

血流感染的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的分子机制及临床研究

马晓波¹ 黄朝阳¹ 徐和平¹ 房丽丽¹ 李珣¹ 胡祖凤² 洪国焱^{1*}

(1 厦门大学附属第一医院检验科, 厦门 361003; 2 厦门大学公共卫生学院, 厦门 361103)

摘要: **目的** 探讨血流感染的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)耐药机制, 分析菌株同源性及其患者的临床特征, 为CRAB的感染控制提供实验依据。**方法** 采用Bact/Alert 3D全自动血培养系统进行血培养, 细菌鉴定和药敏使用Vitek-2 Compact全自动微生物分析系统。对2010年6月—2016年5月临床血流感染患者分离到的27株碳青霉烯类药物(亚胺培南和/或美罗培南MIC \geq 16 μ g/mL)耐药的CRAB复苏菌株, 重新采用Vitek-MS质谱分析仪鉴定, 采用改良Hodge试验检测碳青霉烯酶, PCR法检测B类酶基因(*bla*_{NDM}、*bla*_{IMP}和*bla*_{VIM})和D类酶基因(*bla*_{OXA-23}、*bla*_{OXA-24}、*bla*_{OXA-51}和*bla*_{OXA-58})并测序比对。采用MALDI-TOF分析菌株同源性, 并分析患者的临床资料及感染相关信息。**结果** 血流感染的CRAB绝大多数对常用抗生素耐药。27株CRAB改良Hodge试验均阳性。所有CRAB均未检测到B类酶基因(*bla*_{NDM}、*bla*_{IMP}和*bla*_{VIM}); 25株CRAB同时检测到*bla*_{OXA-23}和*bla*_{OXA-51}; 另2株CRAB则为*bla*_{OXA-58}阳性。采用Vitek-MS进行同源性分析, 细菌分成3大簇(I型13株、II型12株、III型2株)。85.2%(25/27)患者来自重症监护病房或专科的监护病床, 原发感染灶以肺部炎症最常见(11例)。所有的患者在血培养出CRAB前的30d内均有抗菌药物使用史, 使用频率较高的抗菌药物有: 碳青霉烯类、氟喹诺酮类、头霉素类。15例CRAB血流感染患者死亡。**结论** 厦门地区的CRAB以D类产碳青霉烯酶OXA-23和OXA-51最为多见。CRAB血流感染的原发感染多为肺部炎症。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯类耐药; 碳青霉烯酶; 血流感染

中图分类号: R378 文献标志码: A

DOI:10.13461/j.cnki.cja.006247

Clinical and molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from bloodstream infections

Ma Xiao-bo¹, Huang Chao-yang¹, Xu He-ping¹, Fang Li-li¹, Li Xun¹, Hu Zu-feng² and Hong Guo-lin¹

(1 Department of Clinical Lab Medicine, the First affiliated Hospital of Xiamen University Xiamen 361003;

2 School of health public, Xiamen University, Xiamen 361103)

Abstract Objective To study the molecular mechanism of *Acinetobacter baumannii* resistant to carbapenem, to analyze the clinical features of carbapenem resistant *A. baumannii* (CRAB) bacteraemia, and to provide evidence for infection control. **Methods** Blood culturing was carried out by the Bact/Alert 3D automated blood culture system. Then, identification and antimicrobial susceptibility tests were performed by the Vitek-2 compact system. CRAB isolates with MIC of imipenem and meropenem higher than 16 μ g/mL were collected, and were re-identified by the Vitek-MS system (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, and MALDI-TOF MS). The presence of carbapenemase was screened by modified Hodge test. Carbapenemase genes (*bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-51} and *bla*_{OXA-58}) were identified by PCR amplification and sequenced

收稿日期: 2017-12-08

基金项目: 福建省卫生联合资金面上项目(No. 2016J01643)

作者简介: 马晓波, 男, 生于1980年, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 临床微生物及病原检测、细菌耐药机制, E-mail: maxiaoboxm@126.com

*通讯作者, E-mail: xmhg19899@sina.com

alignment. The clinical data were analyzed. **Results** A total of 27 patients with CRAB bacteremia were studied from June 2010 to May 2016. All strains of CRAB were resistant to most of the common antibiotics and were positive by modified Hodge test. Both bla_{OXA-23} and bla_{OXA-51} were detected in 25 strains of CRAB, while 2 strains harboring bla_{OXA-58} . Strains were divided into three clusters by the Vitek-MS system (type I -13 isolates, type II -12 isolates, type III -2 isolates). Eighty-five percent of patients were hospitalized in intensive care units/beds. The primary source of infection was pulmonary inflammation (11 cases). All patients had a history of antibiotics use during 30 days before CRAB was isolated. The main antibiotics used were carbapenems, fluoroquinolones and cephamycins. The prognosis was not good and 15 patients died. **Conclusion** The resistance carbapenemase gene of CRAB in Xiamen area were mainly bla_{OXA-23} and bla_{OXA-51} . CRAB bacteraemia was mainly secondary to pulmonary inflammation.

