

## 烧伤病房鲍氏不动杆菌耐药性及耐药基因分析

张艳红 付建荣 刘群 阎峻 林秀云

**【摘要】** 目的 研究烧伤病房鲍氏不动杆菌的耐药性与耐药基因的携带情况,以及两者之间的关系。方法 2010 年 7 月—2013 年 2 月,收集从笔者单位收治烧伤患者的创面分泌物、血液、静脉导管附着物、气道分泌物、痰液标本分离的鲍氏不动杆菌(经鉴定)30 株。采用全自动微生物鉴定与药敏分析系统测定菌株对 15 种  $\beta$  内酰胺类抗生素、3 种氨基糖苷类抗生素、2 种喹诺酮类抗生素、1 种磺胺类抗生素共计 21 种临床常用抗生素的耐药性。采用 PCR 法检测菌株中 21 种  $\beta$  内酰胺酶编码基因、12 种氨基糖苷类修饰酶编码基因、6 种喹诺酮类药物作用靶位编码基因、3 种 16 S 核糖体 RNA 甲基化酶编码基因、1 种转座子遗传标记基因、3 种整合子、1 种消毒剂耐药基因、1 种磺胺耐药基因的表达。结果 30 株鲍氏不动杆菌对  $\beta$  内酰胺类抗生素的耐药率为 30.0% ~ 100.0%,对氨基糖苷类抗生素的耐药率为 36.7% ~ 46.7%,对喹诺酮类抗生素的耐药率小于或等于 50.0%,对磺胺类抗生素的耐药率为 53.3%。30 株鲍氏不动杆菌中, $\beta$  内酰胺酶编码基因检出情况:17 株携带 *bla*<sub>TEM</sub>,30 株同时携带 *bla*<sub>OXA-177</sub> 群、*bla*<sub>OXA-23</sub> 群和 *bla*<sub>ADC</sub>,2 株携带 *bla*<sub>OXA-10</sub> 群,2 株携带 *bla*<sub>CARB</sub>,1 株携带 *bla*<sub>SPM</sub>;氨基糖苷类修饰酶编码基因检出情况:10 株携带 *aac*(3)-I,26 株携带 *aac*(6')-Ib,1 株携带 *ant*(2'')-I,1 株携带 *ant*(4');喹诺酮类药物作用靶位编码基因检出情况:7 株携带 *qnrA*,2 株携带 *qnrB*;16 S 核糖体 RNA 甲基化酶编码基因检出情况:16 株携带 *aac*(6')-Ib-Cr,30 株携带 *armA*;16 株携带 1 类整合子;15 株携带转座子遗传标记基因 *tnpu*;26 株携带磺胺耐药基因 *sul1*。**结论** 笔者单位检出的 30 株鲍氏不动杆菌同时携带 *bla*<sub>OXA-177</sub> 群、*bla*<sub>OXA-23</sub> 群、*bla*<sub>ADC</sub>、*armA* 耐药基因,是其对  $\beta$  内酰胺类等抗生素呈现多药耐药的主要机制。

**【关键词】** 烧伤; 鲍氏不动杆菌; 抗药性;  $\beta$  内酰胺类; 耐药基因

烧伤病区抗生素使用频繁,但感染仍难以控制,其中鲍氏不动杆菌对临床常用的多种抗生素存在高耐药性<sup>[1-2]</sup>,已经引起临床警惕。在笔者单位烧伤感染的菌种分布中,鲍氏不动杆菌居于前 4 位<sup>[3]</sup>,患者创面同时分离出泛耐药鲍氏不动杆菌和泛耐药铜绿假单胞菌的情况时有发生。为了控制鲍氏不动杆菌造成的医院内感染,有必要对鲍氏不动杆菌携带耐药基因的情况进行深入研究,从而指导临床合理用药。

### 1 材料与与方法

#### 1.1 菌株来源与菌种鉴定

2010 年 7 月—2013 年 2 月,收集从笔者单位收治烧伤患者中分离的非重复鲍氏不动杆菌(经鉴定)30 株,其中 22 株来源于创面分泌物,3 株来源于痰液,2 株来源于血液,2 株来源于静脉导管尖端附着物,1 株来源于气道分泌物。质控菌株为鲍氏不动杆菌 ATCC 19606,购自北京卫生部临床检验中心。

