

## ICUs 分离的三种重要病原菌的耐药特性与基因型分析\*

辛毅娟<sup>a</sup>, 史皆然<sup>b</sup>, 杨柳<sup>a</sup>, 杨玉琪<sup>a</sup>, 徐修礼<sup>a</sup>, 周珊<sup>a</sup>, 郝晓柯<sup>a</sup>, 马越云<sup>a</sup>

(第四军医大学西京医院 a. 检验科; b. 感染科, 西安 710032)

**摘要:**目的 了解西京医院重症监护室分离的3种重要感染病原菌的耐药性和同源性。方法 于2013年11月~2014年3月收集西京医院重症监护室分离到的15株金黄色葡萄球菌, 24株鲍曼不动杆菌和22株铜绿假单胞菌, 应用VITEK-32微生物鉴定药敏分析系统对感染病原菌进行菌种鉴定和药物敏感性试验; 应用Diversilab基因分型系统对感染病原菌进行同源性分析。结果 15株金黄色葡萄球菌分为A1, A2, B, C等4型; 24株鲍曼不动杆菌分为A和C型两型。22株铜绿假单胞菌分为A1, A2, A3, A4, A5, B, C型等7型。相同菌株不同基因型之间存在不同的耐药性; 来自不同区域的同型菌株存在不同的耐药性。结论 同源区域明显相关, 综合分析有助于了解院内感染病原菌的流行趋势和感控效果。

**关键词:**病原菌; 耐药性; 基因型

中图分类号: R378; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)05-024-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.008

### Drug Resistance and Homological Analysis of Important Clinical Bacterial Pathogens

XIN Yi-juan<sup>a</sup>, SHI Jie-ran<sup>b</sup>, YANG Liu<sup>a</sup>, YANG Yu-qi<sup>a</sup>, XU Xiu-li<sup>a</sup>,

ZHOU Shan<sup>a</sup>, HAO Xiao-ke<sup>a</sup>, MA Yue-yue<sup>a</sup> (a. Department of Clinical

Laboratories; b. Department of Infectious Disease, Xijing Hospital, Xi'an 710032, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the antimicrobial resistance and homology of the 3 clinical bacterial pathogens from the intensive care units of Xijing Hospital. **Methods** Collected the clinical infectious pathogens, including 15 *Staphylococcus aureus*, 24 *Bauman acinetobacter* and 22 *Pseudomonas aeruginosa* from November 2013 to March 2014. Pathogens were identified with VITEK-32 automatic microorganism analyzer. At the same time, the drug susceptibility testing was performed. The homology was identified by using automated DiversiLab System DNA fingerprinting. **Results** 15 strains of *Staphylococcus aureus* could be divided into A1, A2, B and C genotypes. 24 strains of *Bauman acinetobacter* could be divided into A and C genotypes. 22 strains of *Pseudomonas aeruginosa* could be divided into A1, A2, A3, A4, A5, B, and C genotypes. There was different resistance among the same strains of different genotypes, and the same genotype strains from different areas had different drug resistance. **Conclusion** There was a high relationship between the drug resistance, genotype and the area it was from. It was suggested that combined analysis these 3 factors might be helpful for full understand the control of the hospital infection.

**Keywords:** bacterial pathogen; drug resistance; genotype

近年来研究发现,金黄色葡萄球菌<sup>[1]</sup>尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MASR)、鲍曼不动杆菌<sup>[2]</sup>、铜绿假单胞菌<sup>[3]</sup>已成为院内感染的主要致病菌,也是我院历年病原菌统计引起院内感染排名前三的菌株。为了解这三株菌株的耐药谱特征及其同源性,本研究对收集于2013年11月~2014年3月我院重症监护室分离到的15株金黄色葡萄球菌、24株鲍曼不动杆菌和22株铜绿假单胞菌进行药物敏感性试验分析,使用基于Rep-PCR的Agilent2100分析仪DiversiLab分析系统的分型方法对筛选的相关菌株进行同源性分析,为医院感染控制和用药指导提供依据。

#### 1 材料与与方法

1.1 研究对象 于2013年11月~2014年3月,收集我院各重症监护室(intensive care units, ICUs)病区分离到的15株金黄色葡萄球菌、24株鲍曼不动杆菌和22株铜绿假单胞菌,并进行鉴定。

