

· 临床论著 ·

外排泵介导鲍曼不动杆菌多重耐药 及其治疗方案研究

杨艳兵^{1,2} 李从荣¹

【摘要】目的 探讨鲍曼不动杆菌(AB)多重耐药与外排泵相关性,及多重耐药鲍曼不动杆菌(MDRAB)感染的治疗方案。**方法** 收集2011年6月至2012年6月武汉大学人民医院ICU分离鉴定出的AB共116株,进行体外药敏试验,采用PCR方法检测外排泵基因,肉汤倍比稀释法检测最低抑菌浓度(MIC)。**结果** 所收集的116株AB,对 β -内酰胺类抗菌药物耐药率较高,特别是头孢噻肟及哌拉西林,高达90%以上;对米诺环素及头孢哌酮舒巴坦耐药率较低,MDRAB检出率达84.48%(98/116);adeB基因总检出率为92.24%(107/116),abeM基因总检出率为88.79%(103/116),adeG基因总检出率为92.24%(107/116),tetB基因总检出率为61.21%(71/116),adeE基因总检出率为0.86%(1/116);MDRAB菌株中adeB、abeM、adeG及tetB外排基因检出率均高于non-MDRAB菌株;SCF、MH单用MIC与联合使用MIC比较,单用均显著高于联用,SCF、MH分别与碳酰肼基-对-氯苯胺(CCCP)联用MIC显著低于SCF与MH联用时的MIC。**结论** AB耐药及多重耐药十分严重,外排泵基因adeB、abeM、adeG、tetB是介导AB多重耐药的机制之一,MH与SCF联合应用具有协同和相加作用,外排泵抑制剂与抗菌药物联合可降低抗菌药物的MIC及用量,恢复其敏感性。

【关键词】 鲍曼不动杆菌;多重耐药;外排泵;治疗方案

Analysis on *Acinetobacter baumannii* multidrug-resistant mediated by efflux pump and treatment
Yang Yanbing^{1,2}, Li Congrong¹. ¹Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; ²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Luohe Central Hospital, Luohe 462300, China

Corresponding author: Li Congrong, Email: conrongLi33@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the correlation between resistance of *Acinetobacter baumannii* (AB) and efflux pumps and the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **Methods** Total of 116 AB strains were collected from June 2011 to June 2012 in ICU of Renmin Hospital of Wuhan University, then the sensitivity to antibiotics were tested, respectively. The efflux pump genes were detected by PCR. The minimum inhibitory concentration minimal inhibitory concentrations (MIC) were detected by broth dilution method. **Results** Among the 116 AB strains which were isolated, the resistant rates to beta-lactam antibiotics were higher, especially to cefotaxime and piperacillin (more than 90%), but the rates to minocycline and cefoperazone/sulbactam were lower. There were 84.48% (98/116) strains MDRAB detected. The 116 isolates, 107 (92.42%) of them were adeB positive, 103 (88.79%) of them were abeM positive strains, 107 (92.42%) of them were adeG positive, 71 (62.21%) of them were tetB positive, 1 (0.86%) strain of them was adeE positive. It showed that efflux genes adeB, abeM, adeG and tetB detected from MDRAB strains were significantly higher than non-MDRAB strains. The MICs of minocycline (MH) and cefoperazone-sulbactam (SCF) were significantly single higher than combined. The MICs of SCF, MH combined with carbonyl cyano-to-chlorobenzene hydrazone (CCCp) were significantly lower than them combined. **Conclusions** The resistant and multidrug-resistant situation are very serious in AB strains. The efflux pump is one of the mechanisms which mediated AB resistant. MH and SCF combined is a collaborative and additive effect. Efflux pump inhibitors combined with antibiotic could reduce the MIC and dosage of antibiotics, and they could recover antibiotic sensitivity.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii*; Multi-drug resistant; Efflux pump; Treatment

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.02.009

基金项目: 国家临床重点专科建设项目 [No.财社(2010)305]

