

# 分析 9 年不动杆菌院内感染的耐药性变化及其与 I 类整合子的相关性

单斌 马晓波 涂亮 杜艳 陈端

作者单位: 650032 云南省, 昆明医学院第一附属医院检验科

**【摘要】** 目的 了解我院 9 年间鲍曼不动杆菌和洛非不动杆菌的耐药性变化, 并探讨其耐药性与 I 类整合子的相关性。方法 收集 2001 年 1 月至 2009 年 12 月我院分离培养的不动杆菌共 1552 株, 采用 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪进行检验及耐药分析。采用 PCR 检测 60 株鲍曼不动杆菌和 30 株洛非不动杆菌的 I 类整合子, 分析 I 类整合子与细菌耐药性的相关性。结果 1552 株不动杆菌中以鲍曼不动杆菌 1360 株 (87.6%), 洛非不动杆菌 154 株 (9.9%) 为主。药敏结果显示不动杆菌的耐药率总体呈逐年上升的趋势。PCR 检测结果显示 38 株 (63.3%) 鲍曼不动杆菌和 17 株 (56.7%) 洛非不动杆菌为 I 类整合子阳性, I 类整合子阳性菌株的耐药率及多重耐药 (multidrug resistance, MDR) 率显著高于 I 类整合子阴性菌株, 且差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 经验性用药或抗生素滥用导致了 9 年间不动杆菌的耐药率呈逐年上升的趋势。I 类整合子在不动杆菌的耐药率及 MDR 率升高中起重要作用。

**【关键词】** 鲍曼不动杆菌; 洛非不动杆菌; I 类整合子; 多重耐药

## Analysis on variation of drug-resistance during 9 years and relation between drug-resistance and integron I of *Acinetobacter*

SHAN Bin, MA Xiao-bo, TU Liang, et al. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China

**【Abstract】** **Objective** To detect situations of drug-resistance of *Acinetobacter Baumannii* and *Acinetobacter hwoffii* in our hospital during 9 years, and discuss the relation between their drug-resistance and integron I. **Methods** 1552 strains *Acinetobacter* were collected and identified from January 2001 to December 2009 in our hospital. The drug sensitivity were detected by VITEK-2, and the integron I of 60 strains *Acinetobacter baumannii* and 30 strains *Acinetobacter hwoffii* were detected by PCR. The correlation between drug-resistance and integron I were analyzed. **Results** 1552 strains *Acinetobacter* main including 1360 strains (87.6%) *Acinetobacter baumannii* and 154 strains (9.9%) *Acinetobacter hwoffii*. The drug-resistance of *Acinetobacter* were raised year by year generally. The results of PCR showed that 38 strains (63.3%) *Acinetobacter baumannii* and 17 strains (56.7%) *Acinetobacter hwoffii* contained integron I. The drug resistance and multidrug-resistance (MDR) of integron I positive strains were higher than integron I negative strains and there were all had statistical significance ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The irrational use of antibiotics lead to the raising of *Acinetobacter*'s drug-resistance rate year by year during 9 years. Integron I plays an important role in the raising of drug-resistance and MDR of *Acinetobacter*.

**【Key words】** *Acinetobacter baumannii*; *Acinetobacter hwoffii*; Integron I; Multidrug resistance

不动杆菌作为重要的条件致病菌广泛存在于自然界, 其耐药现象日益严重, 已成为医院感染的重要病原菌<sup>[1,2]</sup>。常可引起肺炎、尿道感染、脑膜炎、菌血症等各种难治性感染<sup>[3]</sup>, 其临床分离率在非发酵菌中仅次于铜绿假单胞菌。特别是近年来随着临床广谱抗生素的大量使用, 其耐药现象更为严重, 主要表现为多重耐药 (multidrug resistance, MDR) 或泛耐药。其分子耐药机制已成为研究的热点, 特别是针对 I 类

整合子的研究。本文对我院 2001 至 2009 年临床分离的不动杆菌及其耐药性进行分析, 并对其中 60 株鲍曼不动杆菌和 30 株洛非不动杆菌进行 I 类整合子检测, 以探讨鲍曼不动杆菌及洛非不动杆菌的耐药性与 I 类整合子的关系, 现将结果报告如下。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集 2001 年 1 月至 2009 年 12 月我院住院后 48 h 内的感染标本分离培养的不动杆

菌共 1552 株(不含同一病例相同部位重复分离的菌株)。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、铜绿假单胞菌 ATCC27853 均购自卫生部临检中心。随机抽样鲍曼不动杆菌 60 株,洛菲不动杆菌 30 株检测 I 类整合子。