1.2 试剂和仪器 VITEK-32全自动细菌分析系统, Qiagen DNA提取试剂盒, Beckman DU800核酸蛋白分析仪, AmpliTaq Gold扩增酶(1 000U)为ABI公司产品; ABI 2720聚合酶链反应(PCR)扩增仪, Agilent 2100分析仪, DNA LabChip, Rep-PCR标准化试剂盒, DiversiLab软件均来自法国生物梅里埃公司; 溶菌酶(Lysozyme)为Sigma公司的产品; 羊血、营养琼脂及一次性接种环为上海生工生物工程有限公司的产品。

\* 作者简介: 辛毅娟(1985-), 女, 医学硕士, 检验技师, 从事病原微生物的流行病学及致病机制的研究, Tel: 029-84771034, E-mail: xy850510@126.com.  
通讯作者: 马越云, 博士, 副教授, 博士研究生导师, Tel: 029-84775959, E-mail: cmbmayy@fmmu.edu.cn.

1.3 方法

1.3.1 菌种鉴定和药物敏感性试验:应用 VITEK-32 全自动细菌分析系统对西京医院微生物室收集到的感染病原菌进行菌种鉴定和药物敏感性试验。

1.3.2 DNA 抽提:金黄色葡萄球菌,鲍曼不动杆菌及铜绿假单胞菌 DNA 抽提自羊血平板上分离纯化的单菌落,使用 Qiagen DNA kit,按照厂家说明书推荐步骤进行 DNA 抽提,并通过 Beckman DU800 核酸蛋白分析仪检测 DNA 纯度和浓度,纯度严格控制在 1.7~1.9, DNA 浓度调为 25~50 ng/ $\mu$ l。

1.3.3 PCR 扩增:分别使用 DiversiLab System 中针对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌的 Rep-PCR 标准化试剂盒,配制反应混合液 25  $\mu$ l,包括 Rep-PCR MM1 18.0  $\mu$ l, GeneAmp 10  $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l, Primer Mix LL 2.0  $\mu$ l, AmpliTaq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ l, 模板 2  $\mu$ l。循环条件如下,94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 35 个循环;最后 70 $^{\circ}$ C 再延伸 3 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.4 PCR 扩增产物检测:在 DNA LabChip 微流体芯片(范围 700~1 500 bp)中依次加入 9  $\mu$ l Gel-Dye Mix, 5  $\mu$ l DNA Marker, 1  $\mu$ l DNA Ladder, 1  $\mu$ l PCR 扩增产物。将芯片卡入漩涡振荡适配器中, 2 400 r/min 振荡 1 min。5 min 内放入 Agilent 2100 生物分析仪,进行微流电泳。

1.4 统计学分析 DiversiLab version 3.4 自带软件依据 Pearson 相关系数(pearson correlation coefficient, PC)分析和计算各样本的相似性系数。非加权组平均数(unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA)自动比较 Rep-PCR 产物并创建树状图。数据的分析结果包括树状图、相似性矩阵、电泳图谱、虚拟凝胶图谱、散点图和可选择的相似性数据<sup>[4]</sup>。

2 结果

2.1 菌种鉴定和药物敏感性试验 VITEK-32 全自动细菌分析系统鉴定获得 15 株金黄色葡萄球菌,其中有 14 株 MRSA,除对万古霉素、呋喃妥因、利奈唑胺和替考拉宁保持高敏感度外,对其它常见的抗生素的耐药性均已超过 70%;24 株鲍曼不动杆菌,除对头孢他啶、多黏菌素 B 及米诺环素保持较高的敏感度,对其它常见抗生素的耐药性均已超过 79%;22 株铜绿假单胞菌,除对复方新诺明的耐药率为 100%,对其它抗生素的耐药率均低于 55%。

2.2 PCR 检测及同源性分析结果 根据 Diversi-

Lab 系统的评价标准即分析结果的虚拟凝胶图像的判断标准参照分为 3 种:不可辨别(indistinguishable)的相似性>97%,并且没有条带差异;相似(similar)的相似性>95%,有 1~2 条不同的条带;不同(different)的相似性<95%,>2 条不同的条带<sup>[5]</sup>。本研究将不可辨别的相似性菌株定义为 A 型,将相似的相似性菌株定义为 B 型,将不同的相似性菌株定义为 C 型。

