

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.04.005

· 论 著 ·

62 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的同源性分析

何 磊, 邱景富

(重庆医科大学, 重庆 400016)

[摘要] **目的** 了解某院住院患者分离的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)同源性,为预防 CRAB 医院传播提供依据。**方法** 检测 2015 年 8 月—2016 年 11 月该院住院患者各类临床标本分离的 62 株 CRAB 药敏结果,利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析同源性及其流行特征。**结果** 62 株 CRAB 主要来自痰标本(占 88.71%),对头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星均耐药,对左氧氟沙星的耐药率(25.81%)最低。62 株 CRAB 分为 14 个不同的型别,分别为 A~N 型,其中 B、D、E、J 和 M 型别仅包含 1 株菌,其中 F 型别包含 5 个亚型,A、G、H 和 K 型别均有 3 个亚型,C 和 I 型各有 2 个亚型。对主要的克隆株临床资料进行分析,32 株菌(占 51.61%)来自重症监护病房(ICU),另有 12 株菌(占 19.35%)分离患者曾入住 ICU。**结论** 医院内流行的鲍曼不动杆菌存在外部带入和内部传播两种形式,需加大对其感染控制力度。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;耐碳青霉烯类抗生素;脉冲场凝胶电泳;PFGE;同源性

[中图分类号] R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)04-0299-05

Homology analysis on 62 strains of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

HE Lei, QIU Jing-fu (Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To understand the homology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) isolated from hospitalized patients in a hospital, and provide evidence for the prevention of CRAB spread in hospital. **Methods** Antimicrobial susceptibility testing of 62 strains of CRAB isolated from all kinds of clinical specimens from hospitalized patients between August 2015 and November 2016 was performed, homology and epidemic characteristics were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** 62 strains of CRAB were mainly from sputum specimens (88.71%), all were resistant to ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, and ciprofloxacin, resistance rate to levofloxacin was the lowest (25.81%). 62 strains of CRAB were divided into 14 different types (A-N), type B, D, E, J, and M only contained 1 strain respectively, type F contained 5 subtypes, type A, G, H, and K had 3 subtypes respectively, type C and I had 2 subtypes respectively. Clinical data of the main cloned strains were analyzed, 32 strains (51.61%) were isolated from patients in intensive care unit (ICU), and 12 strains (19.35%) from patients who had ever stayed in ICU. **Conclusion** There are two forms of *Acinetobacter baumannii* prevailed in hospital, which are external and internal spread, infection control should be strengthened.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; carbapenem; pulsed-field gel electrophoresis; PFGE; homology

[Chin J Infect Control, 2018, 17(4): 299-303]

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, AB) 属于非发酵革兰阴性球杆菌,营养要求不高,易存活于

各类非生物体表面^[1],在医院各类环境中广泛存在^[2-3],尤其是各类重症监护病房(intensive care unit,

[收稿日期] 2017-06-10

[基金项目] 重庆市卫生计生委重点项目(20141024)

[作者简介] 何磊(1983-),男(汉族),重庆市人,主治医师,主要从事感染性疾病研究。

[通信作者] 邱景富 E-mail:jfqi@126.com

ICU)。近年多次报道 AB 在医院内引起流行和暴发^[4-6]。AB 耐药形势严峻,2015 年 CHINET 中国细菌耐药监测网数据显示,AB 对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 62.00%、70.50%^[7],故耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)给临床防治带来极大困难,需要对其传播途径和同源性进行研究。了解传染源及传播途径,采取相应的措施有效控制 AB 医院流行和暴发^[8]。本研究采用脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技术对中国西南某区县三级甲等医院某时段分离的 CRAB 进行同源性分析,结合临床资料进行流行病学分析,以期提出更精准的防控措施。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 某三甲综合医院 2015 年 8 月—2016 年 11 月住院患者各类临床标本分离的 62 株 CRAB,剔除同一患者长期住院或反复住院分离的重复菌株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和铜绿假单胞菌 ATCC 27853。

1.2 细菌鉴定及药敏试验 采用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定药敏检测系统对菌株进行鉴定和药敏试验,结果判定参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2012 版。检测的抗菌药物包括氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、妥布霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、复方磺胺甲噁唑、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南等。

