

致呼吸机相关性肺炎的鲍曼不动杆菌分子分型

庞杏林, 张颖, 胡玉山, 李孝权, 陈守义

(广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510080)

[摘要] **目的** 了解引起呼吸机相关性肺炎(VAP)的鲍曼不动杆菌(Ab)分子流行病学特征。**方法** 对分离自VAP患者下呼吸道分泌物标本中的7株Ab菌株进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型及耐药性检测。**结果** 7株Ab的PFGE电泳条带相似度为57%~100%,分为A、B、C、D 4个PFGE型别,其中A、B、D型各2株(28.57%),C型1株(14.29%)。Ab对头孢他啶、亚胺培南和妥布霉素等13种抗菌药物产生不同程度的耐药性,均为泛耐药菌株,其中C型Ab为全耐药菌株。**结论** PFGE分型技术可以准确和快速地用于Ab引起的医院感染溯源、分型。

[关键词] 呼吸机相关性肺炎;鲍曼不动杆菌;抗药性;微生物;脉冲场凝胶电泳;流行病学;分子

[中图分类号] R563.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)05-0337-04

Genotyping of *Acinetobacter baumannii* causing ventilator-associated pneumonia

PANG Xing-lin, ZHANG Ying, HU Yu-shan, LI Xiao-quan, CHEN Shou-yi (Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the molecular epidemiological features of *Acinetobacter baumannii* (Ab) causing ventilator-associated pneumonia(VAP). **Methods** Seven strains of Ab isolated from lower respiratory tract secretion of VAP patients were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and drug-resistance of strains were detected. **Results** The similarity of PFGE electrophoresis strips of 7 strains was 57% - 100%, there were 4 PFGE patterns(A, B, C and D), 2(28.57%) strains were for pattern A, B and D respectively, 1(14.29%) strain was for pattern C. Ab had different drug-resistance to 13 kinds of antimicrobial agents (ceftazidime, imipenem, tobramycin, etc.), all were pan-drug-resistant strains, pattern C strain was all-drug-resistant strain. **Conclusion** PFGE typing can accurately and quickly trace the homology of nosocomial infection caused by Ab.

[Key words] ventilator-associated pneumonia; *Acinetobacter baumannii*; drug resistance, microbial; pulsed-field gel electrophoresis; epidemiology, molecule

[Chin Infect Control, 2011, 10(5):337-340]

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)广泛存在于自然界,近年已经成为医院感染常见的条件致病菌。由Ab引起的医院感染发生率位列第4,次于铜绿假单胞菌^[1-2]。呼吸机相关性肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)是重要的医院感染肺炎。由于VAP患者往往存在严重且难治的基础疾病,而Ab对多种抗菌药物的耐药率也逐年上升,故由该菌所致VAP的难治性受到临床广泛关注。近年来,细菌分子分型技术被运用于

医院感染的监测和控制,脉冲场凝胶电泳(PFGE)被认为是目前细菌分子流行病学研究的“金标准”,是公认的医院感染调查最好的分型方法^[3]。本研究对从VAP患者分离的7株Ab菌株进行PFGE分型及耐药性分析,以确定Ab菌株的克隆构成,了解VAP患者感染的Ab分子流行病学特征。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 7株Ab于2008年5—7月间分离

[收稿日期] 2011-03-03

[基金项目] 广州市医药卫生科技项目(2006YB131)

[作者简介] 庞杏林(1974-),女(汉族),广东省广州市人,副主任技师,主要从事医院感染细菌学研究。

[通讯作者] 庞杏林 E-mail: pangxinglin1225@163.com

自广州市某三级甲等医院呼吸科重症监护室(RICU)临床诊断为呼吸机相关性肺炎^[4]患者经规范化流程采集的下呼吸道标本。

1.2 主要试剂与仪器 所用培养基为广州迪景公司产品;VITEK 2 全自动微生物生化鉴定仪及采用的 VITEK[®]2 GN 细菌鉴定卡为法国生物梅里埃公司产品;E-test 药敏定量试验纸片为瑞典 AB BIOMERIEUX 公司产品,包括氨苄西林/舒巴坦(SAM)、阿莫西林/克拉维酸(AMC)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢曲松(CRO)、头孢吡肟(FEP)、亚胺培南(IPM)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、妥布霉素(TOB)、四环素(TET)、环丙沙星(CIP)、复方磺胺甲噁唑(SXT);限制性内切酶 Apa I 为宝生物工程(TaKaRa)大连有限公司产品;蛋白酶 K 为德国默克(Merck)制药公司产品;脉冲场电泳仪 Chef Mapper 及 Gel Dos XR 成像系统均为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 细菌鉴定与药敏试验 细菌分离、培养、鉴定和药敏试验均严格按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)进行。采用 VITEK 2 全自动微生物生化鉴定仪进行细菌鉴定;13 种抗菌药物的药敏试验,采用 E-test 纸片测定抗菌药物的 MIC;大肠埃希菌 ATCC 25922 为质控株。以美国临床实验室标准化研究所(CLSI)M100-S19 的操作规程及标准判读药敏结果^[5]。

