

87 株多重耐药鲍曼不动杆菌多位点序列分型

林吴兵¹ 叶英^{1,2} 李家斌^{1,2}

摘要 目的 了解安徽地区近年来临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性、菌群结构和流行菌株,分析其基因同源性及其亲缘进化关系,为临床抗菌药物应用提供一定的实验室依据。方法 收集安徽地区临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌 87 株,采用琼脂稀释法测定其对 11 种临床常见抗菌药物的最小抑菌浓度。通过多位点序列分型方法,反映菌株间进化关系,利用 BioNumerics 软件构建聚类图,从而进行基因分型。结果 87 株鲍曼不动杆菌对亚胺培南、美罗培南的耐药率分别为 74.7%、66.7%,对其他常用抗菌药物耐药率都很高。其分为 42 个 ST 型,其中 6 个型别是数据库里原来有的,36 个型别为新的型别(暂时命名为 STnew01 ~ STnew36)。ST2 包含 37 株菌,是优势型别,其属于克隆复合体 CCl。结论 多重耐药鲍曼不动杆菌对 11 种常见临床抗菌

药物均呈现出较高的耐药率,ST2 为安徽地区多重耐药鲍曼不动杆菌主要的流行克隆,安徽地区主要的流行株 ST2 与世界上主要的流行克隆具有高度的同源性。

关键词 多重耐药鲍曼不动杆菌; MIC; 多位点序列分型 (MLST); 管家基因; PCR

中图分类号 R 378; R 446

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1480-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.014

鲍曼不动杆菌是引起院内感染的重要机会致病菌,属于革兰阴性非发酵菌,可引起败血症、心内膜炎、脑膜炎、肺炎、创口感染和尿路感染等在内的多种院内感染^[1]。有研究^[2]指出,鲍曼不动杆菌的临床分离率位于非发酵菌分离率第一位。多重耐药鲍曼不动杆菌是指对碳青霉烯类、头孢菌素类、β-内酰胺类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类 3 种及以上抗生素同时表现出耐药^[3]。随着临床广谱抗生素和免疫抑制剂的应用,多重耐药鲍曼不动杆菌越来越多,给临床预防感染及治疗带来巨大挑战^[4]。为了准确

2017-05-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81373072)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院感染病科,合肥 230022

²安徽省细菌耐药监测中心,合肥 230022

作者简介: 林吴兵,男,硕士研究生;

叶英,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: yeying2@139.com

SOCS3 regulates mucus hypersecretion via JAK/STAT signal pathway

Chen Lingxia¹, Zhou Xiangdong^{1,2}

(¹Dept of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010;

²Dept of Respiratory Medicine, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102)

Abstract Objective To investigate the SOCS3 regulates mucus hypersecretion via JAK/STAT signal pathway in inflammatory cells. **Methods** Culture 16HBE cells and divide into three groups: control group, inter leukin (IL)-6-exposed group; IL-6-exposed and microRNA-203-transferred group. The protein levels of JAK1/2, SOCS3 and MUC5AC were measured by Western blot. The mRNA expressions of SOCS3, STAT3 and MUC5AC were detected by Real-time PCR. The protein levels of p-JAK1/2, SOCS3 and MUC5AC were analyzed by ELISA. **Results** Compared with the control group, the mRNA expressions of SOCS3, STAT3, MUC5AC and the protein levels of p-JAK1/2, SOCS3, MUC5AC were both significantly increased in IL-6-exposed group ($P < 0.05$); in the IL-6-exposed and miR-203-transferred group, the protein levels of p-JAK1/2, MUC5AC and the mRNA expressions of STAT3 were both significantly increased ($P < 0.05$), but the mRNA expressions of SOCS3 was almost as much as that in IL-6-exposed group, the protein levels of SOCS3 was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** SOCS3 over-express when cells are stimulated by IL-6, and negative-feedback regulates MUC5AC secretion via JAK/STAT signal pathway.

