

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2013.03.003

· 论 著 ·

儿童感染人苍白杆菌的耐药性及 DHA-1 基因检出

李先斌¹, 刘健龙¹, 宋春荣¹, 郭宽鹏¹, 尤 灿¹, 李胜涛²

(1 湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410007; 2 郴州市第一人民医院, 湖南 郴州 423000)

[摘要] **目的** 初步探讨败血症患儿血标本分离的人苍白杆菌耐药机制。**方法** 采用 VITEK2 compact 全自动微生物鉴定药敏系统对败血症患儿分离的病原菌进行鉴定和药敏试验; 聚合酶链反应(PCR)法对人苍白杆菌受试株进行 *AmpC*、*AmpR*、*DHA-1*、*AcrA*、*RamA*、*OprD*、*TEM*、*SHV* 等多重耐药基因检测, 扩增产物经纯化后测序并进行序列分析。**结果** 从败血症患儿的血标本中检出 155 株人苍白杆菌, 从中随机选取 30 株进行检测。30 株试验菌株中, 有 20 株耐哌拉西林/他唑巴坦, 其中 16 株(80.00%, 16/20)扩增出人苍白杆菌 *AmpC/R* 基因, 2 株(10.00%, 2/20)扩增出 *DHA-1* 基因。30 株受试菌均未扩增出 *AcrA*、*RamA*、*OprD*、*TEM*、*SHV* 等基因。将 155 株人苍白杆菌根据其是否耐哌拉西林/他唑巴坦, 分成耐药组(126 株)和非耐药组(29 株), 其中耐药组菌株对氨苄西林、第一~三代头孢菌素、氨曲南等几乎 100% 耐药, 但对左氧氟沙星、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素等耐药率(0.00%~1.59%)低。**结论** 产 *AmpC/R* 是儿童感染人苍白杆菌耐多种抗菌药物的机制, 重症患儿可选用亚胺培南。应加强对人苍白杆菌耐药性的监测, 防止 *DHA* 基因在革兰阴性杆菌中流行。

[关键词] 儿童; 人苍白杆菌; 败血症; 血流感染; *AmpC* 酶; *DHA* 基因; 抗药性; 微生物

[中图分类号] R378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)03-0169-04

Drug resistance and detection of DHA-1 gene of *Ochrobactrum anthropi* from infected children

LI Xian-bin¹, LIU Jian-long¹, SONG Chun-rong¹, GUO Kuan-peng¹, YOU Can¹, LI Sheng-tao²

(1 Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China; 2 Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou 423000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate drug resistance mechanisms of *Ochrobactrum anthropi* (*O. anthropi*) isolated from blood of children with septicemia. **Methods** VITEK2 compact automatic machine was used to identify and analyze antimicrobial resistance of *O. anthropi*, and drug-resistance gene *AmpC*, *AmpR*, *DHA-1*, *AcrA*, *RamA*, *OprD*, *TEM* and *SHV* were determined by polymerase chain reaction (PCR) method, then PCR products were purified and sequenced. **Results** A total of 155 *O. anthropi* isolates were isolated, 30 of which were randomly selected for detection. Of 30 tested isolates, 20 were resistant to piperacillin / tazobactam, 16(80.00%, 16/20) of which were detected *AmpC/R* genes, 2 (10.00%, 2/20) were detected *DHA-1* gene. None of 30 isolates were amplified *AcrA*, *RamA*, *OprD*, *TEM* and *SHV* gene. According to the resistance to piperacillin/tazobactam, 155 isolates were divided into drug-resistance group (126 isolates) and non-drug-resistance group (29 isolates), drug-resistance group were all resistant to ampicillin, first-third generation cephalosporins, aztreonam, but resistant rates to levofloxacin, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, amikacin and gentamycin were low (0.00% - 1.59%). **Conclusion** Production of *AmpC/R* is the mechanism of multidrug resistance of *O. anthropi*, critically ill patients can choose imipenem. The detection of drug resistance of *O. anthropi* should be reinforced to prevent the prevalence of *DHA* gene among gram-negative bacteria.

