



DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.006

http://www.gjbl.net/gjblkx/fileup/PDF/20140141.pdf

鲍曼不动杆菌耐药性分析及AmpC β -内酰胺酶基因研究

李艳明¹, 刘一凡², 简子娟¹, 刘文恩¹, 李艳华¹, 谷秀梅¹, 彭婉婵¹

(中南大学 1. 湘雅医院检验科, 长沙 410008; 2. 湘雅医学院检验系, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 了解临床标本分离的鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)对常见抗生素的耐药现状并研究Ab中质粒及染色体介导的AmpC β -内酰胺酶基因的分布特点。方法: 应用VITEK-2微生物分析系统对中南大学湘雅医院2010年11月至2011年4月临床标本进行分离培养、鉴定和药物敏感性分析, 采用PCR扩增方法对173株非重复Ab blaMOX, blaCMY-2, blaDHA, blaACC, blaACT-1, blaFOX, blaADC六种耐药基因进行分析。结果: 173株临床分离菌株对第一、三代头孢菌素, 青霉素, 磺胺类复合制剂及呋喃妥因的耐药率均超过70%; 对喹诺酮类药物中左旋氧氟沙星、环丙沙星耐药率分别为23.7%和89.0%; 对氨基糖苷类抗生素耐药率为58.4%~85.5%; 对氨基曲南的耐药率为51.4%; 对碳青霉烯类、第四代头孢菌素及 β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂复合物耐药率为8.7%~89.6%(其中耐药率最低的为头孢哌酮/舒巴坦)。173株Ab中携带blaADC基因的为154株(89.0%), 且产blaADC基因的菌株对头孢曲松、庆大霉素、妥布霉素、复方新诺明、环丙沙星、亚胺培南的耐药率高于不产blaADC基因的菌株, 两组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。未扩增出blaMOX, blaCMY-2, blaDHA, blaACC, blaACT-1, blaFOX五种耐药基因。结论: 头孢哌酮/舒巴坦可作为治疗Ab感染的推荐药物。产ADC型AmpC β -内酰胺酶是Ab菌株对头孢曲松、庆大霉素、妥布霉素、复方新诺明、环丙沙星、亚胺培南耐药的重要原因之一。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; AmpC酶; 耐药基因

Study on drug resistance and genes of AmpC β -lactamases in *Acinetobacter baumannii*

LI Yanming¹, LIU Yifan², JIAN Zijuan¹, LIU Wen'en¹, LI Yanhua¹, GU Xiumei¹, PENG Wanchan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Faculty of Laboratory Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract **Objective:** To investigate the distribution and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* from Xiangya Hospital and to explore the genes of AmpC β -lactamases in *Acinetobacter baumannii*. **Methods:** *Acinetobacter baumannii* were isolated from November 2010 to April 2011 from Xiangya Hospital, Central South University. All strains were identified and determined the MICs of the common antibiotics by VITEK-2 System. The resistance

收稿日期 (Date of reception): 2013-09-19

通信作者 (Corresponding author): 刘文恩, Email: liuwenen@gmail.com

genes, blaMOX, blaCMY-2, blaDHA, blaACC, blaACT-1, blaFOX, blaADC were analyzed by PCR. **Results:** Total isolated strains were highly resistant to the first and third-generations of cephalosporin and penicillin, sulfamethoxazole, nitrofurantoin (>70%). The resistance rate to quinolones, aminoglycosides, aztreonam, carbapenems/forth generations of cephalosporin/ β -lactam/ β -lactamase inhibitor-resistant complex was 23.7%–89.0%, 58.4%–85.5%, 51.4%, and 8.7%–89.6%, respectively. The resistance rate to cefoperazone/sulbactam was the lowest. The rate of carrying blaADC was 89.0%, and the resistance rates of blaADC-positive strains to ceftriaxone, gentamicin, tobramycin, sulfamethoxazole, ciprofloxacin, imipenem was significantly higher than that of blaADC-negative strains ($P<0.05$). The gene of blaMOX, blaCMY-2, blaDHA, blaACC, blaACT-1, blaFOX were not detected. **Conclusion:** Cefoperazone/sulbactam is recommended as treatment drugs of *Acinetobacter baumannii* infection. ADC type AmpC β -lactamase might be an important factor of drug resistance to ceftriaxone, gentamicin, tobramycin, sulfamethoxazole, ciprofloxacin, imipenem in *Acinetobacter baumannii*.

