

多耐药鲍曼不动杆菌耐药性分析和部分耐药基因检测

张玲玲 胡俊锋 李峰 张永

【摘要】 目的 分析皖北地区多耐药鲍曼不动杆菌(MDR-Ab)耐药率和部分耐药基因携带情况。**方法** 用稀释法测定抗生素的最低抑菌浓度(MIC),用PCR扩增OXA-51、OXA-23和I~III类整合子的整合酶基因。**结果** MDR-Ab对替加环素、多黏菌素E和利福平体外药敏试验耐药率较低,分别是5.56%、6.94%、16.67%。临床常用16种抗生素中除舒普深(头孢哌酮/舒巴坦)耐药率为41.67%外,其他抗生素耐药率较高。72株MDR-Ab的OXA-51、OXA-23和I类整合酶基因的携带率分别为100.00%、84.72%和91.67%,未检出II和III类整合酶基因。**结论** MDR-Ab耐药形势严峻,替加环素、多黏菌素E和利福平是治疗MDR-Ab感染的有效药物。MDR-Ab携带I类整合子阳性率较高,OXA-23是导致其对碳青霉烯类抗生素耐药的机制之一。

【关键词】 整合子类; 鲍曼不动杆菌; 多耐药; OXA-51; OXA-23

The resistant characteristic and a part of resistance genes carried of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii ZHANG Ling-ling, HU Jun-feng, LI Feng, ZHANG Yong. Department of Respiratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China
Corresponding author: ZHANG Yong, Email: zsuzy@126.com

【Abstract】 Objective To analysis the antimicrobial resistance and a part of resistance genes carried of multidrug-resistance Acinetobacter baumannii (MDR-Ab) in the hospitals of North Anhui. **Methods** Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by the borth dilution method. Bla_{oxa-51}-like, bla_{oxa-23}-like genes and integrase genes of intergrons from class 1 to 3 were researched by polymerase chain reaction. **Results** Tigecycline, colistin and rifampin were effective against the MDR-Ab, the resistant rates were 5.56%, 6.94% and 16.67%, respectively. The lowest rates of 16 kinds currently used antibiotics was cefoperazone-sulbactam (41.67%). While, others had high resistant rates. Among the 72 strains, all possessed bla_{oxa-51}-like carbapenemase gene, 84.72% (61) carried bla_{oxa-23}-like carbapenemase gene and 91.67% (66) with class 1 integrase gene. **Conclusions** Situation of drug resistance is serious in the clinical separated MDR-Ab. Tigecycline, colistin and rifampin are effective antibiotics to cure MDR-Ab infection. A large number of them are carrying class 1 integrase gene. Bla_{oxa-23}-like gene is the resistant mechanism of permitting the strains against carbapenem.

【Key words】 Integrons; Acinetobacter baumannii; Multidrug resistant; OXA-51; OXA-23

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)为非发酵葡萄糖,革兰染色阴性,无动力的双球菌或球杆菌,普遍存在于自然界和人体。近年来,多耐药鲍曼不动杆菌(multidrug-resistance *Acinetobacter baumannii*, MDR-Ab)暴发流行的报道逐渐增多,是目前引起医院内感染的重要条件致病菌^[1]。可引起呼吸机相关性肺炎(VAP)、泌尿系统感染、菌血症、复杂的皮肤软组织感染、腹膜炎和中枢神经系统感染等。感染多见于免疫

力低下的患者,特别是重症监护病房(ICU)患者。MDR-Ab是指对头孢菌素、碳青霉烯类、氟喹诺酮类、氨基糖苷、β-内酰胺酶抑制剂的复合制剂等五类具有抗铜绿假单胞菌活性药物中至少三种耐药^[2]。

为了解皖北地区MDR-Ab耐药情况,共选取72株MDR-Ab,测定16种临床常用抗生素和3种未应用于临床但文献报道较多抗生素的最低抑菌浓度(MIC)。对D类碳青霉烯酶基因OXA-51、OXA-23和I~III类整合子的整合酶基因进行PCR扩增,了解MDR-Ab耐药基因携带情况,以期为临床正确地使用抗生素提供实验室依据。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.15.038