**1.2 试剂** ①培养基及细菌鉴定板及药物和药敏板(GN14,GN10)购于法国梅里埃公司;根据 CLSI 选择药敏板上的 15 种抗菌药物:头孢他啶,美洛培南,亚胺培南,替卡西林/克拉维酸,哌拉西林/他唑巴坦,氨苄西林/舒巴坦,头孢哌酮/舒巴坦,头孢吡肟,庆大霉素,阿米卡星,妥布霉素,四环素,环丙沙星,左旋氧氟沙星,复方磺胺。②分子生物学试剂:1 kb DNA 分子标准和 100 bp DNA 分子标准均购自武汉华美生物工程公司;Tag 酶,dNTP 试剂、琼脂糖、溴化乙锭均为美国 Sigma 产品;DNA 抽提试剂盒购自上海 Sangon 公司。

**1.3 主要仪器** Bact-Alert120 全自动微生物血培养仪,VITEK-2 全自动微生物鉴定及药敏系统均为法国梅里埃公司产品;-80℃冰箱为美国 Forma Scientific 公司产品。凝胶成像分析系统 D GENE SYSTEM 和 Gel Doc 1000 为美国 Biorad 公司产品;同时使用美国 PE 公司基因扩增仪;美国 BIO-RAD Power Pac 3000 型电泳仪;德国 Eppendorf Centrifuge 5417R 高速冷冻离心机。

#### 1.4 方法

**1.4.1 菌株鉴定与药敏检测** 严格按照 VITEK-2 全自动微生物鉴定及药敏系统操作,并按照该系统标准判读结果。

**1.4.2 I 类整合子结构的检测** ①细菌总 DNA 的提取:用 DNA 抽提试剂盒抽提模板 DNA,具体操作步骤按说明书进行。②PCR 引物设计:引物 1:5'-TGCGGGTYAARGATBTKGATTT-3',引物 2:5'-CARCACATGCGTRTRARAT-3',由上海生工生物工程公司合成。③PCR 反应体系及参数反应体积为 50 μl:模板 3 μl;缓冲液(×10) 5 μl;镁离子(1.5 mmol/L) 4 μl;Tag 酶(5U) 0.5 μl;dNTP(2.5 mmol/L) 4 μl;引物 1(25 μmol/L) 1.5 μl;引物 2(25 μmol/L)

1.5 μl;双蒸水 30.5 μl;④反应参数:95℃预变性 10 min,94℃变性 1 min,51℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,持续 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min 反应结束;⑤选择 3 株 I 类整合子扩增片段测序分析与 GenBank I 类整合子序列做对比分析。

**1.5 统计学处理** 采用 WHONET 5.0 及 SPSS 13.0 进行统计分析。两组间率的比较采用  $\chi^2$  检验及 Fisher 确切概率法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 9 年间各种不动杆菌分离情况** 2001 年 1 月至 2009 年 12 月我院分离的不动杆菌共 1552 株;以鲍曼不动杆菌为主共 1360 株(87.6%),其次为洛菲不动杆菌 154 株(9.9%)。结果见表 1。

**2.2 药敏结果** 9 年间不动杆菌对各种抗生素的耐药性呈现逐年上升趋势,对美洛培南、亚胺培南、左旋氧氟沙星的耐药率较低,9 年的平均耐药率分别为 21.5%、24.9%、17.2%。结果见表 2。

**2.3 I 类整合子分布** 在检测的 60 株鲍曼不动杆菌中发现 38 株为 I 类整合子阳性菌株,阳性率为 63.3%,30 株洛菲不动杆菌中发现 17 株为 I 类整合子阳性菌株,阳性率为 56.7%。如图 1,不动杆菌 2~15 号待测菌株电泳图,出现与目的条带(587 bp)一致的条带为整合子阳性菌株,无此条带则为整合子阴性菌株。

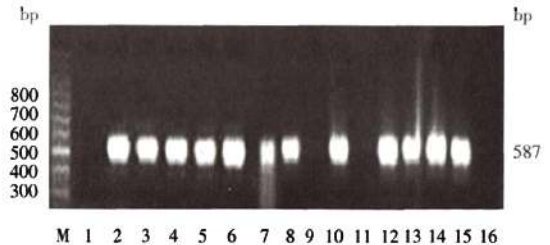


图 1 不动杆菌 I 类整合子 PCR 电泳图

注:M:Marker;1,16:阴性对照;2-15:待测菌株

**2.4 PCR 产物的测序和序列分析** 整合子阳性的 PCR 扩增产物所测得的基因序列与 GenBank 登录号为 AF313471 的整合子序列进行对比分析,二者

表 1 9 年间 1552 株不动杆菌的分离情况[n(%)]