#### 1.2 药物敏感试验

采用法国生物梅里埃公司生产的 VITEK 2 Compact 型全

自动微生物鉴定与药敏分析系统,检测鲍氏不动杆菌对  $\beta$  内酰胺类抗生素氨苄西林、头孢唑林、头孢西丁、头孢吡辛钠、头孢吡辛酯、氨基曲南、头孢他啶、头孢噻吩、头孢曲松、头孢吡肟、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、氨苄西林/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南,氨基糖苷类抗生素阿米卡星、妥布霉素、庆大霉素,喹诺酮类抗生素环丙沙星、左氧氟沙星,磺胺类抗生素复方磺胺甲噁唑共 21 种临床常用抗生素的耐药情况,根据美国临床和实验室标准协会 2009 年标准判定结果。

#### 1.3 基因检测

挑取纯培养的单个菌落,置于 0.5 mL 离心管(管内预先置入 200 ng/mL 蛋白酶 K 溶液)中,加盖后于 56 °C 水浴 2 h,然后行 95 °C 水浴 10 min。以离心半径 13.5 cm,13 000 r/min 离心 1 min,取上清液作为基因检测模板,于 -20 °C 冰箱保存备用。

采用 PCR 法检测菌株中 21 种  $\beta$  内酰胺酶编码基因 *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>OXA-177</sub> 群、*bla*<sub>OXA-23</sub> 群、*bla*<sub>OXA-24</sub> 群、*bla*<sub>OXA-10</sub> 群、*bla*<sub>OXA-2</sub> 群、*bla*<sub>OXA-1</sub> 群、*bla*<sub>OXA-48</sub> 群、*bla*<sub>PER</sub>、*bla*<sub>VEB</sub>、*bla*<sub>GES</sub>、*bla*<sub>CARB</sub>、*bla*<sub>CTX-M</sub>、*bla*<sub>IMP</sub>、*bla*<sub>VIM</sub>、*bla*<sub>SPM</sub>、*bla*<sub>GIM</sub>、*bla*<sub>DHA</sub>、*bla*<sub>MIR</sub>、*bla*<sub>ADC</sub>,12 种氨基糖苷类修饰酶编码基因 *aac*(3)-I、*aac*(3)-II、*aac*(3)-III、*aac*(3)-IV、*aac*(6')-I、*aac*(6')-II、*ant*(3'')-I、*ant*(2'')-I、*ant*(4')、*aac*(6')-Ib、*aph*(3')-III、*aph*(3')-VI,6 种喹诺酮类药物作用靶位编码基因 *qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*、*qepA*,3 种 16 S 核糖体 RNA 甲基化酶编码基因 *armA*、*rmtB*、

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2015.01.010

基金项目:天津市卫生局科技基金(09KZ18)

作者单位:300222 天津市第四医院检验科(张艳红、付建荣、阎峻),烧伤科(刘群),医保科(林秀云)

通信作者:张艳红,Email:yanhongluozhu@163.com

*aac(6')-Ib-Cr*, 1、2、3 类整合子, 转座子遗传标记基因 *tnpu*, 消毒剂耐药基因 *qacEΔ1*, 磺胺耐药基因 *sul1* 的表达。引物序列设计、合成及 PCR 扩增均由杭州迪安医学检验中心完成。反应体系: 1 μmol/L 上游引物 1 μL, 1 μmol/L 下游引物 1 μL, 2 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸 2 μL, 10 倍稀释的缓冲液 2 μL [氯化钾 10 mmol/L、硫酸铵 8 mmol/L、氯化镁 2 mmol/L、Tris-盐酸 (pH 值 9.0) 10 mmol/L、非离子去污剂 5 g/L、牛血清白蛋白 0.2 g/L], *Taq* 酶 1 U (不计体积), 超纯水 9 μL, 模板液 5 μL, 总反应体积 20 μL。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 出现与 marker 标志物相当的目的条带为阳性。

