骨科医院多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性与基因同源性分析*

赵和平，王冀邯，蒋文艳，张　蓓，赵　静，于　燕
（西安交通大学医学院附属红会医院检验科，西安　710054）

摘　要：目的　分析骨科医院多重耐药鲍曼不动杆菌（MDR-AB）的耐药情况及基因分型。**方法**　对2016年1月～7月临床检出的34株MDR-AB进行药敏分析，水煮法提取菌落DNA；以基因外回文重复序列（repetitive extragenic palindromic，REP）为引物进行PCR扩增（REP-PCR），对凝胶电泳条带进行分型分析。**结果**　34株MDR-AB对17种抗生素中的15种药物耐药率在70%以上，对复方新诺明耐药率稍低为62%，对左旋氧氟沙星耐药率最低为15%。REP-PCR将34株MDR-AB分为Ⅰ，Ⅱ和Ⅲ三个基因型，其中Ⅰ型为主要的流行型别。**结论**　骨科医院MDR-AB感染情况严重，且主要由同一种基因型构成，临床应合理使用抗菌药物，定期监测耐药性变迁，避免院内传播。

关键词：多重耐药鲍曼不动杆菌；耐药性；基因外回文重复序列聚合酶链式反应；同源性
中图分类号：R378；Q786　**文献标志码：**A　**文章编号：**1671-7414(2016)05-088-03
doi：10.3969/**j. issn.** 1671-7414.2016.05.023

Drug Resistance and Homology Analysis of Multi-drug Resistant *Acinetobacter Baumannii* in Orthopaedic Hospital

ZHAO He-ping, WANG Ji-han, JIANG Wen-yan, ZHANG Bei, ZHAO Jing, YU Yan
(*Department of Clincal Laboratory, Honghui Hospital, College of Medicine of Xi'an Jiaotong University, Xi'an* 710054, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the drug resistance and homology status of Multi-drug Resistant *Acinetobacter Baumannii* (MDR-AB) in orthopaedic hospital. **Methods**　34 strains MDR-AB were isolated from 2016.1～2016.7 for DNA extraction and were typed by repetitive extragenic palindromie-polyrnerase chain reaction (REP-PCR). **Results**　The resistance rate of MDR-AB were ≥70% to 15 of 17 antimicrobials, except to cotrimoxazole (14%) and levofloxacin (61%), 34 strains of MDR-AB were divided into three types by REP-PCR including type Ⅰ, type Ⅱ and type Ⅲ. **Conclusion**　Drug resistance of MDR-AB was severe and mainly composed of the same genotype (type Ⅰ). Rational use of antimicrobial and regular monitoring of drug resistance is necessary to reduce the nosocomial transmission.

Keywords: MDR-AB; drug resistance; REP-PCR; homology

鲍曼不动杆菌（*acinetobacter baumannii*，AB）为革兰阴性条件致病菌，现已成为医院感染的重要病原菌[1]。近年来，多重耐药鲍曼不动杆菌（multi-drug resistant *acinetobacter baumannii*，MDR-AB）引发的医院感染日益增多，增加了临床抗感染治疗的难度[2]。为了解研究所在骨科医院MDR-AB的耐药情况及同源性，对我院收集的34株MDR-AB进行了基因外回文重复序列（repetitive extragenic palindromic，REP）PCR扩增，结果报道如下：

1　材料与方法

1.1　研究对象　收集本院2016年1月～7月住院患者送检标本分离的MDR-AB 34株，分离培养严格按照《全国临床检验操作规程》（第4版）进行。质控菌株为大肠埃希菌ATCC 25922、铜绿假单胞菌ATCC 27853和金黄色葡萄球菌ATCC 25923。

1.2　试剂与仪器　细菌培养基（温州市康泰生物科技有限公司），PCR试剂（TaKaRa），PCR引物（生工生物工程股份有限公司），TAE（天根），琼脂糖（BIOWEST），核酸染料（BioTeke），DNA Ladder10000（近岸蛋白质科技有限公司），生物安全柜（青岛海尔特种电器有限公司），VITE-K_2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统（梅里埃有限公司）、双蒸水仪器（Thermo）、微量天平（上海菁海仪器有限公司）、数显恒温水浴锅（常州智博瑞仪器制造有限公司）、低温离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）、电泳仪（BIO-RAD）、凝胶成像仪（Ultra-Violet Products, Ltd.）。