Key words *Acinetobacter baumannii*; AmpC lactamases; resistance gene

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)属于非发酵革兰阴性菌, 为条件致病菌, 是重要的医院感染病原菌^[1-2]。近年来, 随着临床上广谱抗生素应用的增多, 其耐药性明显上升, 尤其是多重耐药甚至泛耐药鲍曼不动杆菌的不断出现, 在全球多个国家暴发流行并引起广泛的重视^[3-4]。AmpC β -内酰胺酶存在于大多数革兰阴性杆菌中, 是革兰阴性杆菌主要的耐药原因^[5], 它能水解青霉素、第一、二、三代头孢菌素和单环类 β -内酰胺抗生素, 且不被克拉维酸(CA)抑制。为了解中南大学湘雅医院Ab临床分离株对常见抗生素的耐药现状及AmpC β -内酰胺酶基因存在状况, 笔者收集173株Ab进行了耐药性分析并检测质粒及染色体 AmpC β -内酰胺酶相关基因, 从而了解湘雅医院Ab的耐药现状和耐药产生的原因, 为临床合理使用抗生素提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2010年11月至2011年4月自中南大学湘雅医院住院患者的痰液、支气管分泌物、创面分泌物等送检标本中分离出Ab 173株, 菌株收集无重复。标准菌株为大肠埃希菌ATCC25922, 阴沟肠杆菌029M。收集上述173例Ab感染患者的临床资料, 包括标本种类、年龄、住院科别等。

1.2 主要仪器与试剂

VITEK-2全自动微生物鉴定及药敏系统(法

国生物梅里埃公司); PCR仪(美国ABI公司); 2720基因扩增仪; Taq酶复合液(Premix Taq)(北京TIANGEN公司); DNA Marker(100~2 000 bp, 大连宝生物公司); 上下游引物(10 pmol/L, 上海生工生物工程公司)。

1.3 菌株鉴定及药敏试验

采用VITEK-2全自动微生物鉴定及药敏系统, 操作和结果判读参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2010年推荐的标准。多重耐药鲍曼不动杆菌(multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, MDRAB)判断标准参考《中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识》^[6], 是指对下列五类抗生素中至少三类抗生素耐药的菌株, 包括: 抗假单胞菌头孢菌素、抗假单胞菌碳青霉烯类抗生素、含有 β -内酰胺酶抑制剂的复合制剂(包括哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦)、氟喹诺酮类抗生素、氨基糖苷类抗生素。

1.4 PCR检测AmpC β -内酰胺酶基因

煮沸法提取总DNA作为PCR模板, 参考文献[7-8]报道, 根据GenBank提供的基因序列, 设计检测AmpC β -内酰胺酶基因的PCR引物(表1), 并对扩增产物进行电泳。

1.5 统计学处理

对药敏结果进行统计分析, 结果分析时采用两样本率比较的 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 AmpC β -内酰胺酶基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of AmpC β -lactamase genes

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 /bp
blaMOX	上游: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT 下游: CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520
blaCMY-2	上游: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA 下游: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462
blaDHA	上游: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT 下游: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405
blaACC	上游: AACAGCCTCAGCAGCCGGTAA 下游: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346
blaACT-1	上游: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG 下游: CTTCCTACTGCGGCTGCCAGTT	302
blaFOX	上游: AACATGGGGTATCAGGGAGATG 下游: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190
blaADC	上游: GGTATGGC(T/C)GTGGG(T/C/G)GT(T/C)ATTC 下游: CTAAGA(C/G)TAAATC(G/A)AA(A/G)GGT	445

2 结果

2.1 药敏试验结果

纳入研究的173株Ab临床分离菌株对氨苄西林、第一代头孢菌素、半合成广谱头孢霉素药物头孢替坦、磺胺类复合制剂复方新诺明以及广谱

抗生素呋喃妥因的耐药率均超过90%；对第三代头孢菌素的耐药率均超过70%；对第四代头孢菌素头孢吡肟耐药率为60.7%；对 β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂复合物的耐药率整体偏低，耐药率最低的药物是头孢哌酮/舒巴坦，仅为8.7%。具体见表2。

