文章编号:1001-8689(2009)11-0691-04

呼吸内科常见菌及鲍曼不动杆菌质粒上耐药基因的研究

李蓉[1] 徐小文[2] 陈娇[1] 刘晓庆[1] 莫冰[1] 黎帆[1]
(1 南昌大学基础医学院微生物学教研室, 南昌 330006;
2 南昌市东湖区卫生监督所, 南昌 330008)

摘要: 目的 分析 155 株呼吸内科分离菌的种类、分布、耐药性及鲍曼不动杆菌(Acinetobacter baumannii,AB)质粒上的耐药基因。**方法** 用 Microscan-autoscan-φ 型自动微生物分析仪鉴定到种并测定其对常用抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC_{50}),按美国临床实验室标准化研究所(CLSI/NCCLS)2003 年版标准判断结果,利用 WHONET 5.2 软件进行统计和分析,并用聚合酶链式反应(PCR)分析 AB 质粒上的耐药基因。**结果** 呼吸内科分离菌中革兰阴性菌占 85.81%,常见的菌种是肺炎克雷伯菌(17.29%),AB(15.79%),洛菲不动杆菌(13.53%),铜绿假单胞菌(11.28%),大肠埃希菌(9.77%)和短黄杆菌(9.02%),非发酵菌的分离率明显上升,占分离菌总数的 45.81%,91.61% 的标本来自痰液。革兰阴性菌菌耐药率高,有一株 AB 对除亚胺培南以外的 14 种常用抗生素均高度耐药且其质粒上携带可接合传递并稳定传代的 3 种耐药基因。**结论** 细菌的多重耐药日趋严重,开展细菌耐药性监测,对指导临床合理使用抗生素,降低医院感染率和病死率有重要意义。质粒上带一或多种可接合传递并稳定传代的 bla_{TEM-1}、bla_{PER-1} 和 bla_{OXA-23} 基因是呼吸内科 AB 多重耐药的分子学机制之一。

关键词: 呼吸内科; AB; 耐药; 基因; 质粒
中图分类号: R378.2 **文献标识码:** A

Study on bacteria in respiratory unit and plasmid mediated drug-resistant gene of *Acinetobacter baumannii*

Li Rong[1], Xu Xiao-wen[2], Chen Jiao[1], Liu Xiaoqing[1], Mo Bing[1] and Li Fan[1]
(1 Department of Microbiology, Faculty of Basic Medical Sciences of Nanchang University, Nanchang 330006;
2 Donghu Health Supervising Hygiene, Nanchang 330008)

ABSTRACT Obejective To analyse the species, distribution and drug resistance of 155 isolates obtained from respiratory unit. To study the drug resistant gene of *Acinetobacter baumannii*(AB). **Methods** The minimal inhibitory concentrations(MICs) and bacteria were identified by Microscan-autoscan-φ automatic microbe analytic instrument and the results were anzlyzed according to CLSI/NCCLS(2003) by WHONET 5.2 software. The analysis of drug-resistant gene on plasmid of AB by PCR. **Results** Gram-negative bacilli strains accounted for 85.81% in respiratory infection unit. The main pathogen included *K. pneumoniae*(17.29%), AB(15.79%), *A. lwoffi*(13.53%), *P. aerugiinosa*(11.28%), *E. coil*(9.77%) and *E. brevis*(9.02%). The isolate rate of nonfermenting pathogen were increasing, accounted for 45.81% of total isolates, 91.61% isolates were isolated from the sputum. Drug resistant rates of Gram-negative bacilli were very high. There was a AB isolates which resistant to 14 usually used antibiotics except imipenem and it's plasmid harbored three kinds of drug resistant genes that can be transferred and passed stably. **Conclusion** The serious of bacterial multi-drug resistance is increasing, it is urgent to carry out surveillance of bacterial resistance for use antibiotics reasonably in order to decrease the morbidity rate and fatality rate. Plasmid harboring one or more bla_{TEM-1}, bla_{PER-1} and bla_{OXA-23} genes which can be transferred and passed stably is one of the molecular mechanism of multi-drug resistant AB in respiratory infection unit.

