

• 基础实验研究论著 •

鲍曼不动杆菌的耐药性分析及其表面生理变化^{*}

李 云¹, 夏蔚珉^{1#}, 张丽萍², 张 文¹, 杨秀珍¹, 张彩虹¹

(1. 淄博市中心医院检验科, 山东淄博 255036 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要:目的 通过检测分析该地区鲍曼不动杆菌耐药性及生理形态变化, 了解其耐药性的发展趋势。方法 用 Vitek2-Compact 自动微生物鉴定系统检测鲍曼不动杆菌对 18 种抗菌药物的耐药性。用原子力显微镜比较分析其耐药菌株和敏感菌株的形态学变化。结果 耐药性检测表明, 鲍曼不动杆菌泛耐药现象普遍, 其中对头孢孟多的耐药率达 100%, 重症监护室(ICU)内鲍曼不动杆菌对头孢类抗菌药物耐药性达 84%。通过原子力显微镜观察, 鲍曼不动杆菌耐药菌株形态发生了明显变化, 菌体变成卷曲不规则, 表面凹凸不平。结论 鲍曼不动杆菌耐药性严重, 需严格根据药物检测来指导用药, 以减少耐药性变异菌的产生。

关键词: 鲍氏不动杆菌; 抗药性; 微生物; 原子力显微镜; 重症监护室; 形态变化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)20-2650-02

The antibiotic resistance analysis and the surface physiological change of *Acinetobacter baumannii*^{*}

Li Yun¹, Xia Weimin^{1#}, Zhang Liping², Zhang Wen¹, Yang Xiuzhen¹, Zhang Caihong¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Zibo Center Hospital, Zibo, Shandong 255036, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance and physiological changes of local *Acinetobacter baumannii*, and to get a comprehensive understanding of the development tendency of drug resistance. **Methods** Automatic microorganism identification system was used to detect *Acinetobacter baumannii* and its drug-resistance to 18 antibiotics. Moreover, the atomic force microscopy was used to analyze the morphological changes of drug-resistant strains and sensitive strains. **Results** The detection of drug-resistance showed that the pan drug resistance of *Acinetobacter baumannii* was widespread, in which the cefamandole resistance rates was up to 100%. In intensive care unit(ICU), the drug resistance rate of *Acinetobacter baumannii* to cephalosporin antibiotics was 84%. The result of atomic force microscopy showed that the resistant strains form of *Acinetobacter baumannii* changed significantly, and the bacteria became curly irregular and uneven surface. **Conclusion** The drug-resistance of *Acinetobacter baumannii* is very serious, so it is important to guide drug by the strictly drug testing, in order to reduce the resistant bacteria.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; drug resistance, microbial; atomic force microscope; intensive care unit; morphological changes

随着广谱抗菌药物的大量使用和抗菌药物选择性压力的不断增加, 多重耐药鲍曼不动杆菌的比例也不断上升, 人们对耐药菌的研究也更加深入。Doktycz 等^[1]在 2003 年用 AFM 来观察细菌菌体表面变化, 但对耐药鲍曼不动杆菌菌体表面超微结构没有研究。对鲍曼不动杆菌的耐药情况及表面超微结构进行检测、分析及讨论, 为临床合理用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 69 株鲍曼不动杆菌分离自 2011 年 3 月至 2011 年 9 月期间 ICU 室患者的痰、脓液及血液等临床标本。

1.1.2 试剂 用 Vitek2-Compact 自动微生物鉴定系统的 Vitek2 GN 鉴定卡和 Vitek2 AST-GN13 细菌药敏卡(头孢孟多 MAN、氨苄西林/舒巴坦 SAM、氨曲南 ATM、头孢替坦 CTT、头孢唑林 CZO、头孢吡肟 FEP、亚胺培南 IPM、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑 SXT、妥布霉素 TOB、氨苄西林 AMP、阿莫西林 AM、环丙沙星 CIP、头孢曲松 CRO、呋喃妥因 NIT、庆大霉素 GEN、左氧氟沙星 LVX、头孢他啶 CAZ、哌拉西林/他唑巴坦 TZP), 均产自美国 bioMérieux, Inc 公司。

