·论　　著·

爆炸伤患者分离鲍曼不动杆菌的耐药性及同源性分析*

李　阳[1],周万青[2],曹小利[2],沈　黎[1],姜亦虹[1△]
(南京大学医学院附属鼓楼医院:1.感染管理科;2.检验科,江苏南京 210008)

摘　要:目的　分析爆炸伤患者临床分离鲍曼不动杆菌(Ab)的耐药性和同源性,了解 Ab 的耐药性特点及感染流行状况。**方法**　收集爆炸伤患者临床分离的 61 株 Ab,采用纸片扩散法测定菌株对常用抗菌药物的敏感性;采用脉冲场凝胶电泳分析菌株间的遗传相关性。**结果**　药敏试验结果显示:61 株 Ab 呈现出高耐药率及多重耐药的特点,其对替加环素和米诺环素的耐药率最低,分别为 11.5% 和 48.0%。61 株多重耐药 Ab 共分为 8 种基因型:其中 A 型 25 株,为主要流行型别;B 型 10 株、C 型 6 株、D 型 4 株、E 型 8 株、F 型为 3 株、G 型 4 株、H 型 1 株。存在较高的同源性。**结论**　爆炸伤患者检出的 Ab 具有多重耐药性,可能在地区间存在以克隆株的形式播散,应该引起高度重视。

关键词:爆炸伤;　鲍曼不动杆菌;　多重耐药;　同源性分析
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.002　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2015)23-3367-03

Analysis of multi-drug resistance and homology of Acinetobacter baumannii isolated from patients with explosive injury*

Li Yang[1], *Zhou Wanqing*[2], *Cao Xiaoli*[2], *Shen Li*[1], *Jiang Yihong*[1△]
(1. *Department of Infection Management*; 2. *Department of Clinical Laboratory*, *the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School*, *Nanjing*, *Jiangsu* 210008, *China*)

Abstract:Objective　To analyze the drug resistance and homology of Acinetobacter baumannii(Ab) isolated from patients with explosive injury, so as to explore the characteristics of drug resistance and prevalence of infection. **Methods**　A total of 61 strains of AB isolated from clinical specimens of patients with explosive injury were collected. The antimicrobial susceptibility of these isolates was detected by using K-B test. All the strains were gene typed by using the pulsed field gel electrophoresis. **Results**　The results of antimicrobial susceptibility test shown that the 61 isolates of Ab had high resistance rate, and were multi-drug resistant to common antibacterial agents, except for tigecycline(the resistante rate was 11.5%) and minocycline(the resistante rate was 48.0%). The 61 isolates of Ab were divided into 8 kinds of genotypes, among which type A was the most prevalent one(25 strains). Other genotypes were type B(10 strains), type C(6 strains), type D(4 strains), type E(8 strains), type F(3 strains), type G(4 strains) and type H(1 strain). The isolates of Ab were with high homology. **Conclusion**　Multi-drug resistance is observed in strains of Ab isolates from patients with explosive injury. Clonal strains of AB may be disseminates among regions, which indicates that high attention should be paid to these strains.

Key words:explosive injury;　Acinetobacter baumannii;　multidrug-resistant;　homology analysis

鲍曼不动杆菌(Ab)是专性需氧的非发酵革兰阴性杆菌,广泛分布于自然界[1]。已经成为医院感染的最常见病原体之一。Ab 在医院环境内长时间生存,可广泛定植于物品表面、患者开放的气道,以及患者与医务人员的皮肤,成为医院感染预防控制的重要挑战,并常造成医院感染的暴发。粉尘爆炸,指悬浮于空气中的可燃性粉尘颗粒物在爆炸极限范围内,接触到点火源(如明火、电火花、放电)时发生的爆炸[2]。爆炸释放大量的热,形成高温和强压,可导致范围内的人员发生严重皮肤和呼吸道烧伤[3]。2014 年 8 月 2 日江苏某地发生粉尘爆炸,伤员收治于江苏多所医院的重症监护室(ICU),由于病情严重,患者住院治疗时间较长,后期陆续出现 AB 感染,给患者康复和临床治疗带来很大困难。因此,笔者对爆炸伤患者感染多重耐药 Ab 菌株的耐药性及同源性进行研究分析,以期为预防和控制 AB 感染提供实验室数据参考。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　2014 年 8~9 月苏州、无锡、昆山、常州、南通等地区医院 ICU 临床分离的 61 株 Ab,剔除同一患者的重复分离株,其中苏州地区 29 株、无锡地区 5 株、南通地区 13 株、昆山地区 2 株、常州地区 12 株。所收集的菌株均经过 ATB 32GN 鉴定条(法国生物梅里埃公司)鉴定及确认。菌株分离自痰液、伤口分泌物、血液、尿液、导管头等标本。