KEY WORDS Respiratory unit; *Acinetobacter baumannii*; Drug-resistant; Gene; Plasmid

收稿日期: 2008-12-20 **修回日期:** 2009-03-02

作者简介: 李蓉,女,生于 1973 年,博士,副教授,硕士生导师,北京大学医学部博士后。研究方向:细菌耐药机制。lirong@bjmu.edu.cn

呼吸道感染患者长期住院、大量使用广谱抗菌药物、经常接受呼吸机辅助呼吸等侵入性治疗，发生全身感染的机会增加；随着抗生素的泛用和滥用，呼吸道病原菌耐药性的流行迅速增长[1]且播散迅速，甚至出现多重耐药，这已成为一个全球性问题[2,3]。耐药革兰阴性菌菌呼吸道感染与延长的住院时间和增长的死亡率相关[4]，尤其对儿童、老人、慢性病患者和免疫功能低下者[5]的生命危害更大。对呼吸内科感染常见菌的种类、分布、耐药性进行分析，研究 MDR（multi-drug resistant）鲍曼不动杆菌（AB）质粒上的耐药基因型，有助于指导呼吸内科的临床治疗，促进呼吸内科感染的恢复。在呼吸内科，AB 不断增加，许多 AB 菌株对 β-内酰胺类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类抗生素高度耐药[6]。MDR AB 是近年造成呼吸内科感染治疗困难的一个重要致病菌[7]，因此，我们分析了呼吸内科常见菌的种类、分布及耐药特点，并对 AB 质粒上的耐药基因进行了分型，探讨了其质粒在院内感染耐药传递中的重要作用。现将结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　菌株来源

2004 年 5 月至 11 月从南昌大学一附院检验科分离并保存的呼吸内科菌株，共 155 株。

1.2　药敏试验

用 Microscan-autoscan-φ 型自动微生物分析仪通过微量稀释法直接报告临床分离菌对常用抗菌药物的 MIC_{50}，按美国临床实验室标准化研究所（CLSI/NCCLS）2003 年版标准判断结果，大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853（江西省临检中心）作药敏实验质控菌；大肠埃希菌 ATCC 25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 作 PCR 实验对照（北京协和医院王辉教授惠赠）。

1.3　基因扩增

TEM-1，PER-1，SHV-1，VEB-1，OXA-10，OXA-23，OXA-24 和 SHV 基因扩增引物按文献[8]，由 TaKaRa 公司合成。

1.4　试剂

质粒 DNA 小量纯化试剂盒，Ex Taq™ Hot Start Version 购自 TaKaRa 公司，氨苄西林购自上海 Sangon，LB 培养基（英国 Oxoid 公司）。

1.5　PCR 扩增 AB 耐药基因

PCR 反应总体积 50μl，其中引物各 1μl，10 × PCR（Mg^{2+}）缓冲液 5μl，dNTP4μl，*Taq* 酶 0.25U，DNA 模板 2μl。PCR 扩增条件：首先 94℃ 变性 1min；然后 94℃ 30s，{bla_{TEM-1} 52℃ 30s，bla_{PER-1} 50℃ 30s，bla_{OXA-23} 42℃ 45s}、72℃ 1min，共 30 个循环，最后 72℃ 10min 延伸。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.6　接合试验

选择一株同时带 bla_{TEM-1}、bla_{PER-1} 和 bla_{OXA-23} 基因且对实验所用抗生素全耐药的 MDR AB 作供体菌，大肠埃希菌 ATCC 25922 作受体菌，进行接合试验，挑单个接合子菌落在 Amp^- 和 Amp^+ 的平板上各连传三代。鉴定菌种，分析其产酶、药敏、基因型及传代的稳定性。

1.7　数据分析

药敏结果用 WHO 全球细菌耐药性监测网提供的 WHONET5.2 软件进行统计分析。

2　结果

2.1　细菌分布

2.1.1　菌种分布　在呼吸内科分离的 155 株细菌中，革兰阳性菌菌 22 株，占 14.19%，革兰阴性菌菌 133 株，占 85.81%。在革兰阳性菌中最常见的是葡萄球菌 10 株（45%），其次为肠球菌 6 株（30%）和肺炎链球菌 4 株（20%）等。在革兰阴性菌中最常见的是肺炎克雷伯菌 23 株（17.29%），其次为 AB 21 株（15.79%）、洛菲不动杆菌 18 株（13.53%）、铜绿假单胞菌 15 株（11.28%）、大肠埃希菌 13 株（9.77%）、短黄杆菌 12 株（9.02%）、阴沟肠杆菌 7 株（5.26%）及嗜麦芽假单胞菌 5 株（3.76%）等。其中，非发酵菌的分离率近年来呈上升趋势，占呼吸内科分离细菌总数的 45.81%，值得关注。