1.1.3 仪器 Vitek2-Compact 自动微生物鉴定仪, 购买于法国梅里埃诊断产品; 原子力显微镜, NanoScope(R) IIIa 的扫描探针显微镜为美国 Veeco 公司产。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离与鉴定 按常规进行病原菌培养和分离, 采用 Vitek2-Compact 自动微生物鉴定系统对病原菌进行鉴定, 质控菌株购买于山东省临床检验中心。

1.2.2 药敏试验 根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)的指导原则, 采用肉汤稀释法测定病原菌对相应抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)值, 判定其耐药性。

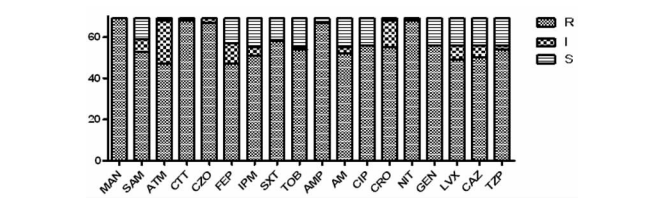
1.2.3 AFM 成像 随机选取已鉴定的敏感鲍曼不动杆菌和多重耐药鲍曼不动杆菌各一株, 将其菌液均匀涂于玻璃片上, 自然晾干, 在 AFM 液相模式(即 1×PBS 液体环境)下扫描观察。每组样品扫描至少 10 个单菌体细胞, 观察其阶高、粗糙度、长度、宽度等参数。扫描器采用 E 型压电陶瓷扫描管, 扫描范围为 10 μm。所用探针型号为 NP2S20, 针尖扫描速率为 1Hz, 针尖曲率半径为 10~40 nm, 共振频率为 40~75 kHz; 微悬臂长度为 115 μm, 宽度为 25 μm, 弹性系数 K 为 0.58 N/m;

^{*} 基金项目: 淄博市科技局基金资助项目(2011GG01222)。作者简介: 李云, 女, 主管技师, 主要从事微生物耐药性研究。 # 为共同第一作者, 夏蔚珉, 女, 主任技师, 主要从事微生物耐药性研究。

相应每条扫描线的像素分别为(256×256) pixel 和(512×512) pixel。图像均在恒力模式下获得,采用高度(height)、振幅(amplitude)和相位(phase)三种信号采集模式同时进行扫描图像输出,所有图像均通过自动平滑(flatten auto)处理以消除慢扫描方向的低频噪音。存储后的图像经 Nanoscope Image Analysis 分析处理软件进行平滑处理后,进行菌体形态的截面分析与测量。

2 结 果

2.1 耐药性检测结果 来自 ICU 的鲍曼不动杆菌普遍耐药,且多重耐药现象严重。对头孢类抗菌药物耐药率达 84% 以上,对亚胺培南的耐药率也达 70%。69 株鲍曼不动杆菌对 18 株抗菌药物的耐药性统计分析见图 1。



注:横坐标为 18 种抗菌药物,纵坐标为 69 株鲍曼不动杆菌,R 代表耐药,I 代表中介,S 代表敏感。

图 1 临床分离的 69 株鲍曼不动杆菌的耐药性分析

2.2 AFM 观察结果 借助原子力显微镜观察鲍曼不动杆菌敏感菌株和耐药菌株,图 2 为敏感菌株和耐药菌株的 AFM 高度图、振幅图和相位图。在纳米技术下观察细菌的形态变化,发现耐药菌表面发生了明显变化,菌体变长变宽,形状变得不规则,粗糙度明显增加。图 3 为鲍曼不动杆菌的三维立体结构图,左图为对抗菌药物敏感的细菌的 AFM 图,可见菌体边界清晰,表面有米粒状细小颗粒状物,有较小的起伏但相对平滑;右图菌体表面颗粒状物明显,菌体表面起伏较大,形态变化明显。

