

· 论 著 ·

ICU 分离的多重耐药鲍曼不动杆菌 PFGE 分型及 I 型整合子介导的耐药研究

毛 璞¹, 傅 威², 杨 淳², 邱桂霞², 叶 丹¹, 黎毅敏²

(1 广州医学院第一附属医院, 广东 广州 510120; 2 广州呼吸疾病研究所呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510120)

[摘要] **目的** 了解某院重症监护室(ICU)分离的多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB) I 型整合子阳性率, 并分析 MDR-AB 的同源性, 探讨 I 型整合子参与耐药、传播的分子机制。**方法** 收集 2008 年 1 月—2009 年 12 月该 ICU 分离的 40 株 MDR-AB, 采用 K-B 纸片扩散法检测其耐药性, 聚合酶链反应(PCR)进行 I 类整合子可变区扩增、克隆测序, 分析 I 类整合子基因结构。应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析 MDR-AB 的同源性。**结果** 75.00% (30/40) 的菌株 I 类整合子阳性, 共检测出两种基因盒, 分别为 *aacA4-catB8-aadA1* 和 *aacC1-orfX-orfX'-orfX'-aadA1*。PFGE 结果表明, 40 株菌分为 4 个克隆, 其中有 26 株属于 B 克隆, 为主要流行菌株型。**结论** I 类整合子在 MDR-AB 中广泛存在, 可能通过水平传播方式在 ICU 中传播。携带 *aacA4-catB8-aadA1* 整合子的 MDR-AB 引起了 ICU 鲍曼不动杆菌的流行。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; 抗药性; 微生物; 多重耐药; 脉冲场凝胶电泳; 重症监护室; 医院感染

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)06-0417-05

PFGE analysis and class I integron-mediated resistance investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from an intensive care unit

MAO Pu¹, FU Wei², YANG Chun², QIU Gui-xia², YE Dan¹, LI Yi-min² (1 The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China; 2 State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the positive rate of class I integron in *Acinetobacter baumannii* (AB) isolated from an intensive care unit (ICU), analyze the homology of multidrug-resistant AB (MDR-AB), and explore the molecular mechanisms of class I integron involved in drug resistance and the spread. **Methods** Forty MDR-AB isolates from the ICU between January 2008 and December 2009 were collected, drug resistance of all isolates were detected by Kirby-Bauer method, PCR and DNA sequencing were undertaken to clarify the context of gene cassette. Pulsed-field gel electrophoresis was used to analyze the homology of MDR-AB. **Results** Class I integron was detected in 75.00% (30/40) of all isolates, 2 types of gene cassettes were identified, namely *aacA4-catB8-aadA1* and *aacC1-orfX-orfX'-orfX'-aadA1*. Forty isolates were classified into 4 distinct genotypes by PFGE analysis, 26 isolates belonged to clone B that were predominant epidemic strain. **Conclusion** class I integrons are widespread in MDR-AB, and spread horizontally in ICU. The epidemic of AB in ICU maybe caused by MDR-AB carrying *aacA4-catB8-aadA1* cassette.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; drug resistance; microbial; multidrug resistance; pulsed-field gel electrophoresis; intensive care unit; healthcare-associated infection

[Chin Infect Control, 2012, 11(6): 417-421]

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要条件致病菌, 其感染日益增多, 仅次于铜绿假单胞菌和大肠埃希

[收稿日期] 2012-04-10

[基金项目] 广州市教育局创新团队科研基金(B94117)

广州市科技计划项目(2010J-E171)

[作者简介] 毛璞(1981-), 女(汉族), 湖北省宜昌市人, 助理研究员, 主要从事医院感染管理研究。

[通讯作者] 黎毅敏 E-mail: liminygz@gmail.com

菌^[1]。随着抗菌药物的广泛使用,多重耐药鲍曼不动杆菌(multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*,MDR-AB)的临床分离比例不断增加^[2]。整合子—基因盒系统是细菌基因组中可移动的遗传元件,可将多个耐药基因整合在一起,形成细菌的多重耐药,是细菌耐药与传播的重要方式^[3]。本研究针对重症监护室(ICU)临床分离的鲍曼不动杆菌,研究 I 类整合子在 MDR-AB 耐药及传播机制中的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 MDR-AB 分离自某院 2008 年 1 月—2009 年 12 月 ICU 患者痰标本,共 40 株。MDR-AB 根据目前国际公认的定义^[4]确定,即对 3 类及以上抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌。

