

• 临床检验研究论著 •

生物被膜阳性鲍曼不动杆菌分布及耐药性分析

张达容¹, 陈远翔²

(1. 重庆市肿瘤研究所检验科, 重庆 400030; 2. 重庆市万州区妇幼保健院检验科, 重庆 404000)

摘要:目的 分析生物被膜阳性的鲍曼不动杆菌在重庆市肿瘤医院各科室间的分布及耐药情况, 为该医院临床感染预防与治疗提供依据。方法 收集经全自动细菌鉴定仪确定的鲍曼不动杆菌 184 株, 采用刚果红培养基筛选生物被膜阳性菌株, K-B 纸片法测定菌株耐药性。结果 生物被膜阳性株标本种类以痰液和伤口分泌物居多, 主要分布于 ICU, 呼吸科和骨科。鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药率最高: 阳性株 85.2%, 阴性株 67.5%。对米诺环素和头孢类联合棒酸抗菌药物(CSL 和 SAM)较为敏感: 阳性株 33.3% 和 35.7%, 阴性株 30.2% 和 19.8%。结论 生物被膜阳性鲍曼不动杆菌与阴性株相比耐药率更高($P < 0.05$), 可首先米诺环素、CSL 和 SAM 作为抗菌药物, 还应加强生物被膜阳性鲍曼不动杆菌耐药性监测, 降低院内感染的发生率。

关键词: 生物膜; 鲍曼不动杆菌; 药物耐受性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)07-0801-02

The distribution and drug-resistance of biofilm-positive acinetobacter baumannii

Zhang Darong¹, Chen Yuanxiang²

(1. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Tumor Institute, Chongqing 400030, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Wanzhou Maternal and Child Health Hospital, Chongqing 404000, China)

Abstract: Objective To analyse distribution and drug-resistance situation of biofilm-positive Acinetobacter baumannii in Chongqing tumor hospital in order to provide references for the treatment and prevention of clinical infection. **Methods** 184 strains Acinetobacter baumannii were collected and identified with automated microbial analyzer. The Congo red medium was used to isolated biofilm-positive strains. The drug-resistance were determined with K-B method. **Results** The highest detection rate of Acinetobacter baumannii was found in sputum and wound secretion. Departments with high to low detection rate were respectively ICU, respiratory, and orthopaedic department. Aminoglycoside antibiotics had the supreme drug-resistance for Acinetobacter baumannii; positive strain 85.2%, negative strains 67.5%. The bacteria was more sensitive to minocycline and cephalosporins plus bar acid antibiotics(CSL and SAM) than others; positive strain 33.3% and 35.7%, negative strains 30.2% and 19.8%. **Conclusion** Biofilm-positive strains show stronger drug-resistance than negative ones($P < 0.05$). Minocycline, CSL and SAM can be used as the preferred antibacterial drugs. The surveillance of Acinetobacter baumannii should be enhanced to reduce the incidence of nosocomial infection.

Key words: biofilms; acinetobacter baumannii; drug tolerance

鲍曼不动杆菌是一种常见的革兰氏阴性条件致病菌, 广泛分布于医院环境中。常引起免疫力低下、有侵入性治疗和长期使用广谱抗菌药物患者的感染。细菌生物被膜又称菌膜, 是细菌为适应自然环境, 在生长过程中不可逆地吸附于惰性物体(医学辅材或机体黏膜)表面后形成的特殊形式^[1]。

膜内细菌群体耐药性极强, 可以逃避宿主免疫和抗菌药物杀伤机制引起感染迁延不愈。生物被膜阳性细菌还可自生物被膜处向外播散, 引起急慢性感染^[2]。所以细菌生物被膜引发的感染日趋严重, 多重耐药的鲍曼不动杆菌日渐增多给临床的治疗带来了严重的挑战。笔者对 2011 年 1~12 月重庆市肿瘤医院送检标本进行了生物被膜阳性鲍曼不动杆菌分布统计和耐药性分析, 以为临床合理用药提供依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 鲍曼不动杆菌 184 株, 其中痰标本 114 株, 外科伤口拭子、分泌物、引流物、脓液 58 株, 尿标本 8 株, 血标本 4 株。

1.2 标准菌株 表皮葡萄球菌 ATCC12228(生物被膜表型阴性), 表皮葡萄球菌 ATCC35984(生物被膜表型阳性)。铜绿假单胞菌 ATCC27853, 大肠杆菌 ATCC25922, 金黄色葡萄球菌