## 2 结果

### 2.1 耐药情况

30 株鲍氏不动杆菌对 β 内酰胺类抗生素的耐药率为 30.0% ~ 100.0%, 对氨基糖苷类抗生素的耐药率为 36.7% ~ 46.7%, 对喹诺酮类抗生素的耐药率小于或等于 50.0%, 对磺胺类抗生素的耐药率为 53.3%。见表 1。

表 1 30 株鲍氏不动杆菌对常用抗生素的耐药情况 (%)

抗生素名称	敏感	中度敏感	耐药
氨苄西林	0	0	100.0
氨苄西林/舒巴坦	43.3	10.0	46.7
哌拉西林	30.0	13.3	56.7
哌拉西林/他唑巴坦	46.7	13.3	40.0
头孢西丁	0	0	100.0
头孢唑林	0	0	100.0
头孢吡辛钠	6.7	3.3	90.0
头孢吡辛酯	3.3	3.3	93.3
头孢曲松	20.0	26.6	53.3
头孢噻肟	6.7	33.3	60.0
头孢他啶	36.7	13.3	50.0
头孢吡肟	36.6	0	63.3
氨基曲南	3.3	23.3	73.3
亚胺培南	66.7	0	33.3
美罗培南	70.0	0	30.0
阿米卡星	60.0	3.3	36.7
庆大霉素	43.3	10.0	46.7
妥布霉素	56.7	0	43.3
环丙沙星	50.0	0	50.0
左氧氟沙星	56.7	6.6	36.7
复方磺胺甲噁唑	46.7	0	53.3

### 2.2 耐药基因

30 株鲍氏不动杆菌中, β 内酰胺酶编码基因检出情况: 17 株携带 *bla<sub>TEM</sub>*, 30 株同时携带 *bla<sub>OXA-177</sub>* 群、*bla<sub>OXA-23</sub>* 群和 *bla<sub>ADC</sub>*, 2 株携带 *bla<sub>OXA-10</sub>* 群, 2 株携带 *bla<sub>CARB</sub>*, 1 株携带 *bla<sub>SPM</sub>*; 氨基糖苷类修饰酶编码基因检出情况: 10 株携带 *aac(3)-I*, 26 株携带 *aac(6')-Ib*, 1 株携带 *ant(2'')-I*, 1 株携带 *ant(4')*; 喹诺酮类药物作用靶位编码基因检出情况: 7 株携带 *qnrA*, 2 株携带 *qnrB*; 16 S 核糖体 RNA 甲基化酶

编码基因检出情况: 16 株携带 *aac(6')-Ib-Cr*, 30 株携带 *armA*; 16 株携带 1 类整合子; 15 株携带转座子遗传标记基因 *tnpu*; 26 株携带磺胺耐药基因 *sul1*。检测的各类基因中其余未述及基因均未检出。

## 3 讨论

本研究结果显示, 30 株鲍氏不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率在 30.0% 左右, 对氨基糖苷类、加酶抑制剂类抗生素的耐药率在 40.0% 左右, 对喹诺酮类抗生素的耐药率不超过 50.0%, 提示这几类抗生素是临床治疗鲍氏不动杆菌感染的较佳选择。其中, 鲍氏不动杆菌对氨基糖苷类、碳青霉烯类抗生素的耐药率, 低于国内其他地区的相关报道水平<sup>[4-6]</sup>, 原因可能与笔者单位近几年严格控制抗生素在临床上的使用有关。30 株鲍氏不动杆菌对第一、二代头孢菌素和头孢西丁的耐药率高于 90.0%, 对第三、四代头孢菌素的耐药率大于或等于 50.0%, 对氨基曲南的耐药率为 73.3%, 提示临床在经验用药时应该避免使用这几类抗生素。

