

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.03.017

碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌耐药性及多位点序列分型研究^{*}

何秀娟¹, 宋其华¹, 田家辰², 叶惠娟¹, 王 红¹, 陈胜男¹

1. 北京市昌平区医院检验科, 北京 102200; 2. 内蒙古自治区锡林郭勒盟太卜寺旗
旗医院检验科, 内蒙古锡林郭勒 027000

摘 要:目的 探讨碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌(CRAB)的耐药性及多位点序列分型, 为医院内感染控制及临床合理用药提供理论依据。**方法** 对北京市昌平区医院 2017—2019 年临床分离的 47 株 CRAB 进行药物敏感性试验, 分子流行病学研究应用多位点序列分型(MLST)技术, MLST 结果的分析使用 eBURST 软件。**结果** 47 株 CRAB 主要来源于痰标本(80.9%), 主要分布在内科重症监护病房(66.0%)、呼吸科(10.6%)、重症监护病房(8.5%)等; 除阿米卡星(81.4%)、复方磺胺甲噁唑(41.9%)、替加环素(40.0%)外, 对其余检测药物的敏感率均低于 5.0%。经扩增得到 4 种序列型(ST), 以 ST208(25 株, 53.2%)、ST195(19 株, 40.4%)为主, 其次为 ST369(2 株, 4.3%)和 ST523(1 株, 2.1%); eBURST 分析显示, 4 种 ST 都属于克隆复合体 92(CCC92)。**结论** 大多数抗菌药物对 CRAB 的耐药率很高, CCC92 在医院流行播散, 临床要重视 CRAB 感染的预防和管理。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯耐药; 耐药性; 多位点序列分型

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)03-0361-04

Analysis of antimicrobial resistance and multilocus sequence typing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*^{*}

HE Xiujuan¹, SONG Qihua¹, TIAN Jiachen², YE Huijuan¹, WANG Hong¹, CHEN Shengnan¹

1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Changping Hospital, Beijing 102200, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Inner Mongolia Autonomous Xilingol League
Taipusi Banner Hospital, Xilingol League, Inner Mongolia 027000, China

Abstract: **Objective** To investigate antimicrobial resistance and multilocus sequence typing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB), in order to provide theoretical basis for controlling nosocomial infection and rational use of antibiotics. **Methods** Drug susceptible test was conducted in 47 strains of CRAB, which were isolated from January 2017 to December 2019 in Beijing Changping Hospital. Multilocus sequence typing was employed to study molecular epidemiology, and the eBURST software was applied to analyze the MLST results. **Results** 47 strains of CRAB were primarily isolated from sputum specimens (80.9%), mainly distributing in the medical intensive care unit(66.0%), respiratory department (10.6%) and intensive care unit (8.5%); the sensitive rate of CRAB strains was 81.4% to amikacin, 41.9% to Compound sulfamethoxazole and 40.0% to tegacycline, while the sensitive rate to the remaining drugs was less than 5.0%. After amplification, 4 sequence types (ST) were obtained, mainly on ST208 (25 strains, 53.2%) and ST195 (19 strains, 40.4%), followed by ST369 (2 strains, 4.3%) and ST523 (1 strain, 2.1%). The eBURST software analysis showed that 4 sequence types were all belonged to the clone complex 92 (CCC92). **Conclusion** CRAB is highly resistant to most antibiotics, and CCC92 is widely disseminated in the hospital, so it should be pay more attention to the prevention and management of CRAB infection.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; antimicrobial resistance; drug resistance; multilocus sequence typing

鲍曼不动杆菌是我国医院内感染的主要条件致病菌之一, 但由于抗菌药物, 尤其是碳青霉烯类制剂

的广泛应用, 碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌(CRAB)的检出率和耐药性在逐年上升。中国细菌耐药监测研