Key words SOCS3; miR-203; JAK/STAT signal pathway; MUC5AC

把握多重耐药鲍曼不动杆菌的分子流行病学规律和耐药特点,该研究对安徽地区 2015 年临床分离的 87 株菌进行耐药性分析和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST),明确其耐药性、等位基因型、序列型以及亲缘进化关系,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 2015 年本实验室从安徽地区 45 家医院收集 87 株多重耐药鲍曼不动杆菌,分离于痰液、血液、气管分泌物、尿液、脑脊液等标本。实验菌株均采用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 全自动微生物分析仪进行鉴定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.2 细菌体外药敏试验 参照 2014 年美国临床实验室标准委员会(CLSI)指南,采用琼脂稀释法测定 87 株多重耐药鲍曼不动杆菌对临床常见 11 种抗菌药物的最小抑菌浓度。

1.3 PCR 扩增与 DNA 测序

1.3.1 DNA 提取 将细菌接种于平板培养 24 h 后,挑取 1 个接种环 1 μ l 的细菌,混悬于 200 μ l 无菌水中;置于 96 $^{\circ}$ C 加热 10 min;13 000 r/min 离心 5 min;吸取离心后的上清液置于新的离心管中,即为 DNA,即为 PCR 的模板。

1.3.2 引物合成 引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成,其序列见表 1。

表 1 MLST 7 个管家基因的引物

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
cpn60	F: ACTGTACTTGTCTCAAGC	405
	R: TTCACCGATGATAAGAAGTGG	
fusA	F: ATCGGTATTCTGCKCACATYGAT	633
	R: CCAACATAKYTGWACACCTTTTTT	
gltA	F: AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	483
	R: GCAGAGATACCAGCAGAGATACACC	
pyrG	F: GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG	297
	R: ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA	
recA	F: CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	372
	R: GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
rplB	F: GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC	330
	R: CACCACCACCRTYGGGTGATC	
rpoB	F: GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA	456
	R: GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC	

1.3.3 PCR 扩增 总反应体系为 50 μ l,其中含 34 μ l 去离子水、5 μ l 的 10 \times PCR 缓冲液、3 μ l 的 MgCl₂(25 mmol/L)、4 μ l 的 dNTP(1.25 mmol/L)、1 μ l 上游引物(10 μ mol/L)、1 μ l 下游引物(10 μ mol/L)

、0.17 μ l 的 Taq 酶(5 U/ μ l)。向以上预混液中加 2 μ l DNA 模板(10 ng/ μ l)。PCR 扩增后,用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。PCR 扩增反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,50 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,72 $^{\circ}$ C 终止延伸 2 min,PCR 扩增共 35 个循环。PCR 产物凝胶电泳成像显示为单一条带时送上海生工生物工程技术有限公司进行纯化和测序。

1.4 MLST 对正反向测序所得的 DNA 序列进行拼接,相关测序文件上传到巴斯德研究所鲍曼不动杆菌数据库网站(<http://www.pasteur.fr/mlst/>),进行 BLAST 比对,确定与命名各序列的等位基因型、各菌株的序列型。利用 eBURST 软件对各 ST 型菌株进行亲缘关系分析并确定其克隆群,每个克隆群含有 3 个及以上 ST 型,且每个 ST 型与另一个 ST 型之间至少有 6 个管家基因的等位基因型相同。使用 BioNumerics 软件绘制 MLST 聚类图。

2 结果

2.1 细菌体外药敏实验结果 87 株多重耐药鲍曼不动杆菌美罗培南、亚胺培南的耐药率分别为 66.7%、74.7%。68 株菌对庆大霉素耐药,62 株对哌拉西林/他唑巴坦耐药,47 株对左氧氟沙星耐药,60 株对头孢曲松耐药,对其他抗菌药物均显示出较高的耐药率,具体耐药情况见表 2。

表 2 87 株多重耐药鲍曼不动杆菌药敏结果[n(%)]

药品	耐药	中介	敏感
头孢他啶	87(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢吡肟	87(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
头孢噻肟	55(63.2)	17(19.6)	15(17.2)
美罗培南	58(66.7)	3(3.4)	26(29.9)
庆大霉素	68(78.2)	2(2.3)	17(19.5)
阿米卡星	43(49.4)	7(8.0)	37(42.6)
环丙沙星	71(81.6)	2(1.4)	14(17.0)
左氧氟沙星	47(54.0)	15(17.2)	25(28.8)
哌拉西林/他唑巴坦	62(71.3)	10(11.5)	15(17.2)
头孢曲松	60(69.0)	15(17.2)	12(13.8)
亚胺培南	65(74.7)	2(2.3)	17(19.5)