ATCC25923 为药敏质控菌株。

1.3 仪器与试剂 全自动细菌鉴定仪由法国生物梅里埃公司提供; 抗菌药敏纸片[阿米卡星(AMK), 庆大霉素(GEN), 妥布霉素(TOB), 环丙沙星(CIP), 左氧氟沙星(LVX), 头孢噻肟(CTX), 头孢曲松(CRO) 头孢他啶(CAZ), 头孢吡肟(FEP), 亚胺培南(IPM), 美洛培南(MEM), 米诺环素(TCY), 头孢哌酮/舒巴坦(CSL), 氨苄西林/舒巴坦(SAM)]均由英国 Oxoid 公司提供; 刚果红培养基由上海艾研生物技术有限公司提供。

1.4 方 法

1.4.1 筛选生物被膜阳性菌 收集经全自动细菌鉴定仪确定的鲍曼不动杆菌 184 株, 用于筛选生物被膜阳性菌。研究表明^[3], 刚果红通过能反应细菌表面多糖及黏膜的原理, 可对生物被膜菌进行筛选。刚果红染液与黏液膜和表面多糖反应着色, 菌落变为黑色且出现干燥结晶即为生物被膜阳性菌株, 菌落红色不变为生物被膜阴性株^[4]。首先通过全自动细菌鉴定仪鉴定出鲍曼不动杆菌, 而后将其接种于刚果红培养基, 37℃ 恒温孵箱中培养 48 h 后与生物被膜标准菌株在刚果红培养基上的菌落形态进行对比, 选出生物被膜阳性菌株。

1.4.2 药敏试验 对分离出的鲍曼不动杆菌按 NCCLS 推荐

的纸片扩散法,选取氨基糖苷类、喹诺酮类、头孢类、碳青霉烯类、米诺环素和头孢类联合棒酸代表性抗菌药物类 14 种,测定细菌在 M-H 培养基上的抗菌药物药敏特性。实验方法及药敏结果判断参照 2010 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI/NCCLS M100-S16)操作规程进行。

1.5 统计学处理 实验数据采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 标本分布 本次试验备筛选鲍曼不动杆菌共计 184 株,其中 72 株经刚果红培养基鉴定为生物被膜阳性株,阳性率 39.1%(72/184)。痰标本分离出阳性株最高为 69.4%(50/72);其次是伤口分泌物标本为 13.8%(10/72);血液、尿液和其他类标本较少。

2.2 菌株科室分布 生物被膜阳性鲍曼不动杆菌菌株分布科室以 ICU 菌株最高(41.7%),呼吸内科、骨科、和其他科室次之(各为 16.7%),脑外科较少(8.3%)。

2.3 药敏情况比较 鲍曼不动杆菌对 14 种常用抗菌药物的耐药情况见表 1。以生物被膜阳性株对氨基糖苷类平均耐药率最高(85.2%),米诺环素和舒巴坦复合剂较为敏感(35.7%)。生物被膜阳性株平均耐药率均大于阴性株($P < 0.05$)。

表 1 生物被膜阳性株与阴性株耐药情况比较(%)

抗菌药物	阳性株耐药率	阴性株耐药率
氨基糖苷类		
AMK	83.3	70.8
GEN	83.3	72.9
TOB	88.9	58.9
喹诺酮类		
CIP	71.4	59.9
LVX	75.0	64.5
头孢类		
CTX	68.2	48.2
CRO	61.1	55.5
CAZ	53.9	55.8
FEP	58.3	49.4
碳青霉烯类		
IPM	55.6	21.8
MEM	56.3	25.6
米诺环素		
TCY	33.3	30.2
舒巴坦		
CSL	44.4	19.3
复合剂类		
SAM	27.0	20.3

3 讨 论

鲍曼不动杆菌是一种条件致病菌。临床标本分离率仅次于铜绿假单胞菌,是医院感染最常见的条件致病菌之一。本实验筛选出生物被膜阳性鲍曼不动杆菌 72 株,主要分布于 ICU,呼吸科和骨科,与文献[5]报道的结果一致。

