

多重耐药鲍曼不动杆菌中耐消毒剂基因 $qacE\Delta 1$ 的存在现状及其阳性菌株的同源性分析*

张 静¹, 张之烽² (1. 江苏省南京市江宁区中医医院检验科 211100; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 南京 210008)

【摘要】 目的 探讨分析多重耐药鲍曼不动杆菌中耐消毒剂基因 $qacE\Delta 1$ 的存在现状及其阳性菌株的同源性。**方法** 对 80 株多重耐药鲍曼不动杆菌采用聚合酶链反应和序列分析方法分析其耐消毒剂基因 $qacE\Delta 1$, 然后采用重复序列聚合酶链反应技术分析 $qacE\Delta 1$ 基因阳性菌株的同源性。**结果** 本研究中, 80 株多重耐药鲍曼不动杆菌检测阳性 42 株, 阳性率为 52.5%, 其中 A 型 30 株, B 型 5 株, C 型 3 株, D 型 2 株, E 型 2 株, 可见 A 型为主要流行类型, 所占比例为 71.43%。42 株阳性多重耐药鲍曼不动杆菌中, 心胸外科为 8 株, 约占 19%, 神经外科 7 株, 约占 17%, 中心重症监护病房(ICU) 6 株, 约占 14%。当最小抑菌浓度(MIC)为 300 mg/L 时, 抑制菌株量最多, 当 MIC 为 500 mg/L 时, 抑制菌株中阳性菌株所占比例最高, 为 83.33%。**结论** 多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性增强与耐消毒剂基因 $qacE\Delta 1$ 具有相关性, 且在临床上存在 5 种分型, 主要为 A 型, 心胸外科、神经外科和中心 ICU 应该作为主要感染控制对象。

【关键词】 多重耐药鲍曼不动杆菌; 耐消毒剂基因; 阳性菌株; 同源性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0888-03

Existing status of disinfectant resistant gene $qacE\Delta 1$ in multidrug-resistant *Acinetobacter Bauman* and analysis of positive strain homology* ZHANG Jing¹, ZHANG Zhi-feng² (1. Department of Clinical Laboratory, Jiangning District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 211100, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

【Abstract】 Objective To explore and analyze the existing status of disinfectant resistant gene $qacE\Delta 1$ in multidrug-resistant *Acinetobacter Bauman* and its positive strain homology. **Methods** The disinfectant resistant $qacE\Delta 1$ gene in 80 strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* was analyzed by the polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis method, then the positive strain homology was analyzed by the sequence repeat polymerase chain reaction. **Results** In this study, 42 strains were positive in 80 strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, the positive rate was 52.5%, in which 30 strains were type A, 5 strains were type B, 3 strains were type C, 2 strains were type D and 2 strains were type E. The type A was the main epidemic type and accounted for 71.43%. Among 42 strains of positive multiple drug resistant *Acinetobacter Bauman*, the heart surgery department had 8 strains (19%), neurosurgery department had 7 strains (17%) and central ICU had 6 strains (14%). When MIC was 300 mg/L, the inhibited strains number was maximal and when MIC was 500mg/L, the proportion of positive strains among inhibited strains was highest (83.33%). **Conclusion** The drug resistance enhancement of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* has a correlation with disinfectant resistant gene $qacE\Delta 1$, moreover five subtypes exist in clinic, which is mainly the type A. The cardiothoracic surgery department, neurosurgery department and central ICU should be as the main infection control objects.

【Key words】 multidrug-resistant *Acinetobacter Bauman*; disinfectant resistant gene; positive strain; homology

医院消毒工作在感染控制中具有相当重要的作用, 但是各种消毒剂的广泛使用使得细菌对消毒剂产生抗药现象, 且已成为预防医学中较为紧要的问题。多重耐药鲍曼不动杆菌在自然界中广泛存在, 且属于条件致病菌。有研究表明, 在重大手术围术期或者重症监护病房(ICU) 长期住院的患者中较易引发多重鲍曼不动杆菌感染, 尤其是身体状况较差、抵抗力低下或者存在免疫功能障碍的患者^[1]。而一旦引发感染, 对于患者的临床治疗会带来很大的困难, 因此多重耐药鲍曼不动杆菌是目前感染控制中最为关注的病原菌^[2]。对多重耐药鲍曼不动