1.2　仪器与试剂　Taq DNA 聚合酶、10×缓冲液(含镁离子)、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)均购自日本 TaKaRa 公司;脉冲场凝胶电泳(PFGE)琼脂糖购自美国 Bio-Rad 公司产品;ApaⅠ内切酶购自美国 Fermentas 公司;蛋白酶 K 购自美国 Merck 公司;聚合酶链式反应(PCR)扩增仪购自美国 PE 公司;十二烷基肌氨酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)均购自上海生工公司;PCR 引物由英俊公司合成;药敏纸片购自英国 Oxoid 公司;多黏菌素 B 由辉瑞公司惠赠。凝胶成像分析系统购自捷达公司;CHEF Mapper XA 型电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3　方法

1.3.1　细菌鉴定与药敏试验　采用 ATB 半自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司)进行细菌鉴定。采用纸片扩散法测定抗菌药物的最小抑菌浓度,共 16 种抗菌药物,包括头孢他啶、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/克拉维酸、环丙沙星、左氧氟沙星、阿米卡星、复方磺胺甲噁唑、米诺环素、替加环素等。质控标准菌

* 基金项目:南京市医学科技发展项目(ykk12064)。
作者简介:李阳,女,主治医师,主要从事临床微生物学与检验研究。　△ 通讯作者,E-mail:menghan63@sina.com。

株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853,均购自原卫生部临床检验中心。按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2015 版文件解读结果。

1.3.2　PFGE 分型　将培养过夜的细菌用低熔点胶灌模,蛋白酶 K 消化 24 h,限制性内切酶 ApaⅠ(30 U)30 ℃酶切 24 h。使用 CHEF Mapper XA 型电泳仪,电压 6 V/cm,夹角 120°,脉冲参数 5～35 s,电泳时间 19 h,电泳温度 14 ℃,分子量标记物为酵母染色体 DNA。嗅乙啶(EB)染色 30 min,拍照。使用 Bionumerics v6.5 软件在非加权分组平均法(UPGMA)的基础上使用骰子相似系数和 1.5%的带容差分析图谱。

1.4　统计学处理　采用 WHONET5.6 软件进行耐药性统计分析。

2　结　　果

2.1　标本分布　回顾性分析 61 株分离 AB 菌株相对应患者的临床资料,结果显示患者病情均较危重,丧失皮肤天然屏障;暴露于各种危险因素:各种侵入性操作、机械通气、长期抗菌药物的使用等。61 株 Ab 主要分离自痰液(38%)、其次为伤口分泌物(34%)、血液(24%)、尿液(2%)和导管头(2%)。

2.2　药敏结果　61 株 Ab 对 16 种抗菌药物的药敏试验结果:Ab 对临床常用抗菌药物,包括广谱的 β-内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类抗菌药物均表现出很高的多重耐药性。除替加环素(11.5%)和米诺环素(48.0%)的耐药率较低之外,头孢吡肟、亚胺培南、美洛培南、替卡西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、环丙沙星的耐药率均大于 90%。检出对碳青霉烯类抗菌药物(包括亚胺培南)均耐药的泛耐药菌株 54 株,占 90.7%。61 株 Ab 对 16 种抗菌药物的耐药性,见表 1。

表 1　61 株 Ab 对 16 种抗菌药物的耐药性分析(%)