2.1.2　标本分布　呼吸内科分离的 155 株致病菌主要来源于痰液，有 142 株（91.61%）；其次为血液 5 株（3.23%）等。

2.2　呼吸内科常见菌的耐药状况

葡萄球菌对临床常用抗生素几乎都耐药，对氨苄西林和哌拉西林耐药率高达 90%，但对万古霉素 100% 敏感；革兰阴性菌耐药率高，肺炎克雷伯菌仅对哌拉西林/三唑巴坦和亚胺培南敏感，对氨苄西林的耐药率高达 86.96%。AB 和洛菲不动杆菌对头孢西丁、头孢噻吩和头孢唑林高度耐药，平均耐药率分别高达 85.71% 和 72.22%，其中有一株 AB 对除 IPM 以外的 14 种常用抗生素均耐药。铜绿假单胞菌和短黄杆菌对氨曲南，庆大霉素和妥布霉素高度耐药，平均耐药率分别为 71.11% 和 88.89%。大肠埃希菌耐药谱广且耐药率高，对除哌拉西林/三唑巴坦，头孢西丁，亚胺培南和阿米卡星之外的 15 种抗生素均耐药。阴沟肠杆菌对除亚胺培南和阿米卡星之外的 17 种抗生素均耐药。嗜麦芽假单胞菌仅对头孢他啶敏感，对其它 11 种抗生素均高度耐药，平均耐药率分别高达 80%。各常见革兰阴性菌菌对临床常用抗生素的耐药率见表 1。

2.3　AB 质粒上的耐药基因型

表 1 呼吸内科常见革兰阴性菌的耐药率(株,%)

抗菌药物	肺炎克雷伯菌 (n=23)	鲍曼不动杆菌 (n=21)	洛菲不动杆菌 (n=18)	铜绿假单胞菌 (n=15)	大肠埃希菌 (n=13)	短黄杆菌 (n=12)	阴沟肠杆菌 (n=7)	嗜麦芽假单胞菌 (n=5)
氨苄西林	20(86.96)	8(38.10)	3(16.67)	-	12(92.31)	-	5(71.43)	-
氨苄西林/舒巴坦	11(47.83)	0(0.00)	0(0.00)	-	7(53.85)	-	5(71.43)	-
哌拉西林	11(47.83)	2(9.52)	0(0.00)	2(13.33)	11(84.62)	2(16.67)	5(71.43)	4(80.00)
哌拉西林/三唑巴坦	1(4.35)	-	-	-	1(6.67)	1(7.69)	1(8.33)	2(28.57)
头孢噻吩	10(43.48)	18(85.71)	13(72.22)	-	8(61.54)	-	6(85.71)	-
头孢唑林	8(34.78)	21(100.00)	16(88.89)	-	8(61.54)	-	6(85.71)	-
头孢呋肟	7(30.43)	5(23.81)	4(22.22)	-	8(61.54)	-	5(71.43)	-
头孢曲松	7(30.43)	2(9.52)	1(5.56)	1(6.67)	8(61.54)	1(8.33)	4(57.14)	4(80.00)
头孢他啶	8(34.78)	1(4.76)	0(0.00)	2(13.33)	8(61.54)	1(8.33)	4(57.14)	1(20.00)
头孢唑肟	7(30.43)	2(9.52)	1(5.56)	2(13.33)	8(61.54)	2(16.67)	4(57.14)	4(80.00)
头孢吡肟	8(34.78)	2(9.52)	0(0.00)	1(6.67)	8(61.54)	1(8.33)	2(28.57)	4(80.00)
头孢西丁	6(26.09)	15(71.43)	10(55.56)	-	1(7.69)	-	6(85.71)	-
氨曲南	7(30.43)	5(23.81)	2(11.11)	11(73.33)	8(61.54)	11(91.67)	4(57.14)	4(80.00)
亚胺培南	2(8.70)	0(0.00)	0(0.00)	2(13.33)	1(7.69)	2(16.67)	1(14.29)	5(100.00)
庆大霉素	7(30.43)	1(4.76)	1(5.56)	11(73.33)	8(61.54)	11(91.67)	3(42.86)	5(100.00)
妥布霉素	6(26.09)	1(4.76)	1(5.56)	10(66.67)	7(53.85)	10(83.33)	3(42.86)	4(80.00)
复方磺胺甲噁唑	11(47.83)	5(23.81)	3(16.67)	5(33.33)	12(92.31)	5(41.67)	4(57.14)	3(60.00)
环丙沙星	6(26.09)	1(4.76)	1(5.56)	1(6.67)	10(76.92)	1(8.33)	2(28.57)	4(80.00)
阿米卡星	-	2(9.52)	1(5.56)	5(33.33)	1(7.69)	5(41.67)	1(14.29)	3(60.00)

