

680 例中有输血史的 406 例,患者血清中的同种抗体与输入的献血者红细胞抗原反应,或是存在于献血者血浆、血浆制品或血液成分中的抗体与受血者红细胞抗原反应,导致血浆中的蛋白质(Ig、补体)非特异性地吸附到红细胞表面,使得患者的红细胞被致敏,而 MGT 法的柱中试剂内含有抗 IgG、C3d 的溶液,它可以与人红细胞上的 IgG 及补体结合,在体外发生凝集^[2];血液、肿瘤患者多恶病质,血型特异性物质过高,如卵巢肿瘤,或长期使用化疗药物红细胞被吸附致敏^[3];新生儿有可能被母亲的 IgG 抗体通过胎盘致敏胎儿红细胞,因此除输注 O 型、Rh (D) 阴性血外,输注其他血型必须对新生儿进行筛查以排除来自母体的抗 A 和抗 B^[4];章文等^[5]报道 7 例新生儿次侧不合是因为输注多个献血员的全血产生同种免疫,使患儿红细胞被不完全抗体所致敏,从而出现 DAT 阳性,引起 MGT 交叉配血时次侧有凝集现象。

DAT 阳性的患者,为保证安全输血,避免溶血性输血反应,各输血科往往为患者提供洗涤红细胞。王显荣等^[6]报道非自身免疫性贫血性溶血 DAT 阳性患者输注洗涤红细胞除了提升血红蛋白外,加快红细胞破坏,增加肝脏对胆红素转化的功能负担,影响康复进程;本研究 679 例均非自身免疫性贫血性溶血患者,交叉配血主侧无凝集,DAT 凝集强度大于或等于次侧凝集强度的患者,输血后未发现迟发性输血反应。近年来,常有报道因多次输血或输多次及多人份的血小板可以导致血小板输注无效^[7],本研究未跟踪探讨输注次侧凝集的血制品与无效输血的发生有无关联。

MGT 因灵敏度高、特异性强、结果直观、能自动化操作,在大医院广泛使用,但在一些基层医院及紧急输血时,仍然使用凝聚胺法交叉配血,凝聚胺法交叉配血法操作简便、快速、经

济^[8],但同一批次的凝聚胺试剂盒之间也存在差异,不能有效筛检出所有的 IgG 不规则抗体,假阴性结果难以判别,会对输血患者造成难以预见的后果,提示凝聚胺商品试剂盒质量的稳定性和重复性值得重视^[9]。因此在非紧急输血时,输血前的不规则抗体的筛查一定要用 MGT 法。

参考文献

- [1] 王显荣. 柱凝集技术交叉配血不合的原因分析[J]. 临床输血与检验, 2002, 4(1): 27-28.
- [2] 唐长玖, 王华, 李瑞元, 等. 微柱凝胶配血次侧不合 17 例临床分析[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(1): 61.
- [3] 王波, 王燕鸣, 焦树贤. 肿瘤影响血型鉴定及交叉配血不合原因分析[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(6): 42-43.
- [4] 赖文玉, 田兆嵩. 婴儿输血[J]. 中国输血杂志, 2002, 15(1): 70-72.
- [5] 章文, 徐刚, 吴跃平, 等. 微柱凝胶技术在婴幼儿输血中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(4): 1023-1024.
- [6] 王显荣, 储松炜, 许立, 等. 非 AIHA 直接抗球蛋白试验阳性患者输注洗涤红细胞的临床实验观察[J]. 临床医学, 2006, 26(2): 27-28.
- [7] 高加良, 周琼秀, 丁显平. 血小板配型在临床血小板输注无效中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1152, F003.
- [8] 田兆嵩, 刘赴平. 输血前检验应重视的几个问题[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(3): 139-140.
- [9] 王远杰, 刘家瑞, 李红梅, 等. 手工凝聚胺法交叉配血不合原因分析[J]. 重庆医学, 2008, 37(11): 1242-1243.

