

鲍曼不动杆菌临床分离株外排泵分布水平与碳氢酶烯类抗生素耐药研究*

李卓成,张彦鹏,吴伟清,李延武,丁芳林
(广东省深圳市第二人民医院检验科 518000)

[摘要] 目的 研究鲍曼不动杆菌临床分离株中外排泵分布水平与碳氢酶烯类抗生素耐药相关情况。方法 选择 2015~2016 年度深圳地区临床分离的 182 株鲍曼不动杆菌,同时进行外排泵抑制试验和肉汤稀释法药敏试验,并对结果按照药敏和外排泵表型两种因素分组进行统计学分析。结果 鲍曼不动杆菌 182 株临床分离株中,外排泵表型阳性 54 株(29.7%);结合碳氢酶烯类抗生素药敏分组统计,阳性组中耐药和敏感分别为 31.9%和 13.9%,差异有统计学意义($\chi^2=4.46, P<0.05$)。结论 鲍曼不动杆菌外排泵耐药机制在临床分离株的碳氢酶烯类抗生素耐药中起作用。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;外排泵;耐药

[中图分类号] R378

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)22-3057-03

Study on the distribution of efflux pump and the antibiotic resistance of carbapenems in clinical isolates of *Acinetobacter Bauman**

Li Zhuocheng, Zhang Yanpeng, Wu Weiqing, Li Yanwu, Ding Fanglin

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

[Abstract] **Objective** To study the distribution of efflux pump and the antibiotic resistance of carbapenems in clinical isolates of 182 strains of *Bauman Acinetobacter*, and to understand the correlation between distribution of efflux pump and the drug resistance of hydrocarbon. **Methods** Totally 182 clinical isolates of *Acinetobacter Baumannii* were selected to detect the efflux phenotype, which were separated between 2015 to 2016 isolated from Shenzhen district, Guangdong province. Efflux pump inhibition test and broth dilution method drug sensitivity test were used. According to the results of the drug sensitivity and the phenotype of efflux pump, *Acinetobacter Baumannii* were divided into groups (carbapenems resistance group, carbapenems sensitive group, efflux pump positive group and efflux pump negative group), then the results were made statistically analysis. **Results** In all the 182 isolates, there were 54 strains with positive efflux pump phenotype, and the positive rate was 29.7%. And the efflux phenotype positive rate was 31.9% in carbapenems resistance group, comparing to 13.9% positive rate in carbapenems sensitive group ($\chi^2=4.46, P<0.05$). **Conclusion** The efflux pumps play an important role in the resistant mechanism of *Acinetobacter Baumannii* clinical isolates to carbapenems.

[Key words] *acinetobacter baumannii*; efflux pump; resistance

鲍曼不动杆菌是一类重要的革兰染色阴性的非发酵医院内感染病原菌,常引起医院内免疫功能低下患者严重的呼吸机相关性肺炎、手术伤口部位感染、泌尿道感染、血流感染及继发性脑膜炎等^[1]。随着近年来广谱抗生素普遍使用等原因,临床上鲍曼不动杆菌的多重耐药株和泛耐药株在世界范围内不断涌现^[2]。碳青霉烯类抗生素是目前临床治疗鲍曼不动杆菌感染最有效的抗菌药物之一^[3]。常见的有亚胺培南(IPM)和美罗培南(MEO)等,能够抵抗大多数超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)和 AmpC 的水解。近年来,耐碳青霉烯类抗生素的鲍曼不动杆菌耐药比例也逐年增高,而其耐药一旦突破碳青霉烯类,人类将面临无药可选的窘境^[4]。鲍曼不动杆菌针对碳氢酶烯类抗生素的耐药机制主要有 4 类:(1)表达碳氢酶烯酶。主要是 Ambler 分类中的 D 类酶,即苯唑西林酶(OXA),包括 OXA-23、OXA-24、OXA-51 和 OXA-58^[5]。(2)产生构象改变的青霉素结合蛋白降低碳氢酶烯类抗生素的结合量。(3)下调外膜通道蛋白的表达或缺如,如 Car 类、OPM 类,从而减少抗生素进入细菌^[5]。(4)多种外排泵基因的过量表达,将进入细菌的抗生素主动排出。鲍曼不动杆菌的外排泵主要有 5 大家族,其中最重要的为 RND 家族,包括均由 3 部分构成的 AdeABC、

