

临床研究

多重耐药鲍曼不动杆菌耐药情况 及其携带耐消毒剂基因的研究

王正兰¹ 李临平¹ 李雪¹ 段秋红¹ 杨晓文¹ 张小玲¹ 梁红萍² 张燕军²

基金项目:山西省卫生厅科技攻关项目(201301031)

作者单位:030012 太原市,山西省人民医院院感科¹,检验科²

通讯作者:李临平, E-mail: wzl933@126.com

【摘要】 目的 了解多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药情况及携带耐消毒剂基因情况。**方法** 收集 2014 年 1 月-2015 年 2 月山西省两所三级甲等医院 50 株多重耐药鲍曼不动杆菌,采用 K-B 法检测抗菌药物的敏感性,采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测耐消毒剂基因 qacEΔ1。**结果** 50 株多重耐药鲍曼不动杆菌主要见于神经外科、ICU、呼吸内科,分别为 15 株(30.0%)、10 株(20.0%)、9 株(18.0%)。其中痰标本 34 株(68.0%)、创面分泌物标本 2 株(4.0%)、血标本 2 株(4%)、尿液标本 5 株(10.0%)、引流物标本 2 株(4.0%)、神经外科患者病床栏杆表面标本 5 株(10.0%)。50 株多重耐药鲍曼不动杆菌对氨苄西林/舒巴坦的耐药率为 96.0%(48/50)、左氧氟沙星为 70.0%(35/50)、头孢他啶为 100.0%(50/50)、头孢哌酮/舒巴坦为 100.0%(50/50)、亚胺培南为 98.0%(49/50)。50 株多重耐药鲍曼不动杆菌中,有 21 株携带耐消毒剂基因 qacEΔ1,阳性率为 42.0%。**结论** 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药情况十分严重,并且携带有耐消毒剂基因 qacEΔ1。因此,应严格规范使用抗菌药物,并采取相应的措施预防多重耐药鲍曼不动杆菌在医院环境中流行爆发。

【关键词】 多重耐药菌;鲍曼不动杆菌;药敏试验;消毒剂;耐消毒剂基因;qacEΔ1;K-B 法

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.04.003

Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* resistant and carry disinfectant-resistant gene research
WANG Zheng-lan, LI Lin-ping, LI Xue, et al. Department of Hospital Infection-Control, Shanxi province People's Hospital, Taiyuan 030012, China

【Abstract】 Objective To understand the situation of disinfectant-resistant gene and drug resistance of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Methods** 50 strains multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* were collected in two grade third A class hospitals of Shanxi province from January 2014 to February 2015. The sensitivity of antibacterial agents were tested by K-B method. Disinfectant resistant gene qacEΔ1 was detected by polymerase chain reaction. **Results** 50 strains multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* were mainly distributed in department of neurosurgeons, ICU and department of respiration, which were 15 strains(30.0%), 10 strains(20.0%), 9 strains(18.0%), respectively. There were 34 strains sputum specimens (68.0%), 2 strains surgical wounds specimens (4.0%), 2 strains blood specimens (4.0%), 5 strains urine specimens (10.0%), 2 strains drainage specimens (4.0%) and 5 strains specimens of bed handrail in department of neurosurgeons patients (10.0%) in 50 strains multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Drug resistance of 50 strains multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* to ampicillin/sulbactam, levofloxacin, ceftazidime, cefoperazone/sulbactam, imipenem were 96.0% (48/50), 70.0% (35/50), 100.0% (50/50), 100.0% (50/50), 98.0% (49/50), respectively. There were 21 strains multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* with disinfectant-resistant gene qacEΔ1 in 50 strains multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, and the positive rate was 42.0%. **Conclusion** The drug resistant situation of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* is very serious, and carry disinfectant-resistant gene qacEΔ1. Therefore, it should be strictly regulate use of antimicrobial agents, and take corresponding measures to preventing epidemic outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in hospital.

