

论著 · 临床研究

血流感染患者鲍曼不动杆菌的耐药基因检测及同源性分析

罗媛, 张任飞[△], 侯钧

(绵阳市第三人民医院检验科, 四川绵阳 621000)

摘要: 目的 探讨血流感染患者血液中分离出的鲍曼不动杆菌的耐药机制及基因同源性, 为多重耐药的鲍曼不动杆菌感染提供防治依据。方法 收集该院 2015 年 1 月至 2016 年 6 月共 14 例由鲍曼不动杆菌引起血流感染的住院患者的不同部位标本, 共分离出 38 株鲍曼不动杆菌。所有菌株按照统一的操作规程进行药敏试验, 聚合酶链式反应(PCR)扩增及琼脂糖凝胶电泳分析碳青霉烯酶基因, 并采用多位点序列分型(MLST)及 eBURST 分析软件进行同源性研究。结果 38 株鲍曼不动杆菌均为多重耐药株, 均检测到 OXA-23-like、OXA-51-like 基因及 ISAbal 序列, OXA-23-like 基因与 ISAbal 序列相关; MLST 分型显示 38 株鲍曼不动杆菌主要由 ST195 型(55.3%)、STn-2 型(15.8%)及 STn-3 型(10.5%)构成。eBURST 分析提示主要流行克隆为 CC92, 占 86.8%。结论 多重耐药的鲍曼不动杆菌携带相同耐药基因, 且菌株存在较高的遗传同源性, 提示存在克隆传播, 为降低医院内鲍曼不动杆菌相关血流感染风险提供了分子生物学依据。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 多重耐药菌; 血流感染; 耐药基因; 同源性**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.014 **中图法分类号:** R446.5**文章编号:** 1673-4130(2018)03-0303-05**文献标识码:** A

Drug resistant gene detection and homology analysis of *Acinetobacter baumannii* in patients with bloodstream infection

LUO Yuan, ZHANG Renfei[△], HOU Jun

(Department of Clinical Laboratory, Mianyang Municipal Third People's Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistant mechanism and the genetic homology of *Acinetobacter baumannii* (*A. ba*) isolated from blood in the patients with bloodstream infection so as to provide a basis for the prevention and treatment of multi-drug resistant *A. ba* infection. **Methods** The different sites of samples from the inpatients with bloodstream infection caused by *A. ba* were collected from January 2015 to June 2016. A total of 38 strains of *A. Ba* were isolated. The drug susceptibility test of all bacterial strains was performed according to the uniform operating specification. The carbapenemase gene was amplified by PCR and its products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The homology study was performed by using multi-locus sequence typing (MLST) and eBURST analysis software. **Results** All 38 strains of *A. ba* were multi-drug-resistant. And in all of them, OXA-23-like and OXA-51-like gene, and ISAbal sequence were detected. OXA-23-like gene was associated with ISAbal sequence; the MLST typing showed that 38 *A. ba* strains mainly included the type ST195 (55.3%), STn-2 (15.8%) and STn-3 (10.5%). The eBURST analysis indicated that the main prevalent clones were CC92, accounting for 86.8%. **Conclusion** Multi-drug resistant *A. ba* carries the same drug-resistant gene and its strain has higher genetic homology, indicating that the clone spread exists, which provides a molecular biological basis for reducing the risks of *A. ba* related bloodstream infection in hospital.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; multi-drug resistant; bloodstream infection; drug-resistant gene; homology

鲍曼不动杆菌是非发酵的革兰阴性杆菌, 黏附力极强, 可通过医务人员或器械传播, 是引起医院内感

染重要的条件致病菌, 其主要引起患有重症、免疫缺陷疾病或严重基础疾病的患者感染, 如呼吸相关性肺

炎、尿路感染、菌血症、手术部位感染及较少出现的中枢神经系统感染等。有报道显示重症监护室(ICU)患者中检出的鲍曼不动杆菌 50.9% 为定植菌, 49.1% 为非定植菌, 感染患者中 53.8% 为血流感染^[1]。近年来国内外多重耐药鲍曼不动杆菌及泛耐药的鲍曼不动杆菌引起的血流感染报道不断增加^[2-4]。根据中国细菌耐药监测网(CHINET)报告, 2009 年鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药率为 50.0%, 2013 年已升至 62.8%^[5-6]。鲍曼不动杆菌耐药机制十分复杂, 其中水解碳青霉烯酶的 β -内酰胺酶(D 类 OXA 型碳青霉烯酶)是导致该菌耐碳青霉烯类抗菌药物的主要原因之一。