有研究表明生物被膜形成后,病原菌对抗菌药物抗性增

强。其机制主要有^[6]:(1)生物被膜的渗透屏障作用,限制抗菌药物进入菌体,同时协助内酰胺酶破坏抗菌药物分子。(2)内部环境的改变形成营养物质浓度的微阶梯梯度,细菌由于营养供给受限或缺氧而产生耐药;(3)生物被膜基因如 hipA B、vlzC、mar、sulA 和 relA 等耐药基因的表达。(4)QS 系统细菌耐药中发挥作用等。李乐和夏忠弟^[7]研究也证明生物被膜阳性鲍曼不动杆菌的部分耐药率高于阴性菌株。在本实验分离出的生物被膜阳性菌株对常用氨基糖苷类、喹诺酮类、头孢类、碳青霉烯类、米诺环素、舒巴坦复合剂耐药率均大于阴性菌株($P < 0.05$)。证明鲍曼不动杆菌生物被膜形成会增加细菌的耐药率^[8-9]。鲍曼不动杆菌对氨基糖苷类抗菌药物主要耐药机制是菌株产生氨基糖苷修饰酶(AMEs),酶的修饰作用导致了高水平耐药^[10]。近年来研究发现,鲍曼不动杆菌产 16SrRNA 甲基化酶(ArmA),使氨基糖苷类抗菌药物同细菌的结合能力减弱,可导致临床常用的及阿米卡星、妥布霉素和庆大霉素耐药^[11],这与本文药敏试验结果相符合。

米诺环素是一种高效抗菌药物,对生物被膜阳性的鲍曼不动杆菌耐药率较低。抗菌机制主要与细菌的 30S 核糖体亚单位结合,阻断了细菌核糖体的受体位点与氨基酰-tRNA 结合,阻止肽链延伸,最终阻止蛋白合成,细菌繁殖受到抑制^[12]。生物被膜阳性的鲍曼不动杆菌还可采用舒巴坦复合剂,此类抗菌药物中舒巴坦可竞争 β -内酰胺酶活性中心的丝氨酸从而抑制 β -内酰胺酶活性,使联合制剂中 β -内酰胺类药物避免被酶破坏而发挥抗菌作用^[13]。

综上所述,生物被膜阳性的鲍曼不动杆菌易形成多重耐药。在治疗生物被膜阳性鲍曼不动杆菌引起的感染时,米诺环素、CSL 和 SAM 应作为优先选择的抗菌药物。

参考文献

- [1] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces[J]. Emerging Infectious Disease, 2002, 8(9): 881-890.
- [2] Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 847-867.
- [3] Mataraci E, Dosler S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 6(12): 6366-6371.
- [4] Rice SA, Koh KS. Biofilm formation and sloughing in Serratia marcescens are controlled by quorum sensing and nutrient cues. [J]. Bacteriol, 2005, 187(10): 3477-3485.
- [5] Sun GC, Shi L. The clinical distribution and Drug-Resistance of Acinetobacter baumannii[J]. Int J Lab Med, 2011, 12(32): 1363-1364.
- [6] Jakubovics NS. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms[J]. Mol Oral Microbiol. 2010 Feb; 25(1): 4-14
- [7] 李乐, 夏忠弟. 鲍曼不动杆菌 I 类整合酶基因在生物被膜内的表达及耐药分析[J]. 中南大学: 医学版, 2008, 33(10): 952-957.
- [8] Lee HW, Koh YM, Kim J, et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(1): 49-54.
- [9] Cevahir N, Demir M, Kaleli H, et al. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in Acinetobacter baumannii strains[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2008, 41(6): 513-518.
- [10] Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine(下转第 804 页)

1.3.3 hZNF23 相对表达量计算方法 根据已知的标准品浓度,计算组织和细胞样本中内参 GAPDH 和 hZNF23 基因拷贝浓度,求出 hZNF23 及内参 GAPDH 的比值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准曲线及线性检测 将标准品稀释成 $10^4 \sim 10^9$ copy/ μ L5 个数量级的标准品工作液,视同样本进行实时定量 PCR 检测。结果显示标准曲线在 5 个数量级检测范围内,而且其起始模板量对数值与相应反应循环数有呈线性关系($r^2 = 0.950$, $P < 0.05$),其标准线性方程为 $Y = -3.2X + 50.5$ 。

2.2 子宫内膜肿瘤组织 hZNF23 相对表达量 子宫内膜肿瘤中 hZNF23 mRNA 的相对表达量为 (7.3 ± 4.15) copies/mL,明显低于癌旁组织标本 (22.0 ± 10.2) copies/mL,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中 60% (18/30) 子宫内膜肿瘤样本 hZNF23 表达水平低于癌旁组织 80%。