[收稿日期] 2012-10-20

[基金项目] 湖南省科技厅课题(2008FJ3193)

[作者简介] 李先斌(1964-), 男(汉族), 湖南省湘乡市人, 副主任检验师, 主要从事临床微生物学研究。

[通讯作者] 李先斌 E-mail: lxb5600983com@sina.com

[Key words] child; *Ochrobactrum anthropi*; septicemia; blood stream infection; AmpC enzyme; DHA gene; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2013, 12(3): 169-172]

人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)广泛分布在自然环境中,是教科书上较少介绍的细菌。由于高度耐药,感染后可引起败血症、脑膜炎、腹膜炎等疾病^[1-2]。2007 年 1 月—2011 年 1 月,我们从败血症患儿的血液中检出 155 株人苍白杆菌,其中多数对含酶抑制剂抗菌药物不敏感,给抗感染治疗带来困难,严重威胁儿童健康。因此,从基因水平研究此耐药菌株的分子特征,对于指导临床治疗,减少耐药菌株的产生具有重大意义。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 155 株人苍白杆菌均分离自 2007 年 1 月—2011 年 1 月湖南省儿童医院收治的败血症患儿血液标本,从中随机选取 30 株进行 *AmpC*、*AmpR*、*DHA-1*、*AcrA*、*RamA*、*OprD*、*TEM*、*SHV* 等多重耐药基因检测。

1.2 仪器与试剂 全自动血培养仪 BACTEC9120 和 BACTEC FX 及配套儿童培养瓶,由美国 BD 公司提供;全自动血培养仪 BACT/ALERT 3D480 和全自动微生物鉴定药敏分析仪 VITEK2 compact 及配套儿童培养瓶、配套的 GN 鉴定卡、AST-GN13 药敏分析卡,均由法国生物梅里埃公司提供;哥伦比亚血平板,由博赛生物研究所提供;基因检测试剂盒和 DNA Marker 由嘉美诺斯生命科学有限公司提供;纯化试剂盒由康为世纪生物公司提供。

1.3 方法 疑为血流感染的患儿在使用抗菌药物前,采 2 份静脉血注入儿童培养瓶置上述全自动血培养仪培养,按标准操作规程进行细菌鉴定及药敏试验。阳性报警后立即涂片革兰染色并接种哥伦比亚血平板。血平板培养物经 VITEK2 compact 进行鉴定和药敏试验,鉴定为人苍白杆菌后再重复鉴定,一致者方纳入本次研究。同时采用琼脂扩散(K-B)法进行药敏试验,其结果与仪器法一致者才发出报告。测试抗菌药物包括:氨苄西林(AMP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、头孢唑林(CFZ)、头孢替坦(CTT)、头孢克罗(CEC)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、氨曲南(ATM)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)。

1.4 细菌处理 挑过夜纯培养细菌单一菌落置入 500 μ L TE 缓冲液,100 $^{\circ}$ C 加热 13 min,10 000 r/min 离心 1 min,上清液即为基因检测的模板液,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.5 基因检测 均采用聚合酶链反应(PCR),靶基因引物序列和目的产物长度见表 1。各种靶基因 PCR 扩增体系均为:每反应体系 P1 引物 1 μ L (1.0 μ mol/L)、P2 引物 1 μ L (1.0 μ mol/L),dNTPs 1 μ L (2 mmol/L),MgCl₂ 2 μ L (2.5 mmol/L),10 \times Buffer 2.5 μ L, Taq 酶(1 U) 1 μ L,超纯水 14.5 μ L,模板液 2 μ L,总反应体积 25 μ L。PCR 扩增热循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C (DHA 65 $^{\circ}$ C, AcrA52 $^{\circ}$ C) 60 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s,循环 30 周期,最后 72 $^{\circ}$ C 延长 7 min。靶基因引物序列和目的产物长度见表 1。