AdeFGH 和 AdeIJK 等外排泵^[6]。细菌外排泵对药物的外排作用是主动耗能过程,其能力源于质子的浓度梯度,而羰基氰氯苯腙(carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazine, CCCP)可以抑制质子转运的解偶联剂,通过破坏质子浓度梯度,抑制主动外排系统的外排作用^[7]。本研究拟使用 CCCP 作为泵抑制剂,研究鲍曼不动杆菌临床分离株外排泵的分布水平,并分析外排泵表型与碳氢酶烯类抗生素耐药的相关性。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 2015~2016 年分离自深圳市第二人民医院的 182 株鲍曼不动杆菌临床分离株。细菌分离培养按《全国临床检验操作规程进行》进行^[8],所有菌株均经过鉴定,剔除分离自同一患者相同部位标本的重复菌株。

1.2 仪器与试剂 全自动微生物分析仪(VITEK-2 COMPACT)购自法国生物梅里埃公司;泵抑制剂 CCCP 来源于 Sigma 公司;MH 平板和 MH 肉汤来源于郑州贝瑞特公司,无菌聚苯乙烯 96 孔板来源于美国 CORNING 公司;IPM 标准品来源于中国药品生物制品检定研究院,IPM 溶剂选择 pH8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS),浓度为 1 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$,分装后贮存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用;恒温振荡培养箱为太仓实验设备厂生产。

1.3 质控菌株 鲍曼不动杆菌 ATCC17978, 大肠埃希菌 ATCC25922, 金黄色葡萄球菌 ATCC25923。质控菌株源于卫生部临床检验中心。

1.4 鲍曼不动杆菌外排泵抑制实验 复苏冻存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱的菌株, 接种于 MH 平板 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $10\sim 16\text{ h}$ 后, 选择鲍曼不动杆菌典型单菌落接种于 MH 肉汤培养基; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 180 r/min 恒温振荡过夜培养 $16\sim 18\text{ h}$ 后, 配置菌液浓度 0.5 个麦氏单位, 用 MH 肉汤 $1:1\ 000$ 稀释后每孔中 $100\ \mu\text{L}$ 接种以下 2 种 96 孔板。(1) 泵抑制实验板: 各孔含终浓度 $10\ \mu\text{g/mL}$ 的 CCCP, 且每行第 1~12 孔从左到右含终浓度为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu\text{g/mL}$ 的 IPM, 每行最后 1 孔均为仅含相同浓度 CCCP 的 MH 肉汤做生长对照孔; (2) 最小抑菌浓度(MIC)测定板: 不含 CCCP, 且每行各孔从左到右含终浓度为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0 $\mu\text{g/mL}$ 的 IPM; 将各 96 孔板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 普通空气孵箱中, 孵育 $16\sim 20\text{ h}$ 判断结果^[9]。

1.5 结果判断 各菌株 MIC 结果判读按 2010 版美国临床实验室标准化委员会(CLSI) 标准进行, 且 96 孔板相应最后一列生长对照孔内细菌明显生长外排泵抑制实验才成立^[9]。如微量肉汤稀释法测定各菌株 MIC 值出现跳孔现象, 则选择抑制细菌生长的较高药物浓度为其 MIC 值。如出现多处跳孔, 则需重复试验进行测定。各菌株外排泵阳性表型的判断标准: 存在泵抑制剂 CCCP 时的菌株 MIC 测定结果比不存在 CCCP 的 MIC 值下降 4 倍及以上。

1.6 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理, 使用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鲍曼不动杆菌临床分离株的科室分布 鲍曼不动杆菌临床分离株共计 182 株, 其中重症监护室(ICU)病区分离株最多, 共 78 株(42.8%); 呼吸内科和神经外科的分离株也均超过 10%(分别为 15.3%和 13.4%)。见表 1。

表 1 182 株鲍曼不动杆菌的科室分布

| 科室 | 2015 年(n) | 2016 年(n) | 合计(n) | 构成比(%) |
|------|-----------|-----------|-------|--------|
| ICU | 52 | 26 | 78 | 42.8 |
| 呼吸内科 | 19 | 9 | 28 | 15.3 |
| 神经外科 | 18 | 6 | 24 | 13.4 |
| 康复科 | 10 | 5 | 15 | 8.2 |
| 烧伤科 | 9 | 3 | 12 | 6.4 |
| 神经内科 | 10 | 3 | 13 | 6.9 |
| 肾内科 | 6 | 2 | 8 | 4.5 |
| 其他科室 | 4 | 0 | 4 | 2.5 |
| 合计 | 128 | 54 | 182 | 100.0 |

2.2 鲍曼不动杆菌外排泵抑制实验结果 将鲍曼不动杆菌临床分离株按标本类型可分为痰液(48.2%)、肺泡灌洗液(8.9%)、分泌物(10.7%)、尿液(14.3%)、血液(7.1%)和其他(10.7%)。182 株鲍曼不动杆菌中, 根据肉汤稀释法测定各菌株 MIC 结果, 其中 IPM 敏感(S)36 株(19.8%), 中介(I)31 株(17.0%), 耐药(R)116 株(63.7%)。182 株鲍曼不动杆菌中外排泵表型阳性 54 株(29.7%), 外排泵阴性表型 128 株(70.3%)。阳性组中 S 与 R 比较差异有统计学意义($\chi^2=4.46, P<0.05$)。见表 2。

