

多重耐药鲍曼不动杆菌耐药谱及耐消毒剂 qacEΔ1 基因分析^{*}

龙 琴¹, 刘 影¹, 彭宇生¹, 刘靳波² (1. 四川省宜宾市第一人民医院检验科 644000; 2. 四川医科大学第一附属医院检验科, 四川泸州 644000)

【摘要】 目的 了解多重耐药鲍曼不动杆菌的临床分布、耐药谱特征及耐消毒剂基因 qacEΔ1 的携带情况, 为医院感染防控提供实验室依据。**方法** 收集 2013 年 10 月至 2014 年 8 月临床标本中分离的鲍曼不动杆菌共 56 株, 分别采用微量肉汤稀释法和聚合酶链反应(PCR)进行药物敏感性试验和耐消毒剂基因 qacEΔ1 的检测; 随机抽取 qacEΔ1 基因阳性标本进行序列测定。**结果** 临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌主要分离于痰液和分泌物标本, 分别占 70.7% 和 15.5%; 病区主要来自重症监护病房和呼吸内科, 分别占 41.1% 和 17.9%。药敏试验除对头孢哌酮/舒巴坦(32.1%)的耐药率较低外, 对其余抗菌药物普遍耐药。耐消毒剂 qacEΔ1 基因检测出 50 株阳性标本, 携带率为 89.3%。测序结果与 GeneBank 中相应基因序列相比较, 同源性为 98%。**结论** 多重耐药鲍曼不动杆菌以呼吸道为主要感染途径且病区集中趋势明显。耐消毒剂 qacEΔ1 基因携带率高, 加强监测多重耐药鲍曼不动杆菌的消毒剂抗性, 对临床科学使用消毒剂具有重要意义。

【关键词】 鲍曼不动杆菌; 多重耐药; 消毒剂抗性; qacEΔ1

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.016 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)07-0904-03

Analysis of drug resistance spectrum and qacEΔ1 disinfectant resistant gene in multi-drug resistant Acinetobacter baumannii^{*} LONG Qin¹, LIU Ying¹, PENG Yu-sheng¹, LIU Jin-bo² (1. Department of Clinical Laboratory, Yibin Municipal First People's Hospital, Yibin, Sichuan 644000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 644000, China)

【Abstract】 Objective To understand the clinical distribution, drug-resistant spectrum features and of carrying situation disinfectant resistant gene qacEΔ1 in multi-drug resistant Acinetobacter baumannii in order to provide the experimental evidences for the prevention and control of nosocomial infection. **Methods** 56 strains of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii isolated from the clinical samples from October 2013 to August 2014 were collected. The drug susceptibility test and detection of disinfectant resistant qacEΔ1 gene were performed by adopting the broth dilution method and polymerase chain reaction (PCR) respectively; the positive samples of qacEΔ1 gene positive were randomly extracted to conduct the sequencing measurement. **Results** 56 strains were mainly isolated from sputum specimens and secretion samples, accounting for 70.7% and 15.5% respectively; the departments were mainly come from the intensive care unit (ICU) and respiratory medicine, accounting for 41.1% and 17.9% respectively. Except for the lower resistant rate (32.1%) of cefoperazone/sulbactam in the drug susceptibility test, the results showed general resistance to other antibacterial drugs. In the disinfectant resistant gene qacEΔ1 detection, 50 positive strains were detected out with the carrying rate of 89.3%. In the comparison between the sequencing results and the corresponding sequence on GeneBank, the homology was 98%. **Conclusion** The respiratory tract is the main infectious pathway of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii in clinic, moreover the endemic area centralized trend is obvious. The carrying rate of disinfectant resistant qacEΔ1 gene is high. Strengthening the disinfectant resistance monitoring of multi-drug resistant Acinetobacter baumannii has an important significance for the scientific use of disinfectants in clinic.