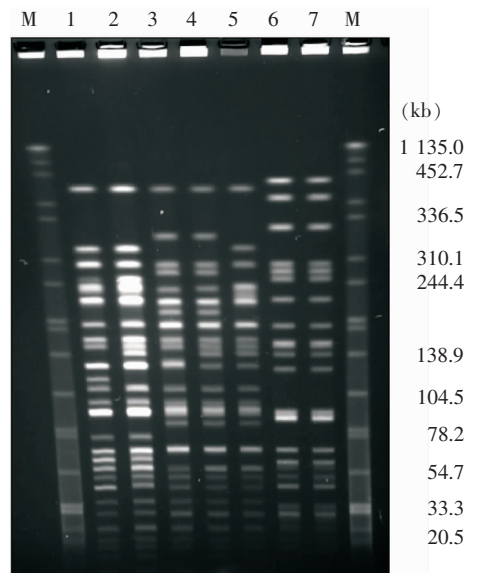
1.4 PFGE 将 Ab 菌株均匀洗脱于 200 μ L 细胞悬浮液中,菌液浓度调制为 2.0 麦氏单位。1%低熔点琼脂糖凝胶包埋 Ab 后,倾倒入专用模具制成胶块,用浓度为 20 mg/mL 的蛋白酶 K 在 54 $^{\circ}$ C 水浴摇床中进行消化,转速为 150 r/min,消化时间 2~3 h。将消化后的胶块切取 2.5 mm \times 4 mm 大小置于 1.5 mL EP 管中,加入 50 U 限制性内切酶 Apa I,在 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切 8 h。酶切后的胶块进行 1%低熔点琼脂糖凝胶电泳,电泳参数为:电压 6 V/cm,夹角 120 $^{\circ}$,温度 14 $^{\circ}$ C,脉冲时间 2.5~20 s,电泳时间 19 h,用沙门氏菌 H9812 作分子量对照。电泳完毕后胶块,用 1 μ g/mL 的 EB 染液染色 20 min,漂洗 25 min,必要时可重复漂洗。用成像仪读胶,获取电泳图像后使用 BioNumerics version 4.61 软件,选择 Dice 相关系数和 UPGMA 方法进行 PFGE 结果处理和聚类分析。判断标准^[6]:酶切图谱差异 3 个条带以上者为不同的类型;3 条以下者为同一型中不同亚型。同一型的各亚型间在基因上有相关

性;而不同型的菌株,认为在流行病学上无相关性。

2 结果

2.1 临床资料 7 例 VAP 患者年龄为 65~82 岁,其中男性 6 例,女性 1 例。分离的 Ab 来自纤维支气管镜、气道抽吸物、支气管肺泡灌洗液、纤维支气管镜引导保护性毛刷等标本。7 例 VAP 患者在标本采集前均使用过抗菌药物,其中 5 例使用肾上腺糖皮质激素。基础疾病均为慢性阻塞性肺疾病(COPD),其中 1 例合并心脏功能不全,1 例合并脑血管意外后遗症,2 例合并意识障碍,3 例合并营养不良;所有患者均留置胃管。平均发病时间为机械通气后(6.50 \pm 1.50)d,VAP 平均病程为(16.00 \pm 5.00)d,住院时间 45~80 d。

2.2 PFGE 分型结果 7 株 Ab 菌株 PFGE 指纹图见图 1。Ab 菌株的全基因组 DNA 经过 Apa I 酶切后,通过 PFGE 分析产生 25~29 个条带,条带分子量大小为 20~450 kb。7 株 Ab 菌株 PFGE 电泳聚类分析结果见图 2。PFGE 电泳条带相似度为 57%~100%,根据判断标准^[6],可将 7 株 Ab 分为 4 个型别,分别命名为 A 型、B 型、C 型和 D 型;其中 A、B、D 型各 2 株(28.57%),C 型 1 株(14.29%)。



M: DNA Marker H9812; Lane 1 - 2: Pattern A; Lane 3 - 4: Pattern B; Lane 5: Pattern C; Lane 6 - 7: Pattern D