【Key words】 Multi-drug resistant bacteria; *Acinetobacter baumannii*; Drug sensitive test; Disinfectant; Disinfectant-resistant gene; qacEΔ1; K-B method

鲍曼不动杆菌现已成为世界范围内医院感染的主要病原菌之一,随着耐药菌株的日益增多,鲍曼不

动杆菌感染已经成为许多国家重要的公共卫生问题。消毒剂的使用对预防与控制医院感染的发生起到了重要的作用,因此,病原菌对消毒剂的敏感情况越来越受到重视^[1]。近年来,国内外研究多关注于医院感染常见致病菌对消毒剂的敏感性,如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、念珠菌等,而对多重耐药鲍曼不动杆菌的耐消毒剂基因研究较少。本文对多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药情况及携带耐消毒剂基因情况进行研究,为医疗机构实施消毒措施提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2014 年 1 月至 2015 年 2 月山西省人民医院、山西大医院微生物室临床送检标本中培养鉴定的多重耐药鲍曼不动杆菌共 50 株。质控菌株为鲍曼不动杆菌 ATCC 19606,购自卫生部临检中心。

1.2 仪器与试剂 细菌的鉴定采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪(生物梅里埃中国有限公司);药敏试验所用药敏纸片哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星、头孢吡肟、左氧氟沙星、环丙沙星、头孢哌酮/舒巴坦、头孢他啶、氨苄西林/舒巴坦、亚胺培南、妥布霉素、庆大霉素,均购自英国 OXOID 公司。Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司),Applied Biosystems 2720 thermal cycler PCR 仪(美国赛默飞世尔科技股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定与药敏试验 细菌鉴定采用全自动微生物分析仪鉴定到种,并用 K-B 法进行常规药敏试验,药敏试验结果参照 2013 年 CLSI 的标准判定。

1.3.2 细菌 DNA 提取 取 1 ml 过夜培养的细菌菌液,加入 1.5 ml 离心管中,以离心半径 8.5 cm,室温 8000 r/min 离心 1 min,弃上清,收集菌体。加入 180 μ l buffer Diaeston,再加入 20 μ l proteionase K 溶液,振荡混匀,56 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 至细胞完全裂解。加入 200 μ l buffer BD 充分颠倒混匀,加入 200 μ l 的无水乙醇充分颠倒混匀,将吸附柱放入收集管中,用移液器将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加入吸附柱中,静置 2 min,再以离心半径 8.5 cm,12 000 r/min 室温离心 1 min,倒掉收集管中的废液。将吸附柱放回收集管中,加入 500 μ l PW solution,以离心半径 8.5 cm,10 000 r/min 离心 30 s 倒掉滤液,将吸附柱放回收集管,再离去除残留的 PW solution。取出吸附柱,放入 1.5 ml 的离心管中,加入 50~100 μ l CE buffer 静置

3 min,以离心半径 8.5 cm,12 000 r/min 室温离心 2 min,收集 DNA 溶液。

1.3.3 基因扩增 采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测多重耐药鲍曼不动杆菌的耐消毒剂基因 qacE Δ 1。PCR 引物,F:TAGC-GAGGGCTTTACTAAGC,R:ATTCAGAATGCCGAA-CACCG,目的产物长度 300 bp。PCR 体积为 25 μ l,其中 10 buffer(with Mg)1 μ l,dNTP 1 μ l,Taq 聚合酶 0.2 μ l,每反应体系 F、R 引物各 0.5 μ l,加双蒸水至 25 μ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,然后 94 $^{\circ}$ C 45 s,44 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μ l 在 1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色成像。阳性结果的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果在 GenBank 上的 BLAST 进行比对。

2 结果

2.1 菌株来源及分布 50 株鲍曼不动杆菌主要见于神经外科、ICU、呼吸内科,检出株数分别为 15 株(30.0%)、10 株(20.0%)、9 株(18.0%)。标本类型为痰标本 34 株(68.0%)、创面分泌物标本 2 株(4.0%)、血标本 2 株(4.0%)、尿液标本 5 株(10.0%)、引流物标本 2 株(4.0%)、以及来自神经外科患者病床栏杆表面标本 5 株(10.0%)。

