

# 重症监护病房耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌感染特点与同源性分析

林佩贤<sup>1</sup> 黄宝添<sup>2</sup> 辜红妮<sup>1</sup> 黄靖宇<sup>1</sup> 许斐斐<sup>1</sup> 林伟青<sup>1</sup>

<sup>1</sup>汕头大学医学院第二附属医院医院感染管理科, 汕头 515041; <sup>2</sup>汕头大学医学院附属肿瘤医院放疗科, 汕头 515041

通信作者: 林伟青, Email: lwqfey@126.com

**【摘要】目的** 了解重症监护病房 (ICU) 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌 (carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB) 感染特点、耐药情况和同源性。**方法** 以 2020 年 7 月至 2021 年 6 月汕头大学医学院第二附属医院 ICU 病区收治的检出鲍曼不动杆菌感染者为研究对象, 按是否为 CRAB 感染分为病例组和对照组, 比较两组的一般特征和用药情况。对 CRAB 菌株进行脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 同源性分析, 采用 PCR 检测耐药基因。**结果** 共检出鲍曼不动杆菌感染者 41 例, 其中病例组 17 例, 对照组 24 例。病例组使用碳青霉烯类药物、抗菌药物使用时间  $\geq 10$  d、检出菌为医院感染病原菌的比例分别为 9/17、14/17 和 12/17, 均高于对照组 ( $\chi^2=6.05$ 、9.62 和 5.53,  $P$  均  $< 0.05$ )。CRAB 菌株对  $\beta$  内酰胺类、喹诺酮类、磺胺类的耐药/中介率均在 80% 以上。PFGE 分型结果显示共检出 9 个型别, 主要的耐药基因为 ADC 基因。**结论** ICU 病区 CRAB 感染多见于医院感染病例, 对  $\beta$  内酰胺类、喹诺酮类、磺胺类的耐药率较高, 主要携带 ADC 耐药基因。

**【关键词】** 鲍氏不动杆菌; 重症监护室; 同源性分析; 耐药; 基因

**基金项目:** 广东省高水平大学重点学科建设“感染性疾病研究与防治”项目 (粤办函[2015]325 号)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220111-00004

## Infections and homology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit

Lin Peixian<sup>1</sup>, Huang Baotian<sup>2</sup>, Gu Hongni<sup>1</sup>, Huang Jingyu<sup>1</sup>, Xu Feifei<sup>1</sup>, Lin Weiqing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hospital Infection Management, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China; <sup>2</sup>Department of Radiation Oncology, Cancer Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Corresponding author: Lin Weiqing, Email: lwqfey@126.com

**【Abstract】Objective** To explore the infection, drug resistance and homology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in intensive care unit (ICU). **Methods** According to whether they were infected with CRAB, the patients infected with *Acinetobacter baumannii* in ICU of the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College were divided into case group and control group. The clinical characteristics and drug application were compared between two groups. The homology of CRAB strains was analyzed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and the drug-resistance genes were detected by PCR. **Results** There were 41 cases infected with *Acinetobacter baumannii*, including 17 cases in case group and 24 cases in control group. The proportions of use of carbapenem drugs, antibiotic application for more than 10 days and nosocomial infections in case group were 9/17, 14/17 and 12/17, respectively, which were significantly higher than those in control group ( $\chi^2=6.05$ , 9.62 and 5.53,  $P$  all  $< 0.05$ ). The drug resistance/intermediary rates of CRAB strains to  $\beta$ -lactams, quinolones and sulfonamides were more than 80%. A total of 9 PFGE types were obtained from CRAB strains, and the main drug resistance gene was ADC gene. **Conclusions** CRAB strains are common in nosocomial infections in the ICU, and are highly resistant to  $\beta$ -lactams, quinolones and sulfonamides with the main drug resistance gene of ADC.