表 2 182 株鲍曼不动杆菌外排泵表型与耐药表型分布

| 标本类型 | 阳性(n) | | | 阴性(n) | | | 合计(n) | 构成比(%) |
|------|-------|----|----|-------|----|----|-------|--------|
| | S | I | R | S | I | R | | |
| 痰液 | 3 | 5 | 19 | 16 | 9 | 36 | 88 | 48.2 |
| 灌洗液 | 0 | 1 | 4 | 1 | 2 | 8 | 16 | 8.9 |
| 分泌物 | 1 | 1 | 4 | 3 | 2 | 9 | 20 | 10.7 |
| 尿液 | 0 | 2 | 5 | 4 | 2 | 13 | 26 | 14.3 |
| 血液 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 | 5 | 12 | 7.1 |
| 其他 | 1 | 2 | 3 | 5 | 1 | 8 | 20 | 10.7 |
| 合计 | 5 | 12 | 37 | 31 | 18 | 79 | 182 | 100.0 |

3 讨 论

鲍曼不动杆菌为条件致病的革兰阴性非发酵菌。临床分离株多源于 ICU 病房、呼吸科、神经外科、康复科等病区的痰液、肺泡灌洗液、分泌物等组织标本。该菌可在住院患者及医院环境中定植, 且抗逆性强, 是医院感染最常见的致病菌^[10]。长期广谱抗生素的使用对菌株产生持续的抗生素选择压力, 造成该菌耐药性逐年提高, 多重耐药和泛耐药鲍曼不动杆菌不断产生^[11]。全国耐药监测网监测数据(2014 年)显示该菌对于青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、喹诺酮类、氨基糖苷类抗生素的耐药水平均超过 60%^[12]; 鲍曼不动杆菌多重耐药, 甚至泛耐药菌株的出现, 成为医院感染控制和临床治疗的重大威胁, 被喻为革兰阴性菌中的“耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MR-SA)”^[7]。本研究所用的 182 株鲍曼不动杆菌对碳氢酶烯类抗生素 IPM 耐药率为 63.7%, 且有 17% 为中介, 对其敏感的菌株仅占 19.8%, 菌株耐药控制的境况不容乐观。

药物外排泵机制是鲍曼不动杆菌重要的耐药机制, 迄今为止已发现 20 余种外排泵^[12], 可以大致分为 5 大外排泵家族, 其中最重要的为 RND 家族, 包括均由 3 个蛋白质部分构成的 AdeABC、AdeFGH 和 AdeIJK 等外排泵^[13]。这些外排泵多为能量依赖型外排泵, 利用质子或 Na^+ 离子偶联交换提供动力, 能够将多种抗生素、金属离子、表面活性剂和多种消毒剂排出细胞外^[14]。2013 年西班牙学者 Rumbo 等^[4]研究了鲍曼不动杆菌 5 大外排泵家族近 20 种外排泵在临床菌株中的大致分布情况, 以及外排泵机制对于菌株耐药水平影响; 有研究发现主动外排泵机制是细菌抵御外界抗生素压力等不良环境和因素的重要手段, 成为细菌获得性多重耐药的重要原因^[7, 15]。

本研究中, 临床分离的 182 株鲍曼不动杆菌中, 约有 54 株(29.7%)有外排泵机制, 阳性组中 S 与 R 比较差异有统计学意义($\chi^2=4.46, P<0.05$)。提示鲍曼不动杆菌主动外排泵的耐药机制在本研究临床分离株对碳青霉烯类抗生素的耐药机制中起作用, 通过抑制外排泵的对碳氢酶烯类抗生素主动泵出, 提高了菌体内抗生素有效水平从而降低了 MIC 值。可以认为, 较低的毒副作用和较高外排抑制活性, 成为开发前景良好的外排泵抑制剂类新型抗生素的必要条件。

参考文献

- [1] 王辉, 郭萍, 孙宏莉, 等. 碳青霉烯类耐药的不动杆菌分子流行病学及其泛耐药的分子机制[J]. 中国检验医学杂志, 2006, 29(12): 1066-1073.
- [2] Jia W, Li C, Zhang H, et al. Prevalence of Genes of OXA-23 Carbapenemase and AdeABC Efflux Pump Associated with Multidrug Resistance of Acinetobacter baumannii Isolates in the ICU of a Comprehensive Hospital of North-