应用该方法将 15 株金黄色葡萄球菌分为 3 型,其中 A 型 13 株, A1 型 8 株, A2 型 5 株; B 型 1 株; C 型 1 株(表 1)。鲍曼不动杆菌 24 株分为 3 型,其中 A 型 20 株, C 型 4 株。铜绿假单胞菌 22 株分为 3 型, A 型 13 株, 其中 A1 型 2 株, A2 型 3 株, A3 型 3 株, A4 型 2 株, A5 型 3 株, B 型 1 株, 其余皆为 C 型。

2.3 各菌株院内分布情况 经过同源性分析,还可以明显看出,老年病科主要感染病原菌为鲍曼不动杆菌,而麻醉科主要为鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌,心脏内科则以铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌为主,其他科室则可见三种病原菌(图 1)。

同时,金黄色葡萄球菌 A1 和 A2 型的标本主要来自神经内科 ICU、消化内科 ICU、神经外科 ICU、心脏内科 ICU,而只有 1 株 B 型来自于呼吸内科 ICU;鲍曼不动杆菌 A 型则遍及各个 ICU, C 型少见;铜绿假单胞菌 A1 型主要见于神经内科, A2, A3 型主要见于呼吸内科, A4, A5 型主要见于神经外科, C 型则可见于多个科室 ICU。可见,不同科室具有各自的区域特点。

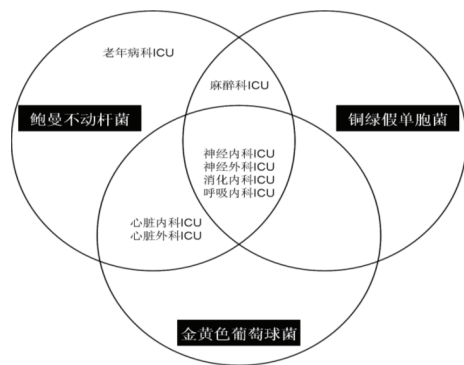


图 1 金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌在不同 ICU 病区的分布

2.4 菌株的耐药性分析 经过耐药性分析,可以明显看出,不同基因型细菌耐药性存在明显差异。如 A1 型金黄色葡萄球菌普遍对红霉素、克林霉素、头孢唑啉、头孢西丁、左旋氧氟沙星、阿米卡星、利福平耐药,而对利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素、呋喃妥因敏感; A2 型金黄色葡萄球菌普遍对红霉

素、克林霉素、头孢唑啉、头孢西丁、左旋氧氟沙星耐药,部分对阿米卡星、利福平中度敏感,而对其它抗生素敏感;B型金黄色葡萄球菌普遍对红霉素、克林霉素、头孢唑啉耐药,对头孢西丁、左旋氧氟沙星、阿米卡星、利福平中度敏感,对利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素、呋喃妥因敏感。C型则只对红霉素耐药,对其它抗生素处于中度敏感或敏感。鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌亦具有这样的特点。其中,A型和B型铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药,而B型和C型铜绿假单胞菌却对亚胺培南均敏感。

同时,我们还可以明显看到,来自不同区域的同型菌株可能存在不同的耐药性。如,在金黄色葡萄球菌中,来自神经外科ICU的A2型金黄色葡萄球菌对阿米卡星和利福平耐药,而来自心脏内科ICU的A2型金黄色葡萄球菌则对其为中度敏感;来自神经科的A型鲍曼不动杆菌对头孢哌酮中度敏感,而来自于其它ICU的均为耐药。

3 讨论 金黄色葡萄球菌尤其是MRSA、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌是ICU最常见的条件致病菌,感染往往与ICU患者的免疫功能低下、多种医院性侵袭性操作、长期应用广谱抗生素有关<sup>[6]</sup>。其耐药机制非常复杂,几乎包括了现在已知的所有耐药机制<sup>[7~9]</sup>。

