

ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性和同源性分析

胡耀华,王红梅,谢小武

(南华大学附属南华医院 检验科,湖南 衡阳 421002)

摘要: **目的** 通过对重症监护病房(ICU)的多重耐药鲍曼不动杆菌进行同源性分析,进行院内感染的基线调查,并分析其耐药谱特征,为临床防治和控制院内感染提供依据。 **方法** 测定 17 种抗菌药物对 62 株鲍曼不动杆菌的最低抑菌浓度(MIC),并采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术分析其耐药株的同源性。 **结果** 有 16 株鲍曼不动杆菌对头孢菌素类、氨基甙类和氟喹诺酮类等抗菌素均显示出较高水平的多重耐药性;其中 4 株 RAPD 分型显示有高度同源性。 **结论** 分离自 ICU 的鲍曼不动杆菌多重耐药率高达 21%,且大多数菌株有高度同源性。因此建立全面的药敏谱和 RAPD 基因分型体系,加强鲍曼不动杆菌耐药监测,为及时找到感染源头、有效控制医院感染提供依据。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 多重耐药; 同源性; 随机扩增多态性 DNA 技术

中图分类号:R378 文献标识码:A 文章编号:2095-1116(2011)03-0333-04

Multidrug Resistance of *Acinetobacter Baumannii* and Homology Analysis

HU Yao-hua, WANG Hong-mei, XIE Xiao-wu

(Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** Through the homogeneous analysis of the multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit (ICU), the baseline survey of hospital infection was carried out and the spectral characteristics of drug resistance was analyzed so as to provide evidence for clinical prevention and control of hospital infection. **Methods** The minimum inhibitory concentration (MIC) of 17 kinds of antimicrobial agents against 62 strains of *Acinetobacter baumannii* were detected and the homology of resistant strains were analysed by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technology. **Results** Sixteen strains of *Acinetobacter baumannii* were multi-resistant to cephalosporins, aminoglycosides and fluoroquinolone antibiotics, 4 strains were highly homologous by randomly amplified polymorphic DNA technique (RAPD). **Conclusion** The multi-drug resistance rate of *Acinetobacter baumannii* isolated from ICU was up to 21%. Most of the strains were highly homologous by RAPD technique. In order to find the source of infection and provide evidence of controlling hospital infections effectively, we should establish a comprehensive spectrum of antibiotics and RAPD genotyping system and strengthen the monitoring of drug resistance of *Acinetobacter baumannii*.

Key words: *acinetobacter baumannii*; multidrug-resistant; homology; randomly amplified polymorphic DNA technique

近年来,鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)在不动杆菌属中流行范围最广,约占 90%,在住院患者中的定植率也可高达 75%^[1]。在医院环境中,由于长期频繁使用抗生素,该菌易出现对多种抗菌药物耐药,甚至出现对常用的抗假单胞菌属的青霉素类、头孢菌素类、单环 β 内酰胺类、氨基糖苷

类、喹诺酮类、碳青霉烯类、氯霉素和利福平等均耐药的菌株(中介菌株划为耐药),即多重耐药/泛耐药现象^[2]。其耐药机制较为复杂^[3],主要是细菌产生了能水解碳青霉烯类的 β -内酰胺酶(碳青霉烯酶),以及其外膜通透性的改变。目前,世界上有多个国家和地区已有 Ab 医院感染暴发流行的报道,

已引起临床严重关注。该菌在医院的环境中分布很广且可长期存活,已成为重症监护病房感染的主要病原菌,且呈逐年增多趋势。为了解 Ab 在医院感染的流行现状和院内感染情况,对本院 2009 年 1 月~2010 年 3 月 ICU 病房分离出的 62 例 Ab 中的 16 株多重耐药株测定 17 种抗菌药物的药物敏感试验,并采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术对耐药株的同源性进行分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

dNTPs、TaqDNA 聚合酶、随机引物 5'-AAG AGC CCG T-3' 均由大连宝生生物工程有限公司提供。VITEK-2 全自动细菌培养鉴定仪及 GNI 鉴定卡为法国梅里埃产品;紫外测定仪:PE 公司;PCR 扩增仪:Eppendorf 公司;凝胶图像分析系统:黑马公司。

