

青岛市ICU多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性及 β -内酰胺酶基因的检测

宋晓萍^{1*}, 兰翠霞¹, 王健¹, 孙明娥¹, 陈佳红², 李程³, 朱元祺⁴(1. 青岛市海慈医疗集团检验科, 山东青岛 266033; 2. 青岛市妇女儿童医院, 山东青岛 266011; 3. 青岛市市立医院, 山东青岛 266011; 4. 青岛大学医学院附属医院, 山东青岛 266003)

中图分类号 R969.3; R378.2; R446.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)34-3209-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.34.15

摘要 目的: 了解青岛市ICU鲍曼不动杆菌临床分离菌株的耐药特征, 检测并分析多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB) β -内酰胺酶基因分布情况, 为指导临床合理应用抗菌药物提供实验依据。方法: Vitek 2-compact微生物鉴定系统进行细菌鉴定试验; K-B琼脂纸片扩散法进行药敏试验; 对筛选出的36株MDRAB, 采用PCR技术检测TEM、CTX、GES、SHV、OXA、DHA、VIM等7种 β -内酰胺酶基因。结果: 在20种抗菌药物中MDRAB对其中的9种全部耐药, 仅对头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、多黏菌素B的敏感度较高, 且MDR组与非MDR组对10种抗菌药物的耐药率差异有统计学意义($P < 0.05$); β -内酰胺酶基因总检出率为30.56% (11/36), 基因TEM、CTX、GES、OXA、VIM检出率分别为13.89%、5.56%、5.56%、11.11%和2.78%, 未检出DHA、SHV基因。结论: 该市ICU鲍曼不动杆菌耐药情况严重, 尤其是多重耐药菌, 几乎对绝大多数临床常用抗菌药物都不敏感; β -内酰胺酶基因的存在和其产生的灭活酶是该市MDRAB对 β -内酰胺类抗生素耐药的重要机制之一, 其基因型主要为TEM和OXA, 部分菌株同时存在有两种 β -内酰胺酶基因参与细菌耐药性的形成。

关键词 鲍曼不动杆菌; 重症监护病房; 多重耐药; β -内酰胺酶基因

Detection of Drug Resistance and β -lactamase Gene of Multi-drug Resistant *Acinetobacter baumannii* in Intensive Care Unit of Qingdao Area

SONG Xiao-ping¹, LAN Cui-xia¹, WANG Jian¹, SUN Ming-e¹, CHEN Jia-hong², LI Cheng³, ZHU Yuan-qi⁴ (1. Dept. of Laboratory, Qingdao Hiser Medical Group, Shandong Qingdao 266033, China; 2. Qingdao Women and Children's Hospital, Shandong Qingdao 266011, China; 3. Qingdao Municipal Hospital, Shandong Qingdao 266011, China; 4. The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Shandong Qingdao 266003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To learn out the drug resistant characteristics of *Acinetobacter baumannii* isolates from Intensive Care Unit (ICU) of Qingdao area and detect the distribution of β -lactamase genes in multi-drug resistant *A. baumannii*, so as to provide experimental basis to guide the clinical use of antibiotics. METHODS: All strains were identified by Vitek 2-compact microbial identification system; K-B method was used for drug susceptibility test; PCR was applied to detect 7 types of β -lactamases genes (TEM, CTX, DHA, SHV, GES, OXA and VIM) among 36 strains of multi-drug resistant *A. baumannii*. RESULTS: Among 20 kinds of antibiotics, the resistant rates to 9 antibiotics were 100% in MDRAB, while the sensitive rate to cefoperazone/sulbactam, imipenem, meropenem and polymyxin B were higher; the difference of the resistance rates to 10 antibiotics between MDR strains and non-MDR strains were statistically significant ($P < 0.05$); the total positive rate of β -lactamases genes was 30.56% (11/36), and the positive rates of TEM, CTX, GES, OXA and VIM were 13.89%, 5.56%, 5.56%, 11.11% and 2.78%, DHA and SHV genes were not found. CONCLUSIONS: The resistance of *A. baumannii* in ICU is serious in this area, especially for multi-drug-resistant *A. baumannii*, which is hardly sensitive to most of commonly used antibiotics; the gene existence of β -lactamases and β -lactamases producing inactivator are the main resistance mechanisms of *A. baumannii* to β -lactam antibiotics. TEM and OXA are the major genotypes in this area. Some strains carry two types of β -lactamase genes involved in formation of bacterial drug resistance.