作者单位: 430060 武汉市, 湖北省武汉大学人民医院检验科¹; 462300 漯河市, 漯河市中心医院呼吸与重症医学科²

通讯作者: 李从荣, Email: conrongLi33@hotmail.com

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, AB) 是一种全球性、机会性院内感染的病原菌, 因其对多种药物产生耐药性倾向, 有的分离时即为多重耐药菌株, 甚至泛耐药, AB 感染成为一个重大的公共卫生问题^[1-2]。最近的研究表明, 主动外排系统基因表达上调在细菌多重耐药中起关键作用。外排泵的过表达, 使菌体内抗菌药物蓄积减少, 从而导致耐药的产生^[3-4]。目前, 用于治疗耐碳青霉烯类抗菌药物 AB 及多重耐药鲍曼不动杆菌 (multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, MDRAB) 感染可供选择的药物极为有限, 联合用药是其治疗的有效策略之一。

资料与方法

一、主要实验材料和试剂

1. 实验菌株: 2011 年 6 月至 2012 年 6 月, 武汉大学人民医院 ICU 患者送检培养标本中分离出的鲍曼不动杆菌 116 株 (排除同一患者同一部位重复分离的菌株)。

2. 标准菌株及 PCR 引物: 大肠埃希菌标准菌株 ATCC25922、铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC27853、金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 均购至我国卫生部临床检验中心, PCR 引物由 Life Technologies 公司合成 (见表 1)。

二、方法

1. 菌株种属的鉴定: 根据《全国临床检验操作

规程》进行培养、分离临床标本, 菌种鉴定及药敏试验采用 Phoenix 100 细菌鉴定/药敏仪。

2. 外排泵基因扩增条件的建立及产物鉴定: 取复活后的细菌, 煮沸法提取细菌 DNA, PCR 扩增目的基因, 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

3. 单药及联合用药 MIC 测定: 参考美国临床实验室标准委员会 (CLSI) 2011 年标准, 采用肉汤稀释法测定药物的 MIC, 棋盘法测定联合用药的 MIC。

四、统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料呈正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组计量资料之间的比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、菌株药敏情况

116 株鲍曼不动杆菌中检出 98 株 MDRAB、34 株广泛耐药鲍曼不动杆菌 (extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*, XDRAB)、15 株全耐药鲍曼不动杆菌 (pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, PDRAB); 对常见抗菌药物的耐药率由高到低依次为: 头孢噻肟 (CTX) 95.69%、哌拉西林 (PRL) 91.37%、庆大霉素 (CN) 87.07%、头孢吡肟 (FEP) 86.21%、哌拉西林/他唑巴坦 (TZP) 86.21%、头孢他啶 (CAZ) 85.34%、阿米卡星 (AK)

表 1 各外排泵引物序列

外排泵	引物序列 (5'→3')	目的片段大小 (bp)
adeB-F	CTTTCATTGCTTTAGAGGTTGC	113
adeB-R	GCTTGCCATCGGGATTATTG	
adeE-F	GAGCTGAGGATTCTCTATGT	504
adeE-R	AGTGTGCTCACCATATAGTC	
adeG-F	GTGTAGTGCCACTGGTTACT	203
adeG-R	ATGTGGGCTAGCTAACGGC	
abeM-F	GCTATTCCGAAGCATTAGGC	119
abeM-R	CCAAAGCAGGTATTGGTCCT	
tetB-F	AAAGAGTCATCAGCAAGGTGCT	545
tetB-R	TATGCGGTGAAATCTCTCTGTC	

表 2 SCF 单用和联合用药对 MDRAB 的 MIC 比较 ($n = 24$)

用药方式	MIC 范围	均数 ($\bar{x} \pm s$)
单药 ($\mu\text{g/ml}$)	2 ~ 256	35.58 \pm 59.65
联合用药 ($\mu\text{g/ml}$)		
SCF + MH	0.25 ~ 64	8.24 \pm 14.22
SCF + CCCP	0.125 ~ 16	2.92 \pm 3.92

表 3 MH 单用和联合用药对 MDRAB 的 MIC 比较 ($n = 24$)

用药方式	MIC 范围	均数 ($\bar{x} \pm s$)
单药 ($\mu\text{g/ml}$)	1 ~ 64	7.04 \pm 13.83
联合用药 ($\mu\text{g/ml}$)		
SCF + MH	0.25 ~ 16	2.14 \pm 3.60
CCCP + MH	0.125 ~ 2	0.50 \pm 0.52

