

研究报告

耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的临床分布及基因组流行病学分析

胡金树^{*1}, 刘伟¹, 贾汝福¹, 宋宇琴², 王超², 唐娜², 冯婕²

1 沧州市中心医院, 河北 沧州 061002

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

胡金树, 刘伟, 贾汝福, 宋宇琴, 王超, 唐娜, 冯婕. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的临床分布及基因组流行病学分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 270-282

Hu Jinshu, Liu Wei, Jia Rufu, Song Yuqin, Wang Chao, Tang Na, Feng Jie. Analysis on the clinical distribution and genomic epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 270-282

摘要:【背景】鲍曼不动杆菌是造成临床感染的重要病原菌之一, 其对碳青霉烯类抗生素的耐药形势日益严重, 利用基因组测序技术解析其临床分布特征和流行病学规律有助于临床感染的有效防治。【目的】研究沧州市中心医院 2018 年检出的 200 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)的临床分布和基因组流行病学特征, 以期为预防院内感染及抗感染治疗提供理论依据。【方法】选取 2018 年各临床科室的耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌, 采用细菌鉴定及药敏分析仪对 16 种抗生素进行药敏试验; PCR 扩增检测碳青霉烯酶基因; 多位点序列分型技术(multilocus sequence typing, MLST)检测菌株序列型; 基因组流行病学分析揭示菌株传播关系。【结果】本院 CRAB 主要分布在急诊重症加强护理病房(intensive care unit, ICU)(47.0%)、呼吸内科(19.5%)和重症医学科(12.0%), 它们对亚胺培南、美罗培南、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、庆大霉素、左旋氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/棒酸、阿米卡星及第三四代头孢类抗生素头孢他定、头孢曲松、头孢吡肟等 12 种抗生素高度耐药, 对复方新诺明呈现出中度耐药趋势, 仅对多粘菌素 B、美罗培南及头孢哌酮/舒巴坦等 3 种抗生素敏感。耐药基因聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)结果显示, CRAB 菌株中 180 株(90.0%)携带苯唑西林酶(oxacillinase, OXA)-23 基因, 19 株(9.5%)携带 OXA-24 基因, 只有 1 株携带 OXA-58 基因。MLST 结果显示, 除 1 株 OXA-58 阳性株为一个新 ST 型 STnew 外, 其余均为国际克隆群 CC2 型。基因组流行病学显示本院菌株共可划分为 A、B、C、D 这 4 个类群, 以 D 类群为主要流行群且不同病

基金项目: 吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(320.6750.17533, 320.6750.16050); 河北省医学科学研究课题计划(20191266)

Supported by: Wu Jieping Medical Foundation Special Clinical Research Grant (320.6750.17533, 320.6750.16050); Medical Science Research Project of Hebei Province (20191266)

*Corresponding author: E-mail: philips0188@163.com

Received: 2021-04-01; Accepted: 2021-09-03; Published online: 2021-10-20

区均有分布。【结论】本院 CRAB 菌株多重耐药严峻, 以携带 OXA-23 基因的 CC2 克隆群菌株为主, 可能存在不同病区间的感染传播, 应加强重点科室环境的清洁工作, 严格规范医务人员的技术操作规程, 慎用碳青霉烯类药物, 尽量减少感染并防止耐药率进一步升高。

关键词: 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌; 临床分布; 耐药基因; 基因组流行病学分析

Analysis on the clinical distribution and genomic epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

HU Jinshu^{*1}, LIU Wei¹, JIA Rufu¹, SONG Yuqin², WANG Chao², TANG Na², FENG Jie²

1 Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061002, Hebei, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] *Acinetobacter baumannii* is one of the most important pathogens causing clinical infection. Its resistance level to carbapenem antibiotics is increasing year by year. Using genome sequencing technology to analyze the distribution and epidemiological characteristics of *A. baumannii* can promote the effective prevention and treatment of clinical infection. [Objective] To study the clinical distribution and genomic epidemiological characteristics of 200 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) strains detected in Cangzhou Central Hospital in 2018, aiming to provide a theoretical basis for the prevention of nosocomial infections and anti-infective treatment. [Methods] The susceptibility of 200 CRAB strains isolated from different clinical department to 16 antimicrobial agents was detected by bacterial identification and drug sensitivity analyzer; PCR amplification was used to detect the carbapenemase gene; multi-locus sequence typing (MLST) was performed to detect strains' sequence type; genomic epidemiological analysis revealed transmission relationships among strains from different department. [Results] CRAB strains was mainly distributed in emergency ICU (47.0%), respiratory department (19.5%) and critical medicine department (12.0%). The CRAB strains showed high resistant level to imipenem, meropenem, ampicillin/sulbactam, ticacillin/clavulanic acid, gentamicin, piperacillin/tazobactam, levofloxacin, ciprofloxacin, amikacin and the third and fourth generation cephalosporins (cephalosporin, ceftriaxone and cefepime) and moderate resistance to sulfamethoxazole. Most strains were still sensitive to polymyxin B, minocycline and cefoperazone/sulbactam. The PCR results of antibiotic resistance genes showed that 180 strains (90.0%) of CRAB strains carried OXA-23 gene, 19 strains (9.5%) carried OXA-24 gene, and only 1 strain carried OXA-58 gene. The results of MLST showed that except for the OXA-58 positive strain, the others were all belonged to international clonal group CC2. Genomic epidemiology analysis showed that the strains in this hospital could be divided into four groups A, B, C and D. Group D was the main epidemic group, and it was distributed in different disease areas. [Conclusions] The multidrug resistance of CRAB strain in our hospital is severe, mainly were CC2 strains carrying OXA-23 gene, and there may be infection transmission among different ward areas. The environmental cleaning work of key departments should be strengthened, the technical

operation rules of medical staff should be strictly standardized, and carbapenem antibiotics should be used cautiously to reduce infection and prevent further increase of drug resistance rate.

