

## 我院 ICU 环境多重耐药鲍曼不动杆菌基因多样性检测

贾宁, 于季红, 谢丽君, 索继江, 邢玉斌, 刘运喜  
解放军总医院 感染管理与疾病控制科, 北京 100853

**摘要:** 目的 了解我院 ICU 环境中多重耐药鲍曼不动杆菌的主要流行菌株型, 为医院感染病原菌的溯源提供数据支持。方法 2010 年 10 月 1 日 - 2011 年 10 月 1 日, 每隔 2 周对外科监护室、神经内科监护室和呼吸科监护室病人周边环境连续采样分离鲍曼不动杆菌, 采用 V-teck 对 15 种抗生素的药物敏感性进行检测, 并采用脉冲场凝胶电泳对环境多重耐药菌分离株进行基因多态性分析; 选取病人多重耐药鲍曼不动杆菌分离株 4 株作为基因型对照。结果 监测期间共收集 7 878 份环境标本, 分离鲍曼不动杆菌 229 株, 其中多重耐药鲍曼不动杆菌分离率为 1.13%(89/7 878), 3 个监护室多重耐药鲍曼不动杆菌污染程度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 89 株环境分离多重耐药鲍曼不动杆菌和 4 株患者鲍曼不动杆菌的基因图谱总体分散, 当相似性系数为 40% 时, 可分为 A、B、C 3 大聚类。89 株环境菌株以 A2 亚类为主 (占 24.7%), 其次为 A1 亚类和 A8 亚类 (各占 15.1%), 时间和空间上未见集中趋势。在同一监护室和不同监护室间同源性 >90% 的病人和环境分离株, 在时间和空间上没有流行病学关联。结论 3 个监护室在 1 年的连续监测期间, 多重耐药鲍曼不动杆菌基因型呈多样性, 未发现耐药菌株的传播, 所收集的多重耐药菌株在抗生素的选择压力下源自于环境菌群。

**关键词:** 鲍曼不动杆菌; 基因型; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R 378 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2015)08-0832-04 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.08.019

网络出版时间: 2015-04-16 11:04

网路出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20150416.1104.001.html>

### Genotype polymorphism of *Acinetobacter baumannii* isolated from ICU environment

JIA Ning, YU Jihong, XIE Lijun, SUO Jijiang, XING Yubin, LIU Yunxi

Department of Nosocomial Infection and Disease Control, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Yunxi. Email: yunxiliu1965@yahoo.com.cn

**Abstract: Objective** To detect the genotypes of *Acinetobacter baumannii* isolated from ICU environments, and provide basis for hospital infection investigation. **Methods** The environmental samples from surgical ICU, neurological ICU and respiratory ICU were collected every two weeks continually from October 2010 to October 2011 and *Acinetobacter baumannii* strains were isolated. The antibiotic susceptibility of 15 kinds antibiotics were detected by V-teck. The genotype polymorphism of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* strains was examined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Four strains from patients were selected as the genotype control. **Results** A total of 7 878 samples were collected. Among 229 *Acinetobacter baumannii* strains, the isolated rate of multi-drug resistant strains was 1.13% (89/7 878). The distribution of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in three ICU had no significant difference ( $P > 0.05$ ). There was no central tendency of the genotypes among the 89 multi-drug resistant isolates, of which three types (class A, B and C) were clustered at the similarity of 40%. The subtype A2 was the main type (24.7%), followed by the subtype A1 and A8, which accounted for 15.1% and 15.1%, respectively. No central tendency was showed in time and space. The patients and the environmental isolates with the similarity of 90% in the same or different ICU showed no epidemiological association. **Conclusion** During the monitoring period, the genotypes polymorphism of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from three ICU environment show no central tendency, which suggests that the isolates come from environmental flora under antibiotic pressure.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*; genotype; pulsed-field gel electrophoresis