85.34%、环丙沙星(CIP)84.48%、左氧氟沙星(LEV)84.48%、美罗培南(MEM)77.59%、亚胺培南(IPM)73.41%、米诺环素(MH)35.34%和头孢哌酮/舒巴坦(SCF)8.54%。

二、外排泵基因的检出情况

adeB 总检出率为 92.24%，abeM 总检出率为 88.79%，adeG 总检出率为 92.24%，tetB 总检出率为 61.21%，adeE 总检出率为 0.86% (PCR 产物见图 1~5)。adeB 在 AK、CN、CIP、LEV、CAZ、CTX、FEP、PRL、IPM、TZP、MEM 及 MH 耐药菌株中检出率高于敏感菌株，adeG 在 AK、CN、CIP、LEV、CAZ、CTX、FEP、PRL、

IPM、TZP 及 MEM 耐药菌株中检出率高于敏感菌株，abeM 在 AK、CN、CIP、LEV、CAZ、CTX、FEP、PRL、IPM 及 TZP 耐药菌株中检出率高于敏感菌株，tetB 在 AK、CN、CIP、LEV、CAZ、CTX、FEP、PRL、IPM、TZP 及 MEM 耐药菌株中检出率高于敏感菌株，差异均具有统计学意义。

MDRAB 菌株中 adeB、abeM、adeG、tetB 和 adeE 检出率分别为 98.98%、94.90%、96.94%、71.43% 和 0.00%。MDRAB 菌株中 adeB、abeM、adeG 及 tetB 外排基因检出率均高于 non-MDRAB 菌株，差异具有统计学意义。

三、单药及联合用药对 MDRAB 的抑菌效果比较

SCF、MH 单用 MIC 与联合使用 MIC 比较，单用均显著高于联用，差异具有统计学意义 ($t = 2.19, P < 0.01$; $t = 1.68, P < 0.05$)，见表 2~3。SCF 与 MH 联合应用 FIC 指数 0~0.5 占 50%，0.5~1 占 45.83%，1~2 占 4.17%。提示 SCF 与 MH 联合应用具有协同和相加作用。SCF、MH 分别与 CCCP 联用对 MDRAB 的 MIC 显著低于二者单用的 MIC，差异具有统计学意义 ($t = 1.77, P < 0.01$; $t = 2.32, P < 0.01$)，且 SCF、MH 各自所用的浓度均在敏感范围。联合用药时浓度-累积抑菌率曲线明显左移，与 CCCP 联用时曲线左移更为显著。

讨 论

AB 具有强大的获得性耐药及克隆传播能力，是我国院内感染的最重要的病原菌之一，《中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识》^[5]指出：AB 感染的抗菌治疗不仅要遵循根据药敏试验结果选择抗菌药物的原则，还要联合用药，特别是对于 MDRAB、XRAB 及 PRAB 感染的患者。

adeABC 外排泵是 AB 中发现的第一个外排泵，能主动外排氨基糖苷类、 β -内酰胺类、氟喹诺酮类、四环素、替加环素、大环内酯类、氯霉素和甲氧苄氨嘧啶^[6-7]，但能否外排碳青霉烯类抗菌药物还存在争议^[8-9]。在本研究中 adeB 总检出率高达 92.24%，与以往研究相似，AK、CN、CIP、LEV、CAZ、CTX、FEP、PRL、IPM、MEM 和 MH 耐药菌株中 adeB 基因的检出率显著高于敏感菌株，在 MDRAB 菌株中，adeB 检出率为 98.98%，高于 non-MDRAB 菌株。对于碳青霉烯类抗菌药物，本研究的结果支持 Heritier 等^[8]研究观点：AdeABC