Keywords: carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; clinical distribution; antibiotic resistance gene; genomic epidemiological analysis

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)属于不动杆菌属,是一种非发酵革兰氏阴性杆菌,广泛存在于自然界,是医院感染的主要病原菌之一,主要引起呼吸道感染、泌尿系统感染、中枢神经系统感染等^[1]。近年来,碳青霉烯类抗生素被广泛应用于临床上鲍曼不动杆菌的感染治疗,国内外报道其对碳青霉烯类抗生素的耐药性日益严重^[2],导致临床抗感染治疗难度的增加,尤其对危重患者、重症加强护理病房(intensive care unit, ICU)的患者威胁很大,成为医院感染防控和治疗的难点^[3]。

研究表明鲍曼不动杆菌对碳青霉烯耐药的主要分子机制有产生碳青霉烯酶、膜孔道蛋白缺失、药物主动外排泵的过度表达、青霉素结合蛋白改变等,其中最主要的耐药机制是产生碳青霉烯酶^[4],碳青霉烯酶可破坏抗菌药物的结构,从而导致耐药。目前,在鲍曼不动杆菌中发现的可导致其对碳青霉烯类抗生素产生耐药的酶主要包括亚胺培南酶(imipenemase, IMP)、首尔亚胺培南酶(Seoul imipenemase, SIM)、维罗纳整合素金属- β -内酰胺酶(Virion integrin-encoded metallo- β -lactamase, VIM)等金属酶^[5-7]以及苯唑西林酶(oxacillinase, OXA)家族(OXA-21、OXA-23-OXA-27、OXA-51和OXA-58等)的一系列酶。金属酶可水解碳青霉烯类药物的 β -内酰胺环,导致对碳青霉烯类抗生素耐药,苯唑西林酶是鲍曼不动杆菌中最为常见的一种酶,可水解苯唑西林,对几乎所有 β -内酰胺类抗菌药物耐药^[8]。此外,世界范围内报道的重要的可转移的碳青霉烯酶还包括肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase,

KPC)、新德里金属- β -内酰胺酶(New Delhi metallo- β -lactamase, NDM)、圣保罗金属- β -内酰胺酶(Sao Paulo metallo- β -lactamase, SPM)等^[9],均可导致该菌对碳青霉烯耐药。

据中国细菌耐药监测网CHINET (<http://www.chinets.com>)报道,耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)的临床分离率逐年增高,为临床治疗带来极大困难,因此,密切关注鲍曼不动杆菌的耐药性及分子流行病学特征对医院感染的防治具有极为重要的意义^[10]。传统的分子流行病学方法以对病原微生物进行药敏试验结合16S rRNA基因、多位点序列分型技术(multilocus sequence typing, MLST)、脉冲场凝胶电泳技术(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)等各种分子分型分析为主,这些方法能在一定程度上指导临床治疗,但存在分辨率较低而不能精确区分病原体的缺陷^[11]。全基因组序列可提供超高分辨率及更全面的遗传信息,而且随着测序技术的迅速发展,测序所需成本和时间越来越少^[12],越来越多的学者将基因组学技术运用到流行病学分析中,通过对病原细菌进行全基因组测序和比较基因组学分析,推测病原菌可能的来源和传播路线,并进一步推测病原的毒力因子和耐药性等重要特征,从而为疾病防控提供指导^[13]。

为深入了解CRAB的感染情况及不同病区菌株间的系统发育关系,本研究以河北省沧州市中心医院2018年检出的200株CRAB为研究对象进行分析,并挑取代表性菌株进行基因组流行病学分析,以期预防院内感染及抗感染治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2018 年 1-12 月,从沧州市中心医院急诊 ICU、呼吸内科、重症医学、神经外科等多个病区采集 127 位患者的临床标本 200 份,主要包括痰液、脑脊液、尿液、血液、灌洗液及静脉导管,共分离到 200 株耐碳青霉烯类抗生素的鲍曼不动杆菌。

1.1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨(tryptone)、酵母提取物(yeast extract),Oxoid 公司;氯化钠(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组提取试剂盒(QIAamp DNA MiniKit),Qiagen 公司;2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix,北京聚合美生物科技有限公司。细菌鉴定及药敏分析仪、细菌鉴定系统随机体外诊断试剂盒(DL-96 系列试剂板),珠海迪尔生物工程有限公司;PCR 扩增仪,Applied Biosystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定和药敏分析及判定标准

使用细菌鉴定及药敏分析仪进行细菌鉴定及药敏分析,抗菌药物包括多黏菌素 B、头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦、阿米卡星、复方新诺明、氨苄西林/舒巴坦、头孢吡肟、庆大霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、头孢他啶、头孢曲松、美罗霉素、替卡西林/棒酸共 16 种,均由细菌鉴定及药敏分析仪配套的细菌鉴定系统随机体外诊断试剂盒提供。依据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) 2018 版的标准^[14]进行药敏结果的判读。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和 ATCC35218。