1.2 菌株来源

从 2009 年开始对 ICU 病房每位病人在进入病房的 24 h 内,每间隔 1 周以及出 ICU 病房时分别对病人和环境因素(氧气湿化瓶、医护人员的手、呼吸机面板等)采集标本,至 2010 年 3 月共检出 62 例 Ab,对 62 株细菌均经 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃公司)鉴定。标准菌株:铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和大肠埃希菌 ATCC 25922 购自于北京天坛药物制品鉴定所生物技术开发公司。采用生物梅里埃公司 ATB 药敏试验板测定 17 种抗菌药物的敏感性。

1.3 方法

1.2.1 抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)的测定
对 62 株 Ab 菌株纯培养后,用 ATB 药敏试验条板微量肉汤法进行 17 种抗生素的 MIC 检测,35℃ 孵育 18 h,以无菌落形成时抗菌药物最低浓度为 MIC。结果解释参照 2009 年 CLSI 的标准判定。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.2.2 RAPD 试验基本方法^[4] DNA 模板浓度直接影响产物数量从而产生不同指纹图,经多次试验得到合适的模板浓度。模板提取:在 4 mL LB 液体培养基中接种单个 Ab 菌落,振荡并 37℃ 过夜增菌,收集 1.5 mL 细菌过夜培养基 5 000 r/min 离心 5 min,沉淀物以 1.5 mL 无菌 PBS 缓冲液(0.01 mol/L、pH 7.5)洗涤 1 次再提取模板 DNA,得到基因组 DNA 在紫外分光光度计上测量 OD 值。使 $A_{260\text{nm}}$ 处有显著吸收峰, A_{260}/A_{280} 为 1.7~1.9^[5]。

1.2.3 RAPD 引物 筛选设计了 2 组随机引物,分别对其中 12 株细菌模板进行反复多次 RAPD,筛选出随机引物 5'-AAG AGC CCG T-3',为稳定性、重复性较理想的引物,浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.4 反应体系优化组成与扩增条件 为了得到重复性较好、分辨率较高的条带,进行了反复多次体系优化比较试验,最后采用反应体系总体积 25 μL ,Tris-Cl 10 mmol/L,DNA 模板 25 ng,KCL 50 mmol/L,明胶 0.1 mmol/L,Taq 酶 0.5 μL ,4 种 dNTP 0.1 mmol/L,氯化镁浓度为 2 mmol/L。PCR 反应条件:95℃ 3 min,94℃ 1 min,36℃ 1 min,72℃ 2 min 进行 40 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。

1.2.5 PCR 产物检测及成像 取扩增产物 15 μL ,在 2% 琼脂糖凝胶上电泳,64 V、2 h。取出凝胶置紫外测定仪上检测。凝胶成像系统进行拍照,以便于 RAPD 型间直观比较。

1.2.6 可重复性检测 所有模板 DNA 都经过两次以上 RAPD 扩增,得到条带的位置是固定和清晰的。

2 结 果

分析 62 株 Ab 抗菌药物敏感性实验结果,有 16 株 Ab 对阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林、阿米卡星、头抱噻吩、头抱噻肟、替卡西林以及庆大霉素全部耐药,对哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/克拉维酸、头抱他啶、头抱吡肟、氨曲南、亚胺培南、美洛培南、复方新诺明、环丙沙星等临床上常用的抗菌药物也多数不敏感或仅中度敏感,呈现多重耐药状态(表 1)。

62 株 Ab 中 13 例病人检出多重耐药,3 株是病人进入 ICU 24 h 内采集的标本,多重耐药 Ab 阳性,排除院内感染;3 株是入院 24 h 内未检出 Ab,但在 1 周后检出 Ab 感染,同时间段内氧气湿化瓶、医护人员的手、呼吸机面板等环境因素采集的标本未检出多重耐药 Ab,确定是院内感染;7 例多重耐药 Ab 阳性病人同时对环境因素(氧气湿化瓶、医护人员的手、呼吸机面板)采集标本,共检出 16 例多重 Ab,需做同源性分析以判断是否院内感染(表 2)。