表 2 173 株 Ab 临床分离菌株对 21 种抗生素的耐药情况

Table 2 Drug resistance of 173 Ab clinical isolates to 21 antibiotics

抗生素	药敏试验株数	敏感 / 株	中介 / 株	耐药 / 株	耐药率 / %
左旋氧氟沙星	173	64	68	41	23.7
头孢哌酮 / 舒巴坦	173	147	11	15	8.7
阿米卡星	173	71	1	101	58.4
头孢曲松	173	4	3	166	96.0
氨苄西林 / 舒巴坦	173	73	45	55	31.8
庆大霉素	173	11	9	153	88.4
氨基曲南	173	23	61	89	51.4
复方新诺明	173	12	0	161	93.1
环丙沙星	173	14	5	154	89.0
头孢他啶	173	11	37	125	72.3
妥布霉素	173	22	3	148	85.5
哌拉西林 / 他唑巴坦	173	11	7	155	89.6
头孢吡肟	173	24	44	105	60.7
头孢噻肟	115	2	1	112	97.4
美洛培南	115	28	57	30	26.1
美洛西林	115	2	0	113	98.3
头孢唑林	58	2	0	56	96.6
头孢替坦	58	2	0	56	96.6
亚胺培南	58	10	1	47	81.0
氨苄西林	58	3	0	55	94.8
呋喃妥因	58	2	0	56	96.6

2.2 173株Ab菌株的多重耐药情况

对173株菌株的上述5类抗生素耐药情况进行统计, 其中MDRAB共33株, 占19.1%(表3)。

表3 173株菌株中多重耐药Ab的统计分析

Table 3 Statistical analysis of MDRB from 173 strains

类别	菌株数量	比例 /%
五类抗生素均敏感	10	5.7
一类抗生素耐药	75	43.4
二类抗生素耐药	55	31.8
三类抗生素耐药	30*	17.3
四类抗生素耐药	2*	1.2
五类抗生素均耐药	1*	0.6
合计	173	100

* 合计为33株, 占19.1%(33/173)。

2.3 AmpC酶基因检测

blaADC扩增产物片段大小与预期相符(图1), 扩增出携带blaADC基因的154株(89.0%), 未扩增出携带blaADC基因的19株(10.1%)。另未扩增出blaMOX, blaCMY-2, blaDHA, blaACC, blaACT-1, blaFOX相关基因的产物。

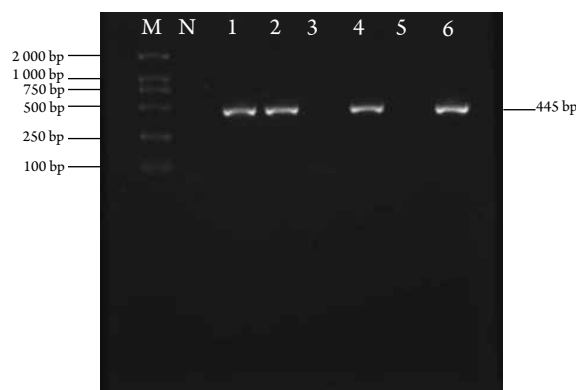


图1 blaADC耐药基因扩增产物电泳凝胶图

Figure 1 PCR electropherogram of blaADC gene

M: Marker; N: Negative; 1-6: Different samples

2.4 携带耐药基因菌株的耐药分析

在全部21种抗生素中选择代表性的15种药物, blaADC阳性菌株对头孢曲松、庆大霉素、妥布霉素、复方新诺明、环丙沙星、亚胺培南这6种药物的耐药率高于blaADC阴性菌株, 且差异有统计学意义($P < 0.05$, 表4)。MDRAB的blaADC基因携带率与非MDRAB的blaADC基因携带率差异无统计学意义[87.9% (29/33) vs 89.3% (125/140), $P > 0.05$]。

表4 产blaADC基因菌株15种抗生素的耐药率分析

Table 4 Analysis of resistance rate to 15 antibiotics of strains carrying blaADC gene

抗生素	blaADC 基因阳性	blaADC 基因阴性	χ^2	P
左旋氧氟沙星	24.0	21.2	0.083	1.000
头孢哌酮 / 舒巴坦	9.7	0.0	2.026	0.378
阿米卡星	59.7	47.4	1.065	0.331
头孢曲松	98.1	78.9	15.900	0.003
氨苄西林 / 舒巴坦	31.2	36.8	0.251	0.610
庆大霉素	91.6	63.2	13.343	0.002
氨曲南	51.3	52.6	0.012	1.000
复方新诺明	94.8	78.9	6.589	0.029
环丙沙星	90.9	73.7	5.133	0.040
头孢他啶	71.4	78.9	0.477	0.595
妥布霉素	89.0	57.9	13.204	0.002
哌拉西林 / 他唑巴坦	90.9	78.9	2.596	0.116
头孢吡肟	61.7	52.6	0.582	0.464
美洛培南	28.0	25.0	0.022	1.000
亚胺培南	95.7	63.6	23.720	<0.001