-:对此菌不建议用此抗生素。

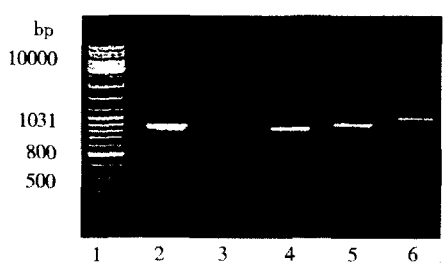
21 株 AB 全部耐药,其中 4 株质粒上带有耐药基因,共分离到 3 种耐药基因型,1 株仅带 bla_{TEM-1} 基因,2 株同时带 bla_{TEM-1} 和 bla_{OXA-23} 基因,1 株同时带 bla_{TEM-1}(840bp)、bla_{PER-1}(925bp)和 bla_{OXA-23}(1003bp)基因,基因分型图见图 1。

2.4 MDR AB 接合试验结果

2.4.1 供体菌、受体菌和接合子的药敏 实验结果表明,供体菌质粒上所带的部分抗菌药物的耐药性传给了受体菌,使得接合子对复方磺胺甲噁唑、氨苄西林、头孢噻吩、头孢吡肟、头孢呋肟耐药,对亚胺培南和氨苄西林/舒巴坦中度敏感。

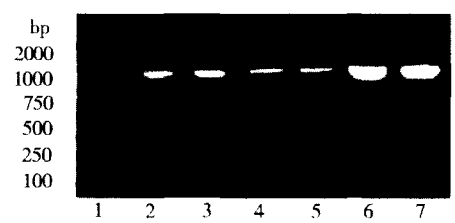
2.4.2 供体菌和接合子的耐药基因型 用 TEM-1,PER-1 和 OXA-23 三对引物分别扩增供体菌和接合子质粒上的耐药基因,结果表明接合子带有与供体菌相同的 bla_{TEM-1}、bla_{PER-1} 和 bla_{OXA-23} 3 种基因(图 2)。

2.4.3 接合子的传代稳定性 接合子质粒上所携带的 bla_{TEM-1}、bla_{PER-1} 和 bla_{OXA-23} 3 种耐药基因在 Amp^- 和 Amp^+ 麦康凯培养基中均能稳定传代。



1:GeneRuler™ DNA Ladder; 2:肺炎克雷伯 ATCC 700603 SHV 引物 PCR 结果(阳性对照); 3:ATCC 25922 SHV 引物 PCR 结果(阴性对照); 4~6:依次为 23 号临床分离株的 TEM、PER 和 OXA-23 引物 PCR 结果

图 1 23 号临床分离株的耐药基因分型图谱



1:DL2000 DNA marker; 2,4,6:供体菌 TEM-1,PER-1 和 OXA-23 引物 PCR 产物;3,5,7:接合子 TEM-1,PER-1 和 OXA-23 引物 PCR 产物

图 2 供体菌和接合子的耐药基因分型图谱

3　讨论

由于呼吸内科患者呼吸道分泌功能减退，纤毛运动减弱，不能及时排痰，加上气管插管、静脉插管、使用呼吸机、长期使用广谱抗生素后，导致菌群失调，耐药率高的革兰阴性菌定植生长，发生全身感染的机会增加[9]。AB 是引起呼吸内科感染爆发的一种机会致病菌，是院内菌血症、肺炎和尿路感染的一个重要源泉[10]，当 AB 是主要病原菌时，通气相关肺炎的死亡率高。MDR AB 的报道逐年增加，常对广谱头孢菌素和碳青霉烯类耐药。