1.3　方法

1.3.1　菌株鉴定及药敏分析：采用VITE-K_2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行菌种鉴定及药敏分析，测试抗生素分别为氨苄西

*　基金项目：西安市卫生局科技计划项目（J2014033）。
作者简介：赵和平（1967－），男，本科，副主任技师，从事临床医学检验工作，Tel：029-62818662，E-mail：redcrossjyk@163.com。
通讯作者：于　燕（1974－），女，硕士研究生，副主任技师，从事临床医学检验工作，Tel：029-62818662，E-mail：732867304@qq.com。

林、氨苄西林/舒巴坦、头孢唑啉、头孢呋辛钠、头孢呋辛酯、头孢替坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、氨曲南、亚胺培南、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左旋氧氟沙星、呋喃妥因、复方新诺明。

1.3.2 细菌DNA提取:水煮法提取所分离的菌株DNA,具体步骤为:接种环挑取血平板孵育24 h的纯培养菌落,均匀悬于150 μl双蒸水中,100℃水浴15 min,立即冰浴冷却,15 000 r/min离心10 min,弃沉淀,留取上清液作为DNA模板备用。

1.3.3 REP-PCR实验:REP-PCR反应所用引物序列为:REP正向引物5'-IIIICGICGICATCIGGC-3';REP反向引物5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'[3]。PCR反应体系为:PCR Mix 25 μl(TaKaRa,Clontech),DNA模板2 μl,REP正向引物1 μl,反向引物1 μl,双蒸水21 μl,总反应体系50 μl。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃45 s,40℃1 min,72℃8 min,35个循环;72℃延伸16 min。扩增产物经1 g/dl琼脂糖凝胶电泳70 min。结果判断:PCR条带数目与位置均相同的样本判定为同一基因型。

2 结果

2.1 MDR-AB标本类型及科室分布 经分离的34株MDR-AB的标本来源、科室分布及患者基本信息见表1。

表1 20例患者基本信息、样本类型及科室分布

编号	性别	年龄(岁)	样本类型	科室
1	男	46	分泌物	骨显微修复外科
2	女	51	分泌物	骨显微修复外科
3	男	52	分泌物	骨显微修复外科
4	男	35	分泌物	骨显微修复外科
5	男	58	分泌物	骨显微修复外科
6	女	34	分泌物	骨显微修复外科
7	女	75	分泌物	创伤骨科环骨盆
8	男	29	分泌物	创伤骨科环骨盆
9	男	29	分泌物	创伤骨科环骨盆
10	男	51	分泌物	创伤骨科下肢
11	女	79	分泌物	重症医学科ICU
12	男	23	分泌物	创伤骨科上肢
13	女	48	分泌物	外科
14	男	67	痰	神经内科
15	男	84	痰	神经内科
16	男	68	痰	神经内科
17	女	74	痰	神经内科
18	男	73	痰	心血管内科
19	男	79	痰	呼吸内科
20	女	79	痰	重症医学科ICU
21	男	57	痰	重症医学科ICU
22	男	73	痰	重症医学科ICU
23	男	66	痰	重症医学科ICU
24	女	70	痰	外科
25	男	26	尿	中医骨科
26	男	54	尿	中医骨科
27	女	51	尿	中医骨科
28	男	28	尿	中医骨科
29	男	81	尿	消化内科
30	男	49	尿	呼吸内科
31	男	46	尿	创伤骨科环骨盆
32	女	54	尿	重症医学科ICU
33	男	56	穿刺液	脊柱外科腰椎病区
34	男	15	引流液	创伤骨科上肢