(收稿日期: 2010-12-06)

• 经验交流 •

鲍曼不动杆菌耐药性及 β-内酰胺酶基因型动态变化研究

金 红, 曹银光, 金 苑, 邵 颺, 谭晓玉, 杨巧芝[△]
(山东省聊城市人民医院检验科 252000)

摘要:目的 调查分析聊城市 309 株鲍曼不动杆菌耐药性及 β-内酰胺酶基因型。方法 用 K-B 法测定临床分离的 309 株鲍曼不动杆菌对 13 种抗菌剂的耐药性,以 Nitrocefim 纸片法和改良三维试验大平皿法对 β-内酰胺酶及分型进行检测,采用聚合酶链反应(PCR)检测 β-内酰胺酶耐药基因型。结果 除亚胺培南(IMP)外,309 株鲍曼不动杆菌对其余 13 种抗菌剂的耐药率均超过 50%,309 株鲍曼不动杆菌中,Nitrocefim 纸片法检测到 294 株产 β-内酰胺酶(95%),其中 171 株(55.24%)能经改良三维试验大平皿法进行酶分型。PCR 扩增对 IMP 中介或耐药的 53 株鲍曼不动杆菌有 11 株扩增到 *bla_{OXA-23}*,产超广谱 β-内酰胺酶(ES-BLs)组 29 株中有 5 株扩增出 *bla_{SHV}*、*bla_{CTX-M-14}*、*bla_{CTX-M-3}*,2 株扩增出 *bla_{SHV}*、*bla_{CTX-M-1}*。结论 本地区鲍曼不动杆菌多重耐药常见,β-内酰胺酶产生率高,碳青霉烯酶以 *bla_{OXA-23}* 型为主,ESBLs、AmpC 两种 β-内酰胺酶基因的多重 PCR 阳性率均低。

关键词: 鲍氏不动杆菌; β-内酰胺酶类; 基因型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.053

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2011)09-1016-02

不动杆菌是近年来医院感染中分离率增长较快的菌种,其中以鲍曼不动杆菌在临床最为常见,是医院感染的重要病原菌,尤其是多重耐药的鲍曼不动杆菌,已成为医院内感染暴发的流行的重要病原菌^[1]。近年来,随着广谱抗生素在临床上的普遍使用,致使鲍曼不动杆菌对临床常用抗生素的耐药性在逐年增加。为了解聊城市鲍曼不动杆菌对 β-内酰胺类抗生素的耐药性及耐药基因流行特点,对 309 株鲍曼不动杆菌耐药表型和常见 β-内酰胺酶基因类型进行分析。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 2002 年 1 月至 2007 年 6 月本院住院患者标

本中分离的 309 例菌株,大部分菌株分离自痰标本,其次来自创面分泌物,血、尿、胆管引流液和大便、脑脊液、胸腔积液、腹腔积液。使用 Vitek-32 细菌自动鉴定仪及 NFC 鉴定卡鉴定菌种,标准菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法。实验方法和判读标准均按照美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)2004 年版规定进行。抗菌纸片亚胺培南(IMP)、哌拉西林(PIP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、氨苄西林/舒巴坦(AMS)、头孢他啶(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、头孢哌酮/舒巴坦(SCF)、阿米卡星

[△] 通讯作者, E-mail: shBiao1966@tom.com.

(AK)、复方新诺明(SXT)、左旋氧氟沙星(LEV)、头孢噻肟(CTX)、头孢曲松(CRO)、氨基曲南(ATM)及 M-H 培养基为英国 Oxoid 公司产品。

