

62 株多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性分析及同源性研究*

卢灵锋¹, 李光荣², 向成玉², 杨 葵², 刘新波^{2△} (1. 四川省宜宾县人民医院检验科, 四川宜宾 644000; 2. 西南医科大学附属第一医院检验科, 四川泸州 646000)

【摘要】 目的 对多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)进行耐药性分析及同源性研究,为预防与控制院内感染提供理论依据。**方法** 收集、分离及鉴定多重鲍曼不动杆菌 62 株,采用琼脂稀释法检测菌株对 23 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行分子分型并分析其同源性。**结果** 62 株 MDAB 中,对大部分抗菌药物的耐药率在 80.0%以上,PFGE 将其分为 4 型,A 型和 B 型为主要克隆株。A 型包括 4 个亚型共 32 株,B 型有 2 个亚型共 19 株,C 型有 8 株,D 型有 3 株。**结论** MDAB 耐药情况十分严峻,在临床科室广泛分布并流行传播,成为耐药菌株逐年增加的一个重要因素。

【关键词】 多重耐药鲍曼不动杆菌; 脉冲场凝胶电泳; 同源性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)10-1331-03

Investigation on drug resistance and homology analysis of 62 strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii**

LU Ling-feng¹, LI Guang-rong², XIANG Cheng-yu², YANG Kui², LIU Jin-bo^{2△} (1. Department of Clinical Laboratory, Yibin County People's Hospital, Yibin, Sichuan 644000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

【Abstract】 Objective To analyze the drug resistance and homology of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*(MDRAB) to provide a theoretical basis for the prevention and control of nosocomial infection. **Methods** A total of 62 strains of MDRAB were collected, separated and identified. The minimum inhibitory concentration(MIC) of 23 kinds of antimicrobial drugs in these strains were detected by the agar dilution method. Molecular typing and homology analysis for these strains was analyzed by using the pulsed field gel electrophoresis(PFGE). **Results** Among 62 strains of MDRAB, the resistance rates to most of antibacterial drugs were above 80.0%. The four types were classified by PFGE, the type A and B were the main cloned strains. The type A included 4 subtypes and 32 strains, the type B had 2 subtypes and 19 strains, and the type C had 8 strains and type D had 3 strains. **Conclusion** The drug resistance situation of MDRAB is very serious,MDRAB is widely distributed, popularized and communicated in clinical departments, which becomes an important factor for drug resistant strain increase year by year.

【Key words】 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*; pulsed field gel electrophoresis; homology

多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)已成为全球医疗机构引起院内感染的重要病原菌之一。主要引起肺炎特别是呼吸机相关性肺炎、菌血症、尿路感染、伤口感染、皮肤感染和继发性脑膜炎等,其广泛分布造成医院感染事件频繁发生^[1]。因此,急切需要掌握临床分离的 MDRAB 的耐药情况、流行趋势,从而为合理使用抗菌药物、流行病学调查和防控提供合理指导和参考^[2]。本研究对临床分离的 62 株 MDRAB 的耐药性和同源性进行探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集西南医科大学附属第一医院 2013 年 10 月至 2014 年 9 月临床分离的 MDRAB 62 株(非重复菌株),标本类型为痰液、分泌物、尿液、血液等,来自于重症监护室(ICU)、呼吸内科、血液内科、烧伤科等科室。

1.2 仪器与试剂 西门子 MicroScan WalkAway 96 Plus 细菌鉴定仪由北京泰林东方商贸有限公司提供;CHEF-DR II 型脉冲场凝胶电泳仪和 Gel Doc XR+凝胶成像仪购自美国 Bio-RAD 公司;抗菌药物标准品购自北京天坛生物有限公司;蛋白

酶 K 和 Apa I 核酸内切酶购自大连宝生物工程有限公司,SeaKem Gold Agarose 购自美国 Lonza 生物有限公司。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 及鲍曼不动杆菌 ATCC19606。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定 根据临床药敏资料筛选出 62 株对 3 种及 3 种以上不同类型抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌。根据菌落形态和革兰染色,经 MicroScan WalkAway 96 Plus 微生物分析仪进行细菌鉴定确认。