研究结果显示,不同菌属耐药各有其特点,且同一菌属不同基因型耐药表型不尽相同,金黄色葡萄球菌A1型均对红霉素、克林霉素、头孢唑啉、头孢西丁、左旋氧氟沙星、阿米卡星、利福平耐药;B型均对红霉素、克林霉素、头孢唑啉耐药;C型仅对红霉素耐药。铜绿假单胞菌A1型均对复方新诺明、美洛培南、亚胺培南、环丙沙星耐药;A2型均对复方新诺明、美洛培南、亚胺培南、头孢哌酮耐药;A3型均对复方新诺明、美洛培南、亚胺培南、头孢他啶、哌拉西林耐药;A4型均对复方新诺明、美洛培南、亚胺培南耐药;A5型均对复方新诺明、美洛培南、多黏菌素B耐药;B型均对复方新诺明、阿米卡星耐药。研究结果还显示,来自不同病区的同一菌属同一基因型耐药表型也不尽相同,鲍曼不动杆菌A型来自呼吸内科ICU的菌株对哌拉西林、头孢吡肟、阿米卡星、亚胺培南、美洛培南、复方新诺明、头孢哌酮耐药;来自麻醉内科ICU的菌株对哌拉西林、头孢吡肟、阿米卡星、亚胺培南、美洛培南、环丙沙星、复方新诺明、头孢哌酮耐药;而来自老年病科ICU的菌株对哌拉西林、阿米卡星、亚胺培南、美洛培南、环丙沙星、复方新诺明耐药;铜绿假单胞菌C型来自呼吸内科ICU的菌株对复方新诺明、米诺环素、头孢他啶耐药。这说明,耐药性的产生有基因型的决定性因素的影响,基本决定了对某

种抗生素是耐药还是敏感;也有来自于药物诱导作用的影响,可能是中毒敏感向耐药发展的重要影响因素。不同病区治疗方式和用药偏爱是后者发生的主要原因。

这提示基于Rep-PCR的DiversiLab分析系统的基因分型,可对细菌耐药性具有显著的提示作用;同时,慎用中度敏感的抗生素,对抑制其转变为耐药表型具有重要意义;综合分析细菌基因分型,细菌来源和耐药性,有助于了解院内感染病原菌的流行趋势和感控效果。

致谢:本课题能够顺利完成在此要衷心的感谢西京医院检验科分子生物室常亮老师及微生物室张鹏亮老师等诸位老师的鼎力相助。

#### 参考文献:

- [1] 谭 珊,万朝敏,邓建军,等.金黄色葡萄球菌感染住院患儿鼻部携带菌株的研究[J].中国当代儿科杂志,2015,17(4):299-302.  
Tan S, Wan CM, Deng JJ, et al. Epidemiological study on nasal carriage in hospitalized children infected with *Staphylococcus aureus*[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(4): 299-302.
- [2] Mortensen BL, Skaar EP. Host-microbe interactions that shape the pathogenesis of *Acinetobacter baumannii* infection[J]. Cellular Microbiology, 2012, 14(19): 1336-1344.
- [3] Doleans-Jordheim A, Cournoyer B, Bergeron E, et al. Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(9): 1105-1111.
- [4] Carretto E, Barbarini D, Farina C, et al. Use of the DiversiLab semiautomated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 60(1): 1-7.
- [5] Lau SH, Cheesborough J, Kaufmann ME, et al. Rapid identification of uropathogenic *Escherichia coli* of the O25:H4-ST131 clonal lineage using the DiversiLab repetitive sequence-based PCR system[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(3): 232-237.
- [6] 黄义山,白珊珊,黄佳佳. 2005年~2010年临床常见病原菌的回顾分析[J]. 川北医学院学报, 2013, 28(1): 55-59.  
Huang YS, Bai SS, Huang JJ. Retrospective analysis of clinical common pathogenic bacteria during 2005~2010[J]. Journal of North Sichuan Medical College, 2013, 28(1): 55-59.
- [7] 张国栋,王 莹,朱红胜. 临床分离的美罗培南和环丙沙星共同耐药的铜绿假单胞菌耐药机制的研究[J]. 检验医学, 2014, 29(6): 646-650.

- Zhang GD, Wang Y, Zhu HS. Research on the drug resistance mechanisms of meropenem and ciprofloxacin in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Laboratory Medicine, 2014, 29(6): 646-650.
- [8] 黄晓莉, 刘娇娇, 赵奇, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药机制及研究现状[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(9): 1738-1739.
- Hang XL, Liu JJ, Zhao Q, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant mechanism and re-

search status [J]. Chin J Lab Diagn, 2012, 16(9): 1738-1739.

- [9] Brigante G, Migliavacca R, Bramati S, et al. Emergence and spread of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone producing both the carbapenemase OXA-23 and the 16S rRNA methylase Arma [J]. J Med Microbiol, 2012, 61(Pt5): 653-661.