1.2 试剂与仪器 聚合酶链反应(PCR)及克隆试剂购自宝生物(大连)有限公司,所用引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。QIAGEN 凝胶回收试剂盒、New England Biolabs 限制性内切酶 *Apa* I、cleancut agarose 购自美国 Bio-rad 公司。主要仪器为 PCR 扩增仪(Bio-rad 公司 1000)、Pulsed Field Certified Agarose(Bio-rad 公司)、凝胶成像系统(Bio-rad 公司)、CHEF-DR III 脉冲场电泳仪(Bio-rad, USA)。

1.3 菌株鉴定及药敏试验 采用 VITEK-2 微生物自动检测仪鉴定菌种;美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的 K-B 纸片扩散法测定菌株对哌拉西林(PFP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、替卡西林/克拉维酸(TIM)、头孢曲松(CRO)、头孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、头孢哌酮/舒巴坦(CFPS,2 : 1)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、米诺环素(MIN)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、复方磺胺甲噁唑(SXT)等 15 种抗菌药物的敏感程度。

1.4 PCR 扩增 I 类整合子可变区 应用煮沸法提取细菌 DNA 模板。可变区保守引物为 intCS-5':GGCATCCAAGCAGCAAG;intCS-3':AAGCAGA CTTGACCTGA。PCR 体系总体积 50 μ L,其中 10 \times Buffer 5 μ L, dNTPs(200 μ mol/L) 4 μ L,上下

游引物(10 pmol)各 2 μ L, Taq 聚合酶(1.25 U) 2.5 μ L,DNA 模板 1 μ L。PCR 循环参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;55 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;循环 30 次后,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增后,用凝胶回收试剂盒回收目的片段,将其连接至 pMD 19-T Simple Vector,转化 *E. coli* DH5 α ,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑白色菌落,菌落经 PCR 检测阳性克隆后,送 invitrogen 公司测序。

1.5 脉冲场凝胶电泳(PFGE) 分离菌株接种于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。离心收集菌液,1 \times TE 重悬,加入等体积的 2% cleancut agarose,立即混匀后加入模具,制成胶块。将胶块放入 300 μ L 的细胞裂解液(100 mmol/L Tris、100 mmol/L EDTA),加入 5 μ L 20 mg/mL 的蛋白酶 K,50 $^{\circ}$ C 过夜。1 \times TE 洗 3 次,每次 1 h。每块小胶加 50 U *Apa* I 内切酶,25 $^{\circ}$ C 过夜。应用 CHEF-DR III 脉冲场电泳仪,0.5 \times TBE,1% Pulsed Field Certified Agarose,14 $^{\circ}$ C,6 V/cm,included angel 120 $^{\circ}$,线性,转换时间为 0.5—20 s,时间 20 h。电流结束,EB 染色后成像。应用 BioNumerics 软件对图像进行分析,选择 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)方法,条带位置差异容许度 2%,优化值 0.8%。相似度 \geq 85%为同一亚型,代表同一克隆株;<85%者为不同的基因型,代表不同克隆株。

1.6 质控菌株 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922,铜绿假单胞菌 ATCC 27853,金黄色葡萄球菌 ATCC 25923,结果参照 2009 CLSI 标准判定。

2 结果

2.1 药敏结果 40 株 MDR-AB 对 MIN 的敏感率最高(35.00%,14/40),其次为 CFPS(敏感率 12.50%,5/40);另 21 株菌为泛耐药株,见表 1。

2.2 PFGE 分析 采用 PFGE 对 40 株 MDR-AB 进行同源性分析,结果显示共 4 组类型,分别命名为 A、B、C、D,相似度 \geq 74.10%,见图 1。其中 6 株菌属于 A 组,26 株菌属于 B 组,C、D 组分别有 3 株和 5 株菌。根据相似度 \geq 85%为同一亚型,代表同一克隆株,A 组有 A1、A2 克隆;B 组分为 B1、B2、B3、B4、B5 克隆;D 组分为 D1、D2 克隆。