3 讨论

AmpC为质粒或染色体介导产生的 β -内酰胺酶,属于Ambler分子结构分类法中的C类和B-J-M功能分类法中的第I组。*Ab*所产生的染色体介导的AmpC β -内酰胺酶因有别于其他AmpC酶,Hujer等^[9]将其命名为ADC β -内酰胺酶。质粒型AmpC β -内酰胺酶耐药基因在质粒间及质粒与染色体间转移主要是通过转座子或整合子为工具实现的^[10],多表现为多重耐药,故为临床抗感染治疗提出新的难题。

β -内酰胺类抗生素曾是*Ab*感染治疗的有效药物,但本研究发现*Ab*对多种 β -内酰胺类抗菌素耐药。近年来,对碳青霉烯类的耐药率在逐年增加。2001年刘文恩等^[11]的报道显示*Ab*在革兰阴性菌中分离率居第3位,对亚胺培南的耐药率最低,为3.4%,2006年对亚胺培南的耐药率升至11.7%^[12]。本研究中blaADC阳性菌株对亚胺培南的耐药率为95.7%,blaADC阴性菌株则为63.6%,均高于其他文献报道^[13-14],可能因为本研究收集菌株数量有限,但仍提示要加强鲍曼不动杆菌对亚胺培南耐药的进一步监测,从而提供更准确的数据供临床参考。本研究中*Ab*对磺胺类、氨基糖苷类的耐药率均超过80%,其原因可能与抗生素滥用、院内感染有关。但是,*Ab*对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率仅为8.7%,其原因可能为舒巴坦与大多数 β -内酰胺类作用靶位不同,其可直接作用于细菌青霉素结合蛋白,同时它可抑制多种 β -内酰胺酶,对不动杆菌有较强的抑菌作用^[15],因此,含舒巴坦的 β -内酰胺类复合制剂可做为治疗*Ab*的推荐药物^[16]。另外对喹诺酮类药物中左旋氧氟沙星耐药率为23.7%,提示左旋氧氟沙星可以作为二线药物。本研究MDRAB的株数与其他文献报道^[13,17]相比较低,但仍需引起高度重视。

blaADC基因的高阳性率可能与*Ab*对第一、二、三代头孢菌素类,青霉素类及单环类 β -内酰胺类抗生素的高耐药率密切相关,由于blaADC基因在*Ab*内普遍存在,但仍未在不动杆菌属中其他的种内以及不动杆菌以外的细菌中发现^[18-19],提示检测blaADC基因有可能作为*Ab*特异性的鉴别指标。

blaADC基因阳性的菌株对抗生素头孢曲松、庆大霉素、妥布霉素、复方新诺明、环丙沙星、亚胺培南的耐药率与blaADC基因阴性相比差异具有统计学意义,表明染色体介导的AmpC酶在*Ab*对上述药物的耐药机制中起重要作用。而blaADC

基因阳性的菌株对其他抗生素的耐药率与blaADC基因阴性相比差异无统计学意义,提示本组研究菌株仍可能存在其他耐药机制。MDRAB blaADC基因携带率与非MDRAB相比,差异没有统计学意义,提示blaADC基因也许并不是本研究菌株对多种抗生素耐药的主要原因,其他耐药机制可能起主导作用。

*Ab*是当前医院感染的重要病原菌,应严密监测其耐药表型的发展变化,研究其耐药基因的携带情况,从而进一步深入探究导致*Ab*耐药的机制,以便为临床治疗提供实验室依据,对指导合理用药、控制耐药菌株的传播有重要意义。