【Key words】 acinetobacter baumannii; multi-drug resistant; disinfectant resistance; qacEΔ1

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要条件致病菌之一, 可从患者痰液、血液、尿液、伤口脓液、胸腔积液和腹水等标本中分离, 可引起医院获得性肺炎、血流感染、腹腔感染、中枢神经系统感染、泌尿系统感染、皮肤软组织感染等^[1]。近年来耐药率不断攀升, 多重耐药、广泛耐药、全耐药鲍曼不动杆菌已呈世界性流行^[2], 成为全球抗感染领域的新挑战^[3]。消毒是目前预防和控制医院感染的主要方法和手段, 利用消毒剂对医院病房、院区环境及医护人员的手等进行消毒, 可杀灭病原菌, 切断传播途径, 避免交叉感染。消毒剂种类繁多, 其中季铵盐类消毒剂因杀菌浓度低、气味小、稳定性好、毒性与刺激性低等优点, 在临

床应用十分广泛。同抗菌药物的使用一样, 由于消毒剂的滥用、处理方法不当等原因, 促使细菌产生选择性压力, 导致对消毒剂产生抗性。为了解四川医科大学第一附属医院临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌的临床分布情况、耐药谱特征及耐季铵盐类消毒剂基因 qacEΔ1 携带情况, 本文就上述问题进行研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2013 年 10 月至 2014 年 8 月四川医科大学第一附属医院临床标本中分离的多重耐药鲍曼不动杆菌共 56 株, 排除同一患者住院期间检出的重复菌株。以大肠埃

^{*} 基金项目: 四川大学与四川省泸州市人民政府战略合作资助项目(2013CDLZ-S15)。

作者简介: 龙琴, 女, 主管技师, 硕士, 研究方向为临床微生物及临床免疫。

希菌(ATCC25922)和铜绿假单胞菌(ATCC27853)作为质控菌株。全部菌株均采用德国 MicroScan WalkAway 96 Plus 全自动微生物鉴定/药敏测试系统进行菌种鉴定。

1.2 试剂与仪器 血平板购自郑州安图;NC50 细菌鉴定/药敏试剂板购自德国 SIEMENS;DNA Marker DL2000 购自北京康为世纪生物;PCR 引物由上海生工合成;dNTPs、Taq DNA 酶、10×Buffer、MgCl₂ 均购自上海生工;琼脂糖(分子生物学级)购自美国。主要仪器包括 HHCP-T01A 型 CO₂ 细胞培养箱(上海恒科);HFsafe 1200/c 生物安全柜(上海力申);S/N9993 比浊仪(德国 SIEMENS);MicroScan WalkAway 96 Plus 全自动微生物鉴定/药敏测试系统(德国 SIEMENS);Thermo Sorvall ST 16R 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific);C1000TMTThermal Cycler PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad);XH600 电泳仪(上海昕慧);G;BOX-Chemi-XR5 凝胶成像仪(美国 Syngene)。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感性试验 采用 MicroScan WalkAway 96 Plus 全自动微生物鉴定/药敏测试系统(微量肉汤稀释法)检测 56 株临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌,测定 18 种常用抗菌药物的敏感性。抗菌药物包括哌拉西林(PIP)、氨苄西林-舒巴坦(SAM)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、头孢噻肟(CTX)、头孢曲松(CRO)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、庆大霉素(GEN)、妥布霉素(TOB)、阿米卡星(AMK)、四环素(TE)、左氧氟沙星(LEV)、环丙沙星(CIP)、复方磺胺甲噁唑(SXT)和头孢哌酮-舒巴坦(SCF)。药敏试验结果解释参照 2013 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)-M100-S23 推荐解释标准进行判断。