2.2 MLST 分型结果 本实验中 87 株鲍曼不动杆菌分为 42 个 ST 型,其中 6 个型别是数据库里原有的,36 个型别为新的型别(暂时命名为 STnew01~STnew36)。ST2 包含 37 株菌,是优势型别;其余 41 个型别分别包含 1~4 株菌。其中 35 个型别只包含 1 株菌,即有 35 株菌具有独特的 ST 型。有 3 株 ST570、4 株 STnew05、2 株 STnew01、2 株 ST-

new10、2 株 STnew18 的菌株都分别来源于同一个患者不同种类的标本。向巴斯德研究所 MLST 数据库提交各菌株 7 个管家基因测序所得序列,查询各序列对应的等位基因编码,从而得到每个菌株的序列型(表 3) 数据库中没有的菌株编号暂时命名为 ST-new 相关测序数据已提交鲍曼不动杆菌数据库等待确认和命名。应用 eBURST 软件分析巴斯德研究所网站上所有鲍曼不动杆菌等位基因谱,确定本实验中 ST2 型鲍曼不动杆菌属于克隆复合体 CC1。ST 型为 STnew05、STnew01、STnew29、STnew06、STnew04、STnew28、STnew21、ST724、ST570 与 ST2 型鲍曼不动杆菌只具有 1 个等位基因上的差别,因此也都属于克隆群 CC1。而本实验中出现的 1 株 ST105 型的鲍曼不动杆菌属于 CC4,ST63 属于 CC6,ST235 则属于独立的 ST 型。将等位基因谱导入 BioNumerics 软件,对 87 株能比对出 ST 型的菌株构建聚类树图(图 1)。

3 讨论

随着抗菌药物广泛应用,多重耐药鲍曼不动杆菌越来越多,并出现多药耐药甚至泛耐药鲍曼不动杆菌在世界范围内的广泛流行,有研究^[5]表明其在 ICU 和血液病房常出现暴发流行,病死率高。鲍曼不动杆菌耐药机制较为复杂,主要有 β-内酰胺酶水解结合机制、外排泵活性增加、外膜蛋白通透性降低、青霉素结合蛋白的改变等,其中产 β-内酰胺酶是鲍曼不动杆菌最常见的耐药机制^[6]。

本研究中 2015 年安徽地区临床分离出来的多重耐药鲍曼不动杆菌耐药情况比较严峻,对大部分抗菌药物的耐药率高达 60.0% 以上,对美罗培南、亚胺培南的耐药率分别为 66.7%、74.7%,对头孢他啶、头孢吡肟耐药率几乎为 100.0%,给临床治疗带来极大困难。亚胺培南和美罗培南既往作为鲍曼不动杆菌感染治疗的最主要的碳青霉烯类药物,此次实验中显示其对鲍曼不动杆菌有较高的耐药率,可能因为安徽地区各医院多经验性选用既往相对敏感的美罗培南和亚胺培南治疗多重耐药鲍曼不动杆菌,从而使耐药菌株压力性增高,产生对美罗培南和亚胺培南的高耐药现象。庆大霉素、阿米卡星为治疗鲍曼不动杆菌的氨基糖苷类药物,其主要的耐药机制是产生氨基糖苷类修饰酶和 16SrRNA 甲基化酶的甲基化^[7],本实验中庆大霉素的耐药率为 78.2%,阿米卡星耐药率为 49.4%,表明本地区阿米卡星对多重耐药鲍曼不动杆菌的治疗效果比较良

好,但是由于其较多的副作用已很少在临床治疗中单独应用。本实验显示喹诺酮类药物如环丙沙星、左氧氟沙星对多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药率分别为 81.6%、54.0%,有研究^[8]称鲍曼不动杆菌对喹