杆菌中耐消毒剂基因 $qacE\Delta 1$ 的存在现状和阳性菌株的同源性进行探讨分析, 可以为医院感染控制提供重要的参考依据。本研究采用聚合酶链反应(PCR)进行 $qacE\Delta 1$ 基因检测, 并采用序列分析方法对 $qacE\Delta 1$ 基因进行分析, 重复聚合酶链反应(REP-PCR)分析 $qacE\Delta 1$ 基因阳性菌株的同源性, 现将研究过程和结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取南京大学医学院附属鼓楼医院检验科

* 基金项目: 江苏省南京市卫生局 2010 年医学科技发展基金资助项目(YKK10061)。

作者简介: 张静, 女, 本科, 副主任技师, 主要从事微生物学研究。

2014 年 2~12 月感染患者的临床标本,并从中分离出耐药鲍曼不动杆菌菌株共 80 株,其中神经外科 13 株,神经内科 12 株,心胸外科 15 株,呼吸内科 8 株,中心 ICU 7 株,血液内科 6 株,肿瘤科 5 株,外科 ICU 4 株,老年科 3 株,其他 7 株。临床检验标本均取自痰液、胸腔积液、胆汁、脑脊液、中段尿及其他分泌物等。

1.2 试剂与仪器 (1)蛋白酶 K(北京鼎国生物技术有限公司);(2)PCR 反应试剂(北京天恩泽公司);(3)PCR 扩增仪(成都百乐科技有限公司,型号规格:双梯度 S1000);(4)DNA Marker 仪[大连市宝生物工程有限公司,型号规格:D516C(A×10)];(5)电泳仪(北京六一仪器厂,型号规格:DYY-6C);(6)凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,型号规格:Gel Doc XR+)。

1.3 DNA 提取方法 将从各科室收集的临床标本均通过接种环接种至准备好的无菌 LB 培养基上,然后将其放在有氧环境中孵育,温度为 37℃,时间为 24 h;吸取 200 μL 蛋白酶 K(浓度 200 ng/mL)添加到 Ep 管中,同时小心选取单个菌落放置于 Ep 管中,将二者混合均匀;56℃水浴,消化 2 h 后,改为 95℃水浴 10 min 杀灭活蛋白酶 k;将所得液体离心处理 30 s,速率为 15 000 r/min,采集上清液置入另一个新的 Ep 管中,保存在-20℃的冰箱中备用,注意避免反复冻融。

1.4 引物序列 耐消毒剂基因 qacEΔ1 引物序列:P1 为 5";P2 为 5",大小为 300 bp,阳性条带。REP 引物序列分别是:REP1 为 5";REP2 为 5'-'。

1.5 PCR 反应体系

1.5.1 qacEΔ1 基因引物序列 PCR 程序 P1 和 P2 各 1 μL(其浓度为 10 pmol/μL),dNTPs 浓度为 200 μmol/L,2 μL 扩增缓冲液 10×Taq(包含 20 mmol/L MgCl₂),1 U Taq DNA 聚合酶,然后小心抽取 5 μL 模板液,加水稀释,直至总反应体系为 20 μL。扩增条件为预变性:温度 93℃,时间 3 min;变性:温度 93℃,时间 30 s;退火:温度为 50℃,时间 30 s;延伸:温度 72℃,时间 10 min。严格按照以上预变性、变性、退火、延伸条件和时间进行循环操作(共循环 35 次),最后延伸,温度 72℃,时间 10 min。

1.5.2 REP 引物序列 PCR 程序 REP1 和 REP2 两种引物各小心抽取 10 pmol,浓度为 200 μmol/L,2.5 μL 扩增缓冲液 10×Taq,2.0 UT Taq DNA 聚合酶,然后小心抽取 2 μL 模板液,加水稀释,直至总反应体系为 25 μL。扩增条件为预变性:温度 95℃,时间 180 s;变性:温度 90℃,时间 30 s;退火:温度 45℃,时间 60 s;延伸:温度 65℃,时间 480 s。严格按照以上预变性、变性、退火、延伸条件和时间进行循环操作(共循环 30 次),最后延伸,温度为 65℃,时间为 10 min。