KEY WORDS *Acinetobacter baumannii*; ICU; Multi-drug resistance; β -lactamase genes

重症监护病房(ICU)是医院感染的高发场所。近年来, 随着临床上广谱抗生素的大量使用, 鲍曼不动杆菌的检出率及耐药率逐年攀升, 并呈现从单一耐药到多重耐药发展的趋势,

* 主管检验师。研究方向: 病原生物学。电话: 0532-83777810。
E-mail: qdhcsp@163.com

给临床抗感染治疗带来极大的挑战。鲍曼不动杆菌的耐药机制相当复杂, β -内酰胺酶是其中重要的耐药机制。由于不同国家和地区甚至不同医院抗生素使用习惯不同, 以及个体差异, 在抗生素的选择压力下筛选出来的 β -内酰胺酶的基因型也有所不同。本研究旨在对青岛市ICU分离的鲍曼不动杆菌耐

药性及β-内酰胺酶基因型进行研究,为临床治疗和控制多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)感染提供理论依据,也为多重耐药机制的深入研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

收集青岛市3所三级甲等综合性医院2010年9月—2011年9月ICU临床分离的鲍曼不动杆菌60株(菌株收集无重复,去掉同一患者不同部位送检样品)。其中青岛大学医学院附属医院、青岛市市立医院、海慈医院各20株。标本来源:呼吸道分泌物、血液、伤口分泌物、尿液、静脉导管、脑脊液以及胸腹水等。选取的菌株采用接种半固体冰箱保存。

1.2 仪器与试剂

Vitek 2-compact全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司);MIT-P型多点接种仪(日本Sakuma公司);Tanon EPS-100型电泳仪(北京原平皓生物技术有限公司);PTC-200型基因扩增仪(美国Bio-Rad公司);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。实验中所用20种抗菌药物均购自中国食品药品检定研究院。PCR试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司(大连TaKaRa公司)产品,引物由南京金思瑞生物科技有限公司合成。质控菌株:大肠埃希菌ATCC 25922、铜绿假单胞菌ATCC 27853,由海慈医院微生物实验室保存。

1.3 基因检测

采用煮沸法直接提取细菌DNA,PCR扩增体系为25 μl:10×Buffer 2.5 μl,MgCl₂ 1.5 mmol/L,上下游引物各0.4 μmol/L,Taq DNA聚合酶1.0 U,dNTPs 0.2 mmol/L,DNA模板3 μl,PCR专用水加至25 μl。各基因PCR循环条件为:94℃预变性5 min;然后94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果并用凝胶成像仪照相保存结果,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Tab 1 Sequence of PCR primer

引物	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
TEM	P1 ATGAGTATTCAACATTTTCGTG	860
	P2TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
CTX	P1 CCCATTGGTTAAAAATCACT	866
	P2 GTTTCGGCTATTACAAACCG	
SHV	P1 ATGCGTTATATTCGCCTGTG	860
	P2 TTAGCGTTGCCAGTGCTCGA	
GES	P1 ATGCGCTTCATTACGCAC	846
	P2 CTATTTGTCGGTGCTCAGG	
OXA	P1 GTCTTCAAGTACGGCATT	822
	P2 GATTTTCTTAGCGCACTTA	
VIM	P1 ATTCGGTCCGAGAGGTCCG	633
	P2 GAGCAAGTCTAGACCGCCG	
DHA	P1 AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
	P2 CCGTACGCATACTGGCTTAGC	