1.2.2 ST 型和耐药基因鉴定

将菌株接入 LB 液体培养基,37 °C、200 r/min

培养 24 h,12 000×g 离心 1 min 收集菌体。抽取 2 μL 菌体,加 10 μL ddH₂O,置于金属浴,98 °C 加热 10 min,随后吸取 1 μL 高温处理后的菌液加入预先配制好的 PCR 体系(49 μL,包含初始浓度为 10 μmol/L 的上、下游引物各 2 μL,2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix 25 μL,ddH₂O 20 μL),共 50 μL 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 °C 2 min;95 °C 10 s,55-60 °C 15 s,72 °C 45 s,30 个循环;72 °C 5 min,4 °C 保存。所用到的看家基因的引物序列参照 Diancourt 等^[15]已建立的 MLST 分型系统中的 7 个看家基因,耐药基因 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58、VIM、SPM、SIM、IMP、NDM、KPC 等引物序列见表 1。

1.3 代表株基因组学分析

1.3.1 基因组 DNA 提取

从不同病区选取 16 株代表性菌株(菌株信息见表 2),以 1.2.2 中离心收集到的菌体为模板,按照细菌基因组提取试剂盒使用说明进行 DNA 提取。

1.3.2 基因组序列测定及组装

将所提取的 DNA 送广东美格基因科技有限公司进行测序,拿到测序数据之后,首先使用 Fastaqc 软件^[16]进行质控,过滤掉低质量的 reads 后,通过 SOAPdenovo 软件^[17]对高质量 reads 进行全基因组序列的组装拼接。

1.3.3 公共数据下载

已完成基因组序列测定的 693 株鲍曼不动杆菌菌株的全基因组序列下载自 PATRIC 网站(<https://patricbrc.org/>)。

1.3.4 SNP 鉴定及系统发育树构建

通过 Mummer 软件^[18]将菌株基因组序列进行两两比对获得一致性序列,随后通过 Show-Align 模块提取 SNP 信息,并用测序 reads 对每个 SNP 进行校验,构建最终的高质量 SNP 集,随后基于 SNP 串联序列通过 MEGA X 软件^[19]构建系统发育树。

表 1 看家基因及耐药基因引物信息表

Table 1 Informations of the primers of housekeeping genes and drug resistance genes

基因类别 Gene types	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	片段大小 Product length (bp)
看家基因 Housekeeping genes	cpn60-F/R	ACTGTACTTGCTCAAGC/TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	405
	fusA-F/R	ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT/CCAACATACTGTGWACACCTTTGTT	633
	gltA-F/R	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC/GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	483
	pyrG-F/R	GGTGTGTTTCATCACTAGGWAAAGG/ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCAC	297
		CMA	
	recA-F/R	CCTGAATCTTCYGGTAAAC/GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	372
	rplB-F/R	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC/CACCACCACRTGYGGGTGATC	330
	rpoB-F/R	GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA/ GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC	1 073
耐药基因 Antibiotic resistance genes	OXA23_F/R	GATCGGATTGGAGAACCAGA/ATTTCTGACCGCATTTC	501
	OXA24_F/R	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA/AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246
	OXA51_F/R	CTATGGTAATGATCTTGCTCGTG/TGGTGGTTGCCTTATGGTG	104
	OXA58_F/R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG/CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599
	VIM_F/R	ATTCCGGTCGG(A=G)GAGGTCCG/TGTGCTKGAGCAAKTCYAGACCG	601
	SIM_F/R	TACAAGGGATTTCGGCATCG/TAATGGCCTGTTCCCATGTG	570
	IMP_F/R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC/CCA AACYACTASGTTATCT	188
	SPM_F/R	AAAATCTGGGTACGCAAACG/ACATTATCCGCTGGAACAGG	271
	NDM_F/R	CCAATATTATGCACCCGGTCG/ATGCGGGCCGTATGAGTGATTG	812
	KPC_F/R	ATGTCACGTATCGCCGTCT/TACTGCCCGTTGACGCCCA	881

表 2 全基因组测序菌株信息表

Table 2 Informations of the strains performed whole genome sequencing

序号 Serial No.	菌株编号 Strain ID	分离时间 Isolation time	病区 Ward	分离源 Isolation source
1	Aba6	2018.02.02	Respiratory medicine	Sputum
2	Aba8	2018.03.26	Respiratory medicine	Sputum
3	Aba10	2018.05.16	Respiratory medicine	Sputum
4	Aba4	2018.01.08	Emergency ICU	Sputum
5	Aba9	2018.05.09	Emergency ICU	Sputum
6	Aba12	2018.08.04	Emergency ICU	Sputum
7	Aba13	2018.08.22	Emergency ICU	Sputum
8	Aba14	2018.10.11	Emergency ICU	Sputum
9	Aba15	2018.12.03	Emergency ICU	Sputum
10	Aba1	2018.03.10	Neurosurgery	Sputum
11	Aba2	2018.04.18	Neurosurgery	Sputum
12	Aba3	2018.05.11	Neurosurgery	Sputum
13	Aba5	2018.01.23	Critical care medicine	Sputum
14	Aba7	2018.02.14	Critical care medicine	Sputum
15	Aba11	2018.06.20	Critical care medicine	Sputum
16	Aba16	2018.12.16	Critical care medicine	Sputum