Key words *Acinetobacter baumannii*; Carbapenem resistance; Carbapenemase; Bacteraemia

作为医院感染重要的条件致病菌之一, 鲍曼不动杆菌的检出率逐年在增加, 值得重视的是鲍曼不动杆菌对抗生素的耐药情况并不乐观, 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *A. baumannii*, CRAB)甚至全耐药菌株的出现, 使临床治疗选药陷入棘手的境地。目前研究显示CRAB对碳青霉烯类的耐药机制包括产生碳青霉烯酶、外膜蛋白表达下调或缺失、靶位蛋白的改变、主动外排系统过度表达和生物膜的形成等^[1], 其中细菌产OXA型碳青霉烯酶是主要机制。

CRAB为临床重要的耐药菌, 在世界卫生组织(World Health Organization, WHO)于2017年列出的重点关注的耐药菌列表上属于优先1级“危急级别(Critical)”的耐药菌(<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-n.>)。在临床上, CRAB常分离自重症病房, 与呼吸机相关肺炎(ventilator associated pneumonia, VAP)关系密切, 但很多时候难于区分CRAB定植的问题。而CRAB相关的血流感染患者也越来越多, 其对临床抗菌药物选择带来了困难, 同时增加了患者的痛苦导致了较高的病死率^[2]。因此对血流感染患者分离的CRAB的耐药机制的研究和临床分析, 以及对CRAB分子流行病学的研究, 可为感染控制及抗菌药物合理使用提供实验依据。

本研究对6年间(2010年6月—2016年5月)临床血流感染患者分离的27株CRAB, 进行表型检测、耐药基因扩增、同源性分析及临床资料回顾, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌株及来源

纳入研究的27株非重复CRAB, 分离自厦门地区2010年6月—2016年5月期间住院患者的血液标本。患者的诊断参照中华医学会检验医学分会《临床微生物学血培养操作规范》^[3]和《血流感染实验诊断与

临床诊治》^[4], 患者体温 $>38^{\circ}\text{C}$ 或 $<36^{\circ}\text{C}$, 同时血培养分离到鲍曼不动杆菌。收集患者的临床资料及病原学资料纳入分析。细菌对亚胺培南和美罗培南的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)均 $\geq 16\mu\text{g/mL}$ 。

血液标本采用Bact/Alert 3D全自动血培养系统(法国Bio Mérieux公司)进行培养, 细菌的鉴定和药敏使用Vitek-2 Compact全自动微生物分析系统(法国Bio Mérieux公司), 复苏菌株的重新鉴定采用Vitek-MS质谱分析仪(法国Bio Mérieux公司)再次确认。

质控菌株包括大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC8739、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC BAA-1705和ATCC BAA-1706均来自卫生部临床检验中心, 包含 bla_{NDM} 、 bla_{OXA-23} 、 bla_{KPC} 、 bla_{IMP} 和 bla_{VIM} 等基因的阳性对照菌株由复旦大学华山医院胡付品教授赠予。

1.2 培养基

哥伦比亚血平板和MH平板购自郑州安图生物科技公司。

1.3 改良Hodge试验检测碳青霉烯酶

参照美国临床实验室标准化协会(the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)对肠杆菌科细菌的推荐, 细菌碳青霉烯酶的检测以美洛培南纸片采用改良Hodge试验进行。被测菌株与美罗培南抑菌圈交界处出现向内矢状的增强生长, 判读为改良Hodge试验阳性。

1.4 引物、试剂及耐药基因检测

细菌DNA的提取采用煮沸法。扩增所用的Premix试剂购自日本TakaRa公司。引物由TakaRa公司合成, 反应体系共 $25\mu\text{L}$, 扩增的反应条件参照文献[5-7], 见表1, 检测碳青霉烯酶耐药基因包括B类酶基因(bla_{NDM} 、 bla_{IMP} 和 bla_{VIM})和D类酶基因