表 1 ICU 分离的 MDR-AB 基本信息及特征

Table 1 Characteristics of MDR-AB isolated from ICU

Isolates No.	Date of AB isolation	Cassette type	PFGE type	Pandrug-resistance	Antimicrobial susceptibility
4568	2009-10-13	Type 1	A1	No	MIN
5468	2009-11-20	No integron	A1	No	MIN
1316	2009-03-25	Type 1	A1	No	MIN
5985	2009-12-10	No integron	A1	No	CFPS FEP
1566	2009-04-09	Type 1	A2	No	MIN
2110	2009-05-13	Type 1	A2	No	MIN
4006	2009-09-09	Type 1	B1	Yes	-
4128	2009-09-15	Type 1	B1	Yes	-
4358	2009-09-26	Type 1	B1	Yes	-
3983	2009-09-03	Type 1	B1	Yes	-
3696	2009-08-24	Type 1	B1	Yes	-
4492	2009-10-10	Type 1	B2	No	CFPS
4791	2009-10-22	Type 1	B2	Yes	-
1042	2009-03-10	Type 1	B2	Yes	-
5084	2009-11-05	Type 1	B2	Yes	-
685	2009-02-16	Type 1	B3	No	MIN
864	2009-02-25	Type 1	B3	No	MIN
975	2009-03-05	Type 1	B3	Yes	-
1054	2009-03-10	Type 1	B3	Yes	-
444	2009-02-01	Type 2	B4	No	MIN MEM IPM
450	2009-02-2	Type 1	B4	No	CFPS FEP
668	2009-02-13	Type 1	B4	Yes	-
1623	2008-05-02	Type 1	B4	Yes	-
3038	2008-08-11	Type 1	B4	No	MIN
2544	2008-07-10	Type 2	B4	No	MIN CFPS
2772	2009-06-30	Type 1	B5	Yes	-
3334	2009-08-05	Type 1	B5	Yes	-
3605	2009-08-19	Type 1	B5	Yes	-
3693	2009-08-24	Type 1	B5	Yes	-
3325	2009-08-05	Type 1	B5	Yes	-
2418	2009-06-04	Type 1	B5	Yes	-
2493	2009-06-10	Type 2	B5	No	MEM IPM
4026	2009-09-09	No integron	C1	No	MIN AMK
4405	2009-10-02	No integron	C1	No	MIN
3993	2009-09-09	No integron	C2	No	MIN GEN
1259	2009-03-20	No integron	D1	Yes	-
433	2009-02-01	No integron	D1	No	MIN SXT AMK GEN
438	2009-02-01	No integron	D1	No	CFPS SXT AMK
310	2009-01-21	No integron	D2	Yes	-
458	2009-02-02	No integron	D2	Yes	-

* Pandrug-resistance: Bacterial strains that are resistant to all antimicrobial agents except polymyxin B^[5].

2.3 可变区分型与测序 应用 PCR 法扩增菌株可变区片段,75.00%(30/40)的菌株 I 类整合子阳性,未检测到 II 类整合子阳性菌株。I 类整合子,根据可变区域的不同分为两种,经克隆测序,90.00%(27/30)为第一种基因型 *aacA4-catB8-aadA1*,10.00%(3/30)为第二种基因型 *aacC1-orfX-or-*

fX-orfX'-aadA1。其中 *aadA1* 编码氨基糖苷腺苷转移酶,*aacC1*、*aacA4* 编码氨基糖苷乙酰转移酶,引起对 GEN、AMK 的耐药;*catB8* 编码氯霉素乙酰基转移酶,介导氯霉素耐药。B 组菌株均编码 I 类整合子,C、D 组菌株均不携带 I 类整合子。