1.3.2 最低抑菌浓度(MIC)测定 采用琼脂稀释法检测,制备 23 种含多个浓度梯度抗菌药物 MH 琼脂平板,浓度范围为 0.25~512.00 mg/L,取 2 μL 0.5 麦氏浊度菌液接种于 MH 琼脂平板相应位置,每个接种点菌数约为 10⁴ CFU,37 ℃ 培养 18~24 h,药敏结果依照 2013 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)执行标准判读。

1.3.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE) 细菌 37 ℃ 培养 18~24 h,用 SeaKem Gold Agarose 进行制备胶块,将胶块置于 20 mg/mL 蛋白酶 K 中,在 160 r/min、温度为 54 ℃ 的水浴摇床中

* 基金项目:四川大学与泸州市人民政府战略合作项目(2013CDLZ-S15)。

作者简介:卢灵锋,男,硕士,主管检验师,主要从事临床微生物研究。△ 通讯作者,E-mail:liujb7203@163.com。

孵育 1.5 h,采用 Apa I 内切酶限制性酶切胶块内 DNA 过夜。打开脉冲场凝胶电泳仪主机、泵和冷凝机的开关,设置电泳参数:6 V/cm,14 ℃,脉冲间隔时间 5~20 s,电场角度 120°,电泳时间 22 h。用 EB 溶液染色,再用凝胶成像仪 GelDoc XR+拍摄图像。

1.3.4 结果判读与分析 建立 1 个 0、1 构成的矩阵:在 Excel

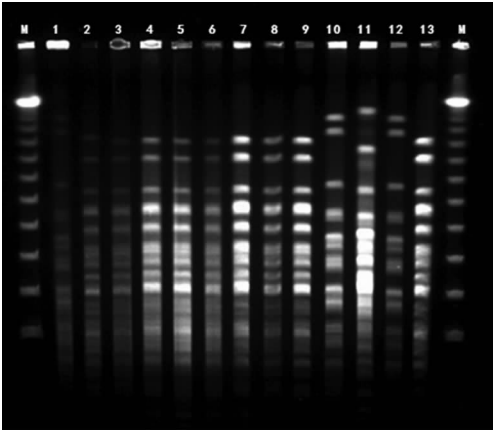
2007 软件中,将同一电泳迁移位置上条带阳性记为 1,条带阴性记为 0,构成原始数据矩阵。采用 NTSYS 2.1e 软件用 UP-GMA 法计算遗传相似系数,进行 SAHN 聚类分析。

2 结 果

2.1 药敏结果 62 株 MDRAW 对大部分抗菌药物的耐药率在 80.0%以上,见表 1。

表 1 62 株 MDRAW 药敏结果

抗菌药物	MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	敏感[n(%)]	中介[n(%)]	耐药[n(%)]
阿米卡星	64	128	5(8.0)	7(11.3)	50(80.6)
氨苄西林/舒巴坦	16	32	51(82.3)	2(3.2)	9(14.5)
头孢曲松钠	64	128	2(3.2)	0(0.0)	60(96.8)
环丙沙星	128	256	0(0.0)	0(0.0)	62(100.0)
多黏菌素	2	2	54(87.1)	0(0.0)	8(12.9)
头孢他啶	128	512	0(0.0)	0(0.0)	62(100.0)
头孢吡肟	256	512	0(0.0)	0(0.0)	62(100.0)
头孢泊肟	64	256	0(0.0)	0(0.0)	62(100.0)
头孢噻肟	256	512	0(0.0)	0(0.0)	62(100.0)
庆大霉素	32	64	4(6.5)	0(0.0)	58(93.5)
加替沙星	8	16	12(19.4)	10(16.1)	40(64.5)
亚胺培南	32	32	2(3.2)	4(6.5)	56(90.3)
左氧氟沙星	16	32	7(11.3)	2(3.2)	53(85.5)
美罗培南	32	64	3(4.8)	4(6.5)	55(88.7)
米诺环素	4	8	44(71.0)	7(11.3)	11(17.7)
美洛西林	256	512	0(0.0)	0(0.0)	62(100.0)
多黏菌素 B	2	2	52(83.9)	3(4.8)	7(11.3)
哌拉西林	>512	>512	0(0.0)	0(0.0)	62(100.0)
利福平	16	32	3(4.8)	2(3.2)	57(92.0)
复方磺胺甲噁唑	8	16	9(14.5)	10(16.1)	43(69.4)
四环素	256	512	4(6.5)	2(3.2)	56(90.3)
妥布霉素	16	32	25(40.3)	4(6.5)	33(53.2)
替加环素	4	8	59(95.1)	1(1.6)	2(3.2)