**【Key Words】** *Acinetobacter baumannii*; Intensive care units; Homology analysis; Drug resistance; Gene

**Fund program:** Guangdong Provincial High-level University Key Discipline Construction Project "Infectious Disease Research and Prevention" (Official Document of Guangdong Provincial People's Government [2015] No.325)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220111-00004

鲍曼不动杆菌(也称鲍氏不动杆菌)是一种非发酵的革兰阴性菌,其中耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)是引起医院感染的重要病原菌<sup>[1]</sup>。根据中国抗菌药物监测网的报告,约 80% 的鲍曼不动杆菌对亚胺培南或美罗培南耐药<sup>[2-3]</sup>,给临床抗感染治疗带来较大困难。WHO 公布的新型抗菌药物研发重点病原体清单中,CRAB 被列为最受关注的革兰阴性菌<sup>[4]</sup>。ICU 是医院感染多发的科室,ICU 病区鲍曼不动杆菌和 CRAB 所致的医院感染分别占 20.9% 和 13.6%<sup>[5]</sup>,也曾有 CRAB 引起医院感染流行和暴发的报道<sup>[6-7]</sup>。本研究对汕头某医院 ICU 病区患者 CRAB 的感染特点和同源性进行分析,现将结果报告如下。

## 对象与方法

### 一、研究对象

以 2020 年 7 月至 2021 年 6 月汕头大学医学院第二附属医院 ICU 病区收治的检出鲍曼不动杆菌患者为研究对象,按检出菌是否为 CRAB 分为病例组和对照组。医院感染病例诊断标准按原卫生部 2001 年《医院感染诊断标准(试行)》执行。纳入排除标准:纳入检出鲍曼不动杆菌的病例,排除住院时间少于 48 h 的病例,同次住院期间检出耐药菌的病例不纳入对照组。本研究经汕头大学医学院第二附属医院伦理委员会审查通过[审批号:汕大医附二伦审科(2022-104)号]。

### 二、菌株鉴定和药敏试验

检测患者入院后的痰液或分泌物,收集检出的第 1 株鲍曼不动杆菌菌株。按照《全国临床检验操作规程》第 3 版要求分离培养病原菌,参照 2019 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)推荐的药敏试验要求<sup>[8]</sup>,采用法国梅里埃公司的 VITEK-compact2 微生物自动分析仪和配套药敏卡进行药敏试验。以大肠埃希菌标准菌株 ATCC25922、铜绿

假单胞菌标准菌株 ATCC27853 进行药敏质控检测。

### 三、PFGE 试验

挑取鲍曼不动杆菌单菌落接种营养平板,37 °C 孵育过夜。制备胶块,使用 60 U Apa I (TAKARA 公司)内切酶进行酶切,在 37 °C 孵育 4 h。在 CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories 公司)电泳仪中进行脉冲场电泳,使用 GelRed 核酸染料染色,在读胶仪中成像。PFGE 图像录入 BioNumerics 软件包进行处理,经校正后根据每两个图像之间的相似性系数,用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类,构建聚类树。PFGE 分型标准: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。

### 四、耐药基因检测

参照 QUIGEN 试剂盒提取细菌基因组 DNA 制备 DNA 模板。PCR 扩增:(1) VIM、IMP、SIM、NDM-1、ADC 各靶基因 PCR 扩增体系为 20 μL:2×Taq Master Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, 模板 1 μL; 扩增参数为:94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 50 s, 其中退火温度 VIM、IMP 和 ADC 为 55 °C, NDM-1 和 SIM 为 58 °C, 退火时间均为 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72 °C 最后延伸 6 min。取 PCR 反应产物 4 μL, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 120 V 电泳 25 min 后凝胶成像系统成像。阳性 PCR 产物送测序公司进行测序。(2) OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58 和 OXA-143: 多重 PCR 法, 反应体系为 20 μL: 2×Taq Master Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 4 μL, 正反向引物各 0.5 μL (10 μmol/L), 模板 1 μL。扩增参数为:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 50 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 共 30 个循环, 72 °C 最后延伸 6 min。取 PCR 反应产物 4 μL, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, 120 V 电泳 25 min 后凝胶成像系统成像。阳性 PCR 产物送测序公司进行测序, 将测序结果开展 blast 比对进行确认。目的基因和引物序列详见表 1。