鲍曼不动杆菌具有强大生存力, 使其在保持遗传性的同时发生高频率的变异, 从而表现出多重耐药和泛耐药。菌株分子流行病学研究对于院内感染暴发的流行病学调查, 特别是对传染源和传播途径的追踪具有非常重要意义。本文拟采用耐药表型、耐药基因型及菌株同源性研究分析引起患者血流感染鲍曼不动杆菌的分子流行病学特征。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 1 月至 2016 年 6 月共 14 例 ICU 血流感染住院患者不同部位的鲍曼不动杆菌共 38 株(已剔除重复株), 其中 12 例患者来自 ICU, 共 33 株; 1 例来自心外科共 3 株, 1 例来自神经外科共 2 株。细菌的分离培养按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)进行。同时收集因鲍曼不动杆菌引起血流感染的 14 例住院患者人口学资料、基础疾病、抗菌药物使用情况、入院后的治疗转归、细菌培养结果等。

1.2 仪器与试剂 法国梅里埃公司 VITEK-2 微生物自动鉴定和药敏仪; 美国应用生物系统公司聚合酶链式反应(PCR)扩增仪; 美国伯乐公司电泳仪及紫外

凝胶成像分析系统。成都精博生物技术有限公司提供 2×Taq PCR Master Mix 溶液; 宝生物技术公司提供 DNA ladder 及其他分子生物学试剂; 英俊生物工程(上海)有限公司合成引物。

1.3 方法

1.3.1 菌种鉴定 水煮裂解法提取细菌基因组 DNA, PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 模板 1 μ L, 引物 1 各 1 μ L, 上游引物 5'-CAT TAT CAC GGT AAT TAG TG-3'; 下游引物 5'-AGA GCA CTG TGC ACT TAA G-3', 扩增鲍曼不动杆菌的 16S RNA 基因的间隔区域, 片段长为 208 bp; 引物 2 各 0.5 μ L, 上游引物 5'-CCT GAA TCT TCT GGT AAA AC-3'; 下游引物 5'-GTT TCT GGG CTG CCA AAC ATT AC-3', 扩增不动杆菌属的高度保守序列, 片段长为 425 bp, 最后双蒸水(ddH₂O)补至 25 μ L。反应参数均为 94 °C, 预变性 5 min, 然后进入循环: 耐药基因检测为 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环, 菌种鉴定则为 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环, 最后均进入 72 °C 7 min 延伸阶段。最后取 PCR 产物 5 μ L 于含 0.5 μ g/mL EB 的 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 经紫外凝胶成像后分析。

1.3.2 菌种鉴定耐药基因检测 多重 PCR 同时扩增 OXA-23、OXA-51、OXA-24、OXA-58 OXA 型碳青霉烯酶耐药基因, 引物序列见表 1。检测体系总体积为 25 μ L, 其中 2×Taq Master Mix 12.5 μ L, 模板 1 μ L, 上下引物各 1 μ L, 最后 ddH₂O 补至 25 μ L, 反应参数同菌种鉴定。ISAbal 与 OXA-23 连锁扩增循环在耐药基因检测基础上延伸至 35 个。最后取 PCR 产物 5 μ L 于含 0.5 μ g/mL EB 的 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 经紫外凝胶成像后分析。

表 1 靶基因 PCR 引物序列及终产物长度

靶基因	引物序列 (5'→3')	终产物长度(bp)
OXA-23	上游引物: GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA 下游引物: ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501
OXA-51	上游引物: TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG 下游引物: TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353
OXA-24	上游引物: GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA 下游引物: AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	249
OXA-58	上游引物: AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG 下游引物: CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599
ISAbal	上游引物: CAT ATG AAA GTA TTA CGT GTT TTA GTG 下游引物: GGT ACC TTA CCA GTA GAA GTT TAC ACC	741

1.3.3 菌株遗传同源性分析 进行 7 种看家基因(GPI、rpoD、recA、gyrB、gltA、cpn60、gdhB)扩增,

PCR 反应总体积均为 50 μ L, 其中 2×Taq PCR Master Mix 25 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, 模板 2 μ L, 加

ddH₂O 补至 50 μL。反应参数为 94 °C 预变性 2 min, 然后进入循环: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环, 最后进入 72 °C 2 min 延伸阶段。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 经紫外凝胶后成像分析。产物测序由上海英俊生物技术有限公司完成。结果与多位点序列分型(MLST)数据库(<https://pubmlst.org/abaumannii/>)中基因序列进行对比分析并确定菌株基因型, 采用 eBURST 分析软件(<http://eburst.mlst.net/>)分析菌株亲缘性并将 STs 归类为克隆复合体(CC), 7 个位点中 ≥6 个位点相同定义为遗传相关克隆。