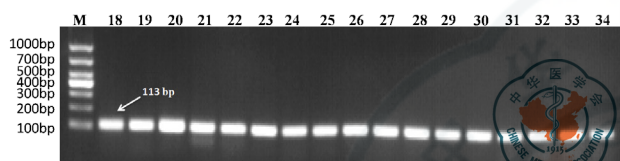


图 1 adeB 基因 PCR 产物电泳图谱

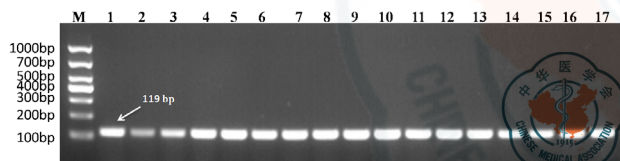


图 2 abeM 基因 PCR 产物电泳图谱

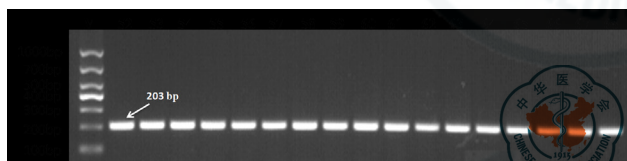


图 3 adeG 基因 PCR 产物电泳图谱

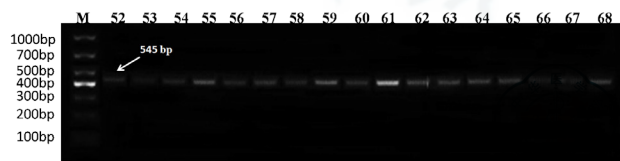


图 4 tetB 基因 PCR 产物电泳图谱

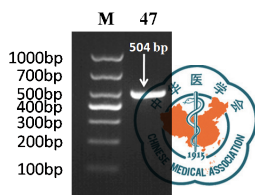


图 5 adeE 基因 PCR 产物电泳图谱

外排泵能外排碳青霉烯类抗菌药物,但是尚需基因转导及敲除等进一步的研究加以确证。

adeFGH与氟喹诺酮、甲氧苄啶、氯霉素和克林霉素高度耐药相关,也能导致替加环素、四环素及磺胺敏感性的下降,而对 β -内酰胺类和氨基糖苷类无影响^[10]。在本研究中adeG总检出率高达92.24%,在CIP、LEV耐药菌株中检出率显著高于敏感菌株。在MDRAB菌株中,adeG检出率为98.98%,高于non-MDRAB菌株。本研究中 β -内酰胺类和氨基糖苷类抗菌药物耐药菌株中adeG检出率均高于敏感菌株(MEM除外),原因可能是所研究的细菌存在氟喹诺酮类交叉耐药。

adeDE能够外排氨基糖苷类、碳青霉烯类、头孢菌素类、喹诺酮类、红霉素、四环素、利福平和氯霉素^[11]。本次研究中仅有1株菌株检测出adeE基因,且该菌株仅对CN、CTA和PRL耐药,可能是由于所收集的标本样本量小,或者本地区adeDE外排泵分布低。本地区adeDE外排泵介导的耐药情况尚需进一步扩大标本量进行研究。

MFS家族外排泵通常只能外排某些特定种类的抗菌药物,tetA主要是外排四环素,tetB能外排四环素及米诺环素^[12]。但该类外排泵并不影响新型四环素类,如甘氨酰环素。本研究菌株未涉及四环素药敏,对MH耐药率35.34%,与以往研究不同,本研究中MH耐药菌株与敏感菌株中tetB基因检出率无统计学差异,可能是因为本研究标本样本量不足,或者本地区tetB基因分布原本就低。但在MDRAB菌株中tetB基因检出率高于non-MDRAB菌株。

AbeM为MATE家族的成员,能外排氨基糖苷类、氟喹诺酮类、氯霉素、甲氧苄氨嘧啶、溴化乙锭及染料^[13],由于仅在大肠埃希菌进行过研究,其与AB多重耐药的相关性仍有待确认。研究发现:在所有临床分离株中abeM基因与抗菌药物耐药性无相关性,甚至在abeM过度表达菌株中^[14-15],表明该外排泵对细菌耐药性的影响很弱。而在本研究中abeM总检出率为88.79%,MDRAB菌株中检出率高于non-MDRAB菌株,除IPM、MEM、SCF和MH外,其他抗菌药物耐药菌株中abeM检出率高于敏感菌株。虽然尚需进一步的研究加以确证,但仍能侧面表明AbeM外排泵能介导AB耐药。

对于MDRAB、XRAB及PRAB感染的治疗,除了根据抗菌药物药代动力学/药效动力学参数,选择合适的给药剂量、次数、时间等提高疗效,也可选择联合用药治疗,联合给药方案可参考国内外相