1.3 改良三维试验大平皿法 β-内酰胺酶类型检测 将菌株接种在 M-H 琼脂平皿上, 35 °C 温箱孵育 16~18 h, 以 Nitrocefin 纸片鉴定出现红色为阳性结果, 1 h 后无颜色变化为阴性结果。以超声破碎法制备 β-内酰胺酶粗提物, 用头孢硝噻吩显色法检测提取物。根据 Coudron 等^[2]和蒋晓飞等^[3]推荐的改良三维试验进行改进, 将 0.5 麦氏单位大肠埃希菌 ATCC 25922 菌液均匀涂布于直径 15 cm 的 M-H 琼脂平皿, 等间距成环形在平皿上分别贴上 IMP、头孢西丁(FOX)、CAZ、CTX 4 种抗生素纸片。纸片之间与距纸片边缘 5 mm 处向外切出相互垂直的宽 1 mm、长 10 mm 狭缝, 分别于每缝中加入相应的待测样本, 将平皿放置于 35 °C 温箱过夜培养 18~24 h 后, 取出观察结果。平皿上抑菌环出现变形, 为阳性结果, 反之为阴性。

1.4 聚合酶链反应(PCR)

1.4.1 分别用两种方法提取 DNA (1)采用 Qiagen Plasmid Mini kit(德国 Qiagen, Hilden)提取质粒;(2)手工碱裂解法提取质粒。

1.4.2 单一引物 PCR 扩增法检测 OXA 型 β-内酰胺酶基因 OXA-23、OXA-24 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 90 s, 循环 35 次; 72 °C 延长 10 min。两种引物及序列, 见表 1。

表 1 OXA 酶单一基因 PCR 引物

引物	序列(5'→3')	扩增长度(bp)
OXA-23R	TCACAACAATAAAAGCACTGT	1 058
OXA-23F	GATGTGTCATAGTATTCGTCGT	
OXA-24R	TTAAATGATTCGAAGATTTCTAGC	825
OXA-24F	ATGAAAAAATTTATACTTCCTATATTCAGC	

1.4.3 多重引物 PCR 扩增法检测 ESBLs 和 AmpC 型 β-内酰胺酶基因 ESBLs(3 对引物)的 PCR 反应条件: 为 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延长 10 min。AmpC(6 对引物)的 PCR 反应条件: 为 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 25

次; 72 °C 延长 7 min。ESBLs 的 3 对引物与 AmpC 酶的 6 对引物, 见表 2、3。

1.4.4 扫描成像 所得扩增产物琼脂糖凝胶电泳观察, 并进行凝胶成像系统扫描成像。

2 结果

2.1 2002 年 1 月至 2007 年 6 月鲍曼不动杆菌对 13 种常用抗菌剂的耐药率(R)及敏感率(S) 见表 4。

表 2 ESBLs 多重 PCR 扩增引物

引物	序列	扩增长度(bp)
SHVR	TCCACCATCCACTGCAGCAGCT	141
SHVF	AACGGAAGTGAATGAGGCGCT	
CTX-M-14R	CAGCCTAGGTTTCAGTGCAGATCC	355
CTX-M-14F	TACCCAGATAATACGCAGGTG	
CTX-M-3R	GAACGTTTCGTCTCCAGCTGT	479
CTX-M-3F	AATCACTGCAGTTCACGCT	

2.2 三维试验检测结果 根据本研究采用的改良三维试验判定原则和结果, 将 114 株 β-内酰胺酶 Nitrocefin 纸片法检测阳性菌株的产酶类型分为下列 8 组, 见表 5。

表 3 β-内酰胺酶多重 PCR 引物

引物	序列	扩增长度(bp)
FOXMR	CAAAGCGGTAACCGGATTGG	190
FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	
EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302
EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTGTGTCGGG	
ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCCATG	346
ACCMF	TCGGTAAAGCCGATGTGTCGGG	
DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405
DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	
CITMR	TTTCTCTGAACGTGGCTGGC	462
CITMF	TGGCCAGAAGTACAGGCAAAA	
MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520
MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	

表 4 鲍曼不动杆菌对 13 种抗菌药物的 R 和 S(%)