表 1 PCR 引物及扩增产物

Table 1 Primers and amplified products of PCR

Gene	Primer sequence (5' \rightarrow 3')	Primer length (bp)
<i>AmpC</i>	P1 CGCCAGCGCAAGTATCGTAT	1 120
	P2 GCGGCCTATTGCTGTGTGTC	
<i>AmpR</i>	P1 CTCAGTTGTTCCGGCATCT	1 318
	P2 AATAGCGGCAGTGGTGAGGA	
<i>DHA-1</i>	P1 GCACCATTAAACCGCTGATGGC	565
	P2 GCGCAAAGCCAGTATGCGTACG	
<i>AcrA</i>	F ATGTGACGATAAACCGGCTC	1 122
	R CTGGCAGTTCGGTGGTTATT	
<i>RamA</i>	F GCATCAACCGCTGCGTATT	774
	R CGTTGCAGATGCCATTTTCG	
<i>OprD</i>	F CGGCGACATCAGCAACACC	193
	R GGGCCGTTGAAGTCGGAGTA	
<i>TEM</i>	P1 TCGGGGAAATGTGCG	972
	P2 TGCTTAATCAGTGAGGCACC	
<i>SHV</i>	P1 GCCTTTATCGGCCTTCACTCAAG	899
	P2 TTAGCGTTGCCAGTGCTCGATCA	

1.6 结果判断 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,与 DNA Marker 对照出现长度相当的目的条带为阳性。产物经纯化后送上海生工公司测序,所有操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.7 质量控制 用大肠埃希菌 ATCC 25922,铜绿假单胞菌 ATCC 27853 对所有鉴定用试剂及药敏分析用抗菌药物纸片进行质量控制,结果均符合预期结果和美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准。

2 结果

2.1 耐药基因检测 随机选取进行多重耐药基因检测的 30 株菌中,有 20 株耐哌拉西林/他唑巴坦,5 株对哌拉西林/他唑巴坦中度敏感,5 株为敏感。20 株耐哌拉西林/他唑巴坦的菌株中有 16 株(80.00%)

扩增出人苍白杆菌 *AmpC/R*(1 200 bp)基因,其中有 2 株扩增出 *DHA-1*(565 bp)基因,占耐哌拉西林/他唑巴坦菌株的 10.00%。其余受试菌株未扩增出人苍白杆菌 *AmpC/R* 基因和 *DHA-1* 基因。30 株受试菌株均未扩增出 *AcrA*、*RamA*、*OprD*、*TEM*、*SHV* 等基因。结果见图 1。

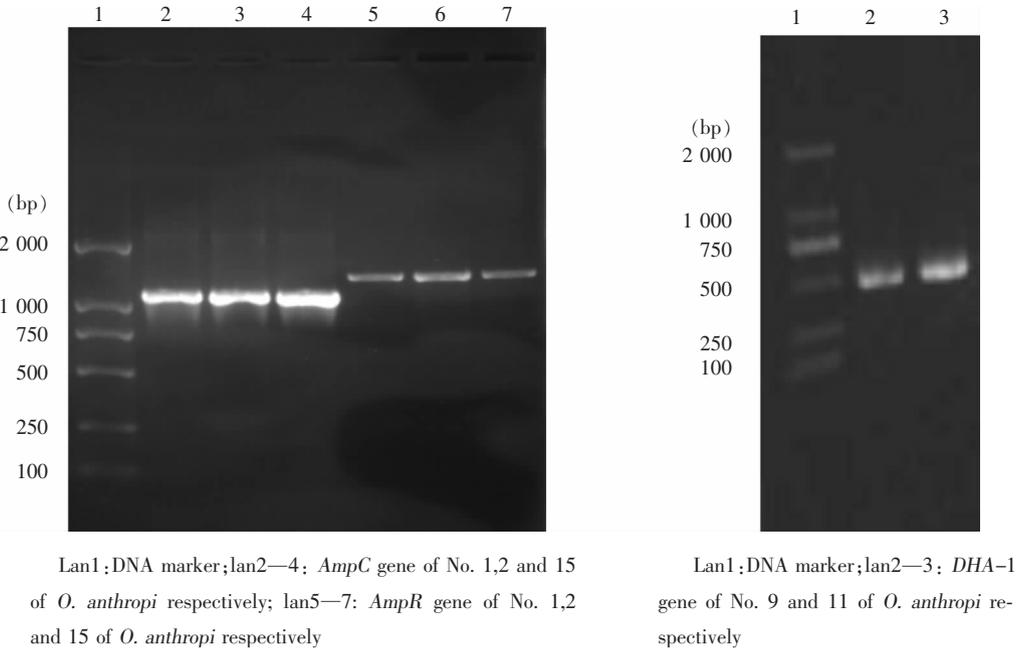


图 1 PCR 扩增电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of PCR amplification