注:M 为标准参考物;1 为 C 型克隆株;2、3、4、5、6、7、8、9、13 为 A 型克隆株;10、12 为 B 型克隆株;11 为 D 型克隆株。

图 1 部分菌株的 PFGE 图谱

2.2 PFGE 结果 PFGE 将 62 株 MDRAW 分为 A、B、C、D 四型,部分菌株 PFGE 图谱,见图 1。采用 NTSYS 2.1e 软件进行聚类分析,根据同源性制作树状图,A 型和 B 型为主要克隆株。A 型包括 4 个亚型共 32 株,分布在 ICU、呼吸内科、神经外科、骨科、血液科 5 个病区(分别有 13、3、8、5、3 株)。B 型有 2 个亚型共 19 株,分布在 ICU、呼吸内科、消化内科、儿科 4 个病区(分别有 11、2、2、4 株);C 型有 8 株,分布于呼吸内科、胸

外科和神经内科 3 个科室(分别有 5、1、2 株)。D 型有 3 株,分别分离自胃肠外科、胸外科和血液科病房。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌流行是医院感染事件频繁发生的原因之一,在不同地区,其分布和检出率亦不尽相同。在 ICU 中尤为普遍,可从患者体内、医护人员的手、医疗设备和工作台表面分离。鲍曼不动杆菌快速获得耐药基因的能力与其致病性密切相关,从而导致多重耐药^[3-4]。

由表 1 可以看出,西南医科大学附属第一医院分离出的 MDRAW 耐药情况十分严峻,对大部分药物耐药率高达 80.0%以上,对头孢菌素类抗菌药物耐药率几乎 100.0%,给临床治疗带来了极大的困难。鲍曼不动杆菌的耐药机制较为复杂,主要有产 β-内酰胺酶、青霉素结合蛋白(PBPs)的结构和数量的变化、外排泵过度表达和外膜孔蛋白丢失等。亚胺培南和美罗培南是常用于治疗鲍曼不动杆菌的碳青霉烯类抗菌药物,本研究显示耐药率高达 90.3%和 88.7%,究其原因可能为医院在治疗鲍曼不动杆菌过程中,多经验性选用既往相对敏感的亚胺培南或美罗培南,使耐药菌株压力性增多。对氨基糖苷类抗菌药物耐药主要是由于鲍曼不动杆菌产生氨基糖苷类修饰酶和 16 S rRNA 甲基化酶的甲基化。氨基糖苷类修饰酶包括氨基糖苷乙酰基转移酶(AAC)、氨基糖苷腺苷转移酶(ANT)和氨基糖苷磷酸转移酶(APH)^[5],目前为止鲍曼不动杆菌能检测到 16 S rRNA 甲基化酶相关的基因有 armA、rmtA、rmtB、

rmtC、rmtD、rmtE、npmA^[6]。对氨基糖苷类抗菌药物常用的种类有庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素,本研究显示其耐药率分别为 93.5%、80.6%和 53.2%。头孢菌素类抗菌药物的耐药率几乎为 100.0%。喹诺酮类抗菌药物如环丙沙星、左氧氟沙星、加替沙星,其耐药率分别为 100.0%、85.5%和 64.5%。鲍曼不动杆菌对喹诺酮类药物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 发生突变时表现为中度耐药,GyrA 和 PraC 同时发生突变与高水平耐药密切相关^[7]。本研究还发现,MDRAB 只有对少数抗菌药物有较低的耐药性,如替加环素、多黏菌素、氨苄西林/舒巴坦、米诺环素的耐药率分别为 3.2%、12.9%、14.5%、17.7%,舒巴坦能不可逆地结合不动杆菌 PBPs,有直接杀菌能力,因此可以考虑选用含舒巴坦制剂或联合使用抗菌药物,或许能使其耐药率降低。Dinc 等^[8]研究发现对于 MDRAB 引起的严重感染,选用大剂量多黏菌素 B 联合利福平或头孢哌酮/舒巴坦联合米诺环素进行治疗,其耐药性大幅降低。