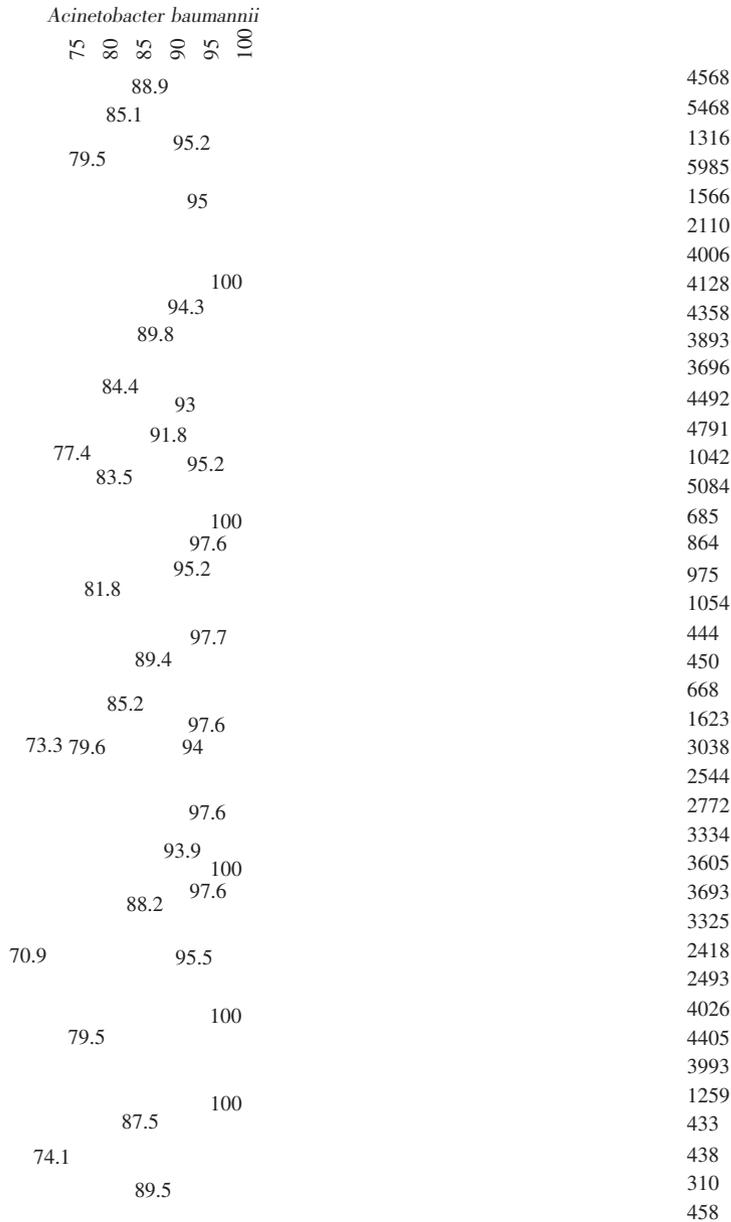


图 1 PFGE 电泳图谱及系统树状图

Figure 1 PFGE profiles of *Apa*-I digested genomic DNA of 40 MDR-AB isolated from ICU patients

3 讨论

研究表明, I 类整合子在 MDR-AB 中广泛存在, 阳性率达 75.00%。可变区编码耐药基因主要介导氨基糖苷类抗菌药物的耐药, 与国内相关研究^[6-7]一致。不同的克隆株携带同一类型整合子, 如 A、B 组克隆株大部分携带类型 I 整合子; 同一来源的克隆株携带不同类型的整合子, 如 B4、B5 克隆株大多数携带类型 I 整合子, 个别菌株却编码类型 2 整合子, 表明整合子能通过水平传播方式在菌株间传播, 该方式是鲍曼不动杆菌获得耐药基因的

方式之一。

本研究 PFGE 分析结果显示, 个别菌株之间相似度较高, 然而两者是否携带 I 类整合子存在差异。如 4568 号与 5468 号菌株相似度达 88.9%, 前者携带 I 类整合子, 后者不携带; 1316 号与 5985 号菌情况类似。结合菌株分离时间的先后, 我们推测可能由于整合子自身不稳定的特性^[8], 出现了整合子丢失的情况。这是首次在临床分离株中观察到此现象。上述两组菌的耐药表型无明显区别, 提示存在其他耐药机制。虽然整合子所编码的基因不是导致多重耐药表型的直接原因, 但其可能指示抗菌药物

压力的增加。

本研究发现一些菌株 PFGE 分型属于同一克隆且携带相同的整合子,却表现出不同的耐药谱,如属于 B2 克隆的 4 株菌,均携带 type1 整合子,而其中一株菌对头孢哌酮/舒巴坦敏感,另 3 株菌为泛耐药菌株。B3、B4、B5、C1、D1 克隆也出现类似情况。我们推测,菌株可能具有相同的基因组,但由于临床抗菌药物压力的不同造成耐药基因表达水平不同,最终反映为耐药谱的差别;另外,也有可能耐药基因不位于 PFGE 内切酶的识别位点,PFGE 分析无法区分如此细致的差别。因此,细菌耐药基因表达水平的调控也可能是耐药机制的重要方面。