(*bla*_{OXA-23}、*bla*_{OXA-24}、*bla*_{OXA-51}和*bla*_{OXA-58})。PCR扩增仪为MyCycler PCR仪(美国Bio-Rad),产物使用PowerPac™ Basic电泳仪经2%琼脂糖凝胶电泳,结果在Universal Hood II型凝胶成像系统(美国Bio-Rad)中观察。

对阳性扩增电泳后的产物送至TaKaRa公司采用ABI 377XL测序仪进行基因序列测定,结果在GenBank网站进行Blast比对。

1.5 菌株同源比较

采用Vitek-MS质谱分析仪科研库比较细菌的同源性。用无菌塑料环挑取待测单菌落,均匀点样至靶板上,置于室温,待干燥后加上1μL基质液涂布于样品点上,室温干燥后上机Vitek-MS质谱分析仪,采用RUO软件检测,然后采用SARAMIS Premium软件进行同源性分析。

1.6 CRAB血流感染的临床资料收集与分析

对27例CRAB血流感染患者,收集并分析患者的一般信息及临床资料等,包括患者的性别、年龄、科别、基础疾病、侵入性操作及其他危险因素、血培养的感染来源、抗生素使用情况、感染性休克的发生情况及治疗预后。

2 结果

2.1 实验菌株的一般资料及药敏情况

血流感染的绝大多数CRAB对常用抗生素均耐

药。仅1株细菌对喹诺酮类(环丙沙星≤0.5μg/mL和左氧氟沙星≤1μg/mL)、氨基糖苷类(庆大霉素和妥布霉素均≤1μg/mL)和复方磺胺甲噁唑(≤1/19μg/mL)敏感。

2.2 碳青霉烯酶的检测及B类、D类酶基因检测

27株CRAB均为改良Hodge试验阳性。所有CRAB均未检测到B类酶基因(*bla*_{NDM}、*bla*_{IMP}和*bla*_{VIM})。

PCR扩增产物电泳结果显示,所有27株CRAB均包含D类碳青霉烯酶基因。且其中25株CRAB同时检测到*bla*_{OXA-23}和*bla*_{OXA-51},1株CRAB包含*bla*_{OXA-51}和*bla*_{OXA-58},而另外1株CRAB仅检测到*bla*_{OXA-58}并不包含*bla*_{OXA-23}和*bla*_{OXA-51}(该菌株正是该株对喹诺酮类、氨基糖苷类和复方磺胺甲噁唑敏感的CRAB菌株)(图1)。

*bla*_{OXA-23}、*bla*_{OXA-51}和*bla*_{OXA-58}扩增阳性产物测序结果经与BLAST比对,与目的基因一致。

2.3 菌株同源性的质谱分析

采用Vitek-MS的SARAMIS Premium软件对27株CRAB进行同源性分析,将细菌分成3大簇(I型13株、II型12株、III型2株),见图2。I型主要分离自ICU、II型主要分布于重症监护室(ICU)及呼吸内科,I型和II型为*bla*_{OXA-23}和*bla*_{OXA-51}阳性株。III型为*bla*_{OXA-58}阳性株,分离自心内科及ICU患者。

2.4 CRAB血流感染患者的临床资料分析

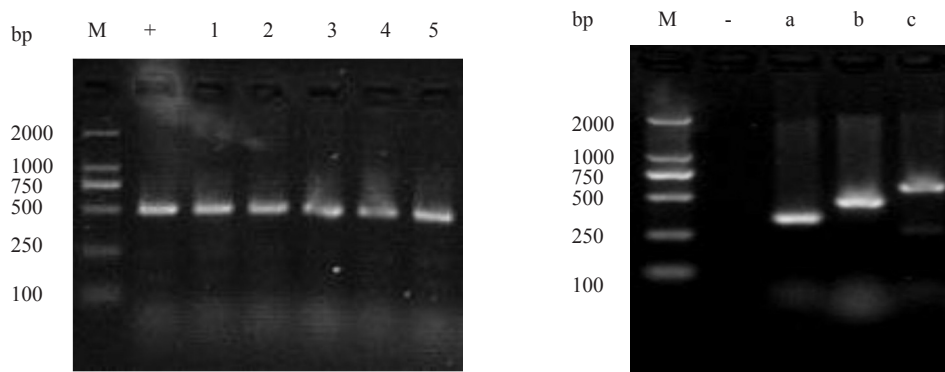
回顾CRAB血流感染患者的临床资料,绝大多数

表1 扩增所用引物^[5-7]
Tab. 1 Primers for PCR^[5-7]