2.2 药敏试验结果 50 株鲍曼不动杆菌均呈多重耐药,对临床常用 12 种抗菌药物耐药率达 70.0%~100.0%,见表 1。

表 1 50 株多重耐药鲍曼不动杆菌
对抗菌药物的药敏试验结果

抗菌药物	耐药株数	耐药率(%)
哌拉西林	49	98.0
哌拉西林/他唑巴坦	49	98.0
头孢他啶	50	100.0
头孢哌酮/舒巴坦	50	100.0
头孢吡肟	49	98.0
亚胺培南	49	98.0
庆大霉素	47	94.0
妥布霉素	44	88.0
环丙沙星	49	98.0
左氧氟沙星	35	70.0
阿米卡星	50	100.0
氨苄西林/舒巴坦	48	96.0

2.3 耐消毒剂基因 qacE Δ 1 检测结果 50 株鲍曼不动杆菌中有 21 株携带耐消毒剂基因 qacE Δ 1,阳

性率为 42.0%，其余菌株均为阴性。耐消毒剂基因 *qacEΔ1* 的 PCR 检测结果见图 1。将阳性结果的 PCR 产物在 GenBank 上进行比对，符合 *qacEΔ1* 基因序列，见图 2。

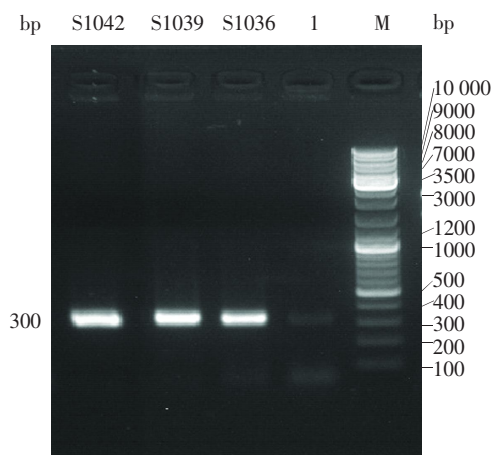


图 1 多重耐药鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因 *qacEΔ1* 检测结果

注：M 为 10 000 bp DNA Marker, I 为阴性对照, S1042, S1039, S1036 均为多重耐药鲍曼不动杆菌菌株

3 讨论

近年来鲍曼不动杆菌在医院环境中分布很广泛,成为医院内感染的重要病原菌,尤其在 ICU 及神经外科等重点科室,鲍曼不动杆菌对常用抗菌药

物的耐药率也呈现逐渐上升趋势,因此引起临床医生及微生物专家的关注。本文研究结果显示,在分离的 50 株鲍曼不动杆菌中,ICU 为 10 株 (20.0%)、呼吸内科为 9 株 (18.0%)、神经外科为 15 株 (30.0%),所有菌株对临床常见的 12 种抗菌药物的耐药率均较高,最高达 100.0%,由此可见临床分离的鲍曼不动杆菌耐药情况较严重,与钟海波等^[2]研究的 60 株鲍曼不动杆菌均呈多重耐药,对临床常用抗生素耐药率达 73.4%~98.3% 的耐药情况相似,这与患者病情较重的科室长期使用抗生素、免疫抑制剂、长期住院、机体免疫力低下、频繁使用各种导管等因素有关。对于多重耐药菌感染的患者,除了使用抗生素,使用消毒剂也是控制感染的有效措施之一。

随着消毒剂的大量广泛使用,由于使用不当使细菌长期接触亚抑制浓度的消毒剂,从而使耐消毒剂的菌株被筛选出来^[3]。同时,由于鲍曼不动杆菌的多重耐药菌株广泛存在,很容易产生抗菌药物和消毒剂均无法杀灭的超级细菌,从而把医院感染控制推向更为严峻的境地^[4]。

细菌对消毒剂抗性机制可分为天然耐药性、通过获得质粒转座子、发生基因突变而产生对消毒剂的耐药性或产生降解或抵抗抗生素的酶。目前,消毒剂抗性基因研究最多的是季铵盐类消毒剂耐药基