收稿日期: 2015-03-26

修回日期: 2015-07-20

(上接 23 页)我们前期的研究表明 S100A6 在卵巢上皮性癌组织标本中呈高表达, 且 S100A6 siRNA 转染卵巢癌细胞 A2780 后, 引起了该细胞 G0/G1 期阻滞, 侵袭能力降低<sup>[16]</sup>, 与已有的研究一致。有学者提出 S100A6 能否成为监测肿瘤病情发展和预测预后的分子肿瘤标志物呢? 随即有学者对于这一问题进行了可行性分析, 裸鼠移植瘤模型中, S100A6 的血清浓度与荷瘤量正相关<sup>[4]</sup>。我们的结果提示, S100A6 的血清浓度在卵巢癌患者中显著升高, 并与手术分期和细胞学分级相关, 提示 S100A6 的血清浓度与卵巢癌病情发展相关。但本研究由于时间有限, 病例样本量较小, S100A6 能否成为监测肿瘤病情发展的分子标志物还需要进一步大样本研究验证。

#### 参考文献:

- [1] Zhu L, Kohda F, Nakahara T, et al. Aberrant expression of S100A6 and matrix metalloproteinase 9, but not S100A2, S100A4, and S100A7, is associated with epidermal carcinogenesis[J]. Journal of Dermatological Science, 2013, 72(3): 311-319.
- [2] Guo ZH, Zhang J, Liang Y, et al. Analyzing S100A6 expression in endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration specimens: a promising diagnostic method of pancreatic cancer[J]. Journal of Clinical Gastroenterology, 2013, 47(1): 69-75.
- [3] Wang XH, Zhang LH, Zhong XY, et al. S100A6 overexpression is associated with poor prognosis and is epigenetically up-regulated in gastric cancer[J]. American Journal of Pathology, 2010, 177(2): 586-597.
- [4] Wei BR, Hoover SB, Ross MM, et al. Serum S100A6 concentration predicts peritoneal tumor burden in mice with epithelial ovarian cancer and is associated with advanced stage in patients[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7670.
- [5] 黄海力, 吴本俨, 朱旭东, 等. 胃癌及其转移灶中 S100A6 基因的表达[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(7): 506-510.
- Huang HL, Wu BY, Zhu XD, et al. Expression of S100A6 in primary and metastatic human gastric cancer[J]. Chinese Journal Oncology, 2008, 30(7): 506-510.
- [6] De Petris L, Orre LM, Kanter L, et al. Tumor expres-

sion of S100A6 correlates with survival of patients with stage I non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2009, 63(3): 410-417.

- [7] McKiernan E, McDermott EW, Evoy D, et al. The role of S100 genes in breast cancer progression [J]. Tumour Biology, 2011, 32(3): 441-450.
- [8] Ito T, Yoshida H, Tomoda C, et al. Expression of S100A2 and S100A6 in thyroid carcinomas [J]. Histopathology, 2005, 46(5): 569-575.
- [9] Ishii A, Suzuki M, Satomi K. Increased cytoplasmic S100A6 expression is associated with pulmonary adenocarcinoma progression [J]. Pathology International, 2009, 59(9): 623-630.
- [10] Luo X, Sharff KA, Chen J, et al. S100A6 expression and function in human osteosarcoma [J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2008, 466(9): 2060-2070.
- [11] Vimalachandran D, Greenhalf W, Thompson C, et al. High nuclear S100A6 (Calcylin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients [J]. Cancer Research, 2005, 65(8): 3218-3225.
- [12] Salama I, Malone PS, Mihaimed F, et al. A review of the S100 proteins in cancer [J]. European Journal of Surgical Oncology, 2008, 34(4): 357-364.
- [14] Luu HH, Zhou L, Haydon RC, et al. Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma [J]. Cancer Letters, 2005, 229(1): 135-148.
- [15] Maelandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, et al. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma [J]. Int J Cancer, 1997, 74(4): 464-469.
- [16] 郑福利, 张颖, 赵亚宁, 等. S100A6 siRNA 对卵巢癌细胞生物学行为的影响 [J]. 中国妇幼健康研究, 2014, 25(1): 48-51.
- Zheng FL, Zhang Y, Zhao YN, et al. Influence of S100A6 siRNA on biological features of human ovarian cancer cell [J]. Chinese Journal of Woman and Child Health Research, 2014, 25(1): 48-51.

收稿日期: 2015-07-21

修回日期: 2015-07-28