^{*} 基金项目: 北京市昌平区卫生科技发展专项(昌卫科 2018-2-02)。

作者简介: 何秀娟, 女, 主任技师, 主要从事临床常见病原菌耐药机制及其分子流行病学研究。

究 2017—2018 年革兰阴性菌监测报告显示,鲍曼不动杆菌对大多数被测抗菌药物的耐药率大于 70%,其中对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率约 70%,对多黏菌素 E、替加环素和米诺环素的耐药率低于 30%^[1]。本研究主要对 CRAB 进行药物敏感性(以下简称药敏)分析和同源性分析,以期为临床治疗和医院内感染控制提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集北京市昌平区医院 2017 年 1 月至 2019 年 12 月从住院和门诊患者分离的鲍曼不动杆菌 200 株,其中 CRAB 有 47 株,2017 年 12 株,2018 年 19 株,2019 年 16 株,已剔除了同一患者的重复菌株。所有菌株采用 Vitek 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统进行鉴定,确定为鲍曼不动杆菌。药敏试验的质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC29213。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 采用 Vitek 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统测定所有 CRAB 菌株对头孢替坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑、氨苄西林/舒巴坦、替加环素、阿米卡星的最低抑菌浓度(MIC)。药敏判断参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)2019 的判断标准^[2],其中替加环素参照美国食品和药品管理局(FDA)判读标准, MIC ≤ 2 μg/mL 为敏感, MIC ≥ 8 μg/mL 为耐药。

1.2.2 DNA 提取 采用煮沸法来提取菌株 DNA。取 200 μL 无菌水加入到无菌管内,取适量新鲜菌落进行稀释,100 °C 水浴 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液存放在另一干净无菌管中,获得所需菌株 DNA,在 -20 °C 冰箱放置保存备用。

1.2.3 多位点序列分型(MLST) 使用 PCR 扩增检测鲍曼不动杆菌 MLST 的 7 个管家基因 *gltA*、*gyrB*、*gdhB*、*recA*、*cpn60*、*gpi* 和 *rpoD*^[3],引物序列见表 1。

所获 PCR 产物送北京擎科生物技术有限公司进行测序。使用鲍曼不动杆菌基因数据库(<https://pubmlst.org/abbaumannii/>)对测序结果进行比对,可获得各管家基因对应的等位基因编号。再按 *gltA*-

gyrB-*gdhB*-*recA*-*cpn60*-*gpi*-*rpoD* 顺序将各菌株管家基因的等位基因编号进行排列组合,每个组合对应一个序列型(ST),用此标识记录每株菌株的分型。如果查找不到测序结果所对应的 ST,经核对后,确认为新的 ST,相关数据上传数据库。最后应用 eBURST 软件对 ST 数据开展进化关系分析。

1.3 统计学处理 采用 Whonet 5.6 软件统计分析耐药率。

表 1 鲍曼不动杆菌 MLST 分型引物序列和产物大小

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
<i>gltA</i> -F	AAATTACAGTGGCACATTAGGTCCC	723
<i>gltA</i> -R	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	
<i>gyrB</i> -F	GAATGCTGGTGATCGTATCG	775
<i>gyrB</i> -R	ACGCTCAACGTTTCAGGATCT	
<i>recA</i> -F	CCTGAATCTTCTGGTAAAC	425
<i>recA</i> -R	GTTTCTGGGCTACCAACATAAC	
<i>cpn60</i> -F	ACTGTACTTGCTCAAGC	480
<i>cpn60</i> -R	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	
<i>rpoD</i> -F	CTAAGCGTTCGCCTAACTCT	1 479
<i>rpoD</i> -R	CTCAAGTAGCGGCTCTGATT	
<i>gdhB</i> -F	TGGCCAGCCATAGTTACAC	713
<i>gdhB</i> -R	ATGCTTTGTTATGGGGGCCA	
<i>gpi</i> -F	GAAATTTCCGGAGCTCACAA	386
<i>gpi</i> -R	TCAGGAGCAATACCCCACTC	

