

• 论 著 •

醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌的分子流行病学及体外药物敏感性分析

黎 敏¹, 皮雯雯², 王 艺¹, 鲁卫平^{1△}

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科, 重庆 400042; 2. 重庆医科大学检验医学系, 重庆 400016)

摘要:目的 精确鉴定醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌菌种, 了解第三军医大学大坪医院醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌的菌种分布情况; 比较分析各菌种对临床常用抗菌药物的体外敏感率。方法 选取 2014 年 2~4 月该院临床分离的 95 株醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌非重复菌株, 采用 16S rRNA 基因测序法鉴定所有菌株到种; 利用 VITEK-2 Compact 自动细菌鉴定药敏仪检测所有细菌对临床常用抗菌药物的体外敏感率。结果 95 株醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌精确鉴定为鲍曼不动杆菌 81 株 (85.26%)、皮特不动杆菌 10 株 (10.53%)、医院不动杆菌 4 株 (4.21%)。药敏试验结果显示, 鲍曼不动杆菌对三代头孢菌素、氨基糖苷类和碳青霉烯类抗菌药物耐药情况严重, 敏感率在 20.00% 左右。而皮特不动杆菌和医院不动杆菌对常用抗菌药物的敏感率都较高。**结论** 传统的生化鉴定方法在不动杆菌种属鉴定中存在局限性, 利用 16S rRNA 基因测序分析, 就可以精确鉴定醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌, 复合菌中各菌种的耐药特性存在较大差异。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 复合菌; 基因测序; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2803-03

Genotyping of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and analysis of antibiotics resistanceLi Min¹, Pi Wenwen², Wang Yi¹, Lu Weiping^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Medical University of Chongqing, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To identify strains of *Acinetobacter* (A.) *calcoaceticus*-A. *baumannii* complex accurately, and investigate the species distribution of *Acinetobacter calcoaceticus*-A. *baumannii* (ACB) complex isolated in Daping Hospital. Analysis the antibiotics resistance of ACB complex. **Methods** A total of 95 clinical isolates of ACB complex were collected from Daping Hospital from February to April 2014, identify by sequence analysis of 16S rRNA gene spacer region. Use VITEK-2compact automatic identification of bacteria by susceptibility meter to detect the precise identification of all ACB complex group of drug sensitivity. **Results** Among all the 95 strains of ACB complex identification results were A. *baumanni* (81, 85.26%), A. *pittii* (10, 10.53%), A. *nosocomialis* (4, 4.21%), A. *baumannii* to third generation cephalosporins, aminoglycosides and carbapenem antibiotic resistance in serious condition, the sensitive rate was only about 20.00%. But A. *pittii* and A. *nosocomialis* had a high sensitivity rate to commonly used antibiotics. **Conclusion** VITEK-2 Compact automatic identification of bacteria susceptibility meter has limitations in identification of *Acinetobacter*, with analysis of 16S rRNA gene sequencing, the ACB complex could be accurately identified. There is significant difference in the composite group-resistant characteristics of each species, clinical infection is also various.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; complex group; gene sequencing; drug resistance

不动杆菌属是一类非发酵革兰阴性菌, 其中鲍曼不动杆菌临床分离率最高, 可引起包括呼吸机相关性肺炎、血行感染等各种感染^[1-2]。有资料显示, 碳青霉烯类抗菌药物从 2007 年耐药率小于 2.0% 上升到 2011 年的 61.4%, 耐药率的大幅上升说明耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌已经频繁出现, 而此类菌往往是泛耐药菌株^[3]。根据 DNA 杂交技术, 不动杆菌至少可分为 45 个基因型, 而常规的生化鉴定方法无法鉴定到所有种。已有研究表明鲍曼不动杆菌、皮特不动杆菌、医院不动杆菌与院内感染密切相关, 但醋酸钙不动杆菌广泛存在于环境中而较少从临床标本中分离得到。不动杆菌的不同菌种所导致的感染其临床预后可能存在差异^[4-5], 据 Lee 等^[6]报道由鲍曼不动杆菌导致的菌血症可能比皮特不动杆菌和医院不动杆菌导致的菌血症预后更差, 因此将醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌菌株鉴定到种有利于临床预后的判断和院内感染的监测。本研究在运用 VITEK-2 Compact 自动细菌鉴定药敏仪对不动杆菌临床分离株进行初步菌种鉴定的基础上, 利用 16S rRNA