PFGE 将 62 株耐药菌株分为 4 型,A 型和 B 型为主要克隆株。A 型包括 4 个亚型共 32 株,分布在 ICU、呼吸内科、神经外科、骨科、血液科 5 个病区,特别是 ICU。B 型有 2 个亚型共 19 株,分布在 ICU、呼吸内科、消化内科、儿科 4 个病区。说明 MDRAB 克隆株在医院内克隆播散,从而造成多重耐药菌株不断增加。可能和患者在住院期间使用的湿化瓶、呼吸机管道、床单、被褥、医护人员使用过的手套,以及医院内其他物品表面有关,并且鲍曼不动杆菌形成的生物膜和芽孢使其能在干燥的物体表面存活数周,这些都是院内感染的重要原因^[9]。因此要有效控制医院感染的发生,在制订更加严格的医院感染控制措施时应注意更多细节:医护工作者保持良好的手卫生,对存在潜在的污染环境进行彻底的清洁消毒,对更换工作服严格消毒,对已经感染的患者进行单间隔离,限制进入 ICU,同时限制广谱抗菌药物的使用,并加强环境的监测,从而防止及减少医院感染的发生^[10]。

参考文献

[1] Badave GK,Kulkarni D. Biofilm producing multidrug resistant acinetobacter baumannii; an emerging challenge [J]. J Clin Diagn Res. 2015,9(1):8-10.
[2] 周宁莉,张之烽,陈俊根,等. 鲍曼不动杆菌分布及耐药性分析[J]. 徐州医学院学报,2009,29(8):548-549.
[3] Hamouda A,Evans BA,Towner KJ,et al. Characterization of epidemiologically unrelated Acinetobacter bauman-

nii isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes[J]. J Clin Microbiol,2010,48(7):2476-2483.
[4] Pogue JM,Mann T,Barber KE,et al. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii; epidemiology, surveillance and management[J]. Expert Rev Anti Infect Ther,2013,11(4):383-393.
[5] 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.
[6] Zhou Y,Yu H,Guo Q,et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2010,29(11):1349-1353.
[7] Liu YH,Kuo SC,Lee YT,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):108-112.
[8] Dinc G,Demiraslan H,Elmali F,et al. Antimicrobial efficacy of doripenem and its combinations with sulbactam, amikacin, colistin, tigecycline in experimental sepsis of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii[J]. New Microbiol,2015,38(1):67-73.
[9] 张晓兵,刘星,龚雅利,等. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学及耐药机制的研究[J]. 第三军医大学学报,2011,33(5):502-505.
[10] Navoa-Ng JA,Berba R,Rosenthal VD,et al. Impact of an International Nosocomial Infection Control Consortium multidimensional approach on catheter-associated urinary tract infections in adult intensive care units in the Philippines; International Nosocomial Infection Control Consortium(INICC) findings[J]. J Infect Public Health,2013,6(5):389-399.

(收稿日期:2015-10-25 修回日期:2015-12-20)

(上接第 1330 页)

with sanger sequencing[J]. J Clin Microbiol,2014,52(8):2933-2939.
[6] 徐琳琳,王文兵. COLD-PCR 技术的原理及应用[J]. 生物学杂志,2012,29(6):84-86.
[7] 仇秦威,罗凯,贺智敏. 华南地区 172 例非小细胞肺癌表皮生长因子受体和 KRAS 突变分析[J]. 实用医学杂志,2015,6(6):947-950.
[8] Ding D,Yu Y,Li Z,et al. The predictive role of pretreatment epidermal growth factor receptor T790M mutation on the progression-free survival of tyrosine-kinase inhibitor-treated non-small cell lung cancer patients; a meta-

analysis[J]. Oncol Targets Ther,2014,7(2):387-393.
[9] 于韶荣,侯志波,陈超,等. 运用高灵敏度 COLD-PCR 法检测胰腺癌和结直肠癌患者 KRAS 基因突变[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(12):1181-1184.
[10] 张春燕. 外周血游离 DNA KRAS 基因突变检测方法的建立和临床应用[D]. 上海:复旦大学,2011.
[11] 梁国威,邵东华,曹清芸,等. TaqMan 探针结合 COLD-PCR 原理定量检测 JAK2 V617F 突变率研究[J]. 中国实验诊断学,2012,16(3):398-401.

(收稿日期:2015-11-05 修回日期:2016-01-10)