1.3.2 耐消毒剂基因 qacEΔ1 检测 细菌 DNA 模板制备采用煮沸法,模板经分光光度计比色 OD 值均在 1.8~2.0。PCR 引物参照 GenBank 公布的鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因 qacEΔ1 基因序列(ABBFA_000617, Gene ID: 7059144),通过 Primer5 软件自行设计,由上海生工合成。P1:5'-ATC CTG GTG CTT GGT GGT-3';P2:5'-ATC CTG CTA CAT CAA TGT TCT G-3'。产物长度为 261 bp。PCR 反应采用 25 ΔL 体系,具体为 P1 (5 μmol/L) 1 μL, P2 (5 μmol/L) 1 μL, dNTPs(10 mmol/L) 0.2 μL, 10×Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, Taq DNA 酶 (5 U/μL) 5 μL, 模板 DNA 2 μL, 蒸馏水加至 25 μL。扩增参数为:93 ℃ 预变性 3 min, 然后 93 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 ℃ 延长 5 min。扩增产物取 6 μL 与 1 μL 6×PCR Loading Buffer 混匀,加入 2% 含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中,100 V 电压电泳 1 h 后,在凝胶成像系统中观察并拍照保存。本次实验阳性对照为预实验阳性标本(基因测序比对相似比 99%), 阴性对照为超纯水。

1.3.3 随机抽取阳性基因扩增产物送铂尚生物技术(上海)进行序列测定。

2 结 果

2.1 标本类型与病区分布情况 56 株多重耐药鲍曼不动杆菌主要为痰液标本 41 株,占 70.7%;其次为分泌物标本 9 株,占 15.5%。科室主要分布于重症监护病房(ICU)23 株,占 41.1%,其次呼吸内科 10 株,占 17.9%。

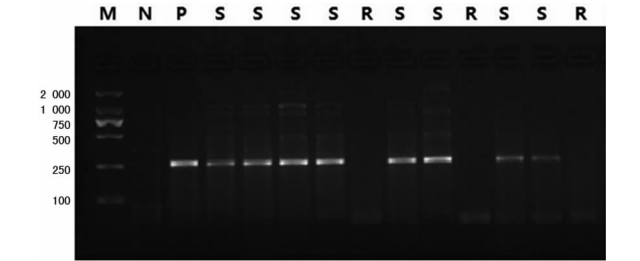
2.2 药敏试验结果 试验结果显示,SAM 的耐药率最低为 32.1%,其余抗菌药物耐药率在 69.6%~100.0%。见表 1。

2.3 耐消毒剂基因 qacEΔ1 检测结果 56 株多重耐药鲍曼不动杆菌共检出 50 株 qacEΔ1 基因阳性,携带率为 89.3%。部分菌株 qacEΔ1 基因检测结果见图 1。

表 1 多重耐药鲍曼不动杆菌药敏试验结果(%)

抗菌药物	敏感率	中介率	耐药率
PIP	0.0	0.0	100.0
SAM	23.3	7.1	69.6
CAZ	0.0	0.0	100.0
FEP	0.0	0.0	100.0
CTX	0.0	0.0	100.0
CRO	0.0	0.0	100.0
IPM	17.8	3.6	78.6
MEM	19.6	5.4	75.0
GEN	1.8	0.0	98.2
TOB	26.8	1.8	71.4
AMK	14.3	5.4	83.3
TE	5.4	0.0	94.6
LEV	12.5	1.8	85.7
CIP	0.0	0.0	100.0
SXT	30.4	0.0	69.6
SCF*	59.0	8.9	32.1

注:SAM 在 CLSI 中暂无标准,按专家推荐标准执行。



注:M 为 DNA Marker;N 为阴性对照;P 为阳性对照;S 为阳性标本;R 为阴性标本。

图 1 qacEΔ1 基因电泳图

2.4 耐消毒剂基因 qacEΔ1 测序结果 随机抽取的阳性标本测序结果经 BLAST 比对分析,与 NCBI 已登录序列号为 AB-BFA_000617(NC_011595.1)序列进行比对,同源率为 98%。