抗菌剂	2002 年		2003 年		2004 年		2005 年		2006 年		2007 年	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
IMP	0.00	100	0.00	100	3.00	97.0	2.7	97.3	3.6	96.4	3.2	96.8
AK	15.2	84.8	21.4	76.8	19.5	80.5	22.5	77.5	23.3	76.4	29.5	70.5
SXT	20.3	79.7	25.8	74.2	24.1	75.9	27.6	72.4	25.3	74.7	35.1	64.9
AMS	21.4	78.6	34.2	65.8	42.5	57.5	32.6	67.4	23.1	76.9	23.5	76.5
FEP	18.8	81.2	20.5	79.5	25.8	74.2	35.4	64.6	42.8	57.2	40.2	59.8
CAZ	20.5	79.5	14.3	85.7	30.4	69.4	40.2	59.8	36.1	63.9	34.2	65.8
TZP	30.5	69.5	40.3	59.7	33.3	66.7	47.1	52.9	56.2	43.7	38.2	61.8
PIP	38.4	61.6	50.4	49.6	46.3	53.7	61.2	38.8	77.4	22.6	58.2	41.8
SCF	—	—	10.3	89.7	29.1	70.9	38.8	61.2	47.2	52.8	39.1	60.9
LEV	—	—	11.3	88.7	19.2	80.8	22.6	77.4	34.5	65.5	23.1	76.9
ATM	18.8	81.2	20.5	79.5	25.8	74.2	35.4	64.6	42.8	57.2	40.2	59.8
CTX	18.6	66.5	11.9	76.9	45.6	39.6	46.6	45.8	33.2	66.8	30.6	56.1
CRO	19.9	67.4	14.5	—	31.1	56.0	39.6	55.6	28.9	61.1	33.5	61.5

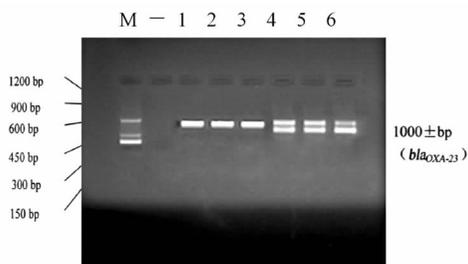
—: 未检出。

(上接第 1017 页)

2.3 对 IMP 中介或耐药的 53 株鲍曼不动杆菌的 OXA-23 基因 PCR 扩增电泳结果 三维试验产碳青霉烯酶组 16 株中有 11 株扩增到大小一致,约 1 000 bp 的条带,考虑其为 *bla*_{OXA-23},见图 1。*OXA-24* 基因 PCR 扩增电泳结果均没有条带出现,故全部菌株 *bla*_{OXA-24} PCR 扩增阴性。

表 5 改良三维试验判定阳性菌株的产酶类型

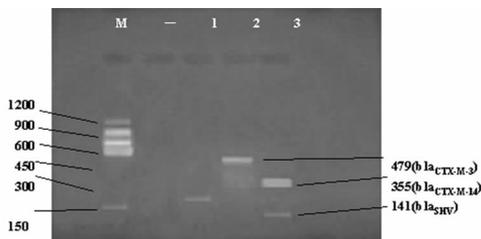
分组	酶类型	n	百分比(%)
1 组	AmpC 酶	5	4.39
2 组	ESBLs	15	13.16
3 组	碳青霉烯酶	4	3.51
4 组	耐酶抑制剂 β-内酰胺酶(IRTs)	18	15.78
5 组	AmpC 酶和 ESBLs	9	7.89
6 组	ESBLs 和碳青霉烯酶	5	4.39
7 组	碳青霉烯酶和 IRIS	7	6.14
8 组	未明类酶	51	44.74



—: 阴性对照; 1~5: 三维试验产碳青霉烯酶组; 6: 三维试验不产碳青霉烯酶组; M: DNA 标记(150~1 200 bp)