1.3.5 功能基因注释

采用 Prokka 软件对菌株基因组进行基因预测,根据预测得到的基因编码区位置信息提取氨基酸序列,与非冗余蛋白数据库(non-redundant, nr)、蛋白质直系同源簇数据库(cluster of orthologous groups of proteins, COG)进行蛋白质同源序列比对,完成功能注释。

2 结果与分析

2.1 菌株分布及药敏结果

耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌分离株主要来源于呼吸道、伤口及尿路感染,其中,最多的是来自痰标本的共 185 株(92.5%),其次为脑脊液 9 株(4.5%)、分泌物 2 株(1.0%),其他标本 4 株(2.0%,尿液、血液、灌洗液、静脉导管各 1 株)。在临床各病区的分布中急诊ICU病区占第一位,共 94 株(47.0%),其他依次为呼吸内科病区 39 株(19.5%)、重症医学科病区 24 株(12.0%)、神经外科病区 14 株(7.0%)、老年内科病区和呼吸与危重症医学病区各 9 株(4.5%),其他病区 11 株(5.5%) (表 3)。

表 3 200 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌在不同病区的分布情况
Table 3 Distribution of 200 strains of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in different disease areas

病区 Ward	菌株数(株) Strains number	比例 Ratio (%)
急诊 ICU Emergency ICU	94	47.0
呼吸内科 Respiratory medicine	39	19.5
重症医学科 Critical care medicine	24	12.0
神经外科 Neurosurgery	14	7.0
老年内科 Geriatric internal medicine	9	4.5
呼吸与危重症医学科 Respiratory and critical care medicine	9	4.5
其他 Others	11	5.5
总计 Total	200	100

本文的研究对象为耐碳青霉烯的鲍曼不动杆菌,即对碳青霉烯类抗生素亚胺培南、美罗培南中任意一种具有耐药性的鲍曼不动杆菌。药敏结果显示,200 株 CRAB 中对亚胺培南和美罗培南同时耐药的菌株为 123 株,占 61.5%;单独对亚胺培南耐药的菌株占比为 63.0%,而对美罗培南耐药的菌株占比为 91.0%。此外,耐碳青霉烯的鲍曼不动杆菌还具有多重耐药特征,对氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、庆大霉素、左旋氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/棒酸、阿米卡星及第三四代头孢类抗生素头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟均显示出较高的耐药性,耐药率都在 80%以上,尤其是对哌拉西林/他唑巴坦已达到 100%耐药。CRAB 对复方新诺明呈现出中度耐药,耐药率为 44.0%,而对多粘菌素 B (耐药率 1.0%)、美满霉素(耐药率 2.0%)及头孢哌酮/舒巴坦(耐药率 14.5%)仍较为敏感,如表 4 所示。

2.2 菌株 OXA23/24 基因和 ST 型结果

鲍曼不动杆菌对碳青霉烯耐药主要是由于 OXA 型耐药基因引起的,因此检测了常见的 OXA 型耐药基因(OXA-23、OXA24、OXA51 和 OXA58)及 IMP、SIM、VIM、NDM、KPC、SPM 基因在 200 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌中的分布情况。结果显示,180 株(90.0%)携带有 OXA-23 基因,19 株(9.5%)携带有 OXA-24 基因,只有 1 株携带 OXA-58 基因,这表明本医院的 CRAB 主要以 OXA-23 型耐药基因为主,但也存在一定的多样性。

采用 Diancourt 等^[15]构建的多位点序列分型系统对 200 株菌的 ST 序列型进行鉴定。如表 5 所示,其中,175 株菌(87.5%)为 ST2 型,23 株为 ST2'型即 ST2 衍生型,与 ST2 只有 1 个等位基因存在 1 个碱基差异。另有 1 株为 ST415'型,同样地,ST415'型与已报道的 ST415 序列型仅存在 1 个碱基差异。此外,我们检测到携带 OXA-58

表 4 200 株耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的药敏情况

Table 4 Drug sensitivity of 200 strains of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

抗生素 Antibiotics	耐药 Resistant		中介 Intermediate		敏感 Susceptible	
	菌株数(株)	比例	菌株数(株)	比例	菌株数(株)	比例
	Strains number	Ratio (%)	Strains number	Ratio (%)	Strains number	Ratio (%)
亚胺培南 Imipenem	126	63.0	65	32.5	9	4.5
美罗培南 Meropenem	182	91.0	17	8.5	0	0.0
氨苄西林/舒巴坦 Ampicillin/sulbactam	169	84.5	25	12.5	6	3.0
头孢他啶 Ceftazidime	199	99.5	0	0.0	1	0.5
环丙沙星 Ciprofloxacin	194	97.0	0	0.0	0	0.0
头孢哌酮/舒巴坦 Cefoperazone/sulbactam	29	14.5	138	69.0	32	16.0
头孢曲松 Ceftriaxone	198	99.0	1	0.5	1	0.5
头孢吡肟 Cefepime	169	84.5	27	13.5	2	1.0
庆大霉素 Gentamicin	188	94.0	4	2.0	6	3.0
左旋氧氟沙星 Levofloxacin	173	86.5	20	10.0	0	0.0
美满霉素 Minocycline	4	2.0	19	9.5	171	85.5
多粘菌素 B Polymyxin B	2	1.0	0	0.0	198	99.0
哌拉西林/他唑巴坦 Piperacillin/tazobactam	200	100.0	0	0.0	0	0.0
复方新诺明 Compoundsulfamethoxazole	88	44.0	0	0.0	112	56.0
替卡西林/棒酸 Ticarclillin/clavulanicacid	197	98.5	0	0.0	0	0.0
阿米卡星 Amikacin	184	92.0	0	0.0	13	6.5