基因的序列分析对 95 株醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌进行鉴定, 并对其耐药情况进行综合分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集第三军医大学大坪医院 2014 年 2~4 月临床分离的 95 株醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌, 同一患者的重复分离菌株不计入内。

1.2 仪器与试剂 Ex Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; VITEK-2 Compact 自动细菌鉴定药敏仪及配套革兰阴性细菌鉴定卡、药敏试验卡购自法国梅里埃生物有限公司; 基因扩增仪、电泳仪、凝胶成像仪购自美国 Bio Rad 公司。

1.3 检测方法

1.3.1 菌株收集 收集通过 VITEK-2 Compact 自动细菌鉴定药敏仪鉴定为醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌的非重复临床菌株, 在血平板上挑取 2~3 个单个菌落, 用 TE 缓冲液配成 2~3 个麦氏单位的菌液装入 EP 管中, -20 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 16S rRNA 序列的扩增 采用煮沸法制备 PCR 模板;

PCR 扩增体系为 25 μ L, 其中缓冲液 2.5 μ L、dNTP 2 μ L、MgCl₂ 2 μ L、引物各 2 μ L、Taq 酶 0.125 μ L、模板 2 μ L, 加灭菌双蒸水至 25 μ L, 混匀。瞬时离心后放入 PCR 扩增仪中。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 然后以 95 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 35 个周期, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 扩增引物序列为上游引物: 5'-GAT CAT GGC TCA GAT TGA AC-3', 下游引物: 5'-CTA CGG TTA CCT TGT TAC GA-3'。

1.3.3 扩增产物电泳 取 2 μ L 扩增产物与 1 μ L 上样缓冲液混匀后点样于含 Gold View 的 2% 琼脂糖凝胶, 100 V 电泳 30 min 后, 置入凝胶成像仪中观察并记录结果。

1.3.4 扩增产物序列的分析 扩增产物测序由南京金瑞斯生物科技有限公司完成, 测序结果在美国国家生物技术信息中心数据库 (NCBI) 中进行 BLAST 比对分析, 初步确定菌种。然后与 GeneBank 上公布的鲍曼不动杆菌、醋酸钙不动杆菌、皮特不动杆菌、医院不动杆菌 4 种标准菌株的 16S rRNA 片段序列运用 DNAssist 软件进行同源比对分析, 精确鉴定菌种。作同源比对的 4 种标准序列分别为鲍曼不动杆菌 16S rRNA 基因, 菌株 ATCC 19606; 醋酸钙不动杆菌 16S rRNA 基因, 菌株 ATCC 23055; 皮特不动杆菌 16S rRNA 基因, 菌株 ATCC 19004; 医院不动杆菌 16S rRNA 基因, 菌株 ATCC B40。

1.3.5 药敏试验 采用 VITEK 2 试卡法进行药敏试验按仪器操作说明, 使用 VITEK 2 药敏试验卡对所有的醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌进行药敏试验。

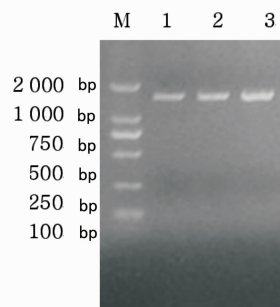
1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计数资料以株数及百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 16S rRNA 基因片段扩增结果 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 目的片段长度约为 1 500 bp, 与标记物相比较可见在 1 000~2 000 bp 中间有一明显的条带, 证明 16S rRNA 基因片段扩增成功。

2.2 菌种鉴定结果及标本来源 95 株醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌中鲍曼不动杆菌 81 株 (85.26%), 皮特不动杆菌 10 株

(10.53%), 医院不动杆菌 4 株 (4.21%)。临床标本来源分布见表 1。



M: DNA 标准参照物; 1~3: 部分 16S rRNA 基因 PCR 产物

图 1 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物电泳结果

2.3 体外药敏试验结果 鲍曼不动杆菌、皮特不动杆菌、医院不动杆菌对不动杆菌属常用药物的最小抑菌浓度 (MIC) 范围及敏感率见表 2。对于皮特不动杆菌和医院不动杆菌, 不动杆菌属常用的抗菌药物都有较高的敏感率, 耐药情况较少。但是对于鲍曼不动杆菌, 常用的第三代头孢和碳青霉烯类等抗菌药物敏感率都只有 20.00% 左右。