表 1 目的基因和引物序列

引物名称	引物序列	扩增片段长度(bp)
<b>B 类 β 内酰胺酶 (金属酶)</b>		
NDM-1-F	CATTGGCGGCGAAAGTCA	921
NDM-1-R	CTCGCACCGAATGTCTGGC	
VIM-F	TTATGGAGCAACCGATGT	920
VIM-R	CAAAAGTCCCCTCCACGA	
SIM-F	TACAAGGGATTCCGGCATCG	741
SIM-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG	
IMP-F	GGCAGTCGCCCTAAACAAA	737
IMP-R	TAGTTACTTGGCTGTGATGG	
<b>C 类 β 内酰胺酶 (头孢菌素酶)</b>		
ADC-F	GCAGATATTCAACGGGCAATTA	305
ADC-R	ATGCGCTCTTCATTTGGAATAC	
<b>D 类 β 内酰胺酶 (苯唑西林酶)</b>		
OXA-23-like-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501
OXA-23-like-R	ATTCTGACCGCATTTCCAT	
OXA-24-like-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246
OXA-24-like-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
OXA-51-like-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353
OXA-51-like-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
OXA-58-like-F	AACTATTGGGGCTTGTGCTG	599
OXA-58-like-R	CCCCTCTGGCTCTACATAC	
OXA-143-R	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT	149
OXA-143-S	TAATCTTGAGGGGCCAACC	

五、统计学分析

以 Epidata3.1 双录入并核对数据，应用 SPSS19.0 进行统计分析。正态性检验方法采用 P-P 图和 Shapiro-Wilk 检验，服从正态分布的计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，组间比较采用独立两样本均数 *t* 检验。计数资料采用例数和构成比表示，组间比较采用  $\chi^2$  检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、感染患者一般情况

感染鲍曼不动杆菌患者共 41 例，按检出菌是否为 CRAB 分为病例组(17 例)和对照组(24 例)，其中病例组男性 12 例，女性 5 例，年龄为(52.06±21.28)岁；对照组男性 22 例，女性 2 例，年龄(49.17±

20.44)岁，两组性别、年龄分布差异无统计学意义( $\chi^2=3.12, P=0.077; t=0.44, P=0.663$ )。结合临床表现，病例组和对照组分别有 13 例和 15 例判断为感染菌，均为肺部感染，余考虑为定植菌。

二、抗菌药物使用、院感发生情况和转归比较

病例组使用碳青霉烯类抗菌药物、抗菌药物使用天数≥10 d、检出菌为医院感染病原菌的比例分别为 9/17、14/17 和 12/17，均高于对照组，差异均有统计学意义( $\chi^2=6.05、9.62$  和  $5.53, P$  均<0.05)。具体结果见表 2。

表 2 汕头大学医学院第二附属医院 ICU 病区患者的抗菌药物使用、机械通气、院感发生情况和转归比较

住院情况	病例组 (n=17)	对照组 (n=24)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
使用碳青霉烯类抗菌药物	9	4	6.05	0.014
抗菌药物使用≥10 d	14	8	9.62	0.002
机械通气	15	20	0.19	0.662
医院感染病原菌	12	8	5.53	0.019
死亡	3	3	0.21	0.646

注：病例组为耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌感染，对照组为非耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌感染

三、CRAB 菌株耐药性及同源性分析

1、药物敏感试验结果

由表 3 可见，检出的 CRAB 除对替加环素敏感外，对其他抗菌药物均呈不同程度耐药。对亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、头孢曲松、头孢吡肟和复方磺胺甲噁唑的耐药/中介率均在 80%以上，头孢哌酮/舒巴坦耐药率为 11/17，氨基糖苷类中妥布霉素的敏感率稍高，为 6/17。

表 3 汕头大学医学院第二附属医院 ICU 病区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的药敏结果(n=17, 株)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
亚胺培南	17	0	0
美罗培南	17	0	0
环丙沙星	16	0	1
头孢曲松	15	2	0
头孢吡肟	15	1	1
庆大霉素	14	0	3
复方磺胺甲噁唑	14	0	3
头孢哌酮/舒巴坦	11	4	2
妥布霉素	10	1	6
左氧氟沙星	4	12	1
替加环素	0	1	16

## 2、同源性及耐药基因分析

经 PFGE 电泳图谱聚类分析,17 株 CRAB 分为 9 个型别,见图 1。其中 5 个型别只包含 1 株菌株,其余 4 个型别分别包含 2~4 株菌株,提示可能存在流行病学关联。17 株菌中有 16 株检出 ADC 基因,1 株检出 SIM 基因,8 株检出 OXA-51-like 基因。4 株 CRAB 菌株检测出多个耐药基因。