基因的菌株 ST 型为一个全新的序列型别, 此处定义为 STnew。ST415 型与 ST2 型只相差 1 个等位基因, 亲缘关系较近, 都属于国际克隆群 II (CC2)^[20], 而 STnew 与 ST2 相差 5 个等位基因, 遗传距离较远, 但 STnew 菌株分离自急诊科 ICU 病区, 而且仅在 2018 年 2 月检测到一次, 疑似为其他外源序列型克隆株的偶然输入。综上

所述, 本医院的耐药碳青霉烯鲍曼不动杆菌以携带 OXA-23 的 CC2 型克隆群菌株为主, 偶尔有其他序列型菌株的外源输入。

2.3 基于全基因组 SNP 的系统发育分析

为进一步探究携带 OXA-23 基因的 CC2 型耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌在不同病区间的系统发育关系, 从分离率最高的 4 个病区(急诊 ICU、呼吸内科、神经外科、重症医学科)共挑选 16 株携带 OXA-23 基因的 CC2 型菌株, 测定其全基因组序列, 以菌株 XH860 的全基因组完成图序列(登录号为 CP014538.1)作为参考进行比较基因组学分析, 共鉴定到 229 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 其中同义突变 100 个、非同义突变 107 个, 其余 22 个

表 5 菌株的 MLST 型分布及耐药基因携带情况

Table 5 Distribution of MLST types and carrying of drug resistance genes in strains

Gene name	ST2	ST2'	ST415'	STnew	Total
OXA-23	159	20	1	0	180
OXA-24	16	3	0	0	19
OXA-58	0	0	0	1	1
Total	175	23	1	1	200

位于基因间区(表 6)。进一步对上述 229 个 SNP 的基因频率进行分析, 86%的 SNP 位点最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF)小于 0.1 ($1/16=0.0625$), 说明大部分的变异位点只发生在一株菌中, 具有菌株特异性。MAF>0.1 的 SNP 位点共 32 个, 只有 4 个位于基因间区, 其余 28 个位点分散于 27 个编码基因上, 而且 79% (22 个)为非同义突变。功能注释结果显示, 这些基因主要是与翻译、核糖体结构及合成(translation, ribosomal structure and biogenesis)、转录(transcription)和细胞壁/细胞膜/包膜合成(cell wall/membrane/envelope biogenesis)等功能相关(图 1), 由此可以推测, 这些耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌在适应临床环境的过程中由于受到了选择压力而发生了适应性进化。

基于 229 个 SNP 的串联序列构建的系统发育树(图 2A)表明, 16 株菌共可划分为 A、B、C、

表 6 16 株菌的 SNP 的变异类型和基因频率
Table 6 Mutation types and gene frequencies of SNP among 16 strains

Mutation type	MAF<0.1	MAF≥0.1
Intergenic	18	4
Synonymous	79	21
Nonsynonymous	100	7

D 这 4 个类群, 其中 A 类群和 C 类群各包含 1 株菌, 分别为菌株 Aba9 和 Aba14; B 类群包含 2 株菌, 为菌株 Aba5 和 Aba16; D 类群共包含 12 株菌, 菌株数最多, 为本医院的优势类群, D 类群还可以分为 D1、D2、D3 这 3 个亚群。急诊 ICU 分离到的 6 株菌在 A、C、D 这 3 个类群中均有分布, 分离自重症医学科的 4 株菌分别分布在 B 类群和 D 类群中, 分离自神经外科的菌株分布在 D 类群, 其中 Aba3 属于 D1 亚群, Aba1 和 Aba2 属于 D3 亚群, 分离自呼吸内科的菌株全部属于 D 类群且集中分布在 D2 亚