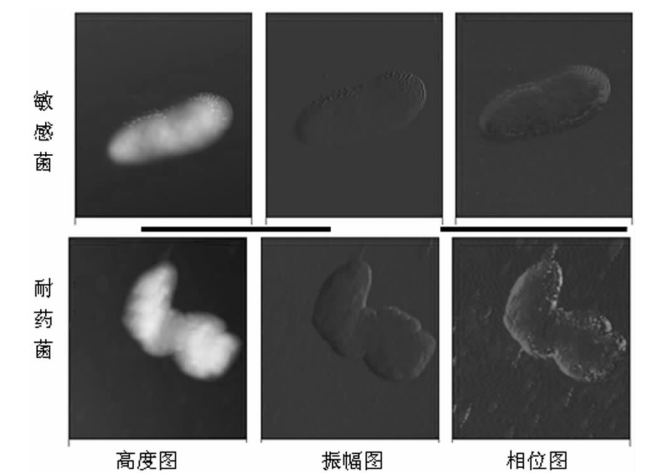


图 2 鲍曼不动杆菌的敏感菌与耐药菌比较 (3.00 μm AFM 图)

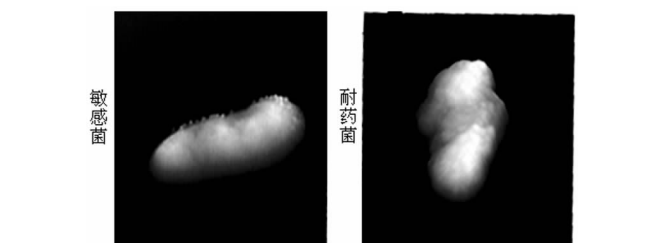


图 3 敏感菌与耐药菌三维图比较 (5.00 μm AFM 图)

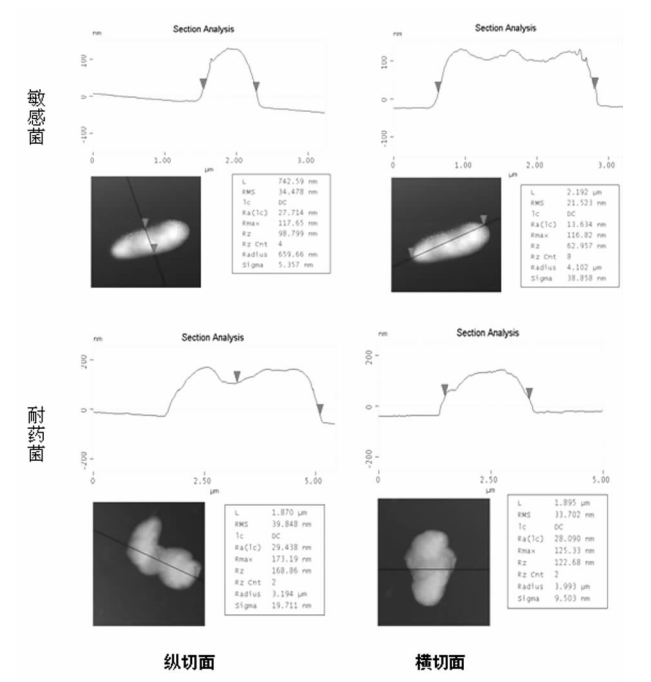


图 4 敏感菌与耐药菌截面分析图比较 (5.00 μm AFM 图)