作者单位:233004 安徽省,蚌埠医学院第一附属医院呼吸与危重症医学科(张玲玲、胡俊锋、张永),微生物室(李峰)

通讯作者:张永,Email:zsuzy@126.com

材料与方法

一、菌株来源

72株MDR-Ab无重复分离自2010~2011年间住院患者临床标本(蚌埠医学院第一附属医院25株,蚌埠医学院第三附属医院31株,淮北市人民医院16株)。

二、设备与试剂

VITEK-32微生物鉴定/药敏系统(法国生物梅里埃);GNS-148革兰阴性杆菌药敏测试卡(法国生物梅里埃)含有16种抗生素(舒普深、左氧氟沙星、头孢唑啉、头孢吡肟、头孢他啶、头孢呋辛、美罗培南、阿米卡星、妥布霉素、氨苄西林/舒巴坦、替卡西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、庆大霉素、环丙沙星、复方新诺明);MH肉汤培养基(深圳伽马科技);90mm血平板(英国OXOID);VITEK比浊管(法国生物梅里埃);替加环素和多黏菌素E粉末(Sigma);利福平粉末(深圳伽马科技);PCR引物(上海生工,序列见表1);DNA Marker(上海生工);梯度PCR仪:TGradient型(Biometra公司);GIS凝胶成像分析系统:TanonGIS-100(上海天能科技);PCR扩增试剂盒(Fermentas);琼脂糖和EB(Sigma);6×上样缓冲液(碧云天生物)。

三、方法

1. 细菌鉴定和药敏:质量菌株:大肠埃希菌(ATCC25922)和鲍曼不动杆菌(ATCC19606)。药敏结果按照2010年CLSI标准判读。

(1)菌株分离纯化后,用VITEK-32全自动微生物分析仪、GNS-148卡及配套试剂行细菌鉴定及药敏试验,上机测定16种常用抗菌药物MIC。(2)宏量肉汤稀释法药敏试验替加环素、多黏菌素E和利福平干粉按照药品说明书计算效能后用药典推荐溶剂配制成抗生素原液。所需药粉剂量根据公式计算:质量(mg)=溶剂(ml)×浓度(μg/ml)/分析效能(μg/mg)。替加环素、多黏菌素E配制成1280μg/ml、利福平配制成640μg/ml抗生素原液,保存于-80℃冰箱备用。挑取血平板上的新鲜菌落接种于含MH肉汤培养基的无菌试管中,恒温37℃,150次/min震荡过夜,用比浊仪将菌液浓度调到0.5麦氏单位,再做1:150倍稀释后使

每管菌液含量约 1×10^6 cfu/ml,吸取1ml加入无菌试管中,再加入根据倍比稀释法配制好的1ml各浓度抗生素,使菌液终浓度约 1×10^5 cfu/ml,恒温摇床37℃,150次/min震荡过夜后读取MIC值。

2. 耐药基因检测:(1)模板DNA制备:从血平板上刮取1~2次接种环新鲜菌落抖落于150μl无菌双蒸水,混匀后煮沸10min,12000r/min离心10min,-80℃冰箱保存备用。(2)PCR反应条件:共建25μl反应体系:PCR Master MIX(2×)12.5μl,上游引物1μl,下游引物1μl,DNA模板1.5μl,无核酸酶水(Water, nuclease-free)9μl。反应条件:95℃预变性5min,95℃变性1min,退火1min(OXA-51,53℃;OXA-23,54℃;intI-1,52℃;intI-2,53℃;intI-3,55℃),72℃延伸1min,共35个循环,最后72℃末次延伸10min。(3)琼脂糖凝胶电泳PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳,EB显色,紫外线灯下观察结果(图1~3)。

四、统计分析

细菌耐药性应用WHONET 5.4软件进行分析;统计学方法应用SPSS 16.0进行处理,结果分析采用Fisher确切概率法,以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义的判断标准。