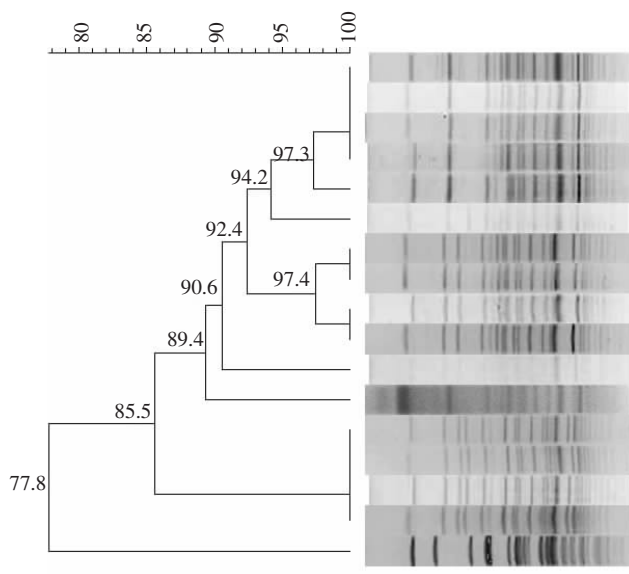


图 1 汕头大学医学院第二附属医院 ICU 病区耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的 PFGE 聚类分析图

## 讨 论

随着亚胺培南在临床上的广泛应用,对碳青霉烯类抗菌药物耐药的临床分离菌株越来越多<sup>[9]</sup>。为应对此类广泛耐药细菌所致感染,检验科需要积极与临床医生沟通,开展多黏菌素、替加环素和头孢他啶-阿维巴坦的药敏试验<sup>[10]</sup>。本文分析汕头某医院 ICU 病区 CRAB 的感染特点和同源性,可更好地指导临床用药并有效控制相关医院感染。

### 一、CRAB 菌株耐药率较高

本次研究结果显示,CRAB 感染患者与一般鲍曼不动杆菌患者的性别、年龄无差异,但感染前使用碳青霉烯类抗菌药物和长时间抗菌治疗者检出 CRAB 的概率增加,长时间使用抗菌药物促使耐药菌的产生,应持续加强碳青霉烯类抗菌药物合理用药管理<sup>[11]</sup>。药敏结果显示,CRAB 菌株对除了替加环

素外的抗菌药物耐药率均高,基于碳青霉烯类耐药菌株的广泛耐药特征,常规药敏试验结果往往显示仅对替加环素、多黏菌素和头孢他啶-阿维巴坦敏感。同时,报道显示此类患者的住院费用和住院日数也增加<sup>[12]</sup>。CRAB 菌株多为医院感染致病菌,因此控制 CRAB 菌株在医院环境的流行传播是医院感染防控工作的重要内容。

### 二、CRAB 存在 ICU 环境内传播

ICU 内患者和环境中存在鲍曼不动杆菌的克隆传播,造成环境污染以及患者交叉感染<sup>[13]</sup>。本研究发现大部分 CRAB 为医院感染菌,部分 PFGE 型别存在多个克隆菌株。现场调查发现 ICU 收治的时间有重叠,由同组医护人员诊疗护理,工勤人员进行床单元清洁消毒存在顺序错误、同一清洁巾擦拭范围过大等不规范的情况。结合病例的住院时间、诊疗护理和清洁消毒情况分析,表明虽然散发菌株可能为外部输入,但院内传播仍是 CRAB 流行传播的主要形式。ADC 基因是 CRAB 固有耐药基因<sup>[14]</sup>,本次检测在 17 株 CRAB 菌株中有 16 株检出 ADC 基因,与既往研究结果基本相符<sup>[15]</sup>。约 1/4 的菌株包含 2 种以上耐药基因,说明其耐药机制具有多样性和复杂性。

### 三、应采取综合干预措施加强 CRAB 防控

主动监测、强化接触隔离和限制抗菌药物使用可减少 CRAB 的感染和定植<sup>[16]</sup>。CRAB 医院感染流行或暴发与环境及物体表面清洁消毒不到位有关,曾有报告 ICU 的器械开关检出的鲍曼不动杆菌与患者检出菌株完全同源<sup>[17]</sup>。医护人员流动性大、岗前培训不足导致床单位终末消毒不彻底可能是 CRAB 传播的重要原因<sup>[18]</sup>。

综上所述,CRAB 感染的防控需要采取加强手卫生、个人防护、培训督导、落实日常消毒和终末消毒、规范抗菌药物使用等一系列综合干预措施。但本研究未同步对病房环境进行微生物学采样和同源性分析,以进一步验证 CRAB 在病房环境中的传播情况,有待以后的研究中进行深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 林佩贤:研究设计和实施、文章撰写、统计分析、获取