图 4 上图为对抗菌药物敏感的鲍曼不动杆菌的截面分析图,纵切面和横切面菌体长约 1~3 μm,宽 0.5~1.0 μm,菌体形态细长,表面规则,变化不大;下图为耐药菌的截面分析图,可以看到菌体表面距离 2.297~3.132 μm,菌体长 2.244~2.992 μm 菌体明显改变,菌体变长变宽,变得卷曲不规则,形态呈现多样化,边界不清,表面凹凸不平,起伏更加明显。

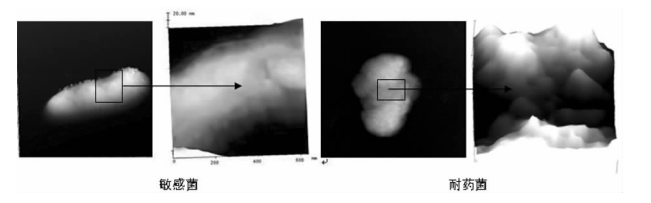


图 5 敏感菌与耐药菌微观分析图 (600 nm × 600 nm AFM 图)

图 5 为敏感菌与耐药菌的 AFM 微观分析图,从 600 nm 的微观观察,敏感的鲍曼不动杆菌表面光滑,起伏不明显,而耐药菌表面起伏较大,可见明显凸起和凹槽,耐药菌的形态变化用纳米技术观察与敏感菌比较发生了很大变化。

3 讨 论

鲍曼不动杆菌是一种条件致病菌,该菌引起的医院感染日益增多,近年来已成为医院感染的重要病原菌之一,并且可通过多种途径在医院内传播。目前临床抗菌药物的广泛应用,鲍曼不动杆菌对抗菌药物的耐药性也逐年增强^[2-4]。本文研究显示,从鲍曼不动杆菌在临床标本的检出分布来看,大多数来源于痰标本(78.63%),这说明该菌引起的定植感染患者较多,ICU 的鲍曼不动杆菌耐药现象严重,呈现多重耐药,患者对多种抗菌药物都不敏感。

鲍曼不动杆菌的耐药机制较为复杂,影响临床的抗感染治疗,并限制治疗方案的选择。从药敏结果看,对 β-内酰胺类、氨基糖苷类抗菌药物普遍耐药,有多重耐药的特点。Me'ndez-Vilas 等^[5]在 2004 年通过 AFM 观察,比较 2 株金黄色葡萄球菌表面特征;Doktycz 等^[1]发现通过 AFM 对(下转第 2655 页)

的缺憾,可能会因此影响结果的准确性。为了明确 *ORMDL3* 与儿童哮喘的关系,研究者正在进一步扩大收集儿童哮喘资料 and 样本量。另外,本课题组正在通过免疫组化检测肺组织中 *ORMDL3* 的表达,同时构建干扰质粒并转染正常支气管上皮细胞,为 *ORMDL3* 在哮喘中的作用机制研究奠定基础。

参考文献

[1] Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, et al. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness [J]. *Nature*, 2002, 418(25): 426-430.

[2] Bouzigon E, Eve C, Hugues A, et al. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(19): 1985-1994.

[3] John W. Holloway, Gerard H. 17q21 Variants and Asthma-Questions and Answers[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(19): 2043-2045.

[4] 谭家余, 罗雅玲, 黄湘, 等. MD-1 基因单核苷酸多态性与华南汉族成人支气管哮喘发病的相关性研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(2): 104-107.

[5] 谭家余, 李粉霞, 吴东, 等. C3 基因单核苷酸多态性与成人哮喘易感性的相关性研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28(2): 204-207.

[6] Moffatt MF, Kabisch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating *ORMDL3* expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 470-473.

[7] Galanter J, Choudhry S, Eng C, et al. *ORMDL3* gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(11): 1194-1200.

[8] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(3): 3-13.

[9] Hirota T, Harada M, Sakashita M, et al. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121: 769-770.

[10] Galanter J, Choudhry S, Eng C, et al. *ORMDL3* gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(11): 1194-1200.