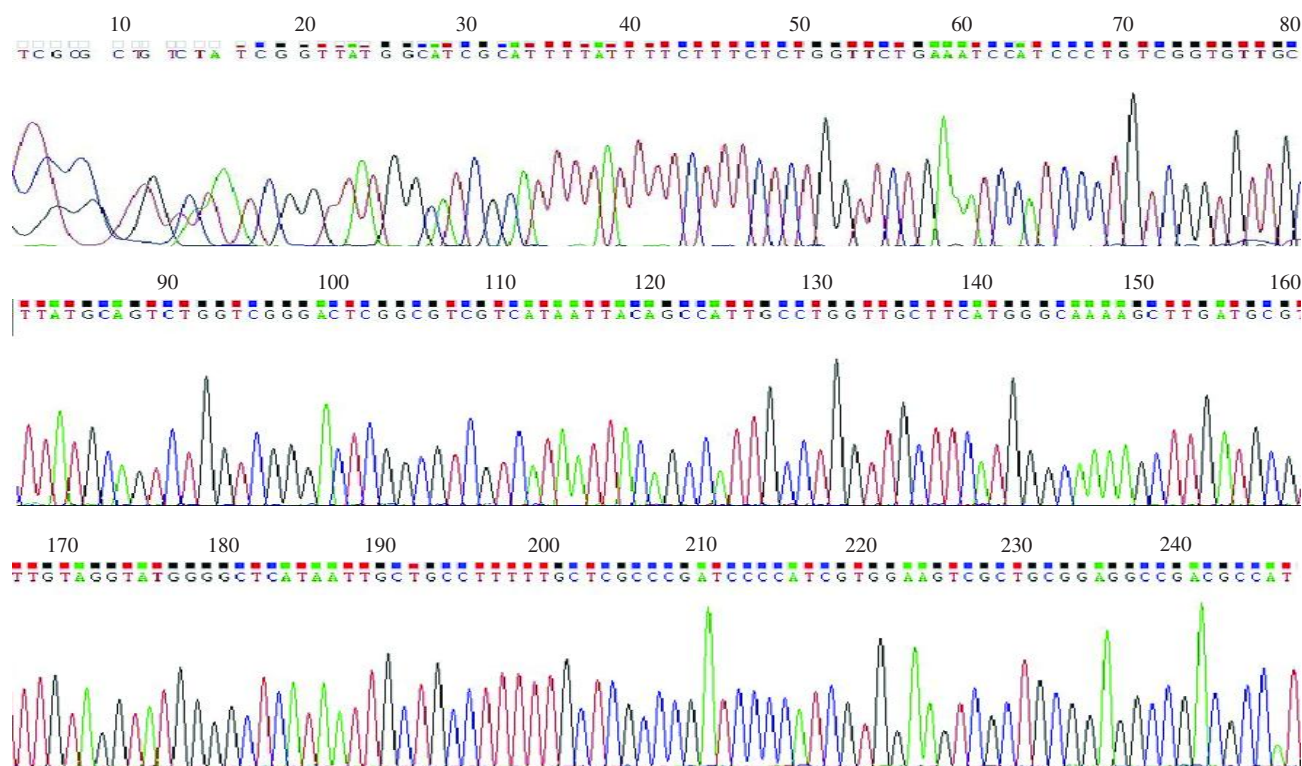


图 2 多重耐药鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因 *qacEΔ1* 测序结果

注:经比对,该基因序列为耐消毒剂基因 *qacEΔ1*

因, 即 *qac* 基因。*qac* 基因家族包括 *qacA*、*qacB*、*qacC*、*qacD*、*qacE*、*qacF* 等, 基因通过表达病原菌多种化合物外排泵而呈现耐药。姜梅杰等^[3]报道, 46 株多重耐药鲍曼不动杆菌中, 93.5% 携带 *qacEΔ1* 基因。说明临床鲍曼不动杆菌菌株携带 *qacEΔ1* 基因是普遍现象。质粒上 *qacEΔ1-sull* 基因呈高携带率, 提示鲍曼不动杆菌可能易于在菌株之间进行基因抗性传播。鲍曼不动杆菌作为临床主要致病菌之一, 对 *qacEΔ1* 基因的携带率较高。本文研究 50 株多重耐药鲍曼不动杆菌中携带 *qacEΔ1* 基因的有 21 株, 阳性率为 42.0%, 低于钟海波等^[2]研究的分离自广州医学院第一附属医院的鲍曼不动杆菌携带的耐消毒剂基因 *qacEΔ1* 的阳性率为 100% 的报道。这可能与地区差异有关, 但本文研究中 42.0% 的阳性率说明携带耐消毒剂基因 *qacEΔ1* 的多重耐药鲍曼不动杆菌仍存在一定的比例, 不容忽视。本文研究还发现 50 株多重耐药鲍曼不动杆菌中, 有 5 株痰液标本中的多重耐药鲍曼不动杆菌与神经外科患者病床栏杆表面的多重耐药鲍曼不动杆菌药敏试验结果相同, 且均携带有耐消毒剂基因 *qacEΔ1*。说明患者痰液经飞沫传播至环境中, 对消毒剂的敏感性降低。另外鲍曼不动杆菌能够形成生物膜, 更有利于菌株在环境中存活, 促进了菌株的播散, 医护人员手卫生不到位, 频繁接触物体表面容易导致医院感染爆发性事件的发生^[5,6]。

综上所述, 山西太原两所三甲医院多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药情况非常严重, 而且耐消毒剂基因的携带率较高, 临床应当根据细菌药敏试验结果正确使用抗菌药物, 避免抗菌药物过度使用, 加强细菌耐药性检测和相关耐药基因分析, 开展分子临床流行病学研究, 分析临床菌株对消毒剂耐药与菌株医院内播散的关系, 对于指导医院正确落实消毒隔离等感控措施具有非常重要的意义。

4 参考文献

- 1 陈佰亿, 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. 中华医学杂志, 2012, 92: 76-85.