目的基因	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段/bp	PCR反应条件
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA-23-F	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3'	460	94℃ 45s, 52℃ 40s, 72℃ 50s, 30cycles
	OXA-23-R	5'-ATTCTGACCGCAITTCAT-3'		
<i>bla</i> _{OXA-24}	OXA-24-F	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3'	501	94℃ 45s, 52℃ 40s, 72℃ 50s, 30cycles
	OXA-24-R	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3'		
<i>bla</i> _{OXA-51}	OXA-51-F	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3'	319	94℃ 45s, 52℃ 40s, 72℃ 50s, 30cycles
	OXA-51-R	5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'		
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-58-F	5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG-3'	555	94℃ 45s, 52℃ 40s, 72℃ 50s, 30cycles
	OXA-58-R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC-3'		
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-1-F	5'-GGGCAGTCGCTTCCAACGGT-3'	410	95℃ 45s, 58℃ 40s, 72℃ 50s, 35cycles
	NDM-1-R	5'-GTAGTGCTCAGTGTGGCAT-3'		
<i>bla</i> _{IPM}	IPM-F	5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	587	95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 35cycles
	IPM-R	5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	5'-ATTGGTCTATTTGACCGGTC-3'	780	95℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 35cycles
	VIM-R	5'-TGCTACTCAACGACTGAGCG-3'		

患者(23/27, 85.2%)来自重症监护病房(19例)或专科的监护病床。年龄分布上, 70%的患者(19/27)年龄超过

60岁。从入科到血培养分离CRAB的时间从0~16d, 平均为7.5d。基础疾病包括肺疾病、肿瘤、急性化脓



M: DL2000 DNA Ladder Marker; "-": negative control; "+": positive control; 1-5: CRAB 1-094/6-028/4-011/13-027/33-073; a: *bla*_{OXA-51} harboring CRAB1-094; b: *bla*_{OXA-23} harboring CRAB17-027; c: *bla*_{OXA-58} harboring CRAB22-021