对 7 例病人中包括医护人员的手和可疑环境因素共 16 株多重耐药 Ab 做 RAPD 扩增同源性分析,a 株为病人入院 1 周后标本检测株,b 株为病人环境采集株,c 株为病人入院 24 h 内标本检测株。从图 1 可见,7 例病人中有 3 例病人虽然环境标本也检出 Ab,但 RAPD 扩增分析 DNA 不同源,可排除院内感染,可见 ICU Ab 院内感染率高达 53.8%。

表 1 16 株鲍曼不动杆菌对 17 种抗菌药物的敏感性 (株)

药物	敏感(S)	中敏(I)	耐药(R)
阿莫西林	0	0	16
阿莫西林/克拉维酸	0	0	16
哌拉西林	0	0	16
阿米卡星	0	0	16
庆大霉素	0	0	16
替卡西林	0	0	16
哌拉西林/他唑巴坦	0	1	15
替卡西林/克拉维酸	0	0	16
头孢噻吩	0	0	16
头孢噻肟	0	0	16
头孢他啶	0	0	16
头孢吡肟	0	0	16
氨基糖甙	0	0	16
亚胺培南	9	0	7
美洛培南	11	0	5
复方新诺明	1	1	14
环丙沙星	1	0	15

表 2 13 例多重耐药鲍曼不动杆菌检出时间和分布情况

入院 24 h 内	环境标本	入院 1 周后	检出阳性例数	
+	-	-	3	非院内感染
-	-	+	3	院内感染
-	+	+	5	同源性分析
+	+	+	2	同源性分析

3 讨 论

由于广谱抗菌药物长期广泛的应用及抗菌药物的不合理使用,根据 2008 年 Mohnarin 细菌耐药监测报告显示,国内细菌耐药情况整体水平高于国外平均水平,其中不动杆菌对碳青霉烯类耐药呈逐年

上升趋势,耐药率接近 50%,比国外高 20% ~ 30% 左右,Ab 在不动杆菌中耐药情况最严重。Ab 主要引起呼吸道感染,也可引发败血症、泌尿系感染、继发性脑膜炎等。Ab 在医院的环境中分布很广且可长期存活,对危重患者和 CCU 及 ICU 中的患者威胁很大,甚至暴发^[6-8]。也将此类感染称做 ICU 获得性感染。多重耐药的 Ab 在台湾以及内地均已出现,应引起高度警惕。本实验结果表明,在这次院内感染的基线调查中 62 株临床标本 Ab 中有 13 株呈多重耐药,检出率高达 21%,因此,及时准确地检出耐药菌株,对建立和完善抗菌药物临床应用和细菌耐药预警机制,并采取相应的措施具有十分重要的意义^[9]。

从 16 株 Ab 对阿莫西林等 17 种药物敏试验中可以看出,Ab 对氨基糖苷类、 β -内酰胺类及喹诺酮类三类抗生素同时耐药,均呈现多重耐药状态,对碳青霉烯类抗生素亚胺培南耐药率也接近 50%,部分菌株已是多重耐药菌株,应及时与医院感染控制科和 ICU 联系,防止院内感染的爆发或流行。

从图 1 可看出,7 例病人中有 2、4、5、6 等 4 例病人标本和环境采集标本(氧气湿化瓶、医护人员的手、呼吸机面板)的条带完全相同,说明这 4 例病人属于院内感染,从中可看出受污染的物体表面,如氧气湿化瓶、医务人员及呼吸机面板等是造成多重耐药 Ab 医院感染的重要因素,因此,应当加强医务人员的手卫生,医务人员在直接接触患者前后、接触患者使用过的物品后以及对患者实施诊疗护理操作前后实施操作时,都应当洗手;完成对多重耐药菌感染患者或者定植患者的诊疗护理操作后,必须及时脱去手套和隔离衣;对多重耐药菌感染患者和定植患者实施隔离措施,不能将多重耐药菌感染患者或者定植患者与气管插管、深静脉留置导管、有开放伤口或者免疫功能抑制患者安置在同一房间;加强医院环境卫生管理,对收治多重耐药菌感染患者和定