由于 ICU 住院患者具有病情重、自身免疫力低下和侵入性操作多等特点,易出现医院感染暴发流行。在本研究开展期间,B 型克隆株为 ICU 病房主要流行菌株。B 型克隆株的流行可能是造成 2009 年 MDR-AB 分离数明显增多的主要原因。其中 B4 亚型存在时间跨度最长,从 2008 年 5 月第一次分离,到 2009 年 2 月仍有此亚型的临床分离株出现。提示该克隆株可能一直存在于 ICU 病房中,并通过某种途径造成交叉感染。

多重耐药、泛耐药菌株的出现,使其感染治疗的药物选择极其有限,常使临床治疗陷入困境。因此,一旦发现 MDR-AB,应做好各项预防措施,防止其播散流行。

[参 考 文 献]

- [1] 文细毛,任南,吴安华. 2010 年全国医院感染横断面调查感染病例病原分布及其耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(1):1-6.
- [2] 杨启文,王辉,徐英春,等. 2009 年中国 13 家教学医院院内感染病原菌的抗生素耐药性监测[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(5):422-430.
- [3] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8):608-620.
- [4] Falagas M E, Koletsi P K, Bliziotis I A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(12):1619-1629.
- [5] Magiorakos A P, Srinivasan A, Carey R B, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria; An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3):268-281.
- [6] 胡晓波,郭海艳,胡传玺,等. I 类整合子在多重耐药鲍曼不动杆菌中的作用研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(5):885-887.
- [7] 张静萍,朱婉,褚云卓,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学研究[J]. 中华内科杂志, 2010, 49(8):657-661.
- [8] Diaz-Mejia J J, Amabile-Cuevas C F, Rosas I, et al. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins [J]. Microbiology, 2008, 154(1):94-102.

(上接第 424 页)

[参 考 文 献]

- [1] 同俏静,庄以渝,王文元. ICU 导管相关性血流感染危险因素分析及对策[J]. 中华护理杂志, 2008, 43(2):177-179.
- [2] Vaquero Sosa E, Izquierdo Garcia E, Arrizabalaga Asenjo M, et al. Blood-stream catheter related infection in inpatient children receiving parenteral nutrition [J]. Nutr Hosp, 2011, 26(1):236-238.
- [3] Kurai H. The management of catheter related blood stream infection [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2012, 39(2):165-168.
- [4] Schonenberger M, Forster C, Siegmund M, et al. Catheter related blood stream infections in critically ill patients with continuous haemo(dia) filtration and temporary non-tunnelled vascular access [J]. Swiss Med Wkly, 2011, 141:w13294.
- [5] Chuengchitraks S, Sirithangkul S, Staworn D, et al. Impact of new practice guideline to prevent catheter-related blood stream infection (CRBSI): experience at the pediatric intensive

care unit of Phramongkutklao Hospital [J]. J Med Assoc Thai, 2010, 93(Suppl 6):S79-S83.

- [6] 中华医学会重症医学分会. 血管内导管相关感染的预防与治疗指南(2007) [J]. 中国实用外科杂志, 2008, 26(6):413-421.
- [7] Tan C C, Zanariah Y, Lim K I, et al. Central venous catheter-related blood stream infections: incidence and an analysis of risk factors [J]. Med J Malaysia, 2007, 62(5):370-374.
- [8] Rosenthal V D, Guzman S, Migone O, et al. The attributable cost, length of hospital stay, and mortality of central line-associated bloodstream infection in intensive care departments in Argentina: A prospective, matched analysis [J]. Am J Infect Control, 2003, 31(8):475-480.
- [9] Cinel I, Dellinger R P. Guidelines for severe infections: are they useful? [J]. Curr Opin Crit Care, 2006, 12(5):483-488.
- [10] 陈玉平,罗桂芝,高丽娟,等. 感染控制专科护士在预防 ICU 中心静脉导管相关性血流感染中的作用 [J]. 中华护理杂志, 2009, 44(10):895-897.