图1 PCR扩增碳氢霉烯酶基因

Fig. 1 PCR screening for carbapenemase genes

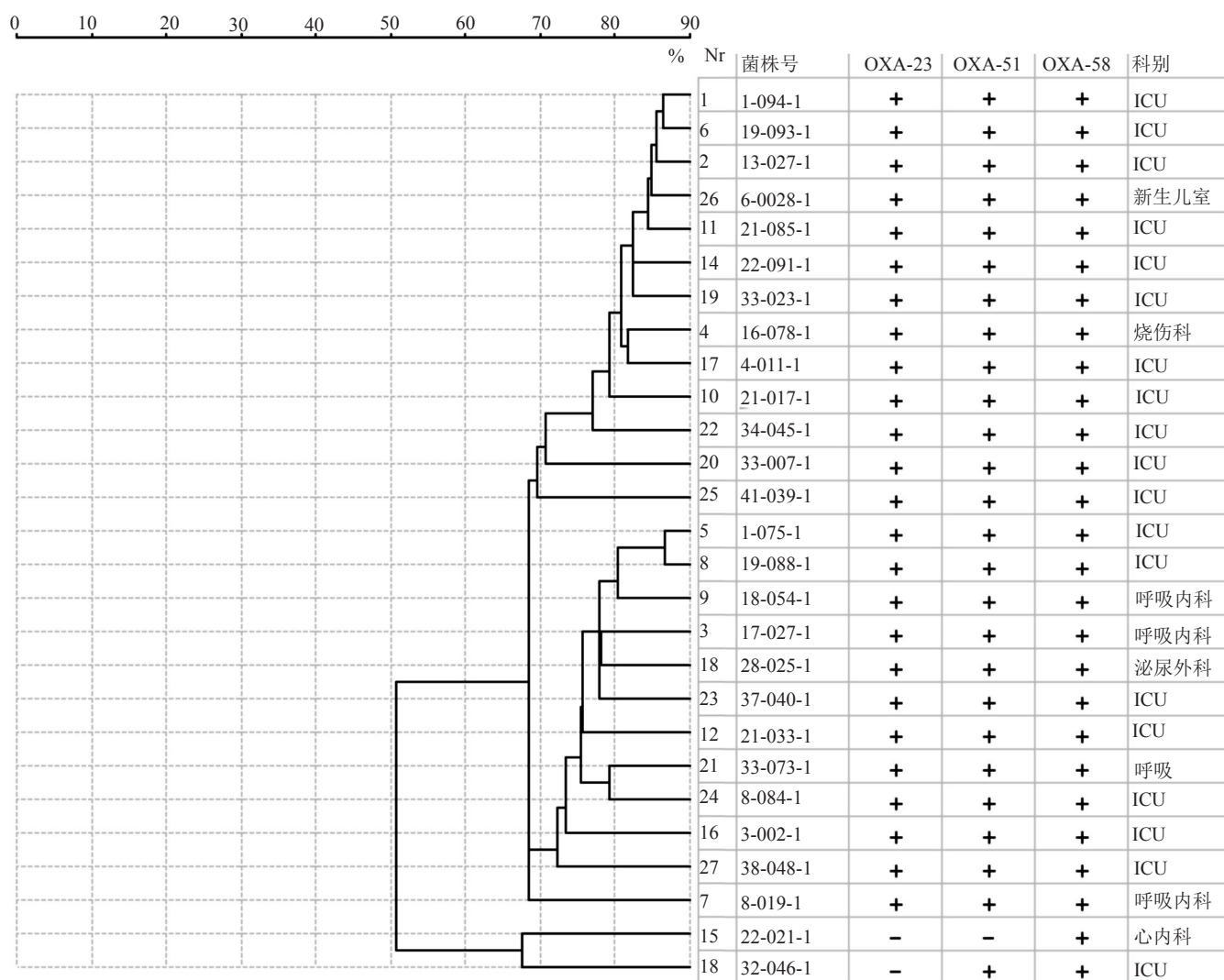


图2 CRAB质谱蛋白质系统同源性分析图

Fig. 2 Homology analysis of CRAB by Vitek-MS

性炎症继发MODS、糖尿病、烧伤、早产儿、胆道疾病、泌尿道感染等。有16例患者有从其他部位标本分离到CRAB(包括痰液11例、胆道引流液1例、胸水1例、中心静脉导管1例、伤口1例、尿液1例)。所有的患者在血培养出CRAB前的30d内均有抗菌药物使用史,使用频率较高的抗菌药物有:碳青霉烯类(22例)、氟喹诺酮类(莫西沙星,12例)、头霉素类(5例)、 β -内酰胺/酶抑制剂复合制剂(哌拉西林/三唑巴坦,4例)、3代头孢菌素(7例)。16例患者的抗感染方案根据药敏结果进行调整,主要采用以替加环素为主的联合用药,其中10例患者病情好转。 bla_{OXA-58} 阳性的CRAB患者未更换抗菌方案,采用莫西沙星治疗后病情好转。所有血流感染患者中,15例(55.5%)患者自动出院或死亡。

3 讨论

不动杆菌属细菌分布广泛,存在于自然环境和医院环境,是临床上重要的非发酵菌。鲍曼不动杆菌为条件致病菌,毒力较低,可导致多种感染,包括肺部感染、尿路感染、伤口感染、血流感染、皮肤软组织感染以及继发性脑膜炎等。鲍曼不动杆菌相关的肺部感染主要是医院获得性肺炎(尤其以呼吸及相关肺炎多见),社区获得性肺炎不常见。其中鲍曼不动杆菌引起的呼吸机相关肺炎和血流感染具有较高的发病率和死亡率^[8]。本研究资料表明,CRAB血流感染患者均入住ICU或专科的监护病床,年龄上多见于老年患者,大多有严重的基础疾病并接受不同的侵入操作。患者的CRAB的原发感染最多见肺部炎症,这表明肺炎是患者CRAB血流感染最常见的原发感染来源^[9]。研究显示,CRAB血流感染患者的预后不良跟大剂量糖皮质激素应用、糖尿病、机械通气、黏菌素和替加环素使用史、感染性休克的发生和入住监护病房等因素有关,尤其是大剂量糖皮质激素应用、感染性休克的发生。患者的病情严重,进展迅速,部分患者甚至在抗感染方案更换前已死亡,CRAB血流感染者的死亡率为48.1%,与Ballouz等报道类似^[9]。报道显示^[9],血流感染的CRAB菌株,对黏菌素全部敏感而替加环素的敏感率亦高达83.3%,我们的结果显示1株 bla_{OXA-58} 阳性菌株对喹诺酮类、氨基糖苷类和复方磺胺甲噁唑仍敏感,临床采用莫西沙星抗感染后患者好转。