1.4 统计学分析

采用世界卫生组织细菌耐药性监测中心推行的WHO-NET 5.4统计软件和SPSS 13.0进行数据处理,MDRAB组与非

MDRAB组对20种抗菌药物的耐药率进行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本类型分布

ICU鲍曼不动杆菌临床分离菌株来源于7种临床标本,其中以呼吸道分泌物最多,占81.67%;其次是外周血标本,占6.67%。具体标本来源分布及构成比见表2。

表2 菌株来源分布及构成比

Tab 2 Source distribution and constituent ratio of strains

标本类型	株数	构成比, %
呼吸道分泌物	49	81.67
血液	4	6.67
伤口分泌物	2	3.33
尿液	2	3.33
胸腹水	1	1.67
脑脊液	1	1.67
静脉导管	1	1.67
合计	60	100

2.2 药敏结果

60株鲍曼不动杆菌中多重耐药菌株36株,检出率60.00%(36/60);泛耐药菌株10株,检出率为16.67%(10/60)。在20种药物中MDRAB对其中的9种药物全部耐药,仅对头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、多黏菌素B的敏感度较高,其敏感率分别为47.22%、55.56%、52.78%、100%。将MDRAB($n=36$)与非MDRAB($n=24$)两者对20种药物的耐药率进行比较,MDRAB对10种药物的耐药率均高于非MDR-AB菌株,经 χ^2 检验 $P<0.05$,表明两者的耐药率差异有统计学意义。具体耐药率及统计分析结果见表3。

表3 MDRAB与非MDRAB耐药率比较

Tab 3 Comparison of resistance rate between MDRAB and non-MDRAB strains

药品名称	MDRAB($n=36$)			非MDRAB($n=24$)			χ^2 值	P
	耐药	敏感	耐药率, %	耐药	敏感	耐药率, %		
哌拉西林	36	0	100	24	0	100		
替卡西林	36	0	100	24	0	100		
氨苄西林/舒巴坦	36	0	100*	18	6	75.00	10.000	0.003
哌拉西林/他唑巴坦	29	7	80.56	14	10	58.33	3.502	0.061
替卡西林/克拉维酸	34	2	94.44*	17	7	70.83	6.296	0.012
头孢哌酮/舒巴坦	19	17	52.78	8	16	33.33	2.200	0.138
头孢噻肟	36	0	100*	19	5	79.17	8.182	0.004
头孢他啶	35	1	97.22*	17	7	70.83	8.678	0.003
头孢曲松	34	2	94.44*	16	8	66.67	8.000	0.005
头孢吡肟	31	5	86.11*	14	10	58.33	5.926	0.015
亚胺培南	16	20	44.44	5	19	20.83	3.529	0.060
美罗培南	17	19	47.22	6	18	25.00	3.008	0.083
庆大霉素	36	0	100*	21	3	87.50	4.737	0.030
阿米卡星	29	7	80.56	15	9	62.50	2.401	0.121
妥布霉素	36	0	100*	19	5	79.17	8.182	0.004
环丙沙星	36	0	100*	20	4	83.33	6.429	0.011
左氧氟沙星	33	3	91.67*	17	7	70.83	4.500	0.034
呋喃妥因	36	0	100	24	0	100		
复方磺胺甲噁唑	36	0	100	24	0	100		
多黏菌素B	0	36	0	0	24	0		

与非MDRAB组比较: * $P<0.05$

vs. non-MDRAB group: * $P<0.05$

2.3 β -内酰胺酶基因检测结果

36株MDRAB, β -内酰胺酶基因总检出率为30.56%(11/36)。其中检出率最高的是TEM基因,其检出率为13.89%(5/36);其次为OXA基因11.11%(4/36);CTX和GES基因均为5.56%(2/36);本次试验中还检出1例VIM基因,检出率为2.78%(1/36);未检出SHV和DHA基因。2例分离菌株同时检测到TEM、OXA两种基因,1例菌株同时检测到CTX、GES两种基因。MDRAB的阳性基因类型及构成比见表4,阳性基因电泳图见图1~图5。