鲍氏不动杆菌的耐药机制十分复杂, 主要有产 β 内酰胺酶、氨基糖苷类修饰酶、16 S 核糖体 RNA 甲基化酶以及靶位点改变、膜通透性下降和主动外排等, 1 种或几种耐药机制共同作用, 导致其多药耐药。本研究检测了 30 株鲍氏不动杆菌中 48 种耐药基因的携带情况, 结果显示 18 种耐药基因呈阳性, 其中阳性率较高的有 β 内酰胺酶编码基因 *bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>OXA-177</sub>* 群、*bla<sub>OXA-23</sub>* 群和 *bla<sub>ADC</sub>*, 氨基糖苷类修饰酶编码基因 *aac(6')-Ib*, 16 S 核糖体 RNA 甲基化酶编码基因 *armA*、*aac(6')-Ib-Cr*, 1 类整合子, 转座子遗传标记基因 *tnpu*, 磺胺耐药基因 *sul1*。本组鲍氏不动杆菌携带前述高表达基因, 是其呈现多药耐药的主要机制。鲍氏不动杆菌对氨基糖苷类抗生素耐药是通过产生氨基糖苷类修饰酶编码基因、16 S 核糖体 RNA 甲基化酶编码基因及细菌外排泵增强所致, 其中前两者最常见<sup>[5]</sup>。整合子与耐药基因的水平传播密切相关, 它能识别并俘获移动性基因盒, 可将许多耐药基因盒整合在一起, 从而导致多药耐药<sup>[7]</sup>。然而, 本研究没有进一步对每株菌进行耐药基因簇群型别的检测及 DNA 测序, 无法确定 30 株鲍氏不动杆菌携带的耐药基因是否存在同一型别耐药基因的水平传播。

本研究中鲍氏不动杆菌耐药基因的高携带率与其对抗生素的耐药率不完全相符, 原因可能是部分耐药基因存在诱导性表达。该类基因在细菌未接触抗生素时也存在, 只是未发生高表达, 故药物敏感试验显示不耐药; 而抗生素的作用会诱导其高表达, 进一步使细菌形成获得性多药耐药<sup>[8]</sup>。提示临床要谨慎使用抗生素, 以免细菌天然携带的多种耐药基因被大量诱导表达, 导致多药耐药。

## 参考文献

- [1] 徐锦雄, 许琰, 严龙宗, 等. 烧伤患者创面 1437 株病原菌分布特点及耐药性分析 [J]. 中华烧伤杂志, 2013, 29(5): 467-469.
- [2] 刘颖, 张会英, 葛艳玲, 等. 烧伤患者创面 1246 株病原菌分布特点及耐药情况分析 [J]. 中华烧伤杂志, 2013, 29(6): 558-

- 560.
- [3] 张艳红,刘群,付建荣. 1993~2007 年烧伤感染的菌群分布特点与耐药性变化调查分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(3):223-225,228.
- [4] 钱小毛,金海勇,糜祖煌. 绍兴地区鲍氏不动杆菌  $\beta$ -内酰胺酶基因型特点与多药耐药关系的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(5):847-848.
- [5] 陈月馨,周惠芬,钟育红,等. 多药耐药鲍氏不动杆菌氨基糖苷类药物耐药遗传学背景研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(2):227-230.
- [6] 刘天祥,薛晓东,魏莲花,等. 烧伤病房鲍氏不动杆菌质粒介导的 16S rRNA 甲基化酶基因及耐药性传递研究[J]. 中华烧伤杂志,2009,25(2):98-102.
- [7] 顾兵,童明庆,宁明哲,等. 南京地区铜绿假单胞菌的整合子流行性调查[J]. 临床检验杂志,2006,24(2):118-121.
- [8] Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, et al. AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(2):557-562.