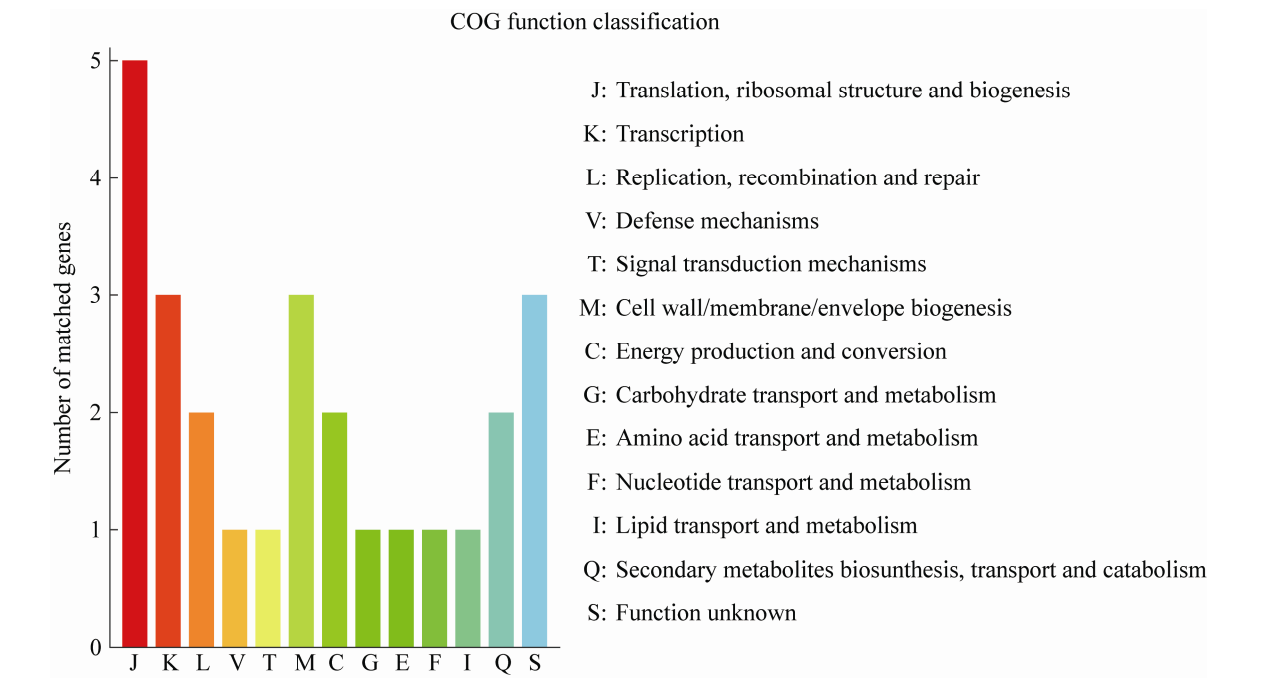


图 1 发生 SNP 突变的编码基因(MAF>0.1)的 COG 功能注释分类
Figure 1 COG functional annotation classification of coding genes with SNP mutation (MAF>0.1).