表4 36例MDRAB菌株 β -内酰胺酶基因类型及构成比

Tab 4 Type and constituent ratio of β -lactamases genes in MDRAB of 36 cases

基因型	阳性菌株数	构成比, %
TEM	3	27.27
CTX	1	9.09
GES	1	9.09
TEM+OXA	2	18.18
CTX+GES	1	9.09
OXA	2	18.18
VIM	1	9.09
合计	11	100

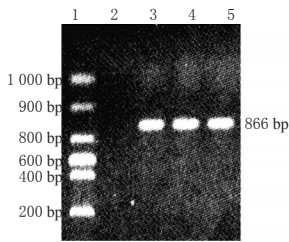


图1 CTX扩增产物电泳结果

1. DNA分子标记; 2. 阴性对照; 3. CTX阳性对照; 4、5. CTX阳性扩增产物

Fig 1 Electrophorogram of CTX gene amplified products

1. DNA marker; 2. negative control; 3. CTX positive control; 4-5. CTX positive amplification products

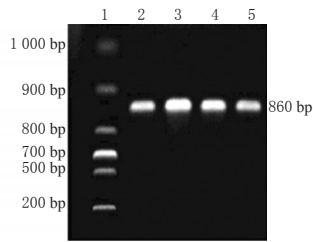


图2 TEM扩增产物电泳结果

1. DNA分子标记; 2. TEM阳性对照; 3、4、5. TEM阳性扩增产物

Fig 2 Electrophorogram of TEM gene amplified products

1. DNA marker; 2. TEM positive control; 3-5. TEM positive amplification products

3 讨论

青岛市ICU分离的60株鲍曼不动杆菌中,有49株在呼吸道分泌物中检出,占81.67%,提示呼吸道感染是鲍曼不动杆菌感染的主要途径,这与国内其他地区或医院情形相似^[1-4]。这可能与ICU患者病情危重、高龄、免疫功能低下、卧床时间较长、意识障碍以及咳嗽反射不同程度的减弱甚至消失,造成痰液不易排出,使误吸机会增多有关。另外,气管插管、气管切开、吸痰、频繁使用呼吸机等均可破坏气管正常的免疫防御功能,导致黏膜上皮受损,气管纤毛的清除能力不同程度地削