2.2 测序结果 扩增出的耐药基因经琼脂糖凝胶电泳,产物经纯化后直接测序,所得 *AmpC/R*、*DHA-1* 测序结果与 CP000758 比对,相似度达到 98%,无 *Gap* (0.00%),基本证实在本次检测的人苍白杆菌耐药基因中确实有 *AmpC/R*、*DHA-1* 基因。

2.3 药敏试验结果 根据对哌拉西林/他唑巴坦是否耐药分成耐药组和非耐药组比较人苍白杆菌的耐药性,显示耐药组病原菌对氨苄西林、第一~三代头孢菌素、氨基糖苷类几乎 100% 耐药,但对左氧氟沙星、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素等耐药率低,见表 2。

3 讨论

人苍白杆菌是土壤和污水中常见的细菌,它可以共生或定植于真核生物体内导致不同的结果,例如能够促进茶叶的生长^[3],但一旦在人体内感染可造成败血症^[4]。人苍白杆菌是儿童尤其是婴幼儿败血症的重要病原菌,却一直未引起国内外的广泛关

表 2 人苍白杆菌对抗菌药物的耐药率(耐药株数,%)

Table 2 Antimicrobial resistant rates of *O. anthropi* (No. of drug-resistant isolates, %)

Antimicrobial agent	Drug-resistance group(n = 126)	Non-drug-resistance group(n = 29)
AMP	126(100.00)	25(86.21)
TZP	126(100.00)	0(0.00)
CFZ	126(100.00)	25(86.21)
CTT	125(99.21)	22(75.86)
CEC	126(100.00)	24(82.76)
CAZ	124(98.41)	23(79.31)
FEP	28(22.22)	3(10.34)
ATM	126(100.00)	16(55.17)
IPM	0(0.00)	0(0.00)
MEM	0(0.00)	0(0.00)
CIP	1(0.79)	0(0.00)
LVX	0(0.00)	0(0.00)
SXT	10(7.94)	2(6.90)
AMK	1(0.79)	0(0.00)
GEN	2(1.59)	0(0.00)

注,但越来越多的报道证实其是对人体有潜在威胁的微生物^[5],并且对多种抗菌药物高度耐药^[6]。也

有文献报道^[7],在患者体内留置导管或其他医疗器械会增加其感染的机会,这可能与它能够黏附在不同的合成材料上有关。

AmpC 酶不是超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs),它除了对第一~三代头孢菌素和 ATM 耐药,对头霉素和含酶抑制剂的抗菌药物也不敏感。本研究耐药基因检测显示,耐 TZP 菌株中有 80% 扩增出了人苍白杆菌 *AmpC/R*(1 120 bp)基因。本组药敏试验结果也显示耐 TZP 菌株对 AMP、第一~三代头孢菌素、ATM 等几乎 100% 耐药,主要机制可能是细菌产生了由染色体或质粒介导的 AmpC 酶在细菌间水平传播,导致敏感菌也获得了耐药性。另外,其他可能的耐药机制如膜孔蛋白的减少或关闭,生物外排泵的作用,都会增强 AmpC 酶的功效。还有一些调节基因,例如 *AmpR* 基因移位可以激活 AmpC 酶转录^[8],这对一些低表达 AmpC 酶细菌的耐药性,特别是机会致病菌在进化的过程中至关重要。本研究未检出 *AcrA*、*RamA*、*OprD*、*SHV* 等基因。*AcrA* 为主动外排基因,跟喹诺酮类抗菌药物有关;*RamA* 介导的耐药可导致 AMK、GEN 等对病原菌无效;*OprD* 可能是碳青霉烯类抗生素的特异性通道;而 *SHV* 等基因跟肠杆菌科细菌有关。本组药敏结果显示,人苍白杆菌对 LVX、IPM、MEM、CIP、AMK、GEN 敏感率高。本研究还发现人苍白杆菌对 FEP 的敏感率为 80.00%,表明 FEP 可作为人苍白杆菌败血症的首选药物之一,同时也说明大约 20% 的人苍白杆菌已经逐渐适应了此类抗生素,这是一个非常危险的信号。周华等^[9]报道,人苍白杆菌对第四代头孢菌素 90% 耐药,这可能与流行菌株和地域不同有关。另外,本实验的菌株全部来自儿童,其感染菌株的毒力也有可能不一致。