抗菌药物名称	株数(n)	R	I	S
头孢哌酮/舒巴坦	55	88.0	4.0	8.0
氨苄西林/舒巴坦	48	88.9	0.0	11.1
替卡西林/克拉维酸	55	92.0	0.0	8.0
哌拉西林/他唑巴坦	61	90.7	0.0	9.3
头孢他啶	61	93.0	0.0	7.0
头孢吡肟	61	90.7	0.0	9.3
亚胺培南	61	90.7	0.0	9.3
美洛培南	55	92.0	0.0	8.0
阿米卡星	34	61.8	0.0	38.2
庆大霉素	48	83.3	5.6	11.1
妥布霉素	48	72.2	0.0	27.8
环丙沙星	43	90.7	0.0	9.3
左旋氧氟沙星	43	88.4	2.3	9.3
复方磺胺甲噁唑	25	88.0	4.0	8.0
米诺环素	25	48.0	20.0	32.0
替加环素	26	11.5	42.3	46.2

R:耐药;I:中介;S:敏感。

2.3　基因同源性分型结果　采用 PFGE 方法对 61 株 Ab 菌株的 DNA 进行扩增,根据琼脂糖凝胶电泳条带进行基因分型,共分为 8 种基因型:其中 A 型 25 株,为主要流行型别;B 型 10 株、C 型 6 株、D 型 4 株、E 型 8 株、F 型为 3 株、G 型 4 株、H 型为 1 株。各型扩增产物电泳结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页"论文附件")。

2.4　聚类分析结果　8 种 Ab 基因型进行树状聚类分析,将相似系数大于 80%归为同一类克隆株,可分为两类:其中Ⅰ类包括 A、B、C、D、E、F 型,Ⅱ类包括 G、H 型。Ⅰ类共 56 株(91.8%)、Ⅱ类共 5 株(8.2%)。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页"论文附件")。

3　讨　　论

ICU、烧伤病房、呼吸病房等病区是多重耐药 Ab 感染的高危病区,患者长时间住院,暴露于侵入性操作,服用广谱抗菌药物,使用机械通气等留置医疗设备,以及严重基础疾病等是导致多重耐药 Ab 菌株的高危因素。多重耐药 Ab 常常通过医护人员的手[4]、污染的医疗器械[5]等途径引起医院感染的暴发流行,其病死率高,造成的经济损失大,后果严重,应引起感染控制管理部门、临床微生物学学者及医院管理人员的高度重视。

本研究显示,临床分离 Ab 的耐药情况已经非常严重,具有多重耐药及高耐药率的特点。Ab 的耐药机制十分复杂,爆炸伤患者多有大量抗菌药物的使用史,抗菌药物的持续选择与运用可能会促进耐药菌株的产生和传播。抗菌药物控制与管理是否能够直接消除多重耐药 Ab 的暴发流行尚不明确。一项为期 10 年的回顾性研究结果显示,碳青霉烯类抗菌药物消耗量的增加与 Ab 的耐药性增加相关[6]。因此,在决定使用抗菌药物时应兼顾患者利益和潜在的不利结果。为确保有效防止多重耐药 AB 菌株的产生,应实施抗菌药物的合理管理措施[7]。

基因同源性分析对于流行病学调查,尤其是对追踪传染源和传播途径具有重要的意义。PFGE 是研究病原菌分子生物学分型的常用方法,与其他研究方法相比,是一种较为理想的分型技术,具有很高的分辨率,在很多病原菌中均有应用,是分辨医院感染暴发和追溯感染源的有效武器[8]。基因分型可用于判断细菌的同源性,同种细菌可以分为不同的基因型,而同源基因型的细菌被认为是统一克隆繁殖、传播形成。分子流行病学研究发现,克隆播散是多重耐药 Ab 呈跨医院、跨地区甚至是跨国流行的主要原因。俞云松[9]研究发现,6 种多重耐药 Ab 流行株在我国广泛流行。本研究应用 PFGE 技术对分离的 61 株多重耐药 AB 进行分型后发现,江苏省有 A、B、C、D、E、F、G、H 8 个类型克隆株流行。其中 A 型克隆株主要在常州、苏州、昆山地区流行,B 型克隆株流行于无锡,C 型克隆株流行于南通。根据 Ab 基因型的树状聚合分析图,相似系数大于 80%归为同一类克隆株,共分为两类克隆株。说明分离的 AB 存在较高同源性,可能在地区间存在以克隆株的形式播散,应该引起高度重视。