2.4 不同菌种对常用抗菌药物敏感率对比分析 鲍曼不动杆菌与皮特不动杆菌、医院不动杆菌相比, 对第三代头孢菌素、亚胺培南、妥布霉素等的敏感率差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 1 临床菌株的来源及在各菌种中的分布 [n(%)]

标本来源	鲍曼不动杆菌	皮特不动杆菌	医院不动杆菌
	(n=81)	(n=10)	(n=4)
痰液	63(77.8)	7(70.0)	3(75.0)
尿液	3(3.7)	0(0.0)	0(0.0)
血液	4(4.9)	0(0.0)	0(0.0)
分泌物及脓液	7(8.6)	2(20.0)	0(0.0)
导管尖	2(2.5)	0(0.0)	0(0.0)
其他	2(2.5)	1(10.0)	1(25.0)

表 2 醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌的体外药敏试验结果

抗菌药物	鲍曼不动杆菌 (n=81)		皮特不动杆菌 (n=10)		医院不动杆菌 (n=4)	
	MIC(μ g/mL)	敏感率(%)	MIC(μ g/mL)	敏感率(%)	MIC(μ g/mL)	敏感率(%)
头孢吡肟	2.00~64.00	20.98	2.00~64.00	90.00	1.00~2.00	100.00
头孢曲松	4.00~64.00	17.28	16.00~64.00	90.00	8.00~16.00	100.00
头孢他啶	2.00~64.00	18.51	4.00~64.00	90.00	4.00	100.00
亚胺培南	1.00~16.00	18.51	1.00~16.00	90.00	1.00	100.00
哌拉西林/他唑巴坦	4.00~128.00	23.45	4.00~128.00	90.00	≤ 4.00	100.00
氨苄西林/舒巴坦	2.00~32.00	17.28	2.00~32.00	90.00	2.00	100.00
妥布霉素	1.00~16.00	24.69	1.00~16.00	90.00	≤ 1.00	100.00
庆大霉素	1.00~16.00	18.51	1.00~16.00	70.00	1.00	100.00
环丙沙星	0.25~4.00	16.05	0.25~4.00	90.00	≤ 0.25	100.00

表 3 醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌药物敏感率比较

抗菌药物	鲍曼不动杆菌 [% (n/n)]	皮特不动杆菌 [% (n/n)]	医院不动杆菌 [% (n/n)]	鲍曼不动杆菌与医院不动杆菌比较 (P)	鲍曼不动杆菌与皮特不动杆菌比较 (P)
头孢吡肟	20.98(17/64)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.003
头孢曲松	17.28(14/67)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.002

续表 3 醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌药物敏感率比较

抗菌药物	鲍曼不动杆菌 [% (n/n)]	皮特不动杆菌 [% (n/n)]	医院不动杆菌 [% (n/n)]	鲍曼不动杆菌与医院 不动杆菌比较(P)	鲍曼不动杆菌与皮特 不动杆菌比较(P)
头孢他啶	18.51(15/66)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.002
亚胺培南	18.51(15/66)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.002
哌拉西林/他唑巴坦	23.45(19/62)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.004
氨苄西林/舒巴坦	17.28(14/67)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.002
妥布霉素	24.69(20/61)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.005
庆大霉素	18.51(15/66)	70(7/10)	100(0/4)	0.000	0.002
环丙沙星	16.05(13/68)	90(9/10)	100(0/4)	0.000	0.001

3 讨 论

由于抗菌药物的广泛使用,细菌基因突变及菌种之间的差异导致近年来鲍曼不动杆菌的多重耐药和泛耐药现象越来越严重,给临床抗感染治疗带来了极大的困扰,同时也使其治疗、预防和控制颇受关注。所以,定期研究和分析不动杆菌的耐药情况可以有效地提高临床抗感染治疗效果和预防多重耐药不动杆菌的爆发流行。