2 结 果

2.1 患者一般资料比较 14 例鲍曼不动杆菌血流感染患者中男 9 例(64.3%), 女 5 例(35.7%)。年龄 29~94 岁, 65 岁以上有 5 例(35.7%)。从基础疾病情况看, 血流感染患者中呼吸系统疾病 4 例(28.6%), 脑部疾病 2 例(14.3%), 腹部疾病 5 例(35.7%); 外伤 2 例(14.3%), 其他部位感染 1 例(7.1%)。7 例患者同时合并有 1~2 种基础疾病。依据病史结合微生物培养结果及预后等资料分析, 14 例均可确定为鲍曼不动杆菌相关的血流感染。同时, 伴有呼吸道感染者 9 例(64.3%), 多部位感染者 8 例(57.1%)。所有患者均进行了 3 种或者 3 种以上抗菌治疗, 共有 4 例(28.6%)死亡, 5 例(35.7%)因病危放弃治疗自动离院。

2.2 细菌常见药物敏感性结果 38 株鲍曼不动杆菌均为多重耐药株, 常见药物敏感性结果见表 2。鲍曼不动杆菌对头孢哌酮/舒巴坦耐药率为 31.58%, 对其他抗菌药物耐药率均超过 50.00%。鲍曼不动杆菌对亚胺培南、氨曲南、头孢他啶、环丙沙星、头孢噻肟、头孢呋辛、头孢吡肟、头孢曲松、头孢替坦、头孢唑肟、头孢曲松、氨苄西林耐药率均为 100.00%。

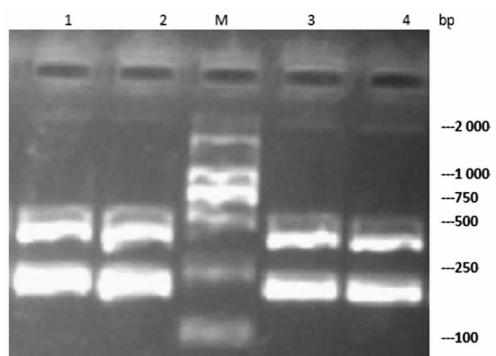
2.3 菌种鉴定及 D 类碳青霉烯酶基因及 ISAbal 基因扩增结果 38 株菌均扩增出 2 条条带, 确定为鲍曼

不动杆菌, 见图 1。均检测到 OXA-23-like、OXA-51-like 基因及 ISAbal 序列, 且 OXA-23-like 基因与 ISAbal 序列相关, 未检测出 OXA-24-like、OXA-58-like, 见图 2。

2.4 菌株同源性分析 MLST 分型显示 38 株鲍曼不动杆菌主要由 ST195 型(21 株, 占 55.3%)、STn-2 型(6 株, 占 15.8%)及 STn-3 型(4 株, 占 10.5%)构成, 其余为 ST75 型(3 株, 占 7.9%), ST368 型(2 株, 占 5.3%), ST92 型(1 株, 占 2.6%)和 STn-1 型(1 株, 占 2.6%), 7 个看家基因电泳扩增结果见图 3。14 例患者中, ICU 病房 8 例患者分离到 ST195 型(占 66.7%), 4 例患者分离到 STn-2 型(占 33.3%); 比对 eBURST 分析, 有 33 株(ST195、STn-1、STn-2、ST75、ST368)为克隆 CC92, 占 86.8%。