[11] Tavendale R, Macgregor DF, Mukhopadhyay SA, et al. Polymorphism controlling *ORMDL3* expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(4): 860-863.

[12] Sleiman PM, Annaiah K, Imielinski M, et al. *ORMDL3* variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(6): 1225-1227.

[13] 金哲, 王金凤, 李红, 等. 北京地区儿童生活方式、免疫状态及 *ORMDL3* 基因 SNPs 与哮喘发生的相关性研究[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(11): 21-24.

[14] 孙婧, 李乔俊, 徐飞, 等. 儿童哮喘与 *ORMDL3* 基因多态性关系的研究[J]. *中国康复理论与实践*, 2010, 16(4): 361-363.

[15] 丁毅鹏, 何海武, 石慧芳, 等. 海南黎族哮喘 *ORMDL3* 基因多态性研究[J]. *海南医学*, 2012, 23(11): 1-2.

(收稿日期: 2013-05-25)

(上接第 2651 页)

耐药菌的菌体表面形态观察, 研究耐药菌的部分耐药机制, 可以明显看到鲍曼不动杆菌多重耐药菌株的形态变化明显, 其表面粗糙度增加, 有很多突起与凹陷, 这与多耐药菌的耐药机制的形成有关。临床常用的大多数抗菌药物作用于细菌的细胞壁, 干扰细胞壁肽聚糖合成而导致细菌死亡, 多重耐药鲍曼不动杆菌通过改变细菌细胞膜通透性(如孔蛋白减少、生物膜的形成)^[6-11], 使抗菌药物不易或无法进入细胞内, 达不到有效杀菌浓度, 这使得存活耐药菌细胞膜表面发生相应的形态的变化, 正如 AFM 观察到的变化一样, 耐药菌的形态发生了明显变化。

通过研究发现, 人体内鲍曼不动杆菌在临床用药的情况下, 耐药菌株发生了明显的形态变化。微生物室应加强细菌耐药监测工作, 并多与临床沟通开展一些相关的耐药机制的研究工作, 制定正确、合理的抗菌剂使用方案, 有效避免耐药菌株的产生与播散^[9]。

参考文献

[1] Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR. AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces[J]. *Ultramicroscopy*, 2003, 97(1/4): 209-216.

[2] 王长炯, 王蓓, 王宁, 等. 江苏省淋病奈瑟菌对抗菌药物的敏感性分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(10): 1025-1026.

[3] 闫钢凤, 曹云, 翟涤, 等. 新生儿重症监护病房多重耐药鲍曼不动

杆菌 β -内酰胺酶的基因型[J]. *中华围产医学杂志*, 2011, 14(5): 257-258.

[4] 孙谦, 周宏伟, 胡燕燕, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌对替加环素耐药状况分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(4): 358-359.

[5] Me'ndez-Vilas AM, Gallardo-Moreno ML. Surface characterisation of two strains of *Staphylococcus epidermidis* with different slime-production by AFM[J]. *App Sur Sci*, 2004, 238(1/4): 18-23.

[6] Salerno MB, Logan BE, Velegol ID. Importance of molecular tails in predicting bacterial adhesion to hydrophobic surfaces[J]. *Langmuir*, 2004, 20(24): 106252-10629.

[7] Duf'rène YF. Using nanotechniques to explore microbial surfaces [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(6): 451-460.

[8] 何旭瑛. 细菌耐药性产生的机制与最新研究进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2009, 8(11): 117-118.

[9] 李娟, 冯锴, 李艳, 等. 血培养菌种分布和耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 1(33): 79-81.

[10] 熊劲芝, 黄强, 王红卫, 等. 鲍曼不动杆菌感染分布及耐药性分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2009, 3(8): 120-121.

[11] 曹守春, 张丽萍, 李加, 等. 狂犬病病毒 CTN-1 v 株原子力显微镜观察结果的初步分析[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2011, 1(31): 34-36.

(收稿日期: 2013-04-05)