鲍曼不动杆菌属于条件致病菌, 易寄生于人体或环境, 生存能力强。自从 1991 年美国首次报

道多重耐药鲍曼不动杆菌院内感染和流行以来, 世界各国先后报道多重耐药鲍曼不动杆菌的流行和播散<sup>[1-2]</sup>。目前有关医院感染鲍曼不动杆菌的研究多集中于病人分离的菌株, 医院环境中的多重耐药鲍曼不动杆菌的基因多样性及与病人分离株的相关性, 相关报道很少。鉴于重症监护病房收治病人病情重、住院时间长、多重耐药菌感染多, 医院环境易受污染。为此, 我们收集了 2010 年 10 月 - 2011 年 10 月分离自我院 3 个重症监护病房环境的多重耐药鲍曼不动杆菌株, 比较菌株间 DNA

收稿日期: 2014-06-20

基金项目: 全军医学科技“十二五”重点项目 (BWS11J048); 国家科技重大专项课题项目 (2009ZX10004-204)

Supported of the Military Special-purpose Program of "Twelfth Five-Year" (BWS11J048); National Science and Technology Major Project (2009ZX10004-204)

作者简介: 贾宁, 女, 博士, 副研究员。研究方向: 医院感染学。Email: jianing@263.net

通信作者: 刘运喜, 男, 博士, 研究员。Email: yunxiliu1965@yahoo.com.cn

指纹图谱, 进而明确我院 ICU 环境中多重耐药鲍曼不动杆菌的主要流行菌株型, 为医院感染病原菌的溯源提供技术支持和数据参考。

### 材料和方法

**1 菌株来源** 2010 年 10 月 1 日 - 2011 年 10 月 1 日, 每隔 2 周对外科监护室 (20 张床)、神经内科监护室 (17 张床) 和呼吸科监护室 (18 张床) 病人周边环境, 包括床扶手、床边桌、监护仪、病人枕头以及护士袖口和 ICU 病房空气等部位, 按《医疗机构消毒技术规范》2012 版操作规程进行病原菌采样。

**2 主要仪器与试剂** BioMérieux Vitek Colorimeter 比浊仪、水浴摇床、水浴箱、CHEF-Mapper 脉冲电泳仪 (Bio-Rad, 美国)、Tanon GIS100013 凝胶成像仪, SeaKem Gold 琼脂糖凝胶购自美国 CambrexBioScience Rockland 公司, 限制性内切酶 *ApaI* 购自 Takara 公司。

**3 菌株培养及药物敏感性实验** 菌株培养按临床检验操作规程常规方法进行, 经法国生物梅里埃 Vitek 32 鉴定。分离的鲍曼不动杆菌 -80℃ 保存。药物敏感性实验采用法国生物梅里埃公司 ATB 药敏条, 对所收集的菌株对氨苄西林/舒巴坦、替卡西林、替卡西林/克拉维酸、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、头孢他啶、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、多黏菌素 E、复方新诺明的药物敏感性进行检测, 参照美国实验室标准化委员会 (NCCLS) 判断标准进行判读。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。根据规范对 3 类或 3 类以上抗菌药物同时呈现耐药的鲍曼不动杆菌, 定义为多重耐药菌, 纳入本次研究<sup>[3-4]</sup>。

**4 脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 检测分子分型** 取新鲜菌落, 用比浊仪调整菌液浓度至 3.6 ~ 4.5 (4.0 最佳) 混匀。取 400 μl 细菌悬浊液包埋后, 20 μl 蛋白酶 K (0.5 mg/ml) 裂解, TE 液洗脱, 限制性内切酶 *ApaI* 50 U 37℃ 水浴中孵育酶切至少 4 h, 0.5 × TBE 电泳缓冲液, 电泳条件: 电压 6 V/cm, 夹角 120°, 脉冲时间 5 ~ 30 s, 电泳 20 h。电泳结束后, EB 染色 25 ~ 30 min, 清水脱色 60 ~ 90 min, Tanon GIS100013 凝胶成像系统成像。根据 PFGE 图谱带型判断个体菌株间的相关性, 条带数相同, 且相应条带大小相同时, 为同一克隆株; 有 3 条以下 (包括 3 条) 条带差异的菌株, 为同一克隆株的不同亚种; 菌株出现 4 ~ 6