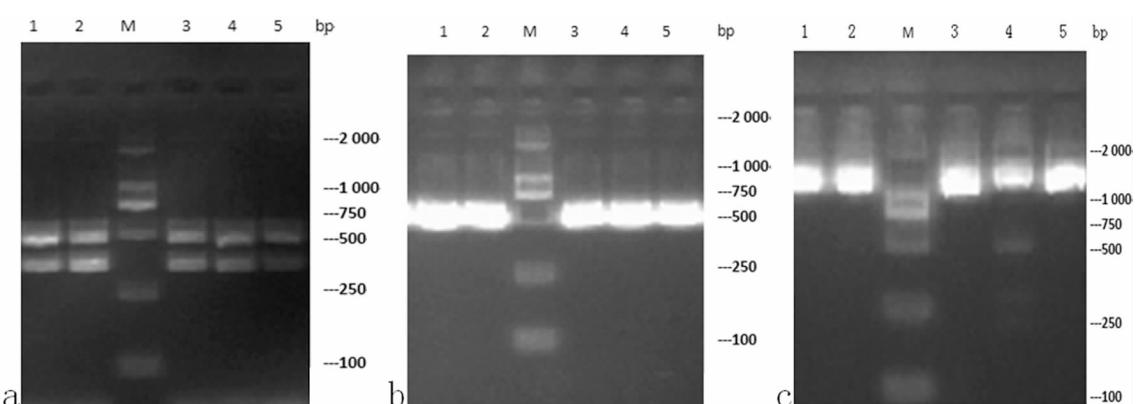
表 2 鲍曼不动杆菌对 24 种抗菌药物敏感性结果(%)

抗菌药物	耐药率	抗菌药物	耐药率
庆大霉素	86.84	复方磺胺甲恶唑	52.63
哌拉西林/他唑巴坦	81.58	左旋氧氟沙星	52.63
妥布霉素	78.94	头孢哌酮钠舒巴坦	31.58
美罗培南	78.94	米诺环素	28.95
氨苄西林/舒巴坦	71.05	替加环素	18.42
阿米卡星	60.53	多黏菌素 B	2.63



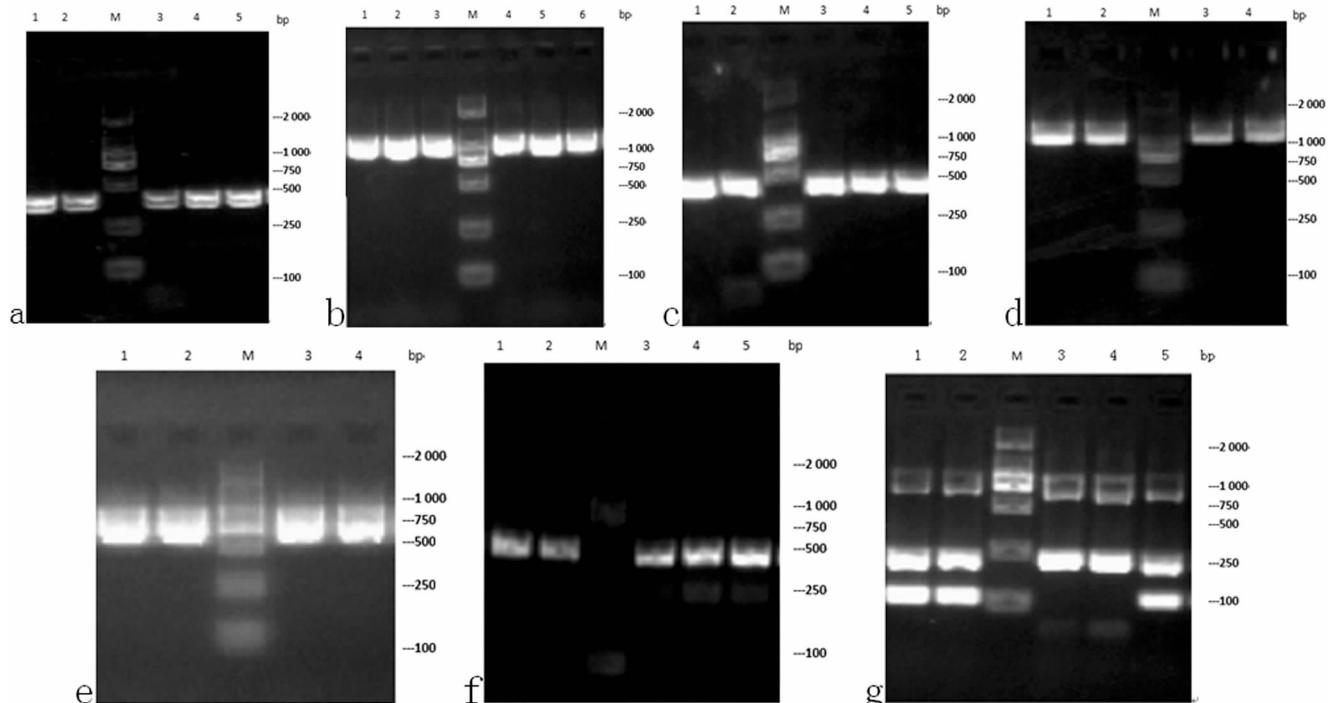
注:1~4 为扩增产物泳道;M 为 DNA 标志物

图 1 鲍曼不动杆菌菌株鉴定电泳结果



注:1~5 为扩增产物泳道;M 表示 DNA 标志物;a:OXA-23-like、OXA-51-like 基因扩增结果;b:ISAbal 基因扩增结果;c:ISAbal 与 OXA-23 连锁扩增结果