1.6 PCR 产物检测 取 5 μL 上述步骤所得扩增产物,然后将其加至浓度为 15 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳,电压设置为 100 V,电泳时间设置为 30 min。待电泳结束后,使用凝胶成像仪观察结果。若出现与阳性对照分子相当的条带,则判定为阳性,反之则为阴性,照相保存。

1.7 消毒剂敏感性检测 采用最小抑菌浓度(MIC)表示消毒剂敏感性,将不同浓度的抑菌剂溶解于营养肉汤中,接种细菌,观察其是否生长,从而确定抑菌剂抑制受试菌株生长的最小浓度。结果参照 2002 年版《消毒技术规范》中相关规定进行检测判定^[3]。

2 结 果

2.1 qacEΔ1 基因检测结果 通过对所有临床标本 DNA 提取、PCR 反应和电泳实验进行检验,并将观察结果和阳性条带进行对照,结果发现,80 株多重耐药鲍曼不动杆菌中共有 42

株耐消毒剂基因 qacEΔ1 呈现阳性,阳性率为 52.5%,其中部分菌株的 PCR 结果如图 1 所示。

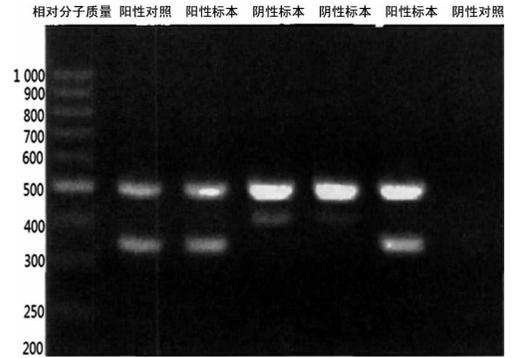


图 1 多重耐药鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因 qacEΔ1 PRC 电泳条带图

2.2 多重耐药鲍曼不动杆菌基因同源性 将登录在 GenBank 中的 qacEΔ1 序列选定为阳性对照,然后选定纯水作为阴性对照,测得多重耐药鲍曼不动杆菌 qacEΔ1 阳性基因序列,分为 A 型、B 型、C 型、D 型和 E 型,各型别所占的比例分别为 20%、33%、20%、13%和 14%,按照科室统计,神经外科 17%,神经内科 10%,心胸外科 19%,呼吸内科 7%,中心 ICU 14%,血液内科 7%,老年科 2%,肿瘤科 10%,外科 ICU 10%,心内科和骨科各 2%。其中 A 型 30 株(神经外科 6 株,心胸外科 4 株,中心 ICU 6 株,肿瘤科 4 株,外科 ICU 各 4 株,血液内科 3 株,心内科、老年科、骨科各 1 株);B 型 5 株(神经外科 1 株,神经内科 3 株,心胸外科 1 株);C 型 3 株(神经内科 1 株,心胸外科 2 株);D 型 2 株(心胸外科 1 株,呼吸内科 1 株);E 型 2 株(均为呼吸内科)。42 株 qacEΔ1 基因为阳性的多重耐药鲍曼不动杆菌的基因型图谱如图 2 所示。

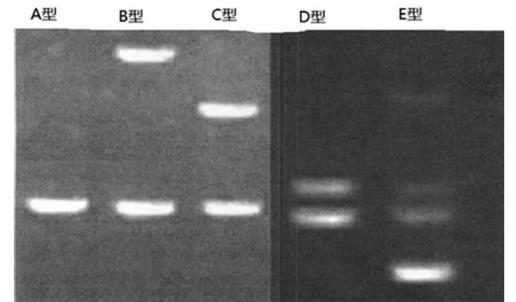


图 2 多重耐药鲍曼不动杆菌 qacEΔ1 阳性基因型图谱

2.3 MIC 检测结果 由 80 株多重耐药鲍曼不动杆菌中 MIC 检测结果可知,当 MIC 为 300 mg/L 时,抑制菌株量最多,当 MIC 为 500 mg/L 时,抑制菌株中阳性菌株所占比例最高,为 83.33%。见表 1。

表 1 80 株多重耐药鲍曼不动杆菌 MIC 检测结果

MIC (mg/L)	菌株数量 (n)	阳性菌株 [n(%)]	阴性菌株 [n(%)]
250	10	4(40.00)	6(60.00)
300	32	16(50.00)	16(50.00)
400	26	11(42.31)	15(57.69)
500	12	10(83.33)	2(16.67)