条带差异, 为可能相关菌株; 有 7 个或更多条带的差异的菌株为不相关菌株。

**5 统计方法** 利用 BioNumerics 软件对菌株电泳结果进行聚类分析。

### 结果

**1 菌株分布** 2010 年 10 月 - 2011 年 10 月我院 3 个监护室病人周边环境共采集标本 7 878 份, 分离鲍曼不动杆菌 229 株, 其中多重耐药鲍曼不动杆菌 89 株, 分离率为 1.13% (89/7 878); 在多重耐药鲍曼不动杆菌分离株中, 呼吸监护室 (RICU) 占 40.5% (36/89), 外科监护室 (SICU) 占 28.1% (25/89), 神经内科监护室 (NICU) 占 31.5% (28/89), 3 个监护室多重耐药鲍曼不动杆菌污染程度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。选取病人多重耐药鲍曼不动杆菌分离株 4 株, 其中呼吸监护室 3 株, 神内监护室 1 株, 作为基因型对照 (表 1)。

**2 多重耐药鲍曼不动杆菌 PFGE 聚类分析** 对 93 株鲍曼不动杆菌进行 PFGE 分型, PFGE 图谱条带为 15 ~ 20 条。同一 ICU 鲍曼不动杆菌 PFGE 图谱型相似但不完全相同。不同 ICU 鲍曼不动杆菌 PFGE 图谱型差异较大 (图 1)。93 株鲍曼不动杆菌产生的基因图谱可分为 A、B、C 3 大聚类。A 聚类分为 A1 ~ A9 九个亚聚类, 在 3 个监护室均有分布, 其中 4 株病人菌株均是 A 类, 3 株呼吸监护室病人菌株分别为 A1、A5、A8 亚聚类, 1 株神经内科监护室病人菌株为 A8 亚聚类。89 株环境菌株以 A2 聚类为主, 占 24.7%; A1 亚类和 A8 亚类均占 15.1%, 其中呼吸监护室环境菌株以 A1 亚类为主, 占 8.6%; A2 亚类占 7.5%、A8 亚类占 4.3%。外科监护室环境菌株以 A2 聚类为主占 7.5%, 为 A1 聚类占 5.4%、A8 聚类占 4.3%; 神经内科监护室环境菌株以 A2 聚类为主占 9.7%, A6 聚类占 5.4%、A8 聚类, A9 聚类占 4.3%。B 聚类主要集中于呼吸监护室环境菌株中, 占 4.3%; C 聚类集中在呼吸监护室环境菌株中占 2.2%。

**3 菌株间同源性分析** 在同一监护室中, 呼吸监护室同源性 90% 以上的菌株有 3 株, 分别是病人痰液分离株 (20110523h8-6, 分离自 2011 年 5 月)、枕头分离株 (20101206h11-1, 分离自 2010 年 12 月) 和护士袖口分离株 (20101115h13-2, 分离自 2010 年 11 月); 神内监护室同源性 90% 以上的菌株 2 株, 分别是病人痰液分离株 (20110926s14-6, 分离自 2011 年 9 月) 和枕头分离株 (20110509s13-1, 分离自 2011 年 5 月)。在不同监护室间, 存在同源性

90% 以上的分离株有 3 组：分离自外科监护室桌面的菌株 (20101206w14-4, 分离时间 2010 年 12 月) 和分离自呼吸监护室枕头的菌株 (20110912h9-1, 分离时间 2011 年 9 月)；分离自外科监护室枕头 (20101206w5-1, 分离时间 2010 年 12 月) 和分离自呼吸监护室枕头 (20101115h12-1, 分离时间 2010 年 11 月) 的菌株；呼吸监护室病人痰分离株 (20101123h11-6, 分离自 2010 年 11 月) 与外科监护室病床枕头的分离株 (20100829w1-1, 分离自 2010 年 8 月) PFGE 图谱型完全一致, 同源性 100%。