结果

1. 临床分离MDR-Ab的一般情况:72株MDR-Ab中ICU病房45株(62.50%)、神经外科8株、呼吸内科4株、神经内科3株、骨科3株、烧伤科2株、其他科室7株。标本种类为痰、分泌物、引流液、尿液等,主要标本种类为呼吸道分泌物,占86.11%。

2. 抗生素药敏结果:替加环素、多黏菌素E、利福平体外药敏试验耐药率较低,分别是5.56%、6.94%、16.67%。临床常用16种抗生素中除舒普深耐药率为41.67%,其他耐药率较高。碳青霉烯类耐药率较高,亚胺培南76.39%,美罗培南77.78%,其他10种抗生素耐药率接近100%,药敏结果见表2。另外,通过本试验发现1例对亚胺培南敏感但对美罗培南耐药菌株。

3. 耐药基因检测:MDR-Ab中检测OXA-51阳性率100.00%,为鲍曼不动杆菌的标志基因。共11株不携

表1 PCR扩增相关耐药基因所用引物及产物大小

耐药基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物(bp)
OXA-23	GATCGGATTGGAGAACCAGA	ATTCTGACCGCATTCCAT	501
OXA-51	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	TGGATTGCACTTCATCTTGG	353
intI-1	CCCAGGCATAGACTGTA	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	160
intI-2	TTGCGAGTATCCATAACCTG	TTACCTGCACTGGATTAAGC	288
intI-3	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	ACGGATCTGCCAAACCTGACT	980

表2 MDR-Ab 的药物敏感性试验结果

抗菌药物	耐药 (株)	中介 (株)	敏感 (株)	耐药率 (%)
舒普深	30	12	30	41.67
左氧氟沙星	72	0	0	100.00
头孢唑啉	72	0	0	100.00
头孢吡肟	71	1	0	98.61
头孢他啶	72	0	0	100.00
头孢呋辛	72	0	0	100.00
美罗培南	56	0	16	77.78
阿米卡星	71	0	1	98.61
妥布霉素	70	0	2	97.22
氨苄西林/舒巴坦	70	1	1	97.22
替卡西林/克拉维酸	72	0	0	100.00
哌拉西林/他唑巴坦	67	5	0	93.06
亚胺培南	55	0	17	76.39
庆大霉素	71	0	1	98.61
环丙沙星	72	0	0	100.00
复方新诺明	69	0	3	95.83
多黏菌素 E	5	4	63	6.94
替加环素	4	13	55	5.56
利福平	12	24	36	16.67

表3 OXA-23 阳、阴性菌株对亚胺培南耐药情况比较(株)

项目	OXA-23 阳性	OXA-23 阴性	合计
亚胺培南敏感	8	9	17
亚胺培南耐药	53	2	55
合计	61	11	72

带 OXA-23 基因,其阳性率 84.72%。11 株 OXA-23 阴性菌株与第一部分药敏结果中的 9 例敏感菌株是一一对应关系,但 OXA-23 阳性菌株对碳青霉烯类耐药明显高于阴性菌株,有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

4. 整合子耐药基因检测:共 6 株不表达 I 类整合子的整合酶基因 *intI-1*,其阳性率 91.67%, II、III 类整合子的整合酶基因 *intI-2*、*intI-3* 未检测出来。

讨 论

由于鲍曼不动杆菌在环境中生存能力强,可广泛定植于各物体表面,如窗帘、门把手、血压计、机械通气设备、窗帘、输液泵、键盘等^[3],并可广泛分布于人体皮肤、呼吸道、消化道及泌尿生殖系统等部位,属于条件致病菌,在免疫力低下和应用免疫抑制剂的情况下才会起感染。所以诊断 Ab 感染时需慎重,应综合考虑患