2 结果

2.1 菌株基本特征 47 株 CRAB 标本类型以痰液(38 株,80.9%)为主,其余为全血(4 株,8.5%)、肺泡灌洗液(3 株,6.4%)、分泌物(1 株,2.1%)和脑脊液(1 株,2.1%)。从男性患者中分离的菌株居多,分离自男性的有 27 株,占 57.4%;分离自女性的有 20 株,占 42.6%。从老年患者中分离的菌株居多,41 株分离自 ≥ 65 岁的患者,占 87.2%;6 株分离自 38~<65 岁的患者,占 12.8%。2017—2019 年检出的鲍曼不动杆菌中 CRAB 占比逐年上升,由 2017 年的 18.2% 增加到 2019 年的 28.1%,主要分布在内科重症监护病房[66.0%(31/47)]、呼吸科[10.6%(5/47)]、重症监护病房[8.5%(4/47)],不同年份 CRAB 占比及来源科室分布情况见表 2。

表 2 2017—2019 年 CRAB 占比及来源科室分布情况

年份(年)	鲍曼不动杆菌(n)	CRAB [n(%)]	来源科室分布(n)							
			内科重症监护病房	呼吸科	重症监护病房	肿瘤科	综合内科	心内二科	骨二科	中医科
2017	66	12(18.2)	8	1	1	1	—	—	—	1
2018	77	19(24.7)	12	1	3	—	1	1	1	—
2019	57	16(28.1)	11	3	—	1	1	—	—	—
合计	200	47(23.5)	31	5	4	2	2	1	1	1

注:—表示无数据。

2.2 药敏试验结果 检出的 CRAB 对头孢替坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、环丙沙星完全耐药,对氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、妥布霉素、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑的耐药率在 50% 以上,见表 3。

表 3 47 株 CRAB 药敏试验结果 (%)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
头孢替坦	100.0	0.0	0.0
头孢他啶	100.0	0.0	0.0
头孢曲松	100.0	0.0	0.0
头孢吡肟	100.0	0.0	0.0
环丙沙星	100.0	0.0	0.0
氨苄西林/舒巴坦	97.4	2.6	0.0
庆大霉素	95.3	2.3	2.3
妥布霉素	93.0	2.3	4.7
左氧氟沙星	81.4	16.3	2.3
复方磺胺甲噁唑	58.1	0.0	41.9
替加环素	40.0	20.0	40.0
阿米卡星	18.6	0.0	81.4

2.3 MLST 分型结果 经 MLST 分析获得 4 种 ST, 其中 ST208 和 ST195 为主要分型,分别占 53.2% (25 株) 和 40.4% (19 株),其次为 ST369 (4.3%, 2 株) 和 ST523 (2.1%, 1 株),未发现新的 ST,ST 位点信息见表 4。eBURST 分析得到一个同分型组,见图 1,发现这 4 种 ST 均属于克隆复合体 92 (CC92),对 4 种 ST 的管家基因进行对比,发现相差仅一个管家基因 (gpi) 或两个管家基因 (gltA、gpi),ST208 为各 ST 共同的祖先,其相互之间亲缘关系很近。

表 4 2017—2019 年分离的 CRAB 标本 ST 位点信息

ST	gltA	gyrB	gdhB	recA	cpn60	gpi	rpoD
208	1	3	3	2	2	97	3
195	1	3	3	2	2	96	3
369	1	3	3	2	2	106	3
523	33	3	3	2	2	50	3

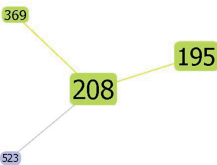


图 1 eBURST 软件分析结果图

3 讨 论

近年来,临床上分离的重要耐药细菌,尤其是以革兰阴性杆菌为主的多重耐药细菌的检出率在快速上升,为临床抗感染治疗带来了巨大的威胁和挑战^[4-5]。2017 年世界卫生组织 (WHO) 根据对新型抗菌药物的迫切需求程度,发表了首份抗菌药物耐药