- western China[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12(8):10079-10092.
- [3] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2011, 11(5):321-329.
- [4] Rumbo C, Gate E, López M, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11):5247-5257.
- [5] 沈继录,朱德妹,吴卫红,等. 革兰阴性杆菌碳青霉烯酶产生与细菌耐药性关系的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(4):408-414.
- [6] 侯天文,尹晓琳,李玮,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌相关耐药基因检测分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(4):379-383.
- [7] Yoon EJ, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*; major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(7):2989-2995.
- [8] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006.
- [9] Richmond GE, Chua KL, Piddock LJ. Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide)[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(7):1594-1600.
- [10] 王辉,刘颖梅,陈民钧,等. 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药机制的研究[J]. *中国医学科学院学报*, 2003, 25(5):567-571.
- [11] Hornsey M, Loman N, Warcham DW, et al. Whole-genome comparison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(7):1499-1503.
- [12] Coldham NG, Webber M, Woodward MJ, et al. A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8):1655-1663.
- [13] Tiwari V, Tiwari M. Quantitative proteomics to study carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Front Microbiol*, 2014, 5:512.
- [14] Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, et al. AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8):1589-1593.
- [15] Seifert H, Dolzani L, Bressan R, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(9):4328-4335.

(收稿日期:2016-02-21 修回日期:2016-04-09)

(上接第 3056 页)

年患者围术期易发生肺部并发症。研究表明,每分钟最大通气量(MVV) < 50% 的患者应慎行肺叶切除, MVV < 60% 或 FEV1 < 1.5 L 的患者慎行全肺切除^[10]。本研究结果显示, FEV1% ≤ 60% 的患者心肺并发症的发生率显著高于 FEV1% > 60% 的患者。因此,应重视术前肺功能的评估,并且推荐对大部分的老年患者,在入院后进行各种呼吸功能的锻炼,如爬楼梯、吹气球及呼吸机辅助呼吸功能锻炼等。这些锻炼可促使老年患者在术前肺功能各项指标基本达标,减少围术期并发症的发生。

与汤轶等^[11]研究一致,本研究也提示:手术时间大于 3 h 是围术期心肺并发症的危险因素, Logistic 逐步回归多因素分析,在其他因素变量取值不变的情况下,手术时间大于 3 h 术后发生心肺并发症的危险度是手术时间小于或等于 3 h 的老年患者的 9.575 倍。因此,手术时间是围术期心肺并发症的危险因素,老年早期肺癌手术应尽快在 3 h 内完成。

综上所述,对老年肺癌患者进行单独全面且细致的评估,包括心肺功能、并发症的评估,术前戒烟、围术期肺康复锻炼,以及多学科团队的术后医疗护理等,是老年肺癌患者安全度过手术危险期、延长生存期及提高生活质量的重要保证和有效措施。

参考文献

- [1] 段玉忠,蒋仁容. 1152 例肺癌患者临床病理资料分析[J]. *山东医药*, 2008, 48(18):84.
- [2] 王欣欣. 进展期非小细胞肺癌的内科治疗进展[J]. *重庆医学*, 2012, 41(31):3330-3333.
- [3] 倪世荣,于淑华. 外科治疗高龄肺癌 46 例分析[J]. *慢性病学杂志*, 2010, 12(4):347-348.
- [4] Berry MF, Hanna J, Tong BC, et al. Risk factors for morbidity after lobectomy for lung cancer in elderly patients[J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 88(4):1093-1099.
- [5] Gonzalez-Aragoneses F, Moreno-Mata N, Simon-Adiego C, et al. Lung cancer surgery in the elderly[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009, 71(3):266-271.
- [6] Jaklitsch MT, Mery CM, Audisio RA. The use of surgery to treat lung cancer in elderly patients[J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4(8):463-471.
- [7] Borsoi L, Kunze U, Kunze M, et al. Trends in mortality and mean age at death from lung cancer in Austria (1975-2007)[J]. *Cancer Epidemiol*, 2011, 35(2):120-125.
- [8] Karagueuzian HS, White C, Sayre J, et al. Cigarette smoke radioactivity and lung cancer risk[J]. *Nicotine Tob Res*, 2012, 14(1):79-90.
- [9] 常秀军,王子彤,韩鸣,等. 795 例肺癌术后发生心律失常危险因素的多因素回顾分析[J]. *中国肿瘤*, 2007, 16(8):633-635.
- [10] 毕克毅,徐瑞剑,王俊杰,等. 168 例全肺切除术早期并发症的回顾性研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(24):3008-3010.
- [11] 汤轶,朱广肖,高明. II 期非小细胞肺癌高龄患者术后并发心律失常的危险因素分析[J]. *河北医学*, 2012, 18(4):444-446.

(收稿日期:2016-02-22 修回日期:2016-04-10)