经费;黄宝添:研究实施、统计分析、文章审阅;辜红妮、黄靖宇:实验操作、采集数据;许斐斐:采集及核校数据;林伟青:研究设计指导、论文审阅

### 参 考 文 献

- [1] Piperaki ET, Tzouveleki LS, Miriagou V, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: in pursuit of an effective treatment[J]. Clin Microbiol Infect, 2019,25(8):951-957. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.03.014.
- [2] Hu F, Guo Y, Yang Y, et al. Resistance reported from China antimicrobial surveillance network (CHINET) in 2018[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019,38 (12):2275-2281. DOI: 10.1007/s10096-019-03673-1.
- [3] Daitch V, Akayzen Y, Abu-Ghanem Y, et al. Secular trends in the appropriateness of empirical antibiotic treatment in patients with bacteremia: a comparison between three prospective cohorts[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018,37(3):455-462. DOI: 10.1007/s10096-018-3190-1.
- [4] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis[J]. Lancet Infect Dis, 2018,18 (3):318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- [5] Liu W, Yang Y, Zhang K, et al. Drug resistance of healthcare-associated pathogenic bacteria and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* homology in the general intensive care unit[J]. Ann Palliat Med, 2020,9(4):1545-1555. DOI: 10.21037/apm-19-632.
- [6] Ayobami O, Willrich N, Harder T, et al. The incidence and prevalence of hospital-acquired (carbapenem-resistant) *Acinetobacter baumannii* in Europe, Eastern Mediterranean and Africa: a systematic review and meta-analysis[J]. Emerg Microbes Infect, 2019,8(1):1747-1759. DOI: 10.1080/22221751.2019.1698273.
- [7] Zhao Y, Hu K, Zhang J, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in ICU of the eastern Heilongjiang Province, China[J]. BMC Infect Dis, 2019,19(1):452. DOI: 10.1186/s12879-019-4073-5.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for anti-microbial susceptibility testing[S]. Twenty-ninth informational supplement, 2019, M100S, 29th ed.
- [9] Kuntaman K, Shigemura K, Osawa K, et al. Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: a collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan[J]. Int J Urol, 2018,25(11):966-972. DOI: 10.1111/iju.13787.
- [10] 郑永贵, 胡付品, 朱德妹, 等. 2019 年 CHINET 细菌耐药监测网二级医院监测结果[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020,20(6):585-593. DOI: 10.16718/j.1009-7708.2020.06.001.
- [11] 石大可, 倪语星. 碳青霉烯类耐药菌的流行现状及趋势[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2021, 48(4):263-265. DOI:10.3760/ema.j.cn331340-20210616-00122.
- [12] 王芳, 孙奇玫, 刘欣, 等. 碳青霉烯类耐药与敏感鲍曼不动杆菌医院感染经济损失的差异[J]. 中国感染控制杂志, 2019,18(9): 842-847. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20195355.
- [13] 江冬萍, 李艳霞, 惠亚, 等. 遂宁市中心医院 ICU 分离的鲍曼不动杆菌耐药性和同源性分析[J]. 现代预防医学, 2020,47(7):1318-1322.
- [14] 邓德耀, 袁文丽, 吴迪, 等. 重症监护病房耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型的检测[J]. 昆明医科大学学报, 2015,36 (7):62-66. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4706.2015.07.014.
- [15] 周鹏鹏, 陈娜, 朱柯蕙, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药基因检测及同源性[J]. 中国感染控制杂志, 2020,19(6):526-532. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20205944.
- [16] An JH, Kim YH, Moon JE, et al. Active surveillance for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical intensive care unit: Can it predict and reduce subsequent infections and the use of colistin? [J]. Am J Infect Control, 2017, 45(6):667-672. DOI: 10.1016/j.ajic.2017.01.016.
- [17] 朱以军, 刘颖, 王月, 张枫. 医院感染鲍曼不动杆菌的耐药性和分子流行病学研究[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2016,43(1):18-22. DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4149.2016.01.006.
- [18] Caselli E. Hygiene: microbial strategies to reduce pathogens and drug resistance in clinical settings[J]. Microb Biotechnol, 2017,10 (5):1079-1083. DOI: 10.1111/1751-7915.12755.

(收稿日期:2022-01-11)