图 1 7 株 Ab 菌株 PFGE 指纹图

Figure 1 PFGE fingerprints of 7 Ab strains

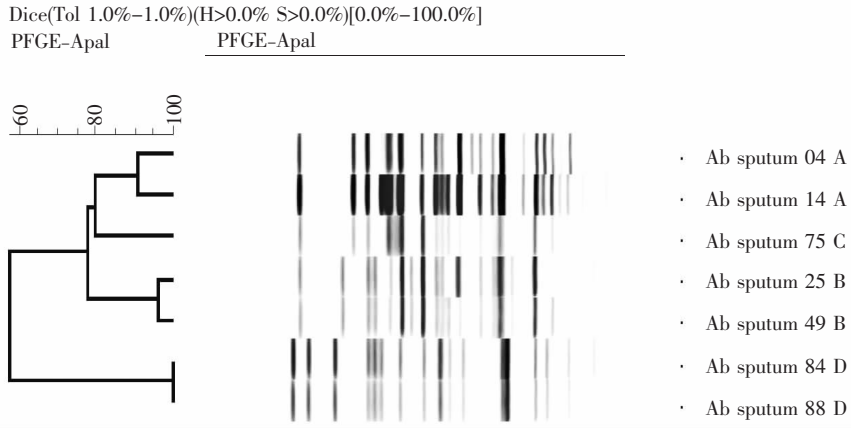


图 2 7 株 Ab 菌株 PFGE 聚类分析结果

Figure 2 Cluster analysis of 7 Ab strains by PFGE

2.3 药敏结果 7 株 Ab 对 13 种抗菌药物产生不同程度的耐药性。根据药敏分析发现,PFGE 同型的 Ab 其耐药表型也相似。除了 D 型 2 株 Ab 对个别抗菌药物的敏感性有稍许差别外,A 型 2 株 Ab 抗菌药物表型和 B 型 2 株 Ab 抗菌药物表型完全一致,仅对亚胺培南敏感,对其余 12 种抗菌药物均表现耐药性;唯一的 1 株 C 型 Ab 对 13 种抗菌药物全

部产生耐药性。分子型别的聚类分析结果也显示 A 型、B 型与 C 型 Ab 的相似性(77.99%)较高,亲缘性较近。D 型 Ab 只对 5 种抗菌药物产生耐药性,相比其他 Ab,是较为敏感的 Ab 菌株类型;分子型别的聚类分析结果也显示 D 型与其他 3 个型别的相似性(57.44%)低,亲缘性较远。7 株 Ab 的 PFGE 分型与耐药表型见表 1。

表 1 7 株 Ab 临床资料以及 PFGE 分型与耐药表型

Table 1 Clinical data, PFGE typing and antimicrobial susceptibility of 7 Ab strains

| No. of Patients' strain | age | Sex | Underlying Disease | Days of Hospital stay | Hormone therapy | Invasive procedure | PFGE type | Antimicrobial agents | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|--------|--------------------|-----------------------|-----------------|--------------------|-----------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | | | | | SAM | AMC | CAZ | CTX | CRO | FEP | IPM | GEN | AMK | TOB | TET | CIP | SXT |
| 04 | 69 | Male | COPD | 72 | - | + | A | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R |
| 14 | 68 | Male | COPD | 68 | + | + | A | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R |
| 25 | 65 | Male | COPD | 77 | - | + | B | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R |
| 49 | 82 | Female | COPD | 80 | + | + | B | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R |
| 75 | 80 | Male | COPD | 45 | + | + | C | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 84 | 81 | Male | COPD | 69 | + | + | D | R | R | I | R | I | S | S | S | I | I | S | S | R |
| 88 | 79 | Male | COPD | 68 | + | + | D | R | R | I | S | R | S | S | S | S | S | S | S | R |

R;Resistant;S;Sensitive;I;Intermediate

3 讨论

国内外研究数据^[7-8]均显示,Ab 是医院感染主要病原菌之一。其对多种抗菌药物固有耐药,在干燥物体表面存活 23 d,还可于肥皂水中存活。医护人员的手在经过肥皂清洗后仍可带有 Ab,机械通气患者经过有创性操作而获得辅助呼吸,Ab 通过医护人员手传播感染的机会增加。在 ICU 中,Ab 感染容易以暴发形式发生,暴发流行往往是由同一克隆株通过某种传播途径在同一病区内引起患者之间的克隆传播。追溯病史,发现本组 7 例患者平均

住院时间为 68 d,平均年龄 75 岁,均存在较严重的基础疾病及各种合并症;治疗期间接受过气管插管、呼吸机人工通气及电动吸痰等创伤性治疗措施,有激素治疗史,有第三代头孢菌素用药史。说明 ICU 中容易发生 Ab 引起的医院感染,与高龄、住院周期长、免疫功能低下、大量抗菌药物和激素治疗、使用各种侵入性操作等因素相关。防御能力受损的重症患者罹患 Ab 感染的危险较大,医护人员应严格执行感染控制规程,尤其在有创性诊疗操作前,除用肥皂洗手外,还应该用消毒乙醇棉球擦拭手,减少 Ab 污染概率。