“重点病原体”清单,其中 CRAB 被列为“极为重要”的新型抗菌药物研发重点病原体之一,其对人类生命健康已构成极大的威胁^[6]。

本研究收集的 200 株非重复鲍曼不动杆菌中 CRAB 占比从 2017 年的 18.2% 增长到 2019 年的 28.1%,呈逐年增长的趋势,但低于李荷楠等^[7]、张瑞玲等^[8]的报道。47 株 CRAB 标本类型来源广泛,其中呼吸道标本(痰液)占比最高 (80.9%),呼吸系统是北京市昌平区医院收治患者的 CRAB 主要感染部位,与相关文献报道一致^[8-10]。CRAB 临床科室来源以内科重症监护室 (66.0%) 为主,主要是感染免疫力低下的危急重症老年患者,也与相关报道相符^[8-9]。本研究发现,CRAB 不仅对碳青霉烯类抗菌药物耐药,对其他 β -内酰胺类药物及含酶抑制剂复合抗菌药物的耐药率也很高。47 株 CRAB 的药敏试验结果显示,其对临床常用的头孢替坦、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、环丙沙星、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、妥布霉素、左氧氟沙星等抗菌药物均具有极高的耐药率;对替加环素的耐药率为 40.0%,也应引起足够的重视。姚丹玲等^[11]研究指出,替加环素联合其他抗菌药物治疗 CRAB 感染并没有明显减少患者 28 d 的病死率,这些都给临床治疗带来了极大困难。由于危重症患者长期卧床、住院且多为高龄,呼吸道经常有大量细菌定植,临床医生应合理选用抗菌药物,根据患者的临床症状、实验室指标、影像学表现等综合分析来自呼吸道标本的 CRAB 是致病菌还是定植菌,以减少不恰当的治疗措施;同时,实验室工作人员必须通过涂片及染色正确评价呼吸道标本的质量,严格拒收不合格标本,多进行微生物标本送检知识的宣传,提高临床医生无菌体液标本的送检意识。

MLST 是基于核酸序列进行细菌分型的方法,其操作比较简单,重复性也高,对长时期和大范围的同源性分析非常适用^[12]。本研究经 MLST 共获得 4 种 ST,其中以 ST208 和 ST195 为主,分别占 53.2% 和 40.4%,均属于 CC92,且暂未发现新的克隆菌株。据报道,CRAB 最主要的克隆复合体是 CC92,在全球范围内广泛流行,在我国多个地区和不同医院也有分离^[13-14]。不同 ST 在国内分布呈现地理差异性,CC92 克隆复合体的传播可跨地区,具有极强的耐药性,这些菌株还可以在临床抗菌药物压力下继续存在,有极强的院内流行传播能力,研究 CRAB 分离株的分子流行病学对于预防医院内感染暴发尤为重要^[15]。每个地区除了要预防本地流行菌株的暴发外,防止外来流行克隆株的入侵同样是重点关注的方向。

鲍曼不动杆菌的耐药机制众多,包括产生各种 β -内酰胺酶、外排基因的过度表达、膜通透性的下降、水解酶的产生、生物膜的形成等^[16],如此复杂的耐药机

制是 CRAB 在院内迅速传播的原因之一,这也是今后要持续研究探索的方向。

综上所述,北京市昌平区医院检出的鲍曼不动杆菌中 CRAB 的占比逐年升高,耐药形势不容乐观,定期进行流行病学监测有助于了解 CRAB 感染暴发流行的实际情况,能更好地为临床诊治提供可靠的依据,有利于医院内感染防控措施的制订与执行。