(收稿日期:2014-03-21)

(本文编辑:谢秋红)

## · 科技快讯 ·

## 西咪替丁改善烧伤后免疫抑制

有关烧伤后免疫应答的研究较多见,其中大多数聚焦于免疫抑制的机制及其相关介质,而与免疫应答恢复相关药物的免疫调节作用的信息甚少。作者研究了西咪替丁对 20%~60% TBSA 烧伤患者免疫应答的调节作用。共 22 名健康受试者与 37 例烧伤患者纳入研究,其中 18 例患者应用  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  西咪替丁作为试验组,其余 19 例患者应用安慰剂作为对照组。流式细胞术检测外周血单核细胞 CD3、CD4、CD8、CD19 和 CD3/人白细胞抗原 DR 位点(HLA-DR)的表达, $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷掺入法检测外周血单核细胞增殖。结果显示,与健康受试者比较,烧伤患者细胞增殖显著抑制,淋巴细胞计数以及单核细胞 CD3、CD4 表达明显下降,单核细胞 CD19 和 HLA-DR 表达明显增加。与对照组比较,试验组患者  $\text{CD8}^+$ T 淋巴细胞表达增加,外周血单核细胞增殖率得到恢复。研究提示,西咪替丁有助于改善烧伤后细胞介导的免疫反应。

王志勇,编译自《*Int Immunopharmacol*》,2014,22(1):273-276;郇京宁,审校

## 灭活细菌可逆转烧伤后抗生素诱导的宿主防御损害

烧伤患者发生医源性感染的概率很高,而抗生素诱导感染易感性的机制尚未明了。本研究旨在检测抗生素治疗对宿主防御机制的影响。作者将 C57BL/6 小鼠制成 30%~35% TBSA 烧伤后进行联合抗生素治疗。48 h 后,取烧伤组和假伤组小鼠进行肠道内及黏膜层内细菌计数。给小鼠口服灭活大肠杆菌或金黄色葡萄球菌,以刺激肠黏膜产生 Toll 样受体。检测 Toll 样受体 4、抗菌蛋白表达以及 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性、肠黏膜细菌清除活力、肠道通透性、肠系膜淋巴结细菌移位、肺炎克雷伯菌移位、血 IL-6 水平、肺泡巨噬细胞吞噬活性。结果显示,烧伤能增加肠道内微生物菌落数及 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性。系统性抗生素治疗减少了肠内细菌菌落,促进细菌向肠系膜淋巴结移位,增加肠道通透性,提高了血 IL-6 水平;同时抗生素治疗也减弱了肠黏膜杀菌能力及肺泡巨噬细胞吞噬活性。口服灭活大肠杆菌或金黄色葡萄球菌,能诱导 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性并且提高肠黏膜 Toll 样受体 4、抗菌蛋白的表达。由于灭活细菌能逆转抗生素诱导的肺炎克雷伯菌移位及肠道和肺防御机制损害,因此作者得出抗生素联合治疗可以破坏肠道菌群,导致宿主系统防御能力受损的结论。本研究提示,补充灭活细菌能诱导非防卫素蛋白表达,并逆转抗生素对烧伤患者肠道及肺防御机制的损害作用。

王志勇,编译自《*J Am Coll Surg*》,2014,219(4):606-619;郇京宁,审校

## 低剂量糖皮质激素可降低严重烧伤患者并发症发生率

过度全身炎症反应是严重烧伤后一个尚未解决的重要问题。本研究旨在评价低剂量糖皮质激素治疗在下调严重烧伤患者全身炎症反应中的作用。研究共纳入 69 例 70% TBSA 及以上面积烧伤患者,其中 31 例急性期应用低剂量糖皮质激素治疗作为试验组,其余 38 例未接受前述激素治疗作为对照组。比较 2 组患者血浆炎症因子水平及临床转归。结果显示,试验组患者肺部感染、应激性溃疡和/或出血的发生率分别为 24.2%、3.0%,明显低于对照组的 47.8%、19.6%;住院时间比对照组缩短近 13 d;病死率、机械通气时间和脓毒症发生率则与对照组相近。ELISA 法检测显示,试验组患者血浆 C 反应蛋白、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平均明显低于对照组。研究提示,严重烧伤急性期应用低剂量糖皮质激素可降低促炎细胞因子水平,从而减少肺部感染和应激性溃疡的发生并缩短住院时间。

王志勇,编译自《*J Crit Care*》,2014,doi:10.1016/j.jcrc.2014.09.016;郇京宁,审校