1.3 PFGE 试验 (1)挑取 AB 单菌落接种于营养平板,37℃ 孵育过夜,用比浊仪调整细菌悬液浓度,使浊度为 3.80~4.20,加入 1% Seakem Gold 胶,混匀制备胶块;(2)使用含蛋白酶 K 细胞裂解液(CLB)消化 2 h,纯水清洗胶块 2 次,TE(10 mmol/L Tris; 1 mmol/L EDTA, pH 8.00)清洗胶块 4 次;(3)使用 60 U ApaI(TAKARA 公司)内切酶进行酶切,在 37℃ 孵育 4 h;(4)在 CHEF-DRIII(Bio-Rad Laboratories 公司)电泳仪中进行脉冲场电泳,电泳参数为 5~20 s,19 h,电泳结束后,使用 GelRed 核酸染料染色,在凝胶成像仪中成像并保存。

1.4 PFGE 分型标准 利用 BioNumeric 软件对图进行分析,图谱条带数量和大小相同为同一型别,3 个条带以下有差异为同一型别的不同亚型,4 个条带以上差异为不同型别。

2 结果

2.1 菌株来源 标本以痰为主(55 份),其余为血(4 份)、支气管肺泡灌洗液(简称灌洗液,2 份)和脑脊液(1 份)。患者中男女性别比为 1.58:1,年龄(56±14)岁,诊断为脑卒中(34 例)、慢性阻塞性肺疾病(10 例)、脑外伤(10 例)、多发伤(5 例)、肿瘤(2 例)和冠心病(1 例)。

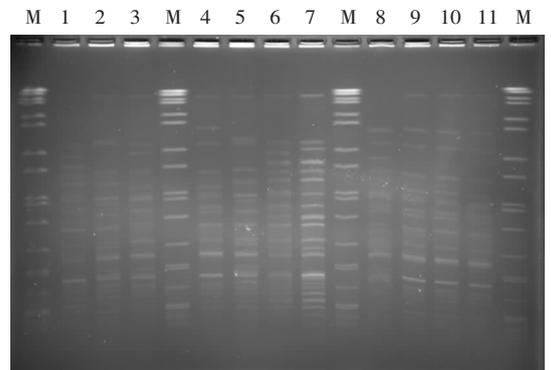
2.2 药敏结果 62 株 CRAB 对头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星均耐药,对氨基糖苷类的庆大霉素和妥布霉素的耐药率较低,均为 69.35%,对左氧氟沙星的耐药率(25.81%)最低。见表 1。

表 1 62 株 CRAB 的药敏结果[株数(%)]

Table 1 Antimicrobial susceptibility testing results of 62 strains of CRAB (No. of isolates[%])

抗菌药物	敏感	中介	耐药
氨苄西林/舒巴坦	0(0.00)	5(8.06)	57(91.94)
头孢他啶	0(0.00)	0(0.00)	62(100.00)
头孢吡肟	0(0.00)	0(0.00)	62(100.00)
亚胺培南	0(0.00)	0(0.00)	62(100.00)
美罗培南	0(0.00)	0(0.00)	62(100.00)
庆大霉素	18(29.03)	1(1.62)	43(69.35)
妥布霉素	19(30.65)	0(0.00)	43(69.35)
环丙沙星	0(0.00)	0(0.00)	62(100.00)
左氧氟沙星	13(20.97)	33(53.22)	16(25.81)
复方磺胺甲噁唑	10(16.13)	0(0.00)	52(83.87)

2.3 PFGE 结果 62 株 CRAB 分为 14 个不同的型别,分别为 A~N 型,B、D、E、J 和 M 型别仅包含 1 株菌,其中 F 型别包含 5 个亚型,A、G、H 和 K 型别均有 3 个亚型,C 和 I 型各有 2 个亚型。见图 1、表 2。



M:标准菌株,1 和 6 为 I2 亚型,2 和 5 为 F1 亚型,3 为 H1 亚型,4、10、11 均为 G1 亚型,7 为 K2 亚型,8 为 B 型,9 为 G2 亚型

图 1 部分菌株 PFGE 电泳图谱

Figure 1 PFGE electrophoresis map of partial strains

表 2 62 株 CRAB 的 PFGE 分型结果
Table 2 PFGE typing results of 62 CRAB strains

PFGE 型别	亚型	菌株数	PFGE 型别	亚型	菌株数
A 型	A1 型	3	H 型	G2 型	1
	A2 型	1		G3 型	1
	A3 型	1		H1 型	4
B 型		1		H2 型	1
	C1 型	1		H3 型	1
C 型	C2 型	1	I 型	I1 型	4
D 型		1		I2 型	5
E 型		1	J 型		1
F 型	F1 型	2	K 型	K1 型	5
	F2 型	4		K2 型	1
	F3 型	3		K3 型	4
	F4 型	1	L 型		3
	F5 型	1		M 型	1
G 型	G1 型	7	N 型		2