7 株 Ab 中,仅有 1 株对常用于产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)细菌治疗的 IPM 产生耐药性,提示本次分离的 Ab 对 IPM 比较敏感。IPM 属于碳青霉烯类抗生素,由于该药抗菌谱广,对产 ESBLs 和 AmpC 的细菌具有良好的抗菌活性,而被认为是治疗多重耐药菌的理想药物。但是,近年来随着 IPM 在临床的广泛应用,其耐药率也逐年增加,Ab 对 IPM 产生的抗药率也在逐年上升^[9]。有文献报道^[10-12],导致不动杆菌属耐碳青霉烯类抗生素的机制主要包括膜屏障,产 OXA223 等苯唑西林酶(D 类酶)或 VIM、IMP 等金属酶(B 类酶)。应加强对碳青霉烯类抗生素的耐药性检测及耐药机制研究,指导临床合理应用该类抗生素,延缓其耐药性的发展。

PFGE 电泳技术常被用于鉴定不同菌株之间基因的相关性,此种细菌全基因 DNA 指纹分析方法非常适合医院感染暴发的调查,可鉴定某种流行克隆传播的程度和方式。国内外至今未建立标准的不动杆菌属 PFGE 实验标准程序,本研究拟探索和优化 PFGE 应用于 Ab 分型的实验条件,建立本实验室的 Ab 菌 PFGE 实验程序。与相关文献^[13-14]对比,发现一些不同之处,如在 Ab 最佳菌液浓度的调制上,分别用了 4 种菌液浓度:0.5、1.0、1.5 和 2.0 麦氏单位,结果表明 2.0 麦氏单位的菌液浓度时 DNA 电泳条带亮度最佳。由此说明,菌量的过多或过少都会影响电泳条带的亮度。限制性内切酶的选择在 PFGE 中至关重要,本实验选用了 *Apa* I 限制性内切酶进行酶切,酶切时间在少于 5 h 情况下得不到清晰的片段,如果酶切时间延长至 8 h 或以上则可获得完全的细菌 DNA 酶切片段。酶的浓度通过多次优化实验后选定为 50 U/mL 的 *Apa* I 酶浓度时酶切效果较理想。电泳时间方面,比较了 17 h、19 h 和 21 h 的电泳效果,其中 17 h 电泳时间过短,没有充分分开酶切条带的电泳距离,可辨性低;而 21 h 电泳时间过长,<100 kb 的酶切片段电泳丢失;只有 19 h 电泳时间既保留了所有 DNA 酶切片段又可以有效分辨 DNA 条带的距离,所以确定 19 h 为最合适的电泳时间。实验证明,本研究选择的 PFGE 方法和条件是适宜的,具有较好的分型性、分辨力和重复性,是理想的细菌分子分型方法,能准确地反映病原的流行病学相关性。

[参 考 文 献]

- [1] Dij Kshoorn L, Nemeč A, Seifert H. An increasing threat in hospitals multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(12): 939-951.
- [2] Simor A E, Lee M, Vearncombe M, et al. An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit: risk factors for acquisition and management [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2002, 23(5): 261-267.
- [3] Maslow J N, Mulligan M E, Arbeit R D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms[J]. Clin Infect Dis, 1993, 17(2):146-153.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(4):201-203.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. CLSI document M100-S19, 19087-19898 USA, 2009.
- [6] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239.
- [7] 王辉, 陈民钧. 1994—2001 年中国重症监护病房非发酵糖细菌的耐药变迁[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5):385-390.
- [8] Vincent J L, Bihari D J, Suter P M, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study[J]. JAMA, 1995, 274 (8):639-644.
- [9] 骆俊, 沈继录, 徐小刚, 等. 耐碳青霉烯类抗生素不动杆菌的 β -内酰胺酶研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(2): 79-83.
- [10] Naas T, Levy M, Hirschauer C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9) : 4826-4829.
- [11] Yu Y S, Yang Q, Xu X W, et al. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital [J]. J Med Microbiol, 2004, 53(7):653-656.
- [12] Jeon B C, Jeong S H, Bae I K, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (5): 2241-2245.
- [13] Yang H Y, Lee H J, Suh J T, et al. Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 β -lactamase in a tertiary care hospital in Korea[J]. Yonsei Med J, 2009, 50(6): 764-770.
- [14] Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1223-1230.