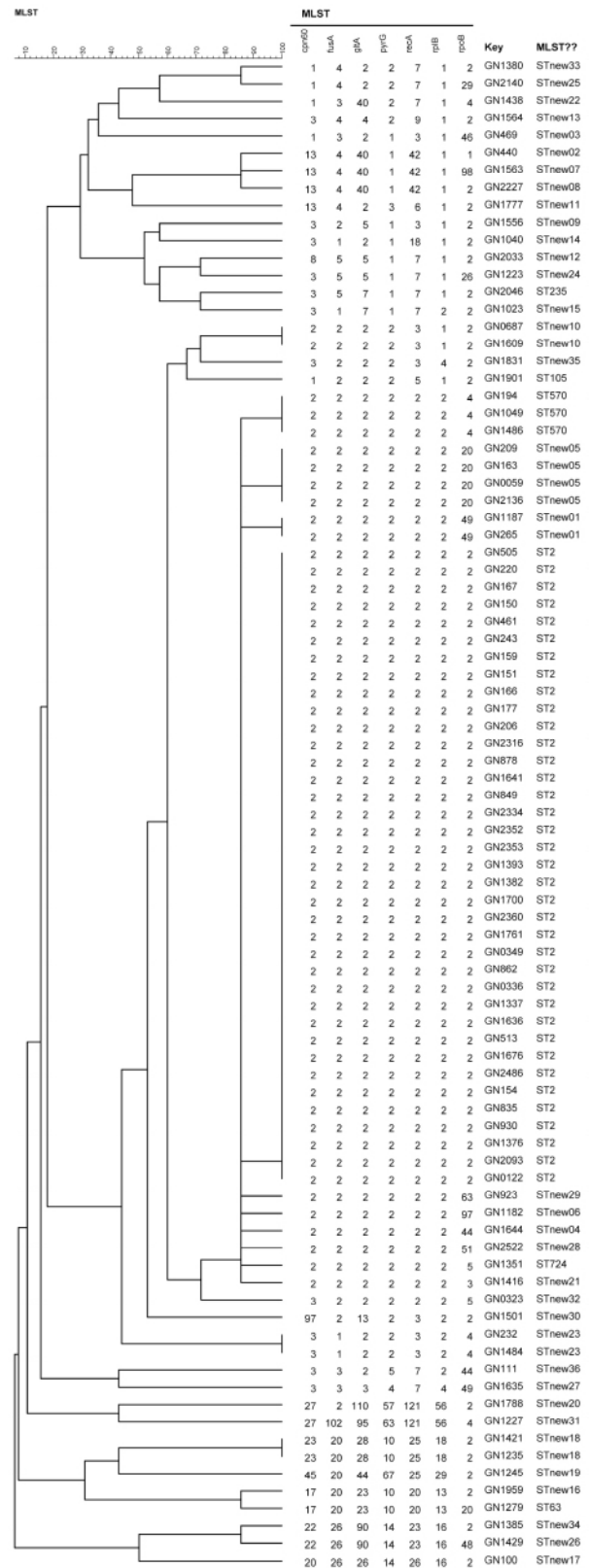


图 1 87 株鲍曼不动杆菌 MLST 聚类图

表3 87株菌株等位基因编码和序列型

菌株数	cpn60	fusA	gltA	pyrG	recA	rplB	rpoB	MLST 型别
37	2	2	2	2	2	2	2	ST2
3	2	2	2	2	2	2	4	ST570
1	3	5	7	1	7	1	2	ST235
1	1	2	2	2	5	1	2	ST105
1	2	2	2	2	2	2	5	ST724
1	17	20	23	10	20	13	20	ST63
2	2	2	2	2	2	2	49	STnew01
1	13	4	40	1	42	1	1	STnew02
1	1	3	2	1	3	1	46	STnew03
1	2	2	2	2	2	2	44	STnew04
4	2	2	2	2	2	2	20	STnew05
1	2	2	2	2	2	2	97	STnew06
1	13	4	40	1	42	1	98	STnew07
1	13	4	40	1	42	1	2	STnew08
1	3	2	5	1	3	1	2	STnew09
2	2	2	2	2	3	1	2	STnew10
1	13	4	2	3	6	1	2	STnew11
1	8	5	5	1	7	1	2	STnew12
1	3	4	4	2	9	1	2	STnew13
1	3	1	2	1	18	1	2	STnew14
1	3	1	7	1	7	2	2	STnew15
1	17	20	23	10	20	13	2	STnew16
1	20	26	26	14	26	16	2	STnew17
2	23	20	28	10	25	18	2	STnew18
1	45	20	44	67	25	29	2	STnew19
1	27	2	110	57	121	56	2	STnew20
1	2	2	2	2	2	2	3	STnew21
1	1	3	40	2	7	1	4	STnew22
2	3	1	2	2	3	2	4	STnew23
1	3	5	5	1	7	1	26	STnew24
1	1	4	2	2	7	1	29	STnew25
1	22	26	90	14	23	16	48	STnew26
1	3	3	3	4	7	4	49	STnew27
1	2	2	2	2	2	2	51	STnew28
1	2	2	2	2	2	2	63	STnew29
1	97	2	13	2	3	2	2	STnew30
1	97	2	13	2	3	2	2	STnew31
1	3	2	2	2	2	2	5	STnew32
1	1	4	2	2	7	1	2	STnew33
