菌对抗菌药物耐药机制研究进展回顾[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(4): 193-202.
[4] Dijkshoom L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii [J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(12): 939-951.
[5] 汪复. 多重耐药铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌严重感染的防治策略[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(3): 230-232.
[6] Su JY, Shi L, Yang LS, et al. Analysis of integrons in clinical isolates of Escherichia coli in China during the last six years[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 254(1): 75-80.
[7] 史俊燕, 张小江, 徐英春, 等. 2007 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, 2009, 9(3): 321-323.
[8] Turton JF, Kaufmann ME, Glover J, et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of Acinetobacter baumannii found in the United Kingdom [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (7): 3074-3082.
[9] Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 1999, 18(11): 761-770.
[10] Partideg SR, Recchial GD, Scaramuzzi C, et al. I site-specific deletion and rearrangement of integrin insert genes catalyzed by the integrin-DNA integrase[J]. Microbiology, 2000, 146 (11): 2855-2864.
[11] Hansson K, Skold O, Sundstrom L. Non-palindromic AttI sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets[J]. Mol Microbiol, 1997, 26 (3): 441-453.
[12] Koeleman JG, Stoof J, Van Der Bijl M, et al. Identification of epidemic strains of Acinetobacter baumannii by integrase gene PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 8-13.

(收稿日期: 2015-03-16)



(6): 546-548.
[15] 魏敏, 鲁怀伟, 程义壮. 肿瘤标志物 CEA、CA199 和 CA242 联合检测在诊断老年胃癌患者中的临床意义[J]. 中外医学研究, 2012, 17(1): 82-83.
[16] 黄星铭, 闵晓霞. 血清 CEA、CA199、CA724 联合检测在胃癌中的诊断价值[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(12): 1465-1466.
[17] Kim DH, Oh SJ, Oh CA, et al. The relationships between perioperative CEA, CA199 and CA724 and recurrence in gastric cancer Patients after curative radical gastrectomy [J]. J Surg Oncol, 2011, 104(6): 585-591.

(收稿日期: 2015-05-18)