图 2 D 类碳青霉烯酶基因及 ISAbal 基因扩增结果



注:1~5为扩增产物泳道;M表示DNA标志物。a:GPI基因扩增结果;b:rpoD基因扩增结果;c:recA基因扩增结果;d:gyrB基因扩增结果;e:glyA基因扩增结果;f:cpn60基因扩增结果;g:gdhB基因扩增结果

图3 7种看家基因电泳扩增结果

3 讨 论

鲍曼不动杆菌已成为医院感染的主要病原菌,其耐药机制主要有产生 β 内酰胺酶,外排泵激活,外膜蛋白缺乏导致对 β 内酰胺类耐药,产生氨基糖苷类修饰酶(AME)或16S rRNA甲基化酶对氨基糖苷类耐药,gryA和parC基因点突变引起对喹诺酮类耐药及产生苯唑西林酶(OXA-23、OXA-24/40等),金属酶,外排泵过度表达等引起碳青霉烯类耐药^[7-8]。产OXA型碳青霉烯酶是鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的最主要机制,D类OXA型碳青霉烯酶属丝氨酸蛋白酶,在一定范围内能够水解阿莫西林、甲氧西林、苯唑西林等,但其对碳青霉烯的水解活性较B类低,主要包括OXA-23-like、OXA-24-like、OXA-51-like、OXA-58-like和OXA-143-like^[9]。而OXA-51-like组碳青霉烯酶为鲍曼不动杆菌固有基因型^[10]。本研究显示38株鲍曼不动杆菌菌株均携带了blaOXA-23-like,blaOXA-51-like基因及插入序列ISAbal,且OXA-23-like与ISAbal关系密切。插入序列ISAbal与OXA类碳青霉烯酶编码基因的同源重组及表达调控有关,ISAbal可以明显增强OXA-23的表达,从而导致菌株对碳青霉烯类抗菌药物高度耐药^[11]。研究结果显示,与ISAbal相关的OXA-23-like基因是介导鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药的碳青霉烯酶基因型。药敏结果显示本院引起血流感染的鲍曼不动杆菌耐药性较高,除对替加环素等少量抗菌药物耐药率较低外,绝大多数抗菌药物耐药率均超过

70%,对亚胺培南耐药的菌株同时也为多重耐药菌株。提示鲍曼不动杆菌感染的治疗常需 β 内酰胺与舒巴坦复方制剂与替加环素等联合,从而有效抑制细菌耐药性的增长^[8]。

本研究鲍曼不动杆菌引起血流感染的患者人群中,男多于女,年龄分布65岁以下患者多于65岁以上,与其他相关报道并不一致,可能与统计菌株较少及患者来源有关^[12]。鲍曼不动杆菌引起血流感染者有12例(85.7%),均来自ICU,与国内外相关报道相符^[2,13]。这与ICU患者住院时间长,免疫功能低下,具有严重原发疾病,留置导尿管及各种侵袭性操作有关,且可能与合并基础疾病,长期大量使用抗菌药物相关。9例患者从呼吸道分离出鲍曼不动杆菌,可能与本院标本来源及ICU患者常进行气道切开或使用呼吸机而造成鲍曼不动杆菌在呼吸道定植从而进一步引起血流感染有关。本研究患者死亡4例,分析其死因可发现4例患者鲍曼不动杆菌分离株均为多重耐药菌株,且均存在严重的原发疾病,合并出现脓毒血症引起多器官衰竭而死亡,与文献报道一致^[1-2]。

MLST分型显示86%菌株为克隆CC92,也是目前全球主要流行克隆,提示存在鲍曼不动杆菌克隆播散的可能,为鲍曼不动杆菌相关血流感染的医院感染控制提供分子生物学依据。因此,在合理选用抗菌药物治疗的同时也要预防鲍曼不动杆菌的感染,医护人员在进行侵入性操作时应严格消毒,切断交叉感染途