1	22	26	90	14	23	16	2	STnew34
1	3	2	2	2	3	4	2	STnew35
1	3	3	2	5	7	2	44	STnew36

诺酮类药物的耐药是因为编码旋转酶和拓扑异构酶 IV 的 GyrA 和 PraC 基因发生突变, GyrA 基因发生突变仅表现出中度耐药, GyrA 和 PraC 基因同时突变与高水平耐药密切相关。

本实验通过 MLST 方法对安徽地区 87 株多重耐药鲍曼不动杆菌进行同源性研究, 通过 BioNumerics 软件构建最小生成树图和聚类图有效直观的展示了其菌群结构和进化关系。MLST 是基于管家基

因核苷酸水平的分子分型技术, 分辨率高^[9]。通常选取 1 组管家基因(一般为 7 个)为研究对象, 测定部分片段的 DNA 序列, 获得每一个序列的等位基因编号, 每个菌株 7 个管家基因的等位基因编号组合构成该菌株的序列型和其他分型方法比较其对菌株同源性分析结果更加可靠且具有很好的重复性, MLST 数据库具有规范性和通用性故适用于大范围不同国家和地区的分子流行病学研究^[10]。

本实验中有 37 株菌为 ST2 型, 占总菌株数 42.5%, 为安徽地区不同医院之间的流行克隆株, 有报道^[11-12]称 ST2 型多重耐药鲍曼不动杆菌在意大利、希腊频繁暴发院内感染事件, 为欧洲地区主要流行株, 在亚洲中东地区及北非地区也有报道^[13], 更主要的是 ST2 也是世界上分布最广的鲍曼不动杆菌 ST 型^[14]。说明安徽地区主要的流行株 ST2 与世界上主要流行克隆具有高度同源性, ST2 型多重耐药鲍曼不动杆菌呈世界范围内流行。其中 36 株菌具有新的 ST 型, 可能与等位基因位点突变有关。ST 型为 STnew05、STnew01、STnew29、STnew06、STnew04、STnew28、STnew21、ST724、ST570 与优势型别 ST2 只具有一个等位基因上的差别, 共同属于克隆复合体 CC1, 其祖先 ST 型均为 ST2, 表明 rpoB 基因可能存在基因重组或者突变, 是分辨率最高的基因, 这有待进一步研究。此外克隆复合体 CC1 是本实验中发现的最大的克隆群, 包含了主导序列型 ST2 在内的 52 株多重耐药鲍曼不动杆菌, 占 59.8%。此次研究显示的数据库暂时未收录的 ST 型菌株其中 4 株 STnew05、2 株 STnew01、2 株 STnew10、2 株 STnew18 的菌株都分别来源于同一个患者不同种类的标本, 说明本实验中同一个患者不同种类的标本被感染的多重耐药鲍曼不动杆菌 ST 型相同。