标本来源包括分泌物13例(38.24%)、痰11例(32.35%)、尿8例(23.53%)、穿刺液1例(2.94%),引流液1例(2.94%)。

2.2 34株MDR-AB耐药性分析 临床分离的MDR-AB药敏结果见表2,显示对β-内酰胺类、头孢类、氨基糖苷类抗生素耐药率高,对复方新诺明耐药率较低,对左旋氧氟沙星耐药率最低。

表2 34株多重耐药鲍曼不动杆菌对17种抗菌药物的耐药性分析

抗菌药物	敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
氨苄西林	0	0	34
氨苄西林/舒巴坦	4	4	26
头孢唑啉	0	0	34
头孢呋辛钠	0	0	34
头孢呋辛酯	0	0	34
头孢替坦	0	0	34
头孢他啶	4	2	28
头孢曲松	0	6	28
头孢吡肟	5	4	25
氨曲南	0	0	34
亚胺培南	9	0	25
庆大霉素	4	0	30
妥布霉素	8	0	26
环丙沙星	5	0	29
左旋氧氟沙星	9	20	5
呋喃妥因	0	0	34
复方新诺明	13	0	21

2.3 MDR-AB基因同源性分析 REP-PCR凝胶电泳结果见图1。提示所分离的34株MDR-AB分别属于Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ3个基因型,其中Ⅰ型为主要基因型。

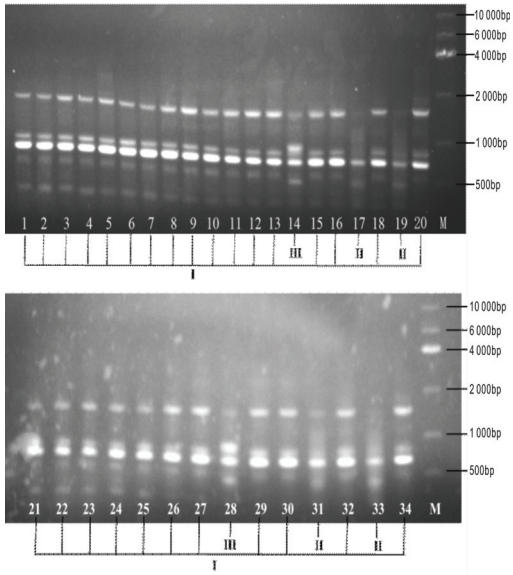

图1 34株MDR-AB REP-PCR凝胶电泳图

3 讨论

多重耐药菌指的是同时对三种及以上不

同类型抗生素耐药的细菌。抗生素的不合理应用及广谱抗菌药的广泛使用助长了多重耐药菌的选择性生存[4]。鲍曼不动杆菌是临床常见的条件致病菌，也是引发院内感染的常见病原菌。碳青霉烯类抗生素以其抗菌谱广、抗菌活性强、对多种β-内酰胺酶高度稳定等特点，是治疗MDR-AB的主要抗菌药物之一，对鲍曼不动杆菌有较好的抗菌活性。近年来，鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类的敏感性也在逐年下降。我们的研究分析了所在骨科医院34株MDR-AB的耐药情况，结果显示在17种抗生素中，MDR-AB对大多数抗生素均有较高耐药率，对头孢类抗生素耐药率高，对亚胺培南耐药率在70%以上，对复方新诺明耐药率稍低，对左旋氧氟沙星耐药率最低。提示研究所在医院MDR-AB存在耐药率高、耐药种类多等特点。国内对泛耐药鲍曼不动杆菌的研究显示，其耐药机制是多基因协同作用的结果，在院内主要以克隆形式播散传播[5]。临床分离的鲍曼不动杆菌合并有Parc变异时，菌株耐药性往往会增强[6]。

34株MDR-AB标本类型及科室分布显示，标本类型所占比例依次为分泌物(38.24%)＞痰(32.35%)＞尿(23.53%)＞穿刺液(2.94%)/引流液(2.94%)。这与国内同类研究中的标本来源统计情况稍有不同，主要体现在国内同类研究以综合性医院为主，标本来源多数为呼吸道/痰样本[4,7]。该研究标本分离自骨科医院，住院病例以骨折、创伤手术等患者为主，伤口/切口分泌物送检细菌标本基数相对较大。标本科室分布以骨科相关科室为主，其次则依次为ICU、神经内科、外科/呼吸内科、心血管内科/消化内科。