2.4 流行病学关联 对主要的克隆株临床资料进行分析,32 株菌(占 51.61%)来自 ICU,另有 12 株菌(占 19.35%)的分离患者曾入住 ICU。3 株 F2 型菌株分离时间分别为 2016 年 4 月 3 日(首发菌株且来源于 ICU)、4 月 10 日和 4 月 16 日,分布在 ICU、神经外科和呼吸内科,且来源于非 ICU 的菌株分离患者

均曾入住过 ICU。2015 年 8 月 15 日—9 月 7 日 3 株 G1 型菌株分别来自消化内科和 ICU,且 3 位患者均在 ICU 住过,2016 年 8 月 10 日—11 月 14 日分离 4 株菌属于 G1 型,首发病例在 ICU 入住,其余均来源于呼吸内科(其中 1 株分离的患者入住过 ICU)。4 株 K3 型菌株和 3 株 L 型菌株均来自 ICU。见表 3。

表 3 主要 CRAB 克隆菌株的基本信息
Table 3 Basic information of the main CRAB cloned strains

菌株编号	分离时间	标本类型	科室	患者是否入住 ICU	PFGE 型别	菌株编号	分离时间	标本类型	科室	患者是否入住 ICU	PFGE 型别
14	20160824	痰	ICU	是	A1	38	20160229	痰	呼吸内科	否	H1
15	20150817	痰	肿瘤科	否	A1	62	20150925	痰	ICU	是	H1
60	20160820	痰	ICU	是	A1	39	20160228	血	ICU	是	H2
13	20160831	痰	ICU	是	A2	31	20160402	痰	胸心外科	是	H3
34	20160321	痰	神经外科	是	A3	17	20160802	痰	呼吸内科	是	I1
2	20161117	灌洗液	呼吸内科	否	F1	55	20160201	痰	ICU	是	I1
5	20161111	痰	呼吸内科	否	F1	43	20151116	痰	神经外科	是	I1
19	20160618	痰	ICU	是	F2	48	20151017	痰	神经外科	是	I1
27	20160416	痰	呼吸内科	是	F2	1	20161106	痰	ICU	是	I2
28	20160410	痰	神经外科	是	F2	18	20160618	血	ICU	是	I2
30	20160403	痰	ICU	是	F2	26	20151227	痰	ICU	是	I2
20	20160614	痰	ICU	是	F3	45	20160418	痰	ICU	是	I2
29	20160408	痰	胸心外科	是	F3	6	20161120	痰	ICU	是	I2
52	20151109	痰	ICU	是	F3	12	20160329	痰	ICU	是	K1
23	20160520	痰	ICU	是	F4	24	20160420	痰	ICU	是	K1
37	20160305	痰	ICU	是	F5	25	20150822	痰	ICU	是	K1
10	20161114	痰	呼吸内科	否	G1	32	20160912	痰	ICU	是	K1
11	20160924	灌洗液	呼吸内科	是	G1	58	20160516	痰	神经内科	是	K1
16	20160917	痰	呼吸内科	否	G1	7	20161105	痰	心内科	否	K2
21	20160810	脓痰	ICU	是	G1	36	20160306	痰	ICU	是	K3
4	20150815	血	消化内科	是	G1	41	20160210	脑脊液	ICU	是	K3
57	20150907	痰	ICU	是	G1	42	20160209	血	ICU	是	K3
59	20150817	痰	ICU	是	G1	56	20150925	痰	ICU	是	K3
9	20160930	痰	呼吸内科	否	G2	46	20150816	痰	ICU	是	L
54	20151020	痰	胸心外科	是	G3	53	20151213	痰	ICU	是	L
3	20150815	痰	呼吸内科	否	H1	61	20151025	痰	ICU	是	L
35	20160315	痰	ICU	是	H1						