径,进而降低多重耐药鲍曼不动杆菌引起血流感染的风险。

参考文献

- [1] ANSALDI F, CANEPA P, BASSETTI M, et al. Sequential outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units of a tertiary referral hospital in Italy: combined molecular approach for epidemiological investigation[J]. J Hosp Infect, 2011, 79(2): 134-140.
- [2] PUNPANICH W, NITHITAMS N, TREERAT V, et al. Risk factors for carbapenem non-susceptibility and mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia in children [J]. Int J Infect Dis, 2012, 16(11): 811-815.
- [3] HUANG S T, CHIANG M C, KUO S C, et al. Risk factors and clinical outcomes of patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2012, 45(5): 356-362.
- [4] KIM S Y, JUNG J Y, KANG Y A, et al. Risk factors for occurrence and 30-day mortality for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in an intensive care unit[J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(8): 939-947.
- [5] 汪复,朱德妹,胡付品,等.2009年中国CHINET细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2010,10(5):325-334.
- [6] 胡付品,朱德妹,汪复,等.2013年中国CHINET细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [7] 张迪,余追,周青山.新建ICU病原菌分布及耐药性调查分析[J].中华医学感染学杂志,2012,22(4):876-869.
- [8] 张辉,张小江,徐英春,等.2011年中国CHINET不动杆菌属细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2013,9(5):342-348.
- [9] 周翠,吴庆,吴莲凤,等.鲍曼不动杆菌OXA-23基因和ISAba1基因检测和耐药性关系[J].疾病监测,2013,28(7):583-586.
- [10] 钟敏,黄文芳.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌产OXA酶的研究进展[J].中国微生态学杂志,2013,25(1):122-125.
- [11] HE C, XIE Y, ZHANG L, et al. Increasing imipenem resistance and dissemination of the ISAba1-associated blaOXA-23 gene among *Acinetobacter baumannii* isolates in an intensive care unit[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(3): 337-341.
- [12] 厉世笑,余素飞,黄林瑶.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌OXA基因检测及同源性分析[J].中国微生态学杂志,2013,25(3):332-334.
- [13] ANUNNATSIRI S, TONSAWAN P. Risk factors and clinical outcomes of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia at a university hospital in Thailand [J]. Southeast Asian J Trop Med, 2011, 42(3): 693-703.

(收稿日期:2017-06-21 修回日期:2017-09-29)

(上接第 302 页)

菌耐药发生的概率。

参考文献

- [1] 付晓燕,辛德莉,秦选光.儿童肺炎支原体感染流行病学,流行特点,发病机制及治疗研究进展[J].山东医药,2015,55(4):96-99.
- [2] 吴移谋,叶元康.支原体学[M].北京:人民卫生出版社,2008:46.
- [3] 邓颖,徐艳,杜克先,等.D-二聚体与免疫球蛋白在肺炎支原体肺炎诊断中的应用效果分析[J].检验医学与临床,2016,13(18):2644-2646.
- [4] 徐文,陈体.MP-IgM,hs-CRP 和 D-二聚体在儿童肺炎支原体感染中的价值[J].实验与检验医学,2014,32(5):577-578.
- [5] 王亚均,吴兆海,程明.肺炎支原体 IgM、IgG、血清 C-反应蛋白和降钙素原检测在儿童支原体肺炎诊断和治疗中的应用[J].实用临床医药杂志,2015,19(23):82-84.
- [6] 熊丽君,陈琅,阮琰,等.肺炎支原体肺炎儿童外周血D-二聚体与CRP的检测分析[J].医学前沿,2016,6(4):76-77.
- [7] 陈学高.小儿支原体肺炎的诊治进展[J].临床肺科杂志,2011,16(8):1246-1247.
- [8] 文启芹,刘俊,明怀志.肺炎支原体肺炎患儿血清hs-CRP,IL-6,IL-8,及肺炎支原体DNA检测的临床意义[J].川北医学院学报,2016,31(1):16-22.
- [9] 同秀丽,孟晨.儿童支原体肺炎并下肢静脉血栓形成 2 例[J].中国循证医学杂志,2012,7(1):94-97.
- [10] 李田华,王海立,李明磊,等.肺炎支原体感染致急性偏瘫 1 例并 12 例文献复习[J].中国实用儿科杂志,2013,28(3):210-213.
- [11] 徐丹,廖绍宗,倪琳婷,等.肺栓塞患者 D 二聚体、纤维蛋白原测定的临床意义[J].血栓与止血学,2010,16(6):275-276.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-10-11)