参考文献

- [1] 李耘,吕媛,郑波,等.中国细菌耐药监测研究 2017—2018 革兰氏阴性菌监测报告[J].中国临床药理学杂志,2019,35(19):2508-2528.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-sixth edition: M100S29[S]. Wayne, PA: CLSI, 2019.
- [3] LEE H Y, HUANG C W, CHEN C L, et al. Emergence in Taiwan of novel imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST455 causing bloodstream infection in critical patients[J]. J Microbiol Immunol, 2015, 48(6): 588-596.
- [4] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(3):241-251.
- [5] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2019,19(1):1-10.
- [6] 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.
- [7] 李荷楠,曾吉,金炎,等.2016 年中国 12 家教学医院院内感染常见病原菌的分布和抗菌药物耐药监测研究[J].中华检验医学杂志,2018,41(9):651-657.
- [8] 张瑞玲,陈志英,刘超梅,等.我院 2015—2017 年耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药监测[J].中国当代医药,2019,26(24):128-130.
- [9] 邢宝宝,赵建平,周秀岚.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)的耐药性分析[J].内蒙古医科大学学报,2019,41(3):310-311.
- [10] 丁毅伟,郝秀红,李艳君,等.我院耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌临床分布及耐药分析[J].解放军医学院学报,2016,37(10):1079-1082.
- [11] 姚丹玲,朱卫民.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌血流感染危险因素分析及其治疗[J].中国抗生素杂志,2021,46(1):76-80.
- [12] KARAH N, SUNDSFJORD A, TOWNER K, et al. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii* [J]. Drug Resist Update, 2012, 15(4): 237-247.
- [13] 滑明溪,李敏,王慧珠,等.我院碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌分子流行病学研究[J].标记免疫分析与临床,2020,27(5):729-733.
- [14] 陈琼.鲍曼不动杆菌替加环素耐药机制研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [15] 刘舒雅,赵雷,叶英.安徽地区耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌分子流行病学研究[J].中国抗生素杂志,2018,43(9):1151-1155.
- [16] HUANG Y Q, ZHOU Q, WANG W G, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: Clinical efficacy of combined antimicrobial therapy and in vitro drug sensitivity test results[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 92.

(收稿日期:2022-08-23 修回日期:2022-12-22)

(上接第 360 页)

- [3] 黄洪,吴友飞,胡蓉,等.益气化痰法联合针灸对脑卒中偏瘫患者血液流变学指标、平衡与功能性步行能力及生活质量的影响[J].中华中医药学刊,2021,39(4):18-21.
- [4] 中国老年医学学会急诊医学分会,中华医学会急诊医学分会卒中医学组,中国卒中学会急救医学分会.急性缺血性脑卒中急诊急救中国专家共识 2018 版(下)[J].心脑血管病防治,2019,19(4):287-291.
- [5] 李嘉烨,杨楠.基于“络脉—玄府”探讨化痰通络法治疗脑小血管病[J].环球中医药,2021,14(8):1407-1410.
- [6] 黄幸,刘若凡,张根明,等.活血化痰法治疗脑卒中的临床应用规律[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(8):1198-1200.
- [7] 崔秦渊,张恒.益气化痰祛瘀通络法治疗急性脑梗死(风痰瘀阻型)的疗效及对患者血清 Hcy、VCAM-1、TNF- α 的影响[J].四川中医,2019,37(7):101-103.
- [8] 邢娟,温昌明,范崇桂,等.病因不明青年缺血性脑卒中病人血清 IgE、MMP-9、MCP-1 水平与颅内动脉狭窄的关系探讨[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(16):2711-2715.
- [9] ZHU H F, SHAO Y L, QIN L, et al. Catalpol enhances neurogenesis and inhibits apoptosis of new neurons via BDNF, but not the BDNF/TrkB pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13: 4145-4157.
- [10] HSU C H, KUO T W, LIU W P, et al. Calycosin preserves BDNF/TrkB signaling and reduces post-stroke neurological injury after cerebral ischemia by reducing accumulation of hypertrophic and TNF- α -containing microglia in rats [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2020, 15(2): 326-339.

(收稿日期:2022-04-19 修回日期:2022-10-16)