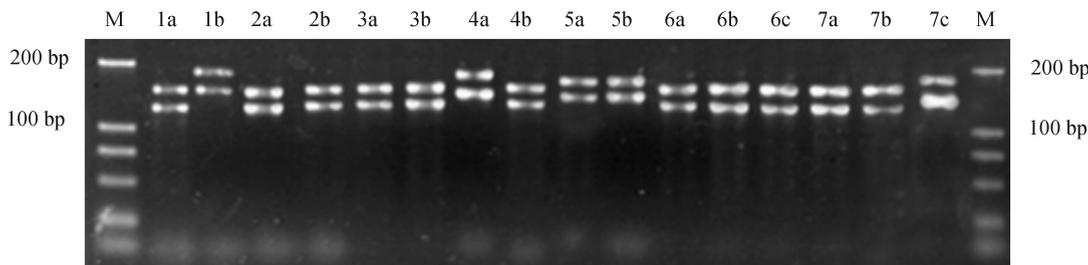


图 1 7 例病人 16 株多重耐药 Ab 的 RAPD 分析

M: DNA Mark; 1、4、7 为 3 例病人标本和环境标本不同源; 2、3、5、6 为 4 例病人标本和环境标本同源。 a: 病人入院 1 周后标本检测株; b: 病人环境采集株; c: 病人入院 24 h 内标本检测株

植患者的病房,应当使用专用的物品进行清洁和消毒,对患者经常接触的物体表面、设备设施表面,应当每天进行清洁和擦拭消毒。出现或者疑似有多重耐药菌感染暴发时,应当增加清洁和消毒频次。应当严格遵守无菌技术操作规程,特别是实施中心静脉置管、气管切开、气管插管、留置尿管、放置引流管等操作时,应当避免污染,减少感染的危险因素。只有及时找到感染源头,切断多重耐药/泛耐药鲍曼不动杆菌的传播途径,建立全面、具有代表性的药敏谱和 RAPD 基因分型体系,加强 Ab 耐药监测和耐药机制研究^[10],才能有效控制医院内感染的播散流行。

参考文献:

[1] 张 樱. 不动杆菌感染及耐药机制的研究进展[J]. 国外医学·流行病学传染病学分册,2005,32(2):109-112.

[2] 王 辉,孙宏莉,宁永忠,等. 不动杆菌属多重耐药及泛耐药的分子机制研究[J]. 中华医学杂志,2006,86(1):17-22.

[3] Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistance *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenemhydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistant in *A. baumannii* is not due solely to the presence of betalactamases [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9):3299-3305.

[4] 贺 文,岳红坤,刘福英. 随机扩增多态性 DNA 原理及其在动物研究中的应用[J]. *生物学通报*, 2005, 40(6):15-17.

[5] Gilad J, Crameli Y. Treatment options for multidrug-resistant *acinetobacter* species [J]. *Drugs*, 2008, 68(2):165-189.

[6] Corbella X, Montero A, Pujol M, et al. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *A. cinetobacter baumannii* [J]. *Clin Microbiol*, 2000, 38(11):4086-4095.

[7] Das I, Lambert P, Hill D, et al. Carbapenem resistant *A. cinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units [J]. *Hosp Infect*, 2002, 50(2):110-114.

[8] Go E S, Urban C, Burns J, et al. Clinical and molecular epidemiology of *A. cinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam [J]. *Lancet*, 1994, 344(8933):1329-1332.

[9] Liao CH, Sheng WH, Chen YC. Predictive value of the serum bactericidal test for mortality in patients infected with multidrug-resistant *acinetobacter baumannii* [J]. *J Infect*, 2007, 5(53):260-263.

[10] Li WL, LIR, Shi XY, et al. Study on ESBLs gene of TEM-1 type and multi-dryg resistance of *acinetobacter baumannii* [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2006, 16(21):3257-3260.