综上所述,结合耐药性及同源性分析结果,本地区存在 Ab 多重耐药菌株及其克隆传播,提示多重耐药 AB 菌株的防控是当今感染控制工作最大的挑战之一。应该加强 Ab 耐药监测,对监测数据进行细致分析,及时发现多重耐药菌的院内传播和聚集病例,当怀疑有多重耐药菌聚集病例时应进行分子流行病学调查。

参考文献

[1]　Munoz-Price LS,Zembower T,Penugonda S,et al. Clinical outcomes of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii bloodstream infections: study of a 2-state monoclonal outbreak[J]. Infect Control Hosp Epidemiol,2010,31(10):1057-1062.

[2]　赵衡阳. 气体和粉尘[M]. 北京:北京理工大学出版社,1996:?.

[3]　赵显东. 可燃粉尘爆炸的危险性分析及预防[J]. 中国西部科技,2011,10(8):33-35.

[4]　Hensley DM,Krauland KJ,McGlasson DL. Acinetobacter baumannii and MRSA contamination on reusable phlebotomy tourniquets[J]. Clin Lab Sci,2010,23(3):151-156.

[5]　Thom KA,Johnson JK,Lee MS,et al. Environmental contamination because of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii surrounding colonized or infected patients[J]. Am J Infect Control,2011,39(9):711-715.

[6]　Goel N,Wattal C,Oberoi JK,et al. Trend analysis(下转第 3371 页)

测物浓度处于临界水平时,重复检查同一标本,将产生 50%的阳性结果和 50%的阴性结果。定性试验临界值的高低直接关系到试验的成败,每个实验室应按照各自的检测系统和实验条件进行验证评价或建立方法学性能参数[7]。本实验室测得 HBsAg 的 C_{50}、C_5、C_{95} 分别为 0.24、0.20、0.28 IU/mL,$C_{50}\pm 20\%$浓度区间包含了 C_5～C_{95} 区间,$C_{50}-20\%$浓度的样品大于或等于 95%结果是阴性,$C_{50}+20\%$浓度的样品大于或等于 95%结果是阳性,说明重复测定临界点附近 95%区间标本能得到一致结果。C_{50} 和 C_5～C_{95} 区间还可用于评价两试剂的不精密度。两试剂 C_{50} 一致,C_5～C_{95} 区间越窄,代表该试剂的不精密度越小;两试剂 C_{50} 浓度不同,可以分为两种情况:如果 C_5～C_{95} 区间不等宽,越窄则该试验的不精密度越小;如果两试剂 C_5～C_{95} 区间等宽可以比较 C_{50} 与 C_5、C_{95} 的离散度。不精密度曲线可应用于定性分析的性能评价,并有较好的推广价值[4,7]。

精密度是定性试验性能评价的常用指标,在临床实际应用中,定量试验研究较多。由于乙肝标志物检测的 ELISA 方法大多是手工操作,影响因素较多,精密度 *CV* 变化较大。各项批内 *CV* 均小于或等于 15%,说明本实验室检测系统比较稳定、可靠,在临床应用的可接受范围之内。HBeAb、HBcAb 两项批间 *CV*>25%,相对于其他 3 项偏高,这可能与这两项指标采用竞争法有关,在检测过程中更应该加强质量控制,应注意 HBeAb、HBcAb 检测的不稳定性对检验结果造成的影响。但批间 *CV* 仍然在可接受范围之内,符合临床质量要求。

对于定性试验的准确度评价常常采用公认的较为准确的阴阳性符合率来表示。目前,原卫生部临床检验质控中心室间质评就是比较好的平台。定性试验的准确度还可以用与临床的吻合率来表达,通过与临床诊断进行比较,评价检测结果是否与临床诊断相吻合。但是这种方法需要临床诊断的金标准,而临床诊断通常需要乙肝标志物的检测结果作为依据,因此,用临床吻合率来评价定性试验的准确度不是最佳方案。用临床的吻合率来评价准确度只能用在 HBV 共价闭合环状(cccDNA)的定量检测[14]。