3 讨 论

鲍曼不动杆菌属于一种不发酵糖类、氧化酶阴性、不能运动的格兰阴性球杆菌,极易在气管插管、免疫低下性疾病、膀胱或者血管内插管、长期使用广谱抗菌或者皮质类固醇类药物、

长期机械通气等各类患者中引发感染^[4-7],可以通过基因突变或者获得外源性基因元件(如质粒、整合子、转座子、耐药基因岛等)多种耐药机制成为多重耐药性菌株。由于其耐干燥能力比较强,因此能够在医院环境中长期存活,难以被清除。再加上生物膜的形成对多重耐药鲍曼不动杆菌在耐药性及环境中持续存活中起到了至关重要的作用。近年来,多重耐药鲍曼不动杆菌在临床中的检出率不断增加,其耐药能力也日渐增强,逐渐成为医院感染控制工作中最主要的目的病原菌。有研究表明,耐消毒剂菌落中耐消毒剂基因控制的耐药性是导致医院感染的重要因素,而多重鲍曼不动杆菌中耐消毒剂基因 *qacE Δ 1* 携带率相对来说较高^[8]。本研究还得出结论,*qacE Δ 1* 基因和多数消毒剂的菌落抗药性存在密切关系,尤其是由季铵类、双胍类化合物制成的消毒剂。所以对多重耐药性鲍曼不动杆菌中耐消毒剂因 *qacE Δ 1* 进行监测并对其阳性菌株的同源性分析是可以作为医院感染控制工作的重要参考。

研究表明,和消毒剂耐药相关的基因主要是 *qac* 基因家族,包括 A、B、C、D、E、F、G、H、J 型,以及 *qacE Δ 1*,与季铵类和双胍类化合物的耐药性存在紧密的关系,其中 *qacE Δ 1* 基因广泛分布于革兰阴性菌中^[9-10]。季铵类化合物主要包括苯扎溴铵(新洁尔灭)和醋酸氯己定等^[11],*qacE Δ 1* 表达的外排蛋白可以降低对细菌的消毒作用。该基因处于 I 类整合因子 3' 的末端,并且与 *sull* 基因重叠。而 I 类整合子可以变区,可以被革兰阴性菌获取,还可以携带多种药物抗药性基因,如链霉素、氯霉素、磺胺类药物等,或者耐 β -内酰胺酶基因^[12-13]。该整合子是及转座子后新发现的移动性基因元件,I 类整合子相较于转座子更容易在医院常见感染细菌中发生转移,进而导致细菌在基因水平上的耐消毒剂特性快速传播。由此可知,I 类整合子与鲍曼不动杆菌的多重耐药性存在密切关系。本研究结果中,80 株多重耐药鲍曼不动杆菌中有 42 株 *qacE Δ 1* 基因为阳性,阳性率为 52.50%,且由 80 株多重耐药鲍曼不动杆菌中 MIC 检测结果可知,当 MIC 为 300 mg/L 时,抑制菌株量最多,当 MIC 为 500 mg/L 时,抑制菌株中阳性菌株所占比例最高,为 83.33%,表明 *qacE Δ 1* 基因与耐药性存在一定的相关性,并间接于耐抗菌药物基因存在一定的联系。不论过度使用抗菌药物还是消毒剂,均有可能导致耐药鲍曼不动杆菌获得 I 类整合子,造成抗菌药物和消毒剂交叉耐药作用。目前本院多重耐药鲍曼不动杆菌阳性率为 52.50%,而据韦剑洪等^[14]报道阳性率为 57.60%,何晓锋等^[15]报道阳性率为 72.65%,均较其降低,但是仍应该引起重视。