表 1 3 个监护室多重鲍曼不动杆菌环境菌株基因多态性分布  
Tab. 1 Genotype distribution of *Acinetobacter baumannii* isolated from three ICU (n, %)

Clone (subclone)	Number	RICU	SICU	NICU
A				
A1	14	8(8.6)	5(5.4)	
A2	23	7(7.5)	7(7.5)	9(9.7)
A3	3	1(1.1)	1(1.1)	1(1.1)
A4	4	1(1.1)	2(2.2)	1(1.1)
A5	5	2(2.2)	1(1.1)	1(1.1)
A6	7	1(1.1)	1(1.1)	5(5.4)
A7	3			3(3.2)
A8	14	4(4.3)	4(4.3)	4(4.3)
A9	12	6(6.5)	2(2.2)	4(4.3)
B	6	4(4.3)	2(2.2)	
C	2	2(2.2)		
Total	89	36(38.7)	25(26.9)	28(30.1)

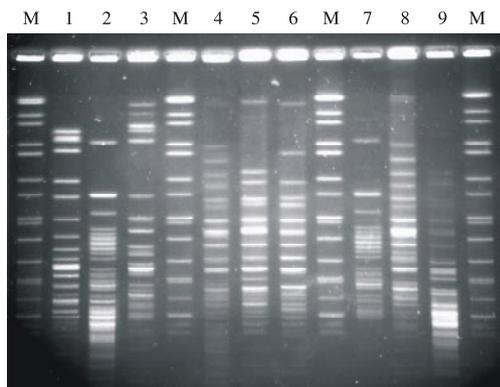


图 1 9 株鲍曼不动杆菌的 PFGE 电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of 9 *Acinetobacter baumannii* isolates  
1: NICU environment 20110912s14-1; 2: RICU human 20101123h11-6; 3: SICU environment 20110912w16-1; 4: RICU environment 20110912h9-5; 5: NICU environment 20110912s12-1; 6: RICU environment 20110912h9-1b; 7: SICU environment 20110829w1-1; 8: RICU environment 20110829h6-4; 9: SICU environment 20111109w15-2

## 讨论

全球对多重耐药鲍曼不动杆菌的研究发现,

欧洲、北美、阿根廷、巴西、中国大陆、中国台湾、中国香港、日本、韩国。甚至偏远的西太平洋大西地岛等, 均存在多重耐药鲍曼不动杆菌克隆株的播散, 不仅限于病房内、科室内、不同科室间, 还可以在个国家, 甚至在不同国家间广泛传播<sup>[5-7]</sup>。但引起大范围流行与传播的多重耐药鲍曼不动杆菌均来源于病人。有关医院环境中的多重耐药鲍曼不动杆菌的基因多样性及与病人分离株的相关性如何, 相关报道很少。

本次调查显示, 在我院 3 个监护室病人周边环境共采集标本 7 878 份中, 其中多重耐药鲍曼不动杆菌分离率为 1.13%(89/7 878); 3 个监护室多重耐药鲍曼不动杆菌污染程度无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。89 株环境和 4 株鲍曼不动杆菌的基因图谱总体分散, 当相似性系数为 40% 时, 可分为 A、B、C 3 大聚类。89 株环境菌株以 A2 亚类为主 (占 24.7%), 其次为 A1 亚类和 A8 亚类 (各占 15.1%), 时间和空间上未见集中趋势, 提示监测期间, 采取的每日两次清洁消毒, 污染后随时清洁消毒的清洁方式下, 各监护室没有形成优势菌株, 造成播散。

在同一监护室中, 呼吸监护室同源性 90% 以上的菌株有 3 株, 护士袖口和枕头分离株分离时间相隔 1 个月, 但与病人感染时间相隔 5 个月, 病人之前未在我院住过院。神内监护室同源性 90% 以上的菌株 2 株, 分离时间相隔 5 个月。在不同监护室间, 存在同源性 90% 以上的分离株有 3 组, 分离自外科监护室桌面的菌株和分离自呼吸监护室枕头的菌株分离时间间隔 9 个月; 分离自外科监护室枕头和分离自呼吸监护室枕头的菌株分离时间间隔 1 个月; 呼吸监护室病人痰分离株与外科监护室病床枕头的分离株分离时间间隔 3 个月。本次调查中虽然在相似性较高的菌株间没有明显的流行病学关联, 但提示病人枕头分离株与病人菌株相关性较高, 说明易被污染, 在日常工作中应注意清洁消毒。