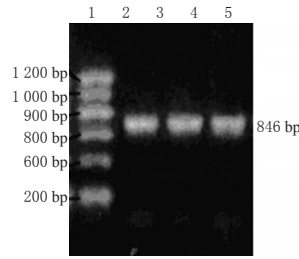


图3 GES扩增产物电泳结果

1. DNA分子标记; 2. GES阳性对照; 3、4. GES阳性扩增产物

Fig 3 Electrophorogram of GES gene amplified products

1. DNA marker; 2. GES positive control; 3-4. GES positive amplification products

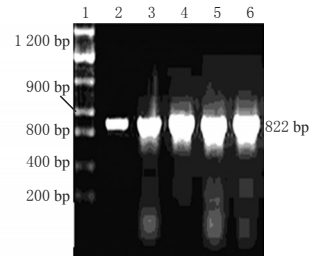


图4 OXA扩增产物电泳结果

1. DNA分子标记; 2. OXA阳性对照; 3、4、5、6. OXA阳性扩增产物

Fig 4 Electrophorogram of OXA gene amplified products

1. DNA marker; 2. OXA positive control; 3-6. OXA positive amplification products

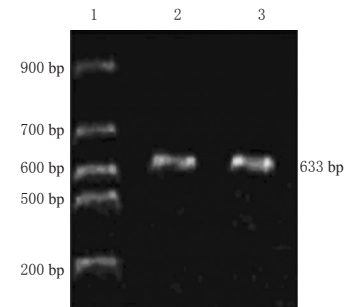


图5 VIM扩增产物电泳结果

1. DNA分子标记; 2. VIM阳性对照; 3. VIM阳性扩增产物

Fig 5 Electrophorogram of VIM gene amplified products

1. DNA marker; 2. VIM positive control; 3. VIM positive amplification products

弱甚至丧失,使细菌容易黏附并定植于下呼吸道,这些均增加了患者呼吸道感染的机会。

该市ICU鲍曼不动杆菌耐药情况严重,尤其是多重耐药菌,几乎对绝大多数临床常用药都不敏感,仅对头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、多黏菌素B的敏感度较高,对多黏菌素B敏感度为100%。头孢哌酮/舒巴坦是第3代头孢菌素和舒巴坦的复合制剂,舒巴坦是一种半合成的 β -内酰胺酶抑制剂,能不可逆地与鲍曼不动杆菌中的PBP₂结合,对其具有天然的杀菌活性。长期以来碳青霉烯类药物对鲍曼不动杆菌具有良好的抗菌活性,是治疗鲍曼不动杆菌感染最有效的药物。但随着此类药物的广泛应用,耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的分离率越来越高。多黏菌素B和多黏菌素E是1947年首次分离成功的肽类抗生素,主要作用于细菌细胞膜,使细胞内的重要物质外漏,为慢效杀菌剂,其不良反应明显(主要为肾毒性和神经毒性)。但由于该类药物的抗菌作用强且不易产生耐药性,故当鲍曼不动杆菌对其他抗菌药物耐药或疗效不佳时,仍可作为选用药物。对多重耐药菌株感染选用该药已有治疗成功的报道,但因其肾毒性大,对重症患者特别是肾功能不全患

者要在密切监测血肌酐、尿素氮水平下使用。2001年Urban C等^[9]报道了1例多黏菌素B耐药的鲍曼不动杆菌。综上所述,针对临床鲍曼不动杆菌感染可以选择性使用敏感率比较高的碳青霉烯类药物(如亚胺培南、美罗培南)和含酶抑制剂类药物(如头孢哌酮/舒巴坦),必要时可在严密监测肾功能的情况下考虑采用多黏菌素治疗。

β -内酰胺类抗菌药物是目前临床应用最广的一类抗菌药物,包括青霉素类、头孢菌素类、单环 β -内酰胺类以及碳青霉烯类等,为临床常用药物。其耐药机制为:产生能水解药物的 β -内酰胺酶;青霉素结合蛋白(PBPs)的改变;外膜孔蛋白结构和数量的改变;外排泵的激活。而产 β -内酰胺酶是其中重要的耐药机制,由于不同国家和地区甚至不同医院抗生素使用习惯不同,以及个体差异,在抗生素的选择压力下筛选出来的 β -内酰胺酶的基因型也有所不同。本研究36株MDRAB中 β -内酰胺酶基因总检出率为30.56%(11/36),该酶可水解 β -内酰胺环,使其丧失抗菌活性。按分子生物学分类(Ambler分类)可分为4类:A类主要是超广谱 β -内酰胺酶,B类为金属 β -内酰胺酶,C类为头孢菌素酶(AmpC),D类为苯唑西林酶(OXA酶)。超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)多数自TEM型和SHV型酶衍生而来,一般由质粒介导,对青霉素,第1、2、3代头孢菌素,单环菌素耐药,但对头霉素类、碳青霉烯类药物及酶抑制剂敏感。其活性可被 β -内酰胺酶抑制剂(舒巴坦、克拉维酸、他唑巴坦)抑制。各个国家、地区、医院流行的ESBL基因型各不相同,如美国以TEM-10、12和26型ESBL为主;欧洲国家如英国以TEM-10和12型ESBL为主,法国以SHV-3、4和TEM-3型ESBL为主;我国以CTX-M型ESBL为主。TEM、SHV、OXA、CTX、VIM、GES基因等是常见的ESBLs。本研究对36株多重耐药菌基因的检测结果显示,10株(27.78%)扩增到ESBLs基因,其中5株检出TEM基因(检出率为13.89%),4株检出OXA基因(检出率为11.11%),2株检出CTX和GES基因(检出率为5.56%),未检出SHV,表明本地区以TEM和OXA型ESBLs流行为主。B类 β -内酰胺酶即金属 β -内酰胺酶(MBL),又称金属酶,与传统的 β -内酰胺酶不同,其活性中心为金属离子,以青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类等绝大多数 β -内酰胺类抗生素为底物,其活性可被离子螯合物EDTA、菲咯啉或巯基类化合物所抑制,但不能被常见的 β -内酰胺酶抑制剂(舒巴坦、克拉维酸、他唑巴坦)抑制。目前在鲍曼不动杆菌中已发现的金属酶有IMP、VIM和SIM型^[6]。赵旺胜等^[7]在8株耐亚胺培南的鲍曼不动杆菌中检测到2株携带VIM型基因,这是我国首次报道的VIM型金属酶基因。随后肖燕、张永明等^[8-9]也在耐药的鲍曼不动杆菌中检测到VIM型金属酶基因。本实验也检出1株VIM基因阳性菌株,检出率为2.78%(1/36)。C类 β -内酰胺酶简称AmpC酶,又称为头孢菌素酶,由不动杆菌染色体(由ADC基因编码)或质粒(由DHA基因编码)编码产生,可水解青霉素、第3代头孢菌素及单环酰胺类,不被克拉维酸抑制,可