本研究中,42 株阳性菌株分别为其中 A 型 30 株,B 型 5 株,C 型 3 株,D 型 2 株,E 型 2 株。其中 A 型最多,所占比例为 71.43%,提示 A 型菌株为主要流行类型,其他类型均为散发株。此外,同一科室的菌株很有可能存在多种基因型,推测此类病区很可能存在院内感染状况,或者是不同患者之间产生交叉感染。此外,呼吸机的携带和转移、超级传播者鼻咽部或呼吸道 PDRAB 对周边医疗环境的污染等均可导致耐药鲍曼不动杆菌的流行。另外,42 株阳性多重耐药鲍曼不动杆菌中,心胸外科为 8 株,约占 19%,神经外科 7 株,约占 17%,中心 ICU 6 株,约占 14%,而老年科、心内科和骨科各均由 1 株阳性菌株,表明消毒标准越高,不动杆菌阳性感染率越低,提示需要严格按照消毒标准进行各项医疗活动实施,以减少阳性感染率,做好医院感染控制工作。

综上所述,多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性增强与耐消毒剂因 *qacE Δ 1* 具有相关性,其中 A 型为主要流行类型,而心胸

外科、神经外科和中心 ICU 应该作为主要感染控制对象。本研究仅对部分多重耐药鲍曼不动杆菌进行检测分析,有必要对其进行逐年动态监测分析,以指导临床感染控制工作。

参考文献

- [1] 胡永强,贾蓓,李崇智,等. 医院感染鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因及同源性分析[J]. 中国抗生素杂志,2012,37(5): 348-351.
- [2] 姜梅杰,冯莉,张福森. 多重耐药鲍曼不动杆菌中氨基糖苷类修饰酶基因及 *qacE Δ 1* 基因的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(11):3062-3064.
- [3] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2002,94-95.
- [4] 田红彪,王玉霄,王燕. ICU 泛耐药鲍曼不动杆菌的耐药性分析及防治策略[J]. 检验医学与临床,2011,8(19): 2396-2397.
- [5] Grandesso S, Sapino B, Amici G, et al. Are E-test and Vitek2 good choices for tigecycline susceptibility testing when comparing broth microdilution for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* [J]. New Microbiol, 2014, 37(4):503-508.
- [6] 金成梅,罗沛佑,方琪,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌感染相关影响因素分析[J]. 检验医学与临床,2014,11(14): 1958-1959.
- [7] 林健谦,伍晓锋,邓思健,等. 鲍曼不动杆菌携带 I 型整合子与耐消毒剂基因研究[J]. 国际呼吸杂志,2013,33(14):1051-1055.
- [8] 程华莉,潘宇红,黄璇,等. 鲍曼不动杆菌烧伤分离株广谱抗生素及消毒剂耐药基因研究[J]. 中国抗生素杂志,2011,36(6):460-464.
- [9] Kwon SO, Gho YS, Lee JC, et al. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate [J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 297(2):150-156.
- [10] 朱健铭,姜如金,吴康乐,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌外排泵基因检测及其对消毒剂敏感性研究[J]. 中国消毒学杂志,2012,29(3):176-179.
- [11] 钟海波,伍晓锋,林健谦,等. 广州三所医院鲍曼不动杆菌携带耐消毒剂基因及耐药基因的调查[J]. 中国医药,2014,9(4):575-579.
- [12] Chu YW, Cheung TK, Chu MY, et al. OXA-23-type imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in Hong Kong [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(3):285-286.
- [13] 陈炎添,熊燕,苏雪棠,等. 呼吸重症监护病房多重耐药鲍曼不动杆菌耐药基因检测及耐药性分析[J]. 临床荟萃,2012,27(19):1684-1686.
- [14] 韦剑洪,方小武,陈伟辉,等. 鲍曼不动杆菌耐消毒剂-磺胺类耐药表型及耐药基因的检测[J]. 蚌埠医学院学报,2013,38(3):345-346.
- [15] 何晓锋,刘芳,曹晋桂,等. 多重耐药革兰阴性杆菌耐消毒剂基因 *qacE Δ 1-sul1* 监测[J]. 中国感染控制杂志,2011,10(2):97-99.