本研究结果表明安徽地区多重耐药鲍曼不动杆菌对临床常用抗生素均呈现出较高的耐药率。ST2 型多重耐药鲍曼不动杆菌正在流行, 且极易引起院内暴发感染和跨地区传播, 采取积极有效的预防和治疗措施刻不容缓。对多重耐药鲍曼不动杆菌进行分子流行病学研究, 有利于为临床治疗多重耐药鲍曼不动杆菌感染提供理论依据, 临床工作者应定期监测菌株分布与流向, 合理应用抗生素做好预防感染相关措施, 减少多重耐药鲍曼不动杆菌暴发流行事件的发生。

参考文献

- [1] Peleg A Y, Seifert H, Paterson D L. *Acinetobacter baumannii*: e-

- mergence of a successful pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev* 2013, 21(3): 538–82.
- [2] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2014年CHINET中国细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志* 2015 22(5): 401–10.
- [3] 白国强, 李昂, 段美丽, 等. 鲍曼不动杆菌的耐药机制及抗生素治疗研究进展 [J]. *山东医药* 2014 54(4): 87–90.
- [4] Durante-Mangon E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance [J]. *Future Microbiol* 2011 6(4): 407–22.
- [5] Torres H A, Vázquez E G, Yague G, et al. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights [J]. *Rev Esp Quimioter* 2013 23(1): 12–9.
- [6] Opazo A, Domínguez M, Bello H, et al. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2012, 6(4): 311–6.
- [7] Aliakbarzade K, Farajnia S, Karimi Nik A, et al. Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates [J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2014, 7(10): e11924.
- [8] Liu Y H, Kuo S C, Lee Y T, et al. Amino acid substitutions of quinolone resistance determining regions in GyrA and ParC associated with quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2012, 45(2): 108–12.
- [9] 陈振华, 刘文恩, 高骞, 等. 鲍氏不动杆菌碳青霉烯酶检测及流行病学分析 [J]. *中华医院感染学杂志* 2011 21(6): 1078–81.
- [10] 符一骥. 中国部分地区鲍曼不动杆菌多位点序列分型及碳青霉烯类抗生素耐药机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [11] Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, et al. Spread of acarbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals [J]. *J Hosp Infect*, 2014 86(4): 260–6.
- [12] Villar M, Cano M E, Gato E, et al. Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: areappraisal [J]. *Medicine(Baltimore)* 2014 93(5): 202–10.
- [13] Bakour S, Touati A, Bachiri T, et al. First report of 16S rRNA methylase Arm A-producing *Acinetobacter baumannii* and rapid spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals [J]. *J Infect Chemother* 2014 20(11): 696–701.
- [14] Kusradze Ia, Diene S M, Goderdzishvili M, et al. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia [J]. *Int J Antimicrob Agents* 2011 38(2): 164–8.

Multilocus sequence typing of 87 strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

Lin Wubing¹, Ye Ying^{1,2}, Li Jiabin^{1,2}

(¹Dept of Infection Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Anhui Center Surveillance of Bacterial Resistance Hefei 230022)

Abstract Objective To obtain knowledge of microbial colonial structures and epidemic strains of clinically isolated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Anhui in recent years. To analyze gene homologies and phylogenetic relationships of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. To provide some laboratory data for clinical antimicrobial application. **Methods** Eighty-seven strains of clinically isolate multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* were collected in this study, and the minimal inhibitory concentrations of these strains to 11 common antimicrobials were measured by agar dilution. Evolutionary relationships between the strains were revealed with employment of multilocus sequence typing, and clustering figures were constructed with the aid of the BioNumerics software, thus enabling genotyping. **Results** The drug-resistance rates of 87 strains of *Acinetobacter baumannii* to imipenem and meropenem were 74.7% and 66.7%, respectively, while the drug-resistance rates to other antimicrobials were considerably high. All the 87 strains were sub-divided into 42 ST-types 6 of which were already involved in the database while 36 (temporarily named STnew01 ~ STnew36) were newly established. Thirty-seven strains were proved dominant types and sub-listed in the ST2 category. The ST2 *Acinetobacter baumannii* belongs to the clone complex CC1. **Conclusion** All multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in research show high drug-resistance rates when treated with 11 common antimicrobials. The ST2 category is the principal epidemic clones of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Anhui province, and a highly recognizable homology is observed between the principal epidemic strains (ST2) in Anhui and those in the world.

Key words multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*; MIC; MLST; housekeeping gene; PCR