3 讨论

AB 是医院感染的重要条件致病菌,虽其毒力不强^[9-10],归因病死率也存在较大争议^[11-12],其在医院的检出率较高,耐药率较高,且耐药机制复杂^[13-15],临床治疗时可选择抗菌药物范围非常窄,CRAB 更为棘手。本研究仅有左氧氟沙星耐药率 < 30%,氨基糖苷类抗生素和复方磺胺甲噁唑虽有敏感菌株,但单用上述药物临床效果不佳,需与替加环素、头孢哌酮/舒巴坦^[16]等联合使用。

菌株同源性分析常用的方法有多位点序列分析(MLST)、多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)和 PFGE 等,其中 PFGE 以其重复性好、分辨力强被誉为细菌分子分型技术的“金标准”,在识别和追踪感染暴发或流行中广泛应用^[17-18]。本研究菌株 PFGE 结果显示,62 株菌分为 14 个不同的型别,其中 5 个型别只包含 1 株菌,存在散发菌株,与多数研究^[19-24](来自临床的标本且未区分社区和医院感染,较少提及散发菌株)结果不同,但仍有部分报道提示存在散发菌株,马真^[25]对 138 株 AB 进行同源性分析发现,24 株散发菌株;周娇娇^[26]在 55 株 AB 中发现 3 株散发菌株。本研究追踪了 B、D、E、J 和 M 型菌株分离患者 3 个月内的住院史,5 名患者都在不同级别的医院住院,提示分离的 AB 多为外部带入,与林家福^[27]分子流行病学调查结果一致,四川北部地区有 2 所医院存在相同基因型的 CRAB。本研究调查的医院为区县级医院,在分级诊疗的政策背景下作为大型综合医院和基层医院的结合点,要接收下级医院转诊的患者,同时也要接收上级医院转回的患者,导致散发菌株较多。AB 已成为一个全球化的病原体并且在不断进化^[28],虽存在外部输入的可能,但 14 个 PFGE 型别中存在多个克隆菌株且分布于多个科室,提示医院传播仍是 AB 流行传播的主要形式。3 株 F2 亚型菌株分离间隔时间不超过 1 周,2 例非 ICU 病例在入住 ICU 期间与首发 ICU 病例同在一个四人间进行治疗;3 株 K3 型中的 2 例患者分离时间仅间隔 1 d 且床位相邻,另外 1 例患者的分离时间与首发病例相距近 1 个月,但其住院时间较长,与前 2 名患者均曾相邻,故 F2 型和 K3 型发生医院感染暴发可能性大。G1 型菌株存在两次疑似暴发,第 1 次疑似暴发首发病例为入住过 ICU 的消化内科 CRAB 血流感染患者,仅有 1 例 ICU 患者与消化内科患者在 ICU 的同一四

人间相对的床位入住,另 1 例患者入住 ICU 时,其他患者已转出 ICU,且所在床位与消化内科患者并未在同一四人间;第 2 次疑似暴发首发病例为 ICU 病例,其余 3 例患者来自呼吸内科,其中 1 例呼吸内科患者入住过 ICU 且与首发病例在 ICU 有共同入住时间,但床位相距较远,另 2 例呼吸内科患者均未入住 ICU,住院时间也无交集,床位也不相邻。L 型 3 株分离间隔时间均超过 1 个月,住院时间无交叉,无床位聚集,不能确定为暴发。G1 型和 L 型疑似暴发的病例并未全部在短时间内形成病例聚集,床单元聚集趋势不明显,CRAB 医院传播明确,一部分亚型菌株形成暴发,另一部分亚型菌株长期存在于科室造成所住患者感染。所有暴发的首发病例均来自于 ICU 或者与 ICU 有关。存在潜在传染源的科室应对物体表面进行彻底消毒,特别是医务人员频繁接触的物体表面,如床栏杆、床旁桌、病床隔帘、门把手、护理站台面、病历夹、电话按键、电脑键盘、鼠标、呼吸机操作面板、监护仪面板、微量注射泵、输液泵等。物体表面与 AB 流行和暴发有较强的关联性^[29-30],在床位不紧张时实行轮换制度,对空置的病区进行消毒,经过监测合格后再重新开放。对于新发现的 CRAB,一定要采取隔离措施。研究^[31]表明,有效的消毒隔离措施对控制医院流行和暴发有重要作用。医务人员的手也可能成为 AB 的传播媒介^[32],应加强手卫生,有效控制其医院传播。本研究属于回顾性研究,无法对当时的环境或可疑物品进行采样,不能对其更详细的传播途径进行阐述,在今后研究中需要改进。

[参考文献]