本研究发现,在 16 株扩增出人苍白杆菌 *AmpC/R* 基因的菌株中,2 株有 *DHA-1* 基因,占耐 TZP 菌株的 10%。*DHA* 型是质粒 AmpC 酶的一种,但和普通的质粒 AmpC 酶不同,*DHA* 型酶携带了 *AmpR* 基因,从而可以诱导高水平表达 AmpC 酶。因 *DHA* 型酶的诱导特性,若选择抗菌药物不当,可诱导 AmpC 酶的产生而造成抗感染治疗失败。对于含 *DHA* 型酶的人苍白杆菌,碳青霉烯类抗生素是治疗感染的合适药物。*DHA* 的来源和生存优势,以及它在国内其他地区的分布如何,均有待研究。罗燕萍等^[10]研究发现,这种质粒通常与其他

β -内酰胺酶一起存在,加强细菌水解各种抗菌药物的能力。因此,如果不加强抗菌药物使用的控制,更多的耐药基因会在更多的菌种,尤其是在革兰阴性杆菌中传播。

在本研究中,我们还对其他 β -内酰胺酶类基因进行了检测,如 *CTX-M-15*、*EBC*、*TEM*,但均未检测到。同时,我们还进行了染色体喹诺酮类耐药基因 *gyrA* 和 *parC* 的检测,同样未发现阳性 PCR 条带。但因检测数量有限,并不能对菌株的耐药性进行完整评价。在将来的进化过程中,由于各种抗菌药物的滥用和各种细菌耐药基因的水平传播,可能会出现新的耐药机制。

[参 考 文 献]

- [1] 储从家,孔繁林,吴惠玲,等. 腹腔液中检出人苍白杆菌和季也蒙念珠菌 1 例[J]. 中国感染控制杂志,2004,3(4):374.
- [2] 赖源,李先斌,刘健龙,等. 湖南地区小儿败血症革兰阴性杆菌构成及耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志,2008,7(3):203-204.
- [3] Chakraborty U, Chakraborty B N, Basnet M, et al. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. [J]. J Appl Microbiol,2009,107(2):625-634.
- [4] Kettaneh A, Weill F X, Poilane I, et al. Septic shock caused by *Ochrobactrum anthropi* in an otherwise healthy host[J]. J Clin Microbiol,2003,41(3):1339-1341.
- [5] Romero Gomez M P, Peinado Esteban A M, Sobrino Daza J A, et al. Prosthetic mitral valve endocarditis due to *Ochrobactrum anthropi*: case report[J]. J Clin Microbiol, 2004,42(7):3371-3373.
- [6] Romano S, Aujoulat F, Jumas-Bilak E, et al. Multilocus sequence typing supports the hypothesis that *Ochrobactrum anthropi* displays a human-associated subpopulation[J]. BMC Microbiol, 2009,9:267-268.
- [7] Alnor D, Frimodt-Moller N, Espersen F, et al. Infections with the unusual human pathogens *Agrobacterium* species and *Ochrobactrum anthropi*[J]. Clin Infect Dis, 1994,18(6):914-920.
- [8] Hanson N D, Sanders C C. Regulation of inducible AmpC β -lactamase expression among Enterobacteriaceae[J]. Curr Pharm Des, 1999,5(11):881-894.
- [9] 周华,凌丽燕,杨青,等. 人苍白杆菌耐药性及 AmpC 酶研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(4):378-380.
- [10] 罗燕萍,沈定霞,崔征,等. 质粒介导的 *DHA* 型 AmpC 酶在肺炎克雷伯菌中的表达及对耐药性的影响[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(5):488-491.