分析病原菌的基因分型对监测医院感染的暴发流行、预防和控制耐药菌的传播有重要指导意义[8]。PCR指纹图谱为鲍曼不动杆菌基因分型的常用方法[9]，REP-PCR是检测基因间重复序列的重要技术，通过对REP-PCR产物电泳条带进行分析，能够获得不同样本基因组间的型别差异。运用此技术，我们发现经临床分离的34株MDR-AB属于三个型别，其中大多数样本为Ⅰ型。

综上所述，研究分离的MDR-AB菌株耐药情况严重，Ⅰ型在该院不同科室间存在较广泛，提示医务人员应加强对病房环境的消毒，做好感染源监测及隔离措施，避免MDR-AB在院内的进一步传播。同时，应对MDR-AB进行耐药监测，根据药敏结果合理选用抗菌药，及时通报临床及感控管理人员，对多重耐药菌株采取有效的预防措施，减少多重耐药菌的产生与传播，降低院感发生率。

参考文献：

[1] Gong Y, Shen X, Huang G, et al. Epidemiology and resistance features of *Acinetobacter baumannii* isolates from the ward environment and patients in the burn ICU of a Chinese hospital[J]. J Microbiol, 2016, 54(8): 551-558.

[2] Yang H, Huang L, Barnie PA, et al. Characterization and distribution of drug resistance associated β-lactamase, membrane porin and efflux pump genes in MDR *A. baumannii* isolated from Zhenjiang, China [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 15393-15402.

[3] Sheehan C, Lynch M, Cullen C, et al. Genomic fingerprinting *Acinetobacter baumannii*: amplification of multiple inter-repetitive extragenic palindromic sequences[J]. J Hosp Infect, 1995, 31(1): 33-40.

[4] 余 琳，苏丹虹，江凤茹. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因分析与同源性分析[J]. 实用医学杂志，2013，29(12)：2018-2021.
Yu L, Su DH, Jiang FR. Drug-resistant gene analysis and homology analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter Baumanii*[J]. The Journal of Practical Medicine, 2013, 29(12): 2018-2021.

[5] 赵苏瑛，张轶恺，吴 倩，等. 泛耐药鲍曼不动杆菌耐药基因的检测及其同源性分析[J]. 现代检验医学杂志，2014，29(3)：22-26.
Zhao SY, Zhang YK, Wu Q, et al. Study on drug resistant-related genes and analysis of homology in pandrug-resistant *acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 22-26.

[6] 杨 苗，刘凌华，张利侠，等. 耐氟喹诺酮类鲍曼不动杆菌Parc的变异研究[J]. 现代检验医学杂志，2015，30(6)：25-26，31.
Yang Z, Liu LH, Zhang LX, et al. Study on parc mutant in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *acinetobacter baummanii*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(6): 25-26, 31.

[7] 孙 晴，张正银. 临床分离广泛耐药鲍曼不动杆菌同源性分析及常见耐药基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志，2015，15(1)：28-31.
Sun Q, Zhang ZY. Analysis of the genetic homology and resistant genes in clinical isolates of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Chin J Infect Chemother, 2015, 15(1): 28-31.

[8] 姜 飞，邓丽华，康海泉，等. 3种基因分型方法在鲍曼不动杆菌中的应用评价[J]. 国际检验医学杂志，2015，36(9)：1195-1197.
Jiang F, Deng LH, Kang HQ, et al. Application evaluation of three kinds of genotyping methods in *Acinetobacter baumannii*[J]. Int J Lab Med, 2015, 36(9): 1195-1197.

[9] Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, et al. Molecular epidemiology of Acinetobacter baumannii and Acinetobacter nosocomialis in Germany over a 5-year period (2005-2009)[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(8): 737-742.

收稿日期：2016-08-23
修回日期：2016-09-04