目前临床上菌种鉴定主要依靠表型差异,VITEK-2 等全自动细菌鉴定分析仪凭借高效、便捷的优点成为临床常用的技术方法^[7],但其只能鉴定不动杆菌属中有限的几种,对生化特性相近的鲍曼不动杆菌、醋酸钙不动杆菌、皮特不动杆菌和医院不动杆菌则难以区分。鲍曼不动杆菌、醋酸钙不动杆菌、皮特不动杆菌和医院不动杆菌虽然表型相似,但流行病学特征却大相径庭,醋酸钙不动杆菌主要存在于环境标本,皮特不动杆菌主要存在于皮肤表面和环境标本,医院不动杆菌主要存在于临床标本,而鲍曼不动杆菌则为院内感染的主要病原体之一^[8-9]。菌种鉴定不精确的缺陷,导致目前很多有关鲍曼不动杆菌的耐药及流行病学资料存在片面性,严重影响了对鲍曼不动杆菌耐药现状及临床分布状况的认识^[10-11]。

本研究采用 16S rRNA 基因分型技术^[12-13],将经 VITEK-2 鉴定为醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌的 95 株临床菌株精确分为鲍曼不动杆菌 81 株(85.26%)、皮特不动杆菌 10 株(10.53%)和医院不动杆菌 4 株(4.21%)。这与 Chuang 等^[13]的研究结果基本一致。药敏试验结果显示鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类和碳青霉烯类抗菌药物耐药情况严重,对亚胺培南、庆大霉素和妥布霉素的敏感率分别为 18.51%、18.51% 和 24.69%。皮特不动杆菌对三代头孢菌素、氨基糖苷类和碳青霉烯类抗菌药物的敏感率相对较好,都在 90.00% 左右。而医院不动杆菌对不动杆菌属常用的抗菌药物都呈现出 100.00% 敏感。鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物耐药性明显高于皮特不动杆菌、医院不动杆菌。

参考文献

[1] Srinivasan VB, Rajamohan G, Pancholi P, et al. Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in central Ohio, USA[J]. *Ann Clin Microb Anti*, 2009, 8(1): 21.
 [2] Jurenaite M, Markuckas A, Suziedeliene E. Identification and characterization of type II toxin-antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Bacteri*, 2013, 195 (14):

3165-3172.
 [3] Abdalhamid B, Hassan H, Itbaileh A, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a tertiary care hospital in Saudi Arabia[J]. *The New Micro*, 2014, 37 (1): 65-73.
 [4] Merino M, Alvarez-Fraga L, Gomez MJ, et al. Complete genome sequence of the multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain AbH120-A2, isolated during a large outbreak in Spai[J]. *Genome announcements*, 2014, 193 (6): 1133-1135.
 [5] Chuang YC, Sheng WH, Li SY, et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *acinetobacter bacteremia*[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 52 (4): 352-360
 [6] Lee NY, Chang TC, Wu CJ, et al. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia[J]. *J Infect*, 2010, 61 (3): 219-227
 [7] 邹自英,陈莉,刘媛,等. 分子生物学方法鉴定鲍曼不动杆菌与仪器鉴定结果比较[J]. *四川医学*, 2014, 35(9): 1123-1125.
 [8] Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, et al. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomic species 13TU*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13 (12): 1199-1201.
 [9] Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, et al. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*[J]. *Gut pathogens*, 2014, 6(1): 13.
 [10] 凌月明,蔡媛媛,王建福,等. 鲍曼不动杆菌临床分布、易感因素及耐药情况分析[J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(2): 212-214.
 [11] Lee HY, Chen CL, Wang SB, et al. Imipenem heteroresistance induced by imipenem in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*; mechanism and clinical implications[J]. *Inter J Antim Agen*, 2011, 37 (4): 302-308.
 [12] Wen JT, Zhou Y, Yang L, et al. Multidrug-resistant genes of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* strains[J]. *Genet Mole Res: GMR*, 2014, 13 (2): 3842-3849.
 [13] Chuang YC, Sheng WH, Lauderdale TL, et al. Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility and carbapenemase resistance determinants among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Taiwan[J]. *J Micro*, 2014, 47(4): 324-332.