者年龄、基础状况、住院时间、抗生素使用情况、有无气管插管等侵入性操作。本试验 72 例患者均有完整的临床数据,包括姓名、性别、年龄、基础疾病、诊断病情、住院天数、抗生素使用情况等。综合临床表现和实验室检查排除定植和污染菌株后,进一步研究其临床分布特征和耐药情况。

本试验发现 MDR-Ab 在 ICU 感染性疾病中所占比例最高,呼吸道是感染发生的主要部位。这可能是 ICU 患者病情危重、长期卧床、年龄偏大、免疫力低下,又加上长期使用呼吸机、反复吸痰等侵入性操作,从而破坏了呼吸道的天然屏障,增加了被感染机会。

从体外药敏结果看,目前临床常用 16 种抗生素中舒普深(头孢哌酮/舒巴坦)敏感性最高,提示舒普深仍为皖北地区治疗的首选药物。碳青霉烯类抗生素耐药率较高,且亚胺培南和美罗培南间存在不完全交叉性耐药,目前已有文献报道^[4],因此进行药敏试验时两者都是必须检测的。72 株 MDR-Ab 对其他 10 余种临床常用抗生素耐药率接近 100%。替加环素、多黏菌素 E 和利福平体外药物敏感性较高,因此应进一步开展大规模的动物、体内药物敏感性试验,同时应进行各药物间联合方案的研究,争取早日为临床治疗 MDR-Ab 感染提供最佳方案。

碳青霉烯类曾被作为抗感染治疗的最后防线,不幸的是,耐碳青霉烯类 Ab(CRAB)耐药率逐年增加,到 2008 年对亚胺培南和美罗培南耐药率已分别达到 77.27% 和 80%^[5]。本试验也发现亚胺培南和美罗培南的耐药率分别是 76.39% 和 77.78%。CRAB 的耐药机制复杂多样,主要机制是产生 D 类碳青霉烯酶基因, OXA-23 基因是目前流行传播范围最广的 D 类碳青霉烯酶,在全球各大洲均有发现^[6]。Ab 产生的 D 类碳青霉烯酶耐药基因共包括 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58 四组,而 OXA-24 和 OXA-58 在中国均未检测到, OXA-23 和 OXA-51 是国内流行的耐药基因,且 OXA-51 是 Ab 天然携带的耐药基因,水解碳青霉烯类抗生素能力较弱^[2]。本试验中 72 株 MDR-Ab 的 OXA-23 检出阳性率较高,是 2010 年至 2011 年间皖北地区三家医院内最主要的 D 类碳青霉烯酶基因,且 OXA-23 基因阳性菌株对亚胺培南耐药明显高于阴性株($P < 0.05$),进一步说明 OXA-23 基因是碳青霉烯类抗生素耐药的主要机制。但我们研究发现有 8 株 OXA-23 基因阳性而对亚胺培南敏感的菌株,这 8 株细菌对氨苄西林/舒巴坦和哌拉西林/他唑巴坦均耐药。李蓉等^[7]也发现 OXA-23 阳性而对亚胺培南敏感的菌株,其原因我们还需做进一步研究。11 株 OXA-23 阴性菌株与第一部分药敏结果中的 9 例亚胺培南敏感菌株是一一对

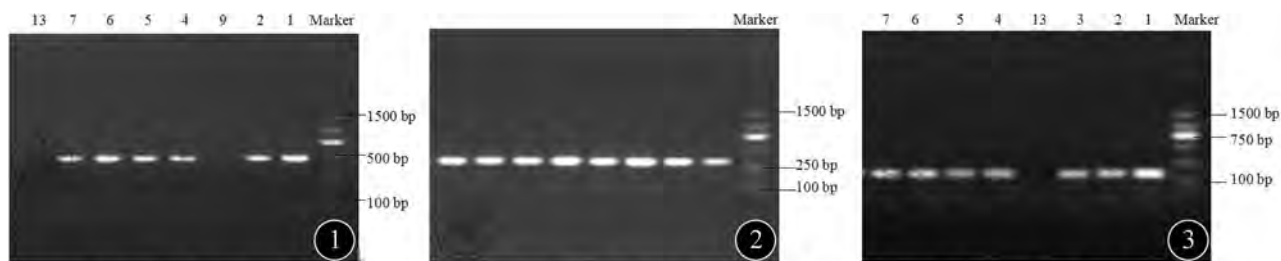


图1 OXA-23 (501 bp); 1, 2, 4, 5, 6, 7为阳性代表菌株; 9, 13为阴性代表菌株 图2 OXA-51 (353 bp); 各标本均为阳性菌株 图3 IntI-1 (160 bp); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7为阳性代表菌株; 13为阴性代表菌株