- 2 钟海波, 伍晓峰, 林建濂. 广州三所医院鲍曼不动杆菌携带耐消毒剂基因及耐药基因的调查. 中国医药, 2014, 9: 575-579.
- 3 姜梅杰, 冯莉, 张福森. 多重耐药鲍曼不动杆菌中氨基糖苷类修饰酶基因及 *qacEΔ1* 基因的研究. 中华临床医师杂志, 2012, 6: 3062-3064.
- 4 Soumet C, Fourreau E, Legrand P, et al. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*. Vet Microbiol, 2012, 158: 147-152.
- 5 Wisplinghoff H, Schmitt R, Woehrman A, et al. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Hospital Infection, 2007, 66: 174-181.
- 6 刘文秀, 崔红霞, 韩爽, 等. 鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌 *qacEΔ1* 基因检测及消毒剂抗性研究. 实用检验医师杂志, 2015, 7: 138-142.

(收稿日期: 2015-11-10)

(本文编辑: 李霖)

消 息

第四届全国生殖医学临床实践和研究论坛征文通知

《第四届全国生殖医学临床实践和研究论坛》将于 2016 年 3 月 18 日-20 日在北京举办。本次大会将围绕妇科生殖内分泌疾病诊治、不孕不育的治疗、男性疾病诊治、生殖遗传、避孕节育及辅助生殖技术等领域的的前沿及热点问题进行全面、多角度的学术交流和探讨。

1 论坛内容

女性生殖内分泌与不孕不育论坛; 男性生殖医学论坛; 计划生育与生殖保健适宜技术论坛; 生殖外科论坛; 辅助生殖论坛; 中药与不孕不育论坛。

2 征文内容

生殖临床学; 生殖实验室技术、基础研究; 生殖男科学、人类精子库; 生殖伦理、管理学、护理学等涉及生殖医学的基

础研究和临床研究及相关问题探索等。

3 参会对象

各级医院从事生殖医学的临床医生、护士、实验室人员; 从事遗传、男科、妇产科、外科、微创、腔镜等相关专业的医生、护士和实验室人员; 各级人口计生委及科研院所, 人口计生委技术服务机构相关人员。

4 会议时间与地点

会议时间: 2016-03-18 至 2016-03-20

会议地点: 北京

5 组委会秘书处

联系人: 王红翔、杨志强

组委会电话/传真: 010-51956860、13366622096