菌种	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	合计
鲍曼	77	90	59	101	115	215	250	231	222	1360
洛菲	11	9	42	15	17	18	12	16	14	154
鲁氏	1	0	2	1	2	3	5	3	2	19
溶血	0	0	0	0	1	1	2	2	2	8
琼氏	0	0	0	0	0	1	2	2	1	6
合计	89(5.7)	99(6.4)	103(6.6)	117(7.5)	135(8.7)	238(15.3)	271(17.4)	254(16.4)	241(15.5)	1552(100.0)

表 2 9 年间不动杆菌对 15 种抗生素的耐药率分析 (%)

抗生素	2001 (n=77)	2002 (n=90)	2003 (n=59)	2004 (n=101)	2005 (n=115)	2006 (n=215)	2007 (n=250)	2008 (n=231)	2009 (n=222)
头孢他啶	41.6	48.9	49.1	55.4	57.4	58.6	67.2	70.1	71.6
亚胺培南	5.2	12.2	18.6	19.8	20.0	21.4	25.6	48.5	52.7
美洛培南	2.6	7.7	15.2	16.8	16.5	17.6	21.2	44.6	51.3
替卡西林/克拉维酸	27.3	37.8	42.3	44.6	44.3	47.0	47.6	59.7	58.1
哌拉西林/他唑巴坦	40.3	46.7	52.5	55.4	55.6	58.6	59.2	64.9	63.5
氨苄西林/舒巴坦	28.6	33.3	37.6	46.5	50.4	59.5	64.4	58.0	67.6
头孢哌酮/舒巴坦	7.8	11.1	13.5	13.9	13.9	17.7	23.2	25.5	32.4
头孢吡肟	41.6	48.9	52.5	59.4	60.0	60.4	64.4	51.1	52.3
庆大霉素	40.3	51.1	55.9	62.4	65.2	66.0	68.8	57.1	60.4
阿米卡星	31.2	30.0	32.2	39.6	39.1	40.0	40.8	38.5	37.8
妥布霉素	37.7	47.7	55.9	60.4	60.9	62.8	67.2	63.2	52.3
四环素	53.2	60.0	66.1	78.2	80.8	81.4	84.8	78.8	76.1
环丙沙星	29.9	38.9	45.7	55.4	56.6	57.2	59.2	60.6	72.5
左旋氧氟沙星	3.9	7.7	15.2	17.8	17.4	18.6	20.0	27.2	27.4
复方磺胺	35.1	45.6	54.2	59.4	60.0	60.0	64.4	62.3	61.2

核苷酸序列和氨基酸序列同源性为 99%,证实 PCR 产物确实为 I 类整合子基因片断。

**2.5 I 类整合子阳性菌与阴性菌对抗菌药物的耐药率比较** I 类整合子阳性的鲍曼不动杆菌对头孢他啶、亚胺培南、美洛培南、氨苄西林/舒巴坦抗生素的耐药率要高于 I 类整合子阴性菌,且二者差异均具有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ),I 类整合子阳性的洛菲不动杆菌对头孢他啶、亚胺培南、美洛培南、氨苄西林/舒巴坦抗生素的耐药率显著高于 I 类整合子阴性菌,且二者差异均有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。I 类整合子阳性菌对其他抗生素耐药性也均高于 I 类整合子阴性菌,但差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。见表 3。

**2.6 60 株鲍曼不动杆菌 I 类整合子阳性菌及 I 类整合子阴性菌株 MDR 率的比较** 结果见表 4,应用

Fisher 确切概率法,结果  $P=0.001$ ,I 类整合子阳性菌株的 MDR 率高于 I 类整合子阴性菌株的 MDR 率,且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 4 60 株鲍曼不动杆菌 I 类整合子阳性菌与 I 类整合子阴性菌 MDR 率的比较

I 类整合子	MDR		合计(n)
	阳性菌(n)	阴性菌(n)	
阳性菌(n)	38	0	38
阴性菌(n)	8	14	22
合计	46	14	60

### 3 讨论

不动杆菌是重要的条件致病菌,广泛分布于自然界、医院环境及人体皮肤表面,其在外界环境的生存能力强,是医院感染的重要病原菌之一。随着临床广谱抗菌药物的大量使用,耐药率呈逐年上升趋势。

表 3 I 类整合子阳性菌与阴性菌对抗菌药物的耐药率比较[n(%)]