ELISA 与本实验室乙肝定量雅培 i4000SR 的结果比对可以较好的评价两检测系统的一致性。本次试验除了 HBeAg、HBeAb 符合率未达到 100%以外,其他 3 项均达到 100%。ELISA 未检出的阳性标本均是目标物雅培 i4000 定量检测浓度较低的样品,这可能导致在日常检测中,较低浓度的 HBeAg、HBeAb 不易检出。

乙肝标志物的检测,除了方法学本身和检测试剂对检测性能的影响外,检测前与检测中均有较多的影响因素。检测过程中加样和加试剂的重复性、孵育温度、孵育时间、洗板等都有可能影响检测结果,所以在实验过程中应将这些因素考虑在内并将其一致化[15]。日常检测也应注意检测过程中其他影响因素对检测结果的影响,做到全程质量控制,这样才能为临床提供正确、可靠的检验结果。

参考文献

[1] Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol,2008,2(4):553-562.

[2] 刘磊,刘新启. HBsAg 携带者乙肝血清学标志物模式分析[J]. 当代医学,2011,17(6):28-29.

[3] 尚红,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版,北京:人民卫生出版社,2015:1016-1018.

[4] 陈桂山,张秀明,熊继红,等. 未知诊断定性试验分析性能评价方法探讨[J]. 检验医学,2010,25(12):978-981.

[5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL39 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2014.

[6] 江涛,李军,王昌富,等. 基于 ISO15189 要求的免疫学定性试验性能验证方法的探讨[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(3):332-333.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP-12A2 User protocol for evaluation of qualitative test performance;approved Guideline[S]. 2nd ed. Wayne,PA,USA:CLSI,2008.

[8] 黄惠,黄宪章,李强,等. 应用 EP12-A2 评价 HBsAg 定性分析不精密度[J]. 临床检验杂志,2011,29(4):314-316.

[9] Liu C,Chen T,Lin J,et al. Evaluation of the performance of four methods for detection of hepatitis B surface antigen and their application for testing 116,455 specimens[J]. J Virol Methods,2014,196(1):174-178.

[10] 何敦雄,符生苗. 海南省临床实验室检测乙肝标志物五项水平评价[J]. 中国热带医学,2008,8(2):227-228.

[11] 张保平,董莉,冯新平,等. 乙肝病毒表面抗原方法学性能验证的评价和分析[J]. 职业与健康,2010,26(1):36-37.

[12] 夏邦世,吴金华. Kappa 一致性检验在检验医学研究中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(1):83-84.

[13] 吴泰相,刘关键,王家良,等. 医学检验不同方法之间一致性比较研究的正确设计和指标的正确表示方法[J]. 华西医学,2000,15(2):147-149.

[14] 杨培,秦波,单幼兰,等. 人工肝支持系统对重型乙型肝炎患者血清中 HBV cccDNA 影响的初步研究[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(12):1463-1466.

[15] 饶月丽,张伟强,邬丽娜. 酶联免疫吸附试验室内质控影响因素的分析[J]. 临床血液学杂志:输血与检验版,2009,22(6):685.

(收稿日期:2015-08-20)

(上接第 3368 页)

of antimicrobial consumption and development of resistance in non-fermenters in a tertiary care hospital in Delhi,India[J]. J Antimicrob Chemother,2011,66(7):1625-1630.

[7] Fishman N. Antimicrobial stewardship[J]. Am J Med,2006,119(6 Suppl 1):S62-70.

[8] Singh A,Goering RV,Simjee S,et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection[J]. Clin Microbiol Rev,2006,19(3):512-530.

[9] 俞云松. 多药耐药鲍曼不动杆菌——21 世纪革兰阴性菌的“MRSA”[J]. 中华临床感染病杂志,2009,2(2):65-68.

(收稿日期:2015-08-18)