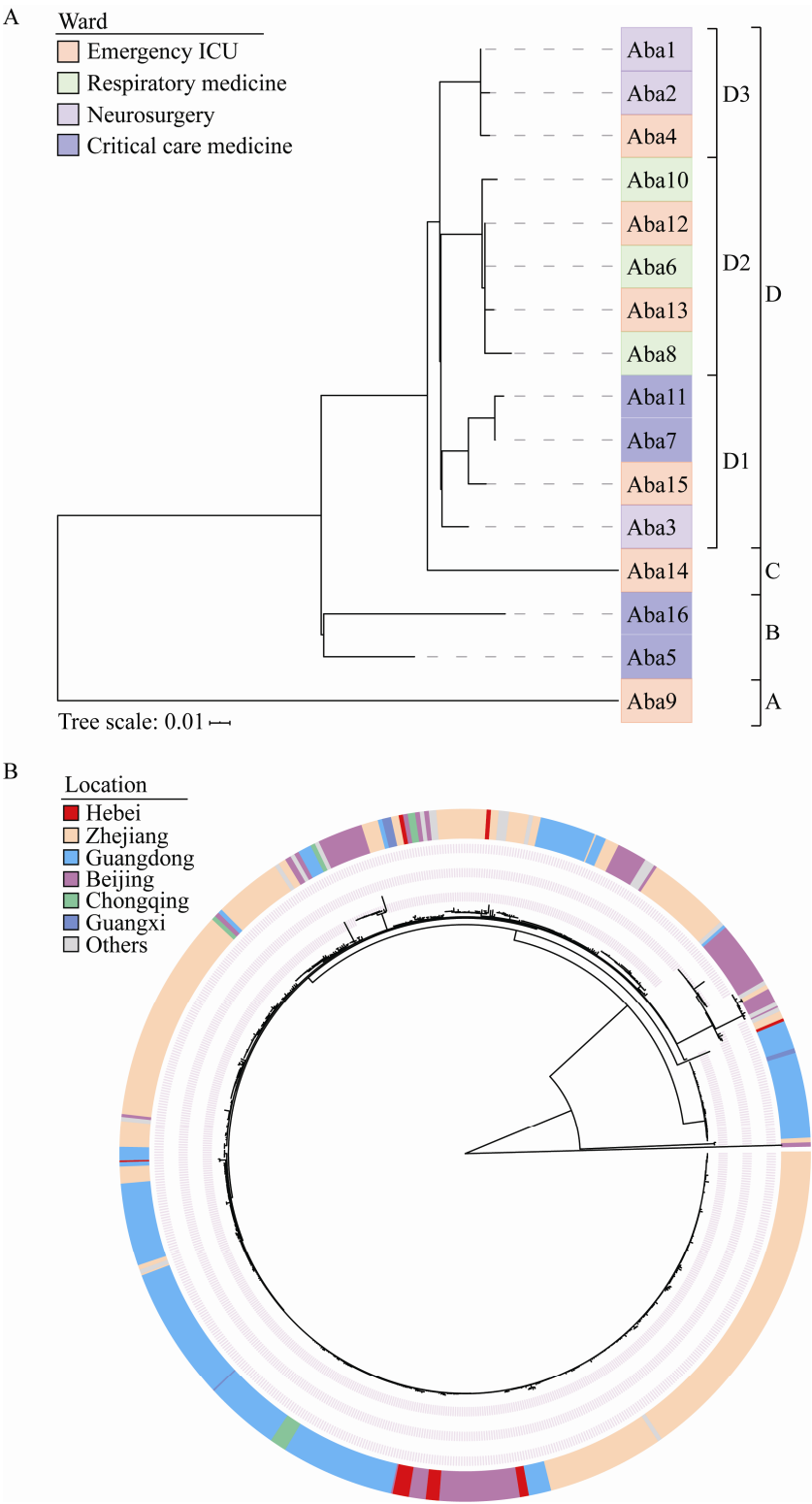


图 2 基于 SNP 序列构建的 16 株(A)和 709 株(B)耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的系统发育树
Figure 2 Phylogenetic tree based on SNP sequences of 16 strains (A) and 709 strains (B) of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.

群。因此,耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌菌株在不同病区之间存在多类群共同流行的现象,其中以D类群为主要类群。

为了定位本医院耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌菌株在全国范围内的遗传分类学地位,结合PATRIC数据库中分离自中国的已完成全基因组序列测定的693株ST2型鲍曼不动杆菌菌株进行基因组流行病学分析。同样以菌株XH860的全基因组序列作为参考,709株菌共鉴定到3 864个SNP。基于3 864个SNP序列构建的系统发育树结果显示,分离自浙江、广东、北京等地的菌株在系统发育树的各个分支均有分布,这表明上述地区的菌株同样存在多类群共同流行的现象,但同一分支内的菌株具有一定程度的地域聚集性,即同一分支内分离自同一地点的菌株亲缘关系更近。如图2B所示,红色所示为本研究中所用菌株,其系统发育结构与图2A中一致,其中,菌株Aba9(A类群)单独构成一个分支,更靠近根部;其次是Aba16和Aba5(B类群),与浙江分离株的亲缘关系较近;菌株Aba14(C类群)则与广东分离株的亲缘关系较近,而D类群的菌株均与北京分离株聚为一支。除Aba9外,本医院菌株与其余多个地区的菌株均存在较高相似性,进一步说明本医院鲍曼不动杆菌的多类群共同流行趋势。

3 讨论与结论

鲍曼不动杆菌生命力极强,在医院环境中分布较广。本研究结果表明,CRAB在沧州市中心医院的急诊ICU、呼吸内科及重症医学科的检出率较高,分别为47.0%、19.5%和12.0%,这与文献[21-22]报道一致。此外,本研究中CRAB的标本来源以痰液为主,与文献[21-23]等临床研究报道一致,但我院占比为92.5%,高于上述报道的81.8%、81.0%及61.31%,这或许是由于我

院痰标本的送检率较高所致,表明CRAB在我院主要引起呼吸道感染,要重视和加强重点科室的感染预防和控制。

鲍曼不动杆菌具有耐药率高、获得性耐药及播散能力强等特点,因此被称为21世纪革兰氏阴性菌中的“耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)”^[24]。碳青霉烯类抗菌药物被认为是治疗鲍曼不动杆菌等革兰氏阴性菌感染最强有力的武器,但近年来鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性逐年升高,并且对碳青霉烯类抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌大多对其他常用的抗菌药物耐药^[25]。

本研究结果显示,CRAB对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为63.0%和91.0%,同时CRAB还具有多重耐药特征,对复方新诺明呈现出中度耐药,而且相较于2015年本医院在静脉导管所检出的鲍曼不动杆菌,其对亚胺培南、美罗培南、氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、庆大霉素、左氧氟沙星、阿米卡星等药物的耐药性均有升高^[26]。这表明CRAB在我院的耐药情况较为严重,临床可使用的有效抗生素种类已非常有限。这可能与抗生素持续暴露所施加的选择压力有关,进而导致耐药性越来越严重。

本研究显示,CRAB仅对多粘菌素B、美满霉素及头孢哌酮/舒巴坦等3种抗生素较为敏感。舒巴坦、他唑巴坦是一种酶抑制剂,将其与抗生素联合使用可增强抗生素对病原菌的杀灭效果^[27],耐碳青霉烯的鲍曼不动杆菌对氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦的耐药率均已升高,只有对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率仍处于相对较低的水平,建议临床对鲍曼不动杆菌感染进行治疗时可选用此类抗生素;同时谨慎使用碳青霉烯类抗菌药物,根据具体的药敏结果及时调整并合理使用抗菌药物,防止耐药性的增加。