抗生素	鲍曼 I 类整合子				洛菲 I 类整合子			
	阳性 38 株	阴性 22 株	$\chi^2$ 值	$P$ 值	阳性 17 株	阴性 13 株	$\chi^2$ 值	$P$ 值
头孢他啶	24(63.2)	4(18.1)	11.324	0.001	10(58.8)	2(15.3)	5.792	0.026
亚胺培南	22(57.9)	0(0.0)	17.164	0.000	9(52.9)	0(0.0)	9.832	0.003
美洛培南	20(52.6)	1(4.5)	11.549	0.001	8(47.1)	0(0.0)	8.342	0.004
头孢哌酮/舒巴坦	9(23.7)	2(9.1)	1.982	0.299	5(29.4)	1(7.6)	2.172	0.196
左旋氧氟沙星	8(21.1)	2(9.1)	1.435	0.299	5(29.4)	2(15.3)	0.810	0.427
复方磺胺	26(68.4)	10(45.4)	3.062	0.104	11(64.7)	5(38.4)	2.039	0.269
氨苄西林/舒巴坦	23(60.5)	1(4.5)	18.194	0.000	10(58.8)	1(7.6)	8.294	0.007
庆大霉素	20(52.6)	9(40.9)	0.767	0.431	10(58.8)	6(46.2)	0.475	0.713

注:因单元格有数据小于 5,例数小于 40,用 Fisher 确切概率法检验

本文研究结果显示我院不动杆菌以鲍曼不动杆菌为主,共检出 1360 株,占 87.6%,与国内的其他报道<sup>[6]</sup>一致;洛非不动杆菌检出率次之,共检出 154 株,占 9.9%。

本文研究结果中鲍曼不动杆菌耐药率高于国内外报道<sup>[5,6]</sup>,且 MDR 率高,对亚胺培南的耐药率从 2001 年的 5.2% 上升到 2009 年的 52.7%,对其它抗菌药物耐药性也有类似表现,表明鲍曼不动杆菌的耐药现象日趋严重,这可能与我院抗生素的广泛使用及不正确使用有关。因此,建议临床医师应根据药敏实验结果正确合理使用抗生素,以期有效地控制鲍曼不动杆菌耐药性的不断增长。

细菌的耐药机制极为复杂。整合子,特别是 I 类整合子,是细菌产生 MDR 的重要原因之一。整合子可以整合在细菌的染色体 DNA 上,也可整合在质粒上,通过位点特异的基因重组机制使耐药基因发生播散。整合在质粒中的整合子可以在不同种属间传播,从而使耐药基因得以横向传播。而整合在染色体上的整合子,可以在细菌增殖过程中传给子代,使耐药基因得以纵向传播。随着整合子耐药基因盒的增多,细菌将对越来越多的抗菌药物产生耐药<sup>[7]</sup>。本文研究发现我院感染的鲍曼及洛非不动杆菌 I 类整合子阳性率均在 50% 以上,药敏检测结果发现 I 类整合子阳性的鲍曼不动杆菌及洛非不动杆菌的耐药率均高于 I 类整合子阴性菌的耐药率,差异具有统计学意义,且鲍曼不动杆菌 I 类整合子阳性菌的 MDR 率高于 I 类整合子阴性菌株,且差异亦具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这表明 I 类整合子在不动杆菌的耐

药性及 MDR 率升高中起到重要作用。

因此,经验性用药或抗生素滥用将会导致细菌耐药性的上升和播散,应加强抗生素应用的管理和耐药监测,根据正确的药敏实验结果合理的选择抗生素,才可能有效的控制包括不动杆菌在内的细菌耐药现象的产生。

#### 4 参考文献

- 1 Villers D, Espaze E, Coste-Burel M, et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med*, 1998, 129:182-189.
- 2 Koeleman JGM, Parlevliet GA, Dijkshoorn L, et al. Nosocomial outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. *J Hosp Infect*, 1997, 37: 113-123.
- 3 Brisse S, Milatovic D, Fluit AC. Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp using automated ribotyping. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:3636-3645.
- 4 熊薇, 张文池. 鲍曼不动杆菌的耐药性. *中国抗感染化疗杂志*, 2001, 1:96-97.
- 5 张军民, 吴坚, 陈民均, 等. 鲍氏不动杆菌 5 年耐药性监测结果分析. *中华医学检验杂志*, 1999, 22:51-56.
- 6 Jellison TK, Mckinnon PS, Rybak MJ. Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteremia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy*, 2001, 21: 142-148.
- 7 杨立军, 朱立华, 徐国宾, 等. 产 ESBLs 肠杆菌科细菌中整合子参与多重耐药机制研究. *中国抗生素杂志*, 2002, 27:722-725.

(收稿日期:2011-01-10)

(本文编辑:李露)

## 消 息

### 中国医师协会检验医师分会网站信息

中国医师协会检验医师分会于 2004 年底创建中国医师协会检验医师分会网站,至今已在互联网上推出 7 年了,欢迎广大医务工作者浏览网站。本网站目前属于非赢利性网站,建立的宗旨是加强检验与临床之间的合作,为检验医师与临床医师提供一个交流的平台,推动检验医师国际间的交流,促进国内行业的发展,服务于广大医务工作者和患者。

本网站的中文实名为:中国医师协会检验医师分会;英文域名为:www.cmdal.org;www.cmdal.com