3 讨 论

近年来,随着临床大量广谱抗菌药物的使用,全国各地分离的多重耐药、泛耐药、全耐药鲍曼不动杆菌日益增多,给临床抗感染治疗带来了很大的困难,也对医院感染控制提出了新的要求。根据 2013 年中国细菌耐药监测网(CHINET)公布资料显示,不动杆菌(鲍曼不动杆菌 89.2%)占临床分离株的 11.97%,位居第 3 位;同时在 7 827 株鲍曼不动杆菌中,泛耐药菌株 1 380 株,占 14.60%,远远高于铜绿假单胞菌(2.00%)和肺炎克雷伯菌(2.30%)的泛耐药菌株检出率^[4]。本次研究对象为临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌,结果显示 56 株多重耐药鲍曼不动杆菌主要分离自痰液和分泌物标本,分别占 70.7%和 15.5%。稍低于苏青等^[5]报道的 103 株临床分离的鲍曼不动杆菌中,痰液标本检出 88 株,检出率 85.4%,提示呼吸道是鲍曼不动杆菌感染的主要途径。在临床科室分布上,集中于 ICU 和呼吸内科,分别占 41.1%和 17.9%。与孙静娜等^[6]报道的多重耐药鲍曼不动杆菌主要分布在 ICU 和呼吸内科相一致。这可能是由于该科室患者多为病情危重、免疫力低下、免疫抑制剂及抗菌药物大量使用、长时间住院、多次接受侵入性操作等因素有关。因此,对某些科室及某些特殊患者可采取相应措施及早预防,医护人员在对患者进行侵入性操作时应严格执行消毒措施,以避免鲍曼不动杆菌在医院的爆发流行。

鲍曼不动杆菌耐药机制复杂、耐药率高且不断上升。张樱等^[7]对北京解放军总医院 18 年临床分离的鲍曼不动杆菌进行

分析显示,鲍曼不动杆菌分离率呈不断增加趋势,亚胺培南和美罗培南的耐药率从 2006 年的 12.1% 和 24.1% 上升至 2011 年的 83.1% 和 83.5%。Dae 等^[8]对 253 株鲍曼不动杆菌进行分析,其中 208 例(占 82.5%)对碳青霉烯类抗菌药物产生耐药,亚胺培南和美罗培南耐药率高达 80.2% 和 81.8%。2013 年 CHINET 显示,鲍曼不动杆菌对多黏菌素 B 的耐药率(<1%)最低,其次为 SAM(36.4%),亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 62.8% 和 59.4%^[4]。本次药敏试验结果显示,SAM 的耐药率最低为 29.3%,其余抗菌药物耐药率在 69.6%~100.0%,提示鲍曼不动杆菌耐药形势严峻。由于 MicroScan WalkAway 96 Plus 全自动微生物鉴定/药敏测试系统中暂无对多黏菌素 B 的药物敏感性试验,本实验并未获得鲍曼不动杆菌对多黏菌素 B 的耐药率。

消毒是目前预防和控制医院感染的主要方法和手段。《中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识》指出:鲍曼不动杆菌医院感染防控中,应加强环境清洁与消毒^[9]。然而,同抗菌药物的使用一样,细菌对消毒剂也可产生抗性。一般认为,细菌对消毒剂的抗性是指对消毒剂常用浓度不再敏感的菌株出现,或是指在能杀灭或抑制绝大部分该种细菌的消毒剂浓度下出现不能被杀灭或抑制菌株的现象^[10]。但细菌介导消毒剂抗性的具体机制尚不十分清楚。近年来临床使用的消毒剂有多种,季铵盐类消毒剂如苯扎溴铵(新洁尔灭)、醋酸氯己定等便是其中之一。早在 1951 年,Lowbury 就发现铜绿假单胞菌对季铵盐类化合物有耐受现象。目前已报道的季铵盐类消毒剂耐药基因有: qacA、qacB、qacC、qacE、qacEΔ1、qacF、qacG、qacH、qacJ,其中 qacEΔ1 是 qacE 的缺失型,是 I 类整合子的一部分,由整合子介导,表达细菌多种化合物外排泵,可被革兰阴性菌广泛获取^[11]。目前关于鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因的报道主要集中在对 qacEΔ1 的研究上,但世界各地报道的携带率差异较大。本次研究即对泸州地区多重耐药鲍曼不动杆菌的 qacEΔ1 基因携带率进行调查,结果显示,56 株多重耐药鲍曼不动杆菌中共检出 50 株 qacEΔ1 阳性标本,携带率高,为 89.3%。低于国内学者陈辉英^[12]对 20 株从重症监护室患者分离出的耐药性鲍曼不动杆菌中,耐消毒剂基因 qacEΔ1 阳性携带率为 100%,高于美国 Taitt 等^[13]在对 97 株临床分离的多重耐药鲍曼不动杆菌进行分析时,检出 44 株携带 qacEΔ1 基因,携带率为 45.36%。与伊朗 Mahzounieh 等^[14]在对从烧伤患者分离出的多重耐药鲍曼不动杆菌研究分析中发现,其耐消毒剂基因 qacEΔ1 阳性携带率高达 80.00% 相一致。