图 1 PCR 产物电泳结果

2.4 ESBLs 3 种基因多重 PCR 结果 对 CTX/CAZ 均耐药的 71 株鲍曼不动杆菌的 *SHV*、*CTX-M-3* 和 *CTX-M-14* 共 3 种基因 PCR 扩增电泳结果发现,三维试验产 ESBLs 组 29 株中有 5 株扩增出条带,其中 3 株为不同大小的单一条带,分别约 150、300、450 bp,考虑依次为 *bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M-14}、*bla*_{CTX-M-3},另 2 株出现大小一致的双条带,均约为 150、300 bp 大小,考虑同时存在 *bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M-3} 两种基因型(图 2)。三维试验不产 ESBLs 组 42 株鲍曼不动杆菌 PCR 扩增电泳结果均没有条带出现。



M: DNA 标记(150~1 200 bp); —: 阴性对照; 1: *bla*_{SHV}; 2: *bla*_{CTX-M-3}; 3: *bla*_{CTX-M-14}。

图 2 ESBLs 3 种基因多重 PCR 结果

3 讨论

不动杆菌是近年来医院感染中分离率增长较快的菌种,其中以鲍曼不动杆菌在临床最为常见,是医院感染的重要病原菌,尤其是多重耐药的鲍曼不动杆菌,已成为医院内感染暴发流行的重要病原菌^[1],引起了临床和微生物学者的严重关注。

鲍曼不动杆菌是引起肺部感染出现率增高较快的细菌,已成为肺部院内感染的主要病原体^[4],也可引发败血症、泌尿系统感染、继发性脑膜炎等。鲍曼不动杆菌在医院环境中分布很广且可长期存活,对危重患者包括重症心脏监护病房(CCU)和重症监护病房(ICU)患者威胁很大,易在 ICU 引起暴发流行^[5-7]。

本试验采用单一 PCR 和多重 PCR 两种方法检测了鲍曼不动杆菌的耐药基因。使用 *OXA-23*、*OXA-24* 2 种酶的基因引物对 IMP 中介或耐药的 136 株鲍曼不动杆菌的基因进行 PCR 扩增,结果发现 *bla*_{OXA-23} 阳性, *bla*_{OXA-24} 阴性。本试验研究携带 *bla*_{OXA-23} 的 33 株鲍曼不动杆菌,其临床资料完整的 25 例中有 23 例被诊断为医院感染,这至少可以说明本院的确存在有对 IMP 耐药的鲍曼不动杆菌医院感染流行,且基因型为 *bla*_{OXA-23}。

本研究结果表明,至少在 DHA 酶基因方面,存在有肠杆菌科细菌向鲍曼不动杆菌的水平传递。值得提出的是,虽然铜绿假单胞菌是医院感染中最常见的非发酵革兰阴性菌,但是从本研究结果来看,鲍曼不动杆菌的 ESBLs 基因主要来自于肠杆菌科细菌,与铜绿假单胞菌关系不大;可是在 AmpC 酶基因方面就有了差异,这说明在铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌之间也存在耐药质粒的水平传播。

参考文献

- [1] Bou G, Cervero G, Dominguez MA, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant acinetobacter baumannii strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9): 3299-3305.
- [2] Coudron PE, Moland ES, Thomason KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veteran's medical center[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(5): 1791-1796.
- [3] 蒋晓飞,洪秀华,孙景勇,等.多重耐药铜绿假单胞菌超广谱 β-内酰胺酶分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, 22(4): 443-446.
- [4] Via J, Marcos A, Marco F, et al. In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase and susceptibility of clinical isolates of acinetobacter baumannii[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(1): 138-141.
- [5] 朱旭慧,孙自镛,简翠,等.不动杆菌属的耐药性分析[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2005, 5(6): 342.
- [6] 张翔,卢建平.鲍氏不动杆菌感染及耐药性变化的趋势[J]. *中华医院感染学杂志*, 2004, 14(3): 341-343.
- [7] 王春新,谢国强,严子禾,等.耐亚胺培南细菌的临床分离及耐药谱分析[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26(9): 666-667.

(收稿日期:2011-01-11)