应关系,有2株 OXA-23 基因阴性但仍对碳青霉烯类耐药,说明尚存在其他耐药机制参与 MDR-Ab 对碳青霉烯类抗生素耐药。

整合子是一种基因单位,在整合酶的催化下通过特异性结合位点捕获外源性耐药基因并使之表达,同时它又可整合到质粒或染色体上,或自身作为转座子的一个组成部分而参与转移,使耐药基因在同种或不同种属细菌间广泛传播^[8]。目前 I ~ III 类整合子已证实与 Ab 耐药性相关,且 I 类整合子较常见,参与 β-内酰胺类、氨基糖苷类等多种抗生素耐药^[9-10]。本试验 72 株 MDR-Ab 中 I 类整合子的阳性率 91.67%,其携带情况明显高于大量文献报道^[11],与本试验选取标本均为 MDR-Ab 有关,并推测可能是其多重耐药的重要机制之一。

综上所述,虽然 MDR-Ab 对临床常用抗生素耐药率较高,但并非无药可治,替加环素、多黏菌素和利福平的体外药物敏感性结果令人满意。MDR-Ab 耐药机制复杂多样, I 类整合子携带率较高,OXA-23 是其对碳青霉烯类抗生素的主要耐药机制^[12]。我们应进一步开展各种敏感性较高的抗生素间联合应用方案探索和细菌耐药机制研究,为临床合理应用抗生素和新药研发提供实验室依据。

参 考 文 献

[1] Fishbain J, Peleg AY. Treatment of Acinetobacter infections. Clin In-

fect Dis, 2010, 51:79-84.

[2] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii; emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev, 2008, 21:538-582.

[3] 俞云松. 多药耐药鲍曼不动杆菌——21 世纪革兰阴性菌的“MR-SA”. 中华临床感染病杂志, 2009, 2:65-68.

[4] Lesho E, Wortmann G, Moran K, et al. Fatal Acinetobacter baumannii infection with discordant carbapenem susceptibility. Clin Infect Dis, 2005, 41:758-759.

[5] Baumgart AM, Molinari MA, Silveira AC. Prevalence of carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii in high complexity hospital. Braz J Infect Dis, 2010, 14:433-436.

[6] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54:24-38.

[7] 李蓉, 李文林, 石小玉, 等. 鲍曼不动杆菌 OXA-23 型碳青霉烯酶基因的研究. 中国抗生素杂志, 2007, 32:123-126.

[8] Mazel D. Integrons; agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol, 2006, 4:608-620.

[9] Kansakar P, Dorji D, Chongtrakool P, et al. Local dissemination of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clones in a Thai hospital. Microb Drug Resist, 2011, 17:109-119.

[10] Huang LY, Chen TL, Lu PL, et al. Dissemination of multidrug-resistant, class I integron-carrying Acinetobacter baumannii isolates in Taiwan. Clin Microbiol Infect, 2008, 14:1010-1019.

[11] 单霞, 黄茂, 梅亚宁. 鲍曼不动杆菌耐药性与 I 整合子关系研究. 南京医科大学学报:自然科学版, 2010, 30:82-86.

[12] 余琳, 江凤茹, 卢鉴财, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌 OXA-23 基因与 9acEΔ1 基因检测的研究. 检验医学与临床, 2011, 8:1793-1797.

(收稿日期:2012-03-01)

(本文编辑:戚红丹)