导致血流感染的常见病原菌中,非发酵糖革兰阴性菌以鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌为主。但血

流感染分离的鲍曼不动杆菌耐药情况不容乐观^[10],来自Chinet的资料显示,鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物耐药严重,对碳青霉烯类药物的耐药率在近10年间从31%增加到66.7%^[11]。CRAB的耐药机制^[12]:①产碳青霉烯酶,最常见的是D类OXA型酶和B类金属酶;②外排机制如AdeABC、AdeIJK和AdeFGH等;③外膜蛋白丢失如CarO、Omp33-36、OprD样蛋白等。其中OXA型酶是最常见的,尤其是OXA-23、OXA-24/40和OXA-58亚型以及自有的OXA-51型酶。我们对血培养分离的CRAB的分析显示,产D类酶(bla_{OXA-23} 和 bla_{OXA-51})是厦门地区血流感染CRAB的最常见的碳青霉烯类耐药基因,这与Fu等^[13]学者对我国16个城市的CRAB的分析相似。此外 bla_{OXA-58} 基因也是CRAB的一种重要的耐药基因,但其耐药表型有自己的特点,对喹诺酮类、氨基糖苷类和复方磺胺甲噁唑仍敏感,其所在质粒的结构还有待研究。

通过使用MALDI-TOF MS快速、灵敏地识别医院内的工具,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)在鉴定细菌上快速而精准,研究显示,对鲍曼不动杆菌的质谱技术进行同源性分析十分便捷,结果可与多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、重复序列PCR(repetitive sequence-based PCR)、ERIC-PCR等结果相比拟^[14-15]。MALDI-TOF MS在院内感染暴发的监控中具有很好的实时性。本次研究的CRAB细菌分成3大簇,I型和II型在院内存在流行,尤其是ICU,而III型为散发分布。

总之,CRAB血流感染的原发感染多为肺部炎症,且患者的病情严重,进展迅速,易导致感染性休克,具有较高的死亡风险。厦门地区的CRAB耐药主要是产D类碳青霉烯酶。

致谢:感谢华山医院胡付品教授惠赠参考菌株。

参考文献

- [1] 刘赫,多丽波.鲍曼不动杆菌A类碳青霉烯酶的研究进展[J].中国抗生素杂志,2015,40(4):318-320.
- [2] Chopra T, Marchaim D, Awali R A, et al. Epidemiology of bloodstream infections caused by *Acinetobacter baumannii* and impact of drug resistance to both carbapenems and ampicillin-sulbactam on clinical outcomes[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12): 6270-6275.
- [3] 中华医学会检验医学分会.临床微生物学血培养操作规范[J].中华检验医学杂志,2004,27(2):124-126.
- [4] 周庭银,倪语星,王明贵,等.血流感染实验诊断与临床诊

- 治[M]. 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 198-200.
- [5] Gao J, Zhao X, Bao Y, *et al.* Antibiotic resistance and OXA-type carbapenemases-encoding genes in airborne *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wards[J]. *Burns*, 2014, 40(2): 295-299.
- [6] Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, *et al.* Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(7): 1584-1590.
- [7] Tysall L, Stockdale M W, Chadwick P R, *et al.* IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49(1): 217-218.
- [8] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 721.
- [9] Ballouz T, Aridi J, Afif C, *et al.* Risk factors, clinical presentation, and outcome of *Acinetobacter baumannii* bacteremia[J]. *Front Cell Infect Mi*, 2017, 7(156): 1-8..
- [10] 李光辉, 朱德妹, 汪复, 等. 2012年中国CHINET血培养临床分离菌的分布及耐药性[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, (6): 474-481.
- [11] Hu F P, Guo Y, Zhu D M, *et al.* Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005-2014[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(Suppl 1): S9-S14.
- [12] Abbott I, Cerqueira G M, Bhuiyan S, *et al.* Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies[J]. *Expert Rev Anti-infect Ther*, 2013, 11(4): 395-409.
- [13] Fu Y, Zhou J, Zhou H, *et al.* Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(4): 644-650.
- [14] Mencacci A, Monari C, Leli C, *et al.* Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(2): 603-606.
- [15] 嵇金如, 沈萍, 应超群, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合菌鉴定及同源性分析中的应用[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(2): 134-138.