关指南,也可以根据药敏试验结果进行组合。尤其是对于外排泵表达导致的耐药菌株,更应慎重的使用单独用药方案,应根据药敏试验结果选择最优的组合方案进行联合治疗。

本研究结合本院分离MDRAB的药敏结果,选择敏感率高的MH及SCF进行试验。联合用药可显著降低MDRAB的MIC,此外,联合用药在快速杀灭细菌的同时,还能减少药物的用量,从而减少不良反应及毒副作用的产生。本研究的菌株的FIC指数主要集中在0~0.5、0.5~1,提示药物联用有很好的协同、相加作用。虽然体外抑菌试验不能完全代表临床疗效,但是国内外诸多试验、临床研究以及本研究结果均表明联合用药的优越性,因此,临床应根据药敏试验结果选择合适的抗菌药物进行联合应用。

自青霉素问世以来,抗菌药物在人类细菌感染治疗中发挥了巨大的作用。但是,耐药菌株不断出现并迅速蔓延,给人类的生命健康造成了严重威胁,传统靶点或方法发现新抗菌药物越来越困难,因此研究新的治疗策略尤为重要。外排泵抑制剂(efflux pump inhibitors, EPIs)不仅能拮抗外排泵的外排作用,抑制药物从细菌胞内的排出,恢复对抗菌药物的敏感性^[16],还可保护细菌在药物环境中不被诱导耐药,降低耐药突变频率^[17]。基于此,本研究尝试体外使用EPIs(CCCP)联合抗菌药物进行体外抑菌试验,观察二者联合对MDRAB的抑菌效果。试验结果表明:CCCPC与抗菌药物联用的抗菌效果优于单纯抗菌药物之间组合,且CCCPC与MH、SCF联用,后者各自的MIC均在敏感范围。说明EPIs能够恢复抗菌药物对耐药菌株的敏感性,也反证了外排泵在鲍曼不动杆菌多重耐药中的重要作用。

参考文献

- 1 Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H, et al. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(12): 939-951.
- 2 Perez, F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471-3484.
- 3 Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria[J]. Annu Rev Biochem, 2009, 78: 119-146.
- 4 Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux[J]. Curr Opin Microbiol, 1998, 1(5): 516-523.
- 5 陈伯义, 何礼贤, 胡必杰, 等. 中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(2): 76-85.
- 6 Magnet S, Courvalin P, Lambert T, et al. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(12): 3375-3380.
- 7 Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents

- Chemother,2008,52(2):557-562.
- 8 Heritier C, Poirel L, Fournier PE, et al. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother,2005,49(10):4174-4179.
- 9 Wong EW, Yusof MY, Mansor MB, et al. Disruption of adeB gene has a greater effect on resistance to meropenems than adeA gene in *Acinetobacter spp.* isolated from University Malaya Medical Centre[J]. Singapore Med J,2009,50(8):822-826.
- 10 Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, et al. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother,2010,54(10):4389-4393.
- 11 Chau SL, Chu YW, Houang ET, et al. Novel resistance-nodulation-cell division efflux system adeDE in *Acinetobacter* genomic DNA group 3[J]. Antimicrob Agents Chemother,2004,48(10):4054-4055.
- 12 Marti S, Fernández-Cuenca F, Pascual A, et al. Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin,2006,24(2):77-80.
- 13 Su XZ, Chen J, Mizushima T, et al. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters[J]. Antimicrob Agents Chemother,2005,49(10):4362-4364.
- 14 Chen Y, Pi B, Zhou H, et al. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Med Microbiol,2009,58(Pt 8):1086-1091.
- 15 Bratu S, Landman D, Martin DA, et al. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City[J]. Antimicrob Agents Chemother,2008,52(9):2999-3005.
- 16 Zechini B, Versace I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria[J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov,2009,4(1):37-50.
- 17 Martinez A, Lin, J. Effect of an efflux pump inhibitor on the function of the multidrug efflux pump cmeABC and antimicrobial resistance in campylobacter[J]. Foodborne Pathog Dis,2006,3(4):393-402.

(收稿日期: 2014-06-25)

(本文编辑: 孙荣华)

杨艳兵, 李从荣. 外排泵介导鲍曼不动杆菌多重耐药及其治疗方案研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(2): 191-195.