综上所述,加强对多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性监测及对消毒剂抗性进行分析,对指导医院科学合理使用抗菌药物及消毒剂具有重要意义。

参考文献

[1] Munoz-Price LS, Weinstein RA. Acinetobacter infection

(上接第 903 页)

- [3] 蒋森,付海龙,徐广峰,等. Has-miR-1 在人食管癌细胞株中的表达及生物信息学分析[J]. 山东医药,2010,52(43):32-34.
- [4] Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6):1915-1922.
- [5] Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al. Distinctive MicroRNA Profiles Relating to Patient Survival in Esophageal Squamous Cell Carcinoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(1):26-33.

[J]. N Engl J Med, 2008, 358(12):1271-1281.

- [2] Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, et al. Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(2):233-238.
- [3] 俞云松. 多耐药鲍曼不动杆菌-21 世纪革兰阴性菌的“MRSA”[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(2):65-68.
- [4] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5):365-374.
- [5] 苏青, 范琳, 于景云. 鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药性监测[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(1):80-82.
- [6] 孙静娜, 刘泽世, 王国欣, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌的临床分布及其外排泵基因型分析[J]. 山东医药, 2014, 54(43):22-24.
- [7] 张樱, 杨继勇, 叶丽艳, 等. 连续 18 年的鲍氏不动杆菌耐药变迁及不同来源分布[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(6):1433-1435.
- [8] Dae HK, Ji YC, Hae WK, et al. Spread of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Global Clone 2 in Asia and AbaR-Type Resistance Islands [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11):5239-5246.
- [9] 陈佰义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. 中国医药科学, 2012, 2(8):3-8.
- [10] 林辉, 郑剑. 铜绿假单胞菌对消毒剂抗药性的研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24(3):269-271.
- [11] Kucken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of qacE and qacEΔ1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 183(1):95-98.
- [12] 陈辉英. 鲍氏不动杆菌消毒剂耐药基因 qacEΔ1 的检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(6):1429-1430.
- [13] Taitt CR, Leski TA, Stockelman MG, et al. Antimicrobial resistance determinants in Acinetobacter baumannii isolates taken from military treatment facilities[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(2):768-781.
- [14] Mahzounieh M, Khoshnood S, Ebrahimi A, et al. Detection of Antiseptic-Resistance Genes in Pseudomonas and Acinetobacter spp. Isolated From Burn Patients [J]. Jundishapur J Nat Pharm Prod, 2014, 9(2):15402.

(收稿日期:2015-08-22 修回日期:2015-12-10)

- [6] Fu HL, Wu de P, Wang XF, et al. Altered miRNA expression is associated with differentiation, invasion, and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in patients from Huaian, China [J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 67(2):657-668.
- [7] Nohata N, Sone Y, Hanazawa T, et al. miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2011, 2(1/2):29-42.

(收稿日期:2015-10-01 修回日期:2015-12-15)