被氯唑西林抑制。AmpC酶按其产生方式可分为3类:诱导高产酶、持续高产酶和持续低产酶,前两者与 β -内酰胺类抗生素的诱导有关。染色体介导的去阻遏高产AmpC酶是鲍曼不动杆菌对第3代头孢菌素耐药的主要原因。ADC为不动杆菌特有的染色体介导的头孢菌素酶,国内已有不少关于MDRAB菌ADC基因检出率较高的报道^[10]。本研究中未检出DHA基因,说明在AmpC酶引起鲍曼不动杆菌的耐药可能主要由染色体(由ADC基因编码)而非质粒(由DHA基因编码)编码产生。

本研究首次为该市ICU提供了鲍曼不动杆菌临床分离株的耐药特征及相关耐药基因检测等实验数据,对该市ICU鲍曼不动杆菌感染的耐药性监控以及临床治疗中抗菌药物选择等均具有指导意义,也为开展鲍曼不动杆菌临床分离株多重耐药机制的深入研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 郑沁,赖怡,康梅,等.华西医院重症监护病房连续两年院内感染革兰阴性杆菌的耐药性监测[J].中国抗生素杂志,2008,33(1):20.
- [2] 肖永红,王进.2006—2007年Mohnarín ICU病原菌耐药性监测[J].中华医院感染学杂志,2008,18(9):1223.
- [3] 熊丽蓉,刘耀,谢林利,等.我院2006—2011年鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J].中国药房,2012,23(46):4369.
- [4] 王顺,贾征夫.ICU 288株鲍曼不动杆菌的耐药性探讨[J].中华医院感染学杂志,2011,21(23):5066.
- [5] Urban C, Mariano N, Rahal JJ, et al. Polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate susceptible to recombinant BPI and cecropin P1[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 4(5):994.
- [6] Jones RN, Biedenbach DJ, Sader HS, et al. Emerging epidemic of metallo- β -lactamase mediated resistances[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005, 51(2):77.
- [7] 赵旺胜,江淑芳,顾兵,等.鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药性及耐药基因型分析[J].南京医科大学学报:自然科学版,2006,26(10):929.
- [8] 肖燕,姚怡,朱雪明,等.鲍曼不动杆菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药性及耐药基因型研究[J].临床输血与检验,2008,10(3):230.
- [9] 张永明,薛晓东,魏莲花,等.鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药基因研究[J].第四军医大学学报,2009,30(17):1600.
- [10] 侯天文,尹晓琳,陈兴,等.多重耐药鲍曼不动杆菌blaADC酶耐药基因检测及临床特点分析[J].中国病原生物学杂志,2008,3(1):8.

(收稿日期:2013-03-16 修回日期:2013-05-27)