本研究发现，南昌大学一附院呼吸内科感染最常见的致病菌为肺炎克雷伯菌 23 株，占 17.29%，其次为 AB 21 株（15.79%）和洛菲不动杆菌 18 株（13.53%）等。痰液中分离得最多，占 91.61%，远高于西班牙某医院的报道（35%）[9]，这与呼吸内科患者长期使用呼吸机辅助呼吸密切相关。万古霉素为金葡菌感染治疗的首选药，与其它文献报道一致；革兰阴性菌耐药率高，亚胺培南为治疗革兰阴性菌感染的首选药，但嗜麦芽假单胞菌仅对头孢他啶敏感。不动杆菌属对 β-内酰胺类抗生素耐药率高，与其它文献报道一致[11]。不同地区、不同医院、不同科室，由于常规使用的抗生素有所不同，常见感染细菌的种类及耐药谱会有所不同。因此，应注意在获得培养和药敏实验结果后再选择性的治疗，并注意抗生素循环使用。

目前国内、外在 AB 中分离的由质粒介导的 β-内酰胺酶主要为 TEM-1 型，PER-1 型 ESBLs 和 OXA-23 型碳青霉烯水解酶，且分离率极低。本研究在耐药 AB 质粒上分离到了 TEM-1 型和 PER-1 型两种 ESBLs 基因，以及 OXA-23 型碳青霉烯水解酶基因，有一株对除亚胺培南以外的 14 种常用抗生素均高度耐药的 AB 同时带 $bla_{\text{TEM-1}}$、$bla_{\text{PER-1}}$ 和 $bla_{\text{OXA-23}}$ 3 种基因，应进一步监测其流行和耐药情况，及时调整抗生素的使用方案，以防多重耐药 AB 感染。

接合是不同种属细菌间 DNA 自然传递的最常见方式，革兰阴性菌杆菌耐药率增长的最重要机制是带耐药基因的质粒通过接合播散。本研究证明了 AB 所带的多重耐药质粒可在不同种属间通过接合的方式进行传递，并可稳定传代，与 Joshi 等[11]报道相符。

以上结果提示，不同医院的呼吸内科，抗感染所使用的抗生素不同，常见致病菌的种类及耐药谱也会有所不同，碳青霉烯类为治疗严重细菌感染的最有价值的方法，但碳青霉烯类耐药 AB 也逐渐增长；对呼吸内科感染常见菌的种类、分布、耐药性进行分析，研究 MDR AB 质粒上的耐药基因型并确定其在不同种属细菌间的可传递性，有助于指导呼吸内科感染的治疗。

参　考　文　献

[1] Hawkey P, Munday C J. Multiple resistance in Gram-negative bacteria[J]. *Reviews in Medical Microbiology*, 2004, 15(2): 51 ~ 61.

[2] Ayalew K, Nambiar S, Yasinskaya Y, *et al*. Carbapenems in pediatrics[J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2003, 25 (5): 593 ~ 599.

[3] Hujer K M, Hujer A M, Hulten E A, *et al*. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(12): 4114 ~ 4123.

[4] Jeffrey E C, Jennifer A S, Kurt D R. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the 16S rRNA gene[J]. *J Clinical Micro biology*, 2003, 41(8): 3790 ~ 3800.

[5] Lockhart S R, Abramson M A, Beekmann S E, *et al*. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004[J]. *J Clinic Microbiology*, 2007, 45 (10): 3352 ~ 3359.

[6] Yildirim S, Nursal T Z, Tarim A, *et al*. Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care units, and the hospital services unit of a single center [J]. *J Burn Care & Rehabilitation*, 2005, 26(6): 488 ~ 492.

[7] Szabó D, Szentandrássy J, Juhász Z, *et al*. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumanii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2008, 7: 12

[8] 李蓉，李文林，石小玉，等. 产 ESBLs 鲍曼不动杆菌的耐药特性及其耐药基因分型[J]. 中国抗生素杂志，2006，31 (4)：219 ~ 222.

[9] Nemec A, Dijkshoorn L, Reijden T, *et al*. Long-term predominance of two pan-European clones among multi- resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech republic [J]. *J Medical Microbiology*, 2004, 53(2): 147 ~ 153.

[10] Hodle A E, Richter K P, Thompson R M. Infection control practices in U. S. burn units[J]. *J Burn Care & Research*, 2006, 27(2): 142 ~ 151.

[11] Joshi S G, Litake G, Ghole VS, *et al*. Plasmid-borne extended-spectrum [beta]-lactamase in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Medical Microbiology*, 2003, 52 (12): 1125 ~ 1127.