参考文献

1. Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment[J]. Clin Microbiol Infect, 2002, 8(11): 687-693.
2. Gómez J, Simarro E, Baños V, et al. Six-year prospective study of risk and prognostic factors in patients with nosocomial sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999, 18(5): 358-361.
3. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538-582.
4. Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities [J]. J Infect Dev Ctries, 2009, 3(5): 335-341.
5. 叶惠芬, 周小棉, 陈惠玲, 等. 三种检测阴沟肠杆菌 AmpC 酶方法的比较[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(4): 654-655.
YE Huifen, ZHOU Xiaomian, CHEN Huiling, et al. Comparison of three detection methods of AmpC in *Enterobacter cloacae*[J]. The Journal of Practical Medicine, 2008, 24(4): 654-655.
6. 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]. 中华医学杂志, 2012, 92(2): 76-85.
CHEN Baiyi, HE Lixian, HU Bijie, et al. Diagnosis, treatment, prevention and control of *Acinetobacter baumannii* infection in China[J]. National Medical Journal of China, 2012, 92(2): 76-85.
7. 张丽梅, 苏丹虹, 徐韞健. 鲍曼不动杆菌AmpC酶和AmpC耐药基因检测分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(21): 2683-2685.
ZHANG Limei, SU Danhong, XU Yunjian. Detection on AmpC β -lactamases and AmpC gene of *Acinetobacter baumannii*[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2012, 9(21): 2683-2685.
8. 傅爱玲, 于翠香, 李希华. 多重耐药鲍曼不动杆菌 β -内酰胺酶基

- 因和膜孔蛋白基因研究[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(7): 549-552.
- FU Ailing, YU Cuixiang, LI Xihua. Investigation of β -lactamases enzyme and porin genes of multi-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(7): 549-552.
9. Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7): 2941-2948.
 10. Bratu S, Landman D, Martin DA, et al. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(9): 2999-3005.
 11. 刘文恩, 唐银, 张晋湘, 等. 湘雅医院2001年细菌培养结果及耐药性分析[J]. 中华国际感染控制杂志, 2002, 1(2): 86-88.

LIU Wen'en, TANG Yin, ZHANG Jinxiang, et al. Analysis of bacterial culture results and antibiotic resistance within Xiangya Hospital in 2001[J]. Chinese International Journal of Infection Control, 2002, 1(2): 86-88.

 12. 刘文恩, 易春梅, 邹明祥. 2006年湘雅医院Ab临床感染分布和耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2007, 14(6): 1718-1720.

LIU Wenen, YI Chunmei, ZOU Minxiang. Analysis of distribution and resistance profile of infection of *Acinetobacter baumannii* in Xiangya Hospital in 2006[J]. Practical Preventive Medicine, 2007, 14(6): 1718-1720.

 13. 梁伟, 邹明祥, 邹靖敏, 等. 长沙地区临床分离碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌的分子流行病学特征[J]. 中南大学学报: 医学版, 2012, 37(5): 521-526.

LIANG Wei, ZOU Mingxiang, WU Jingmin, et al. Molecular epidemiological characteristics of clinically isolated carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Changsha[J]. Journal of Central South University. Medical Sciences, 2012, 37(5): 521-526.

 14. 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011年中国CHINET细菌耐药性检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(5): 321-329.

HU Fupin, ZHU Demei, WANG Fu, et al. 2011 CHINET surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2012, 12(5): 321-329.

 15. Levin AS, Levy CE, Manrique AE, et al. Severe nosocomial infections with imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* treated with ampicillin/sulbactam[J]. Int J Antimicrob Agents, 2003, 21(1): 58-62.
 16. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(4): 388-416.
 17. 侯天文, 尹晓琳, 陈兴, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌blaADC酶耐药基因检测及临床特点分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(1): 8-11.

HOU Tianwen, YIN Xiaolin, CHEN Xing, et al. Detection and analysis of drug resistant gene of ADC type beta-lactamase in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Pathogen and Biology, 2008, 3(1): 8-11.

 18. Ribera A, Fernández-Cuenca F, Beceiro A, et al. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and beta-lactams in *Acinetobacter* genospecies 3[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(4): 1430-1432.
 19. Segal H, Nelson EC, Elisha BG. Genetic environment and transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(2): 612-614.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 李艳明, 刘一凡, 简子娟, 刘文恩, 李艳华, 谷秀梅, 彭婉婵. 鲍曼不动杆菌耐药性分析及 AmpC β -内酰胺酶基因研究 [J]. 临床与病理杂志, 2014, 34(1): 41-46. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.006

Cite this article as: LI Yanming, LIU Yifan, JIAN Zijuan, LIU Wen'en, LI Yanhua, GU Xiumei, PENG Wanchan. Study on drug resistance and genes of AmpC β -lactamases in *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2014, 34(1): 41-46. DOI:10.11714/j.issn.2095-6959.2014.01.006