研究显示, 鲍曼不动杆菌主要通过染色体基因突变、外膜孔蛋白改变、药物主动外排系统 (adeABC 基因簇编码的泵出系统<sup>[8]</sup>) 和产生灭活酶 (如  $\beta$ -内酰胺酶、碳青霉烯酶<sup>[9]</sup>、钝化酶<sup>[10]</sup>等) 等共同介导多重耐药性或泛耐药性。最近国外学者通过比较抗菌药物产生前后 75 余年多种致病菌中质粒种类及其基因结构, 发现这些细菌的质粒谱并无明显变化, 只是许多耐药质粒中出现了多种插入序列, 这些可移动的特殊 DNA 序列 (整合

子)是介导耐药基因在质粒之间或质粒与染色体之间转移、集聚和重组的重要工具,它不仅可通过位点特异性重组系统在细菌中传播,而且具有高效捕获耐药基因的功能<sup>[11]</sup>。临床上出现多重耐药的鲍曼不动杆菌与可移动的整合子对耐药基因的积累是分不开的。本次研究中的分离的环境多重耐药菌株耐药性呈现较高水平,但除了5组(8株)环境菌株相关性较高以外,其余81株基因型呈多样性,没有明显的流行优势株,其耐药性的获得可能与质粒或整合子的水平传播有关,因而合理使用抗生素,尽可能减少筛选出携带新型耐药基因的菌株,才能有效防止多重耐药菌在医院内的暴发和环境污染。

#### 参考文献

- 1 Turkoglu M, Mirza E, Tunçcan OG, et al. Acinetobacter baumannii infection in patients with hematologic malignancies in intensive care unit: risk factors and impact on mortality [J]. J Crit Care, 2011, 26 (5): 460-467.
- 2 Choi WS, Kim SH, Jeon EG, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in intensive care units and successful outbreak control program [J]. J Korean Med Sci, 2010, 25 (7): 999-1004.
- 3 李春辉, 吴安华. MDR、XDR、PDR 多重耐药菌暂行标准定义—国际专家建议 [J]. 中国感染控制杂志, 2014, 13 (1): 62-64.
- 4 Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18 (3): 268-281.
- 5 Sieniawski K, Kaczka K, Rucińska M, et al. Acinetobacter baumannii nosocomial infections [J]. Pol Przegl Chir, 2013, 85 (9): 483-490.
- 6 Lemos EV, De La Hoz FP, Einarsen TR, et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with Acinetobacter baumannii infection: systematic review and meta-analysis [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20 (5): 416-423.
- 7 Wang X, Xu X, Li Z, et al. An outbreak of a nosocomial NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST147 at a teaching hospital in mainland China [J]. Microb Drug Resist, 2014, 20 (2): 144-149.
- 8 Bou G, Santillana E, Sheri A, et al. Design, synthesis, and crystal structures of 6-alkylidene-2'-substituted penicillanic acid sulfones as potent inhibitors of Acinetobacter baumannii OXA-24 carbapenemase [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132 (38): 13320-13331.
- 9 Martins N, Dalla-Costa L, Uehara AA, et al. Emergence of Acinetobacter baumannii international clone II in Brazil: reflection of a global expansion [J]. Infect Genet Evol, 2013, 20: 378-380.
- 10 Montefour K, Frieden J, Hurst S, et al. Acinetobacter baumannii: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care [J]. Crit Care Nurse, 2008, 28 (1): 15-25.
- 11 Domingues S, Toleman MA, Nielsen KM, et al. Identical miniature inverted repeat transposable elements flank class 1 integrons in clinical isolates of Acinetobacter spp [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51 (7): 2382-2384.