3 讨论

研究显示锌指转录因子在调节个体发育,细胞分化,细胞增殖和凋亡中起到至关重要的作用^[4]。其中的许多基因定位于高度等位基因缺失的区域,这些基因预示着可能和肿瘤的发生和发展有着密切的关系^[5]。依据实时定量 PCR 策略,从一个在人类肿瘤中高度等位基因缺失的区域 16q22 扩增目的基因 hZNF23,因其与恶性肿瘤的发生发展相关^[6],因而逐渐成为人们的研究热点。目前对 hZNF23 的特性进行了深入研究,发现它在人体多种组织中表达,且与生长抑制有关。Huang 等^[7]研究发现 KRAB-ZNF23 在卵巢癌患者体内表达下调,同时发现 hZNF23 通过诱导细胞周期阻滞肿瘤细胞生长。同时 Huang 等^[7]又发现 hZNF23 可以诱导癌细胞发生凋亡,从而抑制肿瘤细胞的生长。目前,国内对 hZNF23 在肿瘤中的表达研究较少,而子宫内膜肿瘤是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,故对 hZNF23 在子宫内膜肿瘤中的表达进行研究。本试验结果显示,hZNF23 mRNA 在子宫内膜肿瘤及其癌旁组织中均有表达,但是在子宫内膜肿瘤组织中其表达水平显著低于癌旁组织($P < 0.05$),这说明了 hZNF23 可能在肿瘤发生过程中扮演了很重要的角色。结果提示 hZNF23 是一个生长抑制因子,在肿瘤中的低表达将会促进肿瘤生长。另外推测 hZNF23 基因启动子甲基化和 hZNF23 蛋白质转录后调节等机制,都有可能是 hZNF23 基因表达下调的原因^[8]。

有研究报道 hZNF23 抑制细胞生长的另外一个机制是能够诱导细胞凋亡^[9]。在这个过程中,hZNF23 的过度表达可上调 p27kip-1 的表达,抑制细胞生长,细胞周期停滞在 G₁ 期,而且 hZNF23 还可通过线粒体依赖途径如降低线粒体跨膜电位、Bcl-XL 表达下调、细胞色素 C 释放、PARP-1 和 caspase-3/9 激活等途径诱导人子宫内膜肿瘤细胞凋亡^[10-11],最后导致细胞

核固缩。推测 hZNF23 可能经由线粒体依赖途径参与肿瘤细胞凋亡,但也有报道^[12]可能有另外的机制的存在,因为在用 siRNA 抑制 p27 表达的情况下,hZNF23 继续保持部分的生长抑制作用,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Huang C, Jia Y, Yang S, et al. Characterization of ZNF23, a KRAB-containing protein that is downregulated in human cancers and inhibits cell cycle progression[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(2):254-263
- [2] Castro MA, Dal-Pizzol F, Zdanov S, et al. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer[J]. *Cancer*, 2010, 116(15):3645-3655.
- [3] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [4] Oliver CH, Khaled WT, Friend H, et al. The Stat6-regulated KRAB domain zinc finger protein Zfp157 regulates the balance of lineages in mammary glands and compensates for loss of Gata-3 [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(10):1086-1097.
- [5] Han X, Guo J, Deng W, et al. High-throughput cell-based screening reveals a role for ZNF131 as a repressor of ERalpha signaling [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1):476.
- [6] Henriksen J, Stabell M, Meza-Zepeda LA, et al. Identification of target genes for wild type and truncated HMGA2 in mesenchymal stem-like cells[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(1):329.
- [7] Huang C, Yang S, Ge R, et al. ZNF23 induces apoptosis in human ovarian cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2008, 266(2):135-143.
- [8] Tran HT, Kim HN, Lee IK, et al. DNA methylation changes following 5-azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome[J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(2):207-13.
- [9] Alas S, Ng CP, Bonavida B. Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3):836-845.
- [10] Mu R, Lu N, Wang J, et al. An oxidative an Moglle of sambogic acid • induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 is involved in its anti-cancer activity in vitro [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2010, 19(1):61-67.
- [11] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points[J]. *Cell*, 2004, 116(2):205-219.
- [12] Hosseini SM, Herd S, Vincent AL, et al. Genetic analysis of chromosome 20-related posterior polymorphous corneal dystrophy: genetic heterogeneity and exclusion of three candidate genes[J]. *Mol Vis*, 2008, 14(1):71-80.

(收稿日期:2012-10-09)

(上接第 802 页)

- toxicity in humans[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(4):470-487.
- [11] Wang P C, Cai J B. Analysis on aminoglycoside resistance of *Acinetobacter baumannii* and related genes[J]. *Int J Lab Med*, 2012, 33(10):1155-1156.
 - [12] 马序竹, 吕媛. 鲍曼不动杆菌对主要抗菌药物耐药机制[J]. *中国临床药理学志*, 2009, 25(1):90-94.

- [13] Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 12):1619-1629.

(收稿日期:2012-12-06)