- [1] Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, et al. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78 [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 282.
- [2] 毛璞,李建春,叶丹,等. ICU 患者血流感染耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌同源性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(9): 577-581.
- [3] 孙晴,张正银. 临床分离广泛耐药鲍曼不动杆菌同源性分析及常见耐药基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(1): 28-31.
- [4] Gamacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management [J]. Curr Opin Infect Dis, 2010, 23(4): 332-339.
- [5] Guo-Xin M, Dan-Yang S, Xi-Zhou G, et al. Laboratory to

- clinical investigation of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in a general hospital[J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(1): e13120.
- [6] Chang HL, Tang CH, Hsu YM, et al. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009, 30(1): 34-38.
- [7] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志 2016, 16(6): 685-694.
- [8] 赵霞, 王力红, 张京利, 等. 多药耐药鲍氏不动杆菌的同源性鉴定与控制[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(12): 2492-2494.
- [9] Moisoiu A, Ionitã M, Sãrbu L, et al. Antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical specimens in the "Marius Nasta" Pneumology Institute, Bucharest [J]. Pneumologia, 2014, 63(2): 109-111.
- [10] 刘彩霞. 医院感染鲍曼不动杆菌耐药机制与毒力因子的研究[D]. 温州: 温州医学院, 2009.
- [11] 何磊, 姜道彬, 李春华, 等. 鲍氏不动杆菌感染因病死亡率研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(23): 5518-5520.
- [12] 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]. 中国医药科学, 2012, 92(8): 3-8.
- [13] Azimi L, Lari AR, Talebi M, et al. Comparison between phenotypic and PCR for detection of OXA-23 type and metallo-beta-lactamases producer *Acinetobacter spp.* [J]. GMS Hyg Infect Control, 2013, 8(2): Doc16.
- [14] Revathi G, Siu LK, Lu PL, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in East Africa[J]. Int J Infect Dis, 2013, 17(12): e1255-e1258.
- [15] Mosqueda N, Gato E, Roca I, et al. Characterization of plasmids carrying the blaOXA-24/40 carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(10): 2629-2633.
- [16] 刘丹, 张莹, 李清华. 727 例鲍曼不动杆菌耐药分析和临床治疗意见[J]. 中国实用医药, 2013, 8(14): 180-182.
- [17] Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America; an international multicentre study[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(6): 1145-1154.
- [18] Higuchi W, Mimura S, Kurosawa Y, et al. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in a Japanese child, demonstrating multiple divergent strains in Japan[J]. J Infect Chemother, 2010, 16(4): 292-297.
- [19] 龚燕飞, 曾强, 刘湘林, 等. 亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学及耐药基因研究[J]. 实用预防医学, 2014, 21(1): 28-31.
- [20] 张晓兵, 刘星, 龚雅利, 等. 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学及耐药机制的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(5): 502-505.
- [21] 王璐. 多重耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学及相关耐药基因的初步研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2009.
- [22] 胡莹, 刘晓莉, 马润, 等. 昆明地区烧伤病房鲍曼不动杆菌的耐药性和分子流行病学调查[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(5): 508-510.
- [23] 吴海燕, 谭斌, 张志军, 等. 某院院内耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌分子流行病学研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, 11(2): 162-167.
- [24] 李永丽, 应春妹. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌分子流行病学及耐药机制研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(11): 1430-1435.
- [25] 马真. 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药机制和分子流行病学研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2009.
- [26] 周娇娇. 多重耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学和耐药机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- [27] 林家福. 川北地区耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌分子流行病学调查及碳青霉烯酶的检测[D]. 南充: 川北医学院, 2013.
- [28] Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen[J]. Pathog Dis, 2014, 71(3): 292-301.
- [29] Denton M, Wilcox MH, Parnell P, et al. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit[J]. Intensive Crit Care Nurs, 2005, 21(2): 94-98.
- [30] 朱健强, 林红燕, 钟韵. ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌分子流行病学调查[J]. 广州医学院学报, 2016, 44(1): 26-29.
- [31] 姜如金, 朱健铭, 吴康乐. 含氯消毒剂对多重耐药鲍曼不动杆菌杀灭效果的研究[J]. 中华临床感染病杂志, 2012, 5(1): 5-8.
- [32] 磨国鑫, 余丹阳, 管希周, 等. 监护室分离的鲍曼不动杆菌的耐药特征与同源性分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(9): 656-659.

(本文编辑: 豆清娅、左双燕)