尽管有研究表明 OXA 酶的水解活性比较弱,但在不动杆菌对碳青霉烯类的耐药机制中至关重要^[28]。据报道,国外流行的 CRAB 主要是产生 OXA-23 型碳青霉烯酶。Koh 等^[29]研究表明新加坡总医院的 CRAB 菌株中有 91%携带 OXA-23 基因; Villegas 等^[30]从纽约市 7 家医院分离到 66 株 CRAB,全部检测到 OXA-23 基因;随后, Jeon 等^[31]也发现韩国的 CRAB 与 OXA-23 基因相关。国内临床 CRAB 的耐药主要也是由于产生了 OXA-23 型碳青霉烯酶。余广超等^[32]研究发现,暨南大学附属医院的 124 株 CRAB 中有 98 株 OXA-23 基因阳性菌株; Ji 等^[33]对分离自中国 23 个省份的 2 880 株不动杆菌属细菌的 PCR 结果表明,绝大多数的 CRAB 菌株中携带 OXA-23 基因。上述研究菌株样本数量大、覆盖度广,但未包含河北省的菌株。本研究以河北省沧州医院的 CRAB 为研究对象,在 90.0%的 CRAB 菌株中检出 OXA-23 型耐药基因,表明本院的 CRAB 主要以 OXA-23 型耐药基因为主,这与国内外的报道均一致,并且在一定程度上是对前述研究的补充。此外,MLST 分型结果显示,本研究中除 1 株 STnew 菌株外,其余菌株均属于国际克隆群 II (CC2),说明本院 CRAB 以携带 OXA-23 的 CC2 型克隆群菌株为主,这与 Zhao 等^[34]的研究结果一致。

病原菌在医院内的流行传播较为常见,临床分离菌株的基因同源性分析对于流行病学调查,特别是传染源和传播途径的追踪具有重要意义。本研究对 16 株携带 OXA-23 基因的 CC2 克隆群菌株进行了基因组流行病学分析,结果显示 16 株 CC2 克隆群 CRAB 菌株具有较高的遗传多样性,共可划分为 A、B、C、D 这 4 个类群,呈现出多类群共同流行的趋势,其中 D 类群为院内主要流行类群,在各个病区内均有分布。其中分离自急诊 ICU 科的菌株多样性最高,涵盖

了 A、C、D 这 3 个类群,分别与其余病区的菌株具有较近的亲缘关系,说明不同病区之间极有可能发生了交叉传播。菌株 Aba9 分离自急诊 ICU,位于系统发育树最靠近根部的位置,说明本院内的 CRAB 有可能是由急诊 ICU 首先发生感染,进而在其余科室间发生传播,但由于 Aba9 菌株分离于 2018 年 5 月,并非本院的首个分离株,而且本研究并未对医院环境、医疗器械及医护人员手部等进行鲍曼不动杆菌的监测,因此无法准确推断其传播方向及途径,后续纳入更全面的菌株集将有助于本院 CRAB 的溯源分析。另外,医院应加强重点科室环境的清洁工作,严格规范医务人员的技术操作规程,同时应谨慎使用碳青霉烯类抗菌药物,根据具体的药敏结果及时调整并合理使用抗菌药物,尽量达到减少感染并防止耐药率进一步升高的目的。

REFERENCES

- [1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2008, 21(3): 538-582
- [2] Liu LL, Ji SJ, Ruan Z, Fu Y, Fu YQ, Wang YF, Yu YS. Dissemination of blaOXA-23 in *Acinetobacter* spp. in China: main roles of conjugative plasmid pAZJ221 and transposon Tn2009[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(4): 1998-2005
- [3] Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno V. Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen[J]. Journal of Pathogens, 2016, 2016: 7318075
- [4] 蔡果果, 王春艳. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药机制及治疗研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(2): 234-237
Cai GG, Wang CY. Research progress on drug resistance mechanism and treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2019, 35(2): 234-237 (in Chinese)
- [5] Cayô R, Streling AP, Nodari CS, Matos AP, De Paula Luz A, Dijkshoorn L, Pignatari ACC, Gales AC. Occurrence of IMP-1 in non-baumannii *Acinetobacter* clinical isolates from Brazil[J]. Journal of Medical

- Microbiology, 2018, 67(5): 628-630
- [6] Abouelfetouh A, Torky AS, Aboulmagd E. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Egypt[J]. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2019, 8(1): 1-9
- [7] Girija SA, Jayaseelan VP, Arumugam P. Prevalence of VIM-and GIM-producing *Acinetobacter baumannii* from patients with severe urinary tract infection[J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2018, 65(4): 539-550
- [8] Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2014, 27(2): 241-263
- [9] El-Kholy AA, Elanany MG, Sherif MM, Gad MA. High prevalence of VIM, KPC, and NDM expression among surgical site infection pathogens in patients having emergency surgery[J]. Surgical Infections, 2018, 19(6): 629-633
- [10] 郑少微, 李萍, 张正良, 裴红红. 2005–2017 年中国 CHINET 常见革兰阴性菌对碳青霉烯类抗生素耐药的监测结果[J]. 临床急诊杂志, 2019, 20(1): 40-44
- Zheng SW, Li P, Zhang ZL, Pei HH. CHINET surveillance of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria in China from 2005 to 2017[J]. Journal of Clinical Emergency, 2019, 20(1): 40-44 (in Chinese)
- [11] Maiden MCJ, Van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(10): 728-736
- [12] Relman DA. Microbial genomics and infectious diseases[J]. The New England Journal of Medicine, 2011, 365(4): 347-357
- [13] Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, FitzGerald M, Godfrey P, Haas BJ, Murphy CI, Russ C, et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011[J]. PNAS, 2012, 109(8): 3065-3070
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[S]. 2018: M100-S28
- [15] Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10034
- [16] Andrews S. FastQC[Z]. 2015. <https://qubeshub.org/resources/fastqc>
- [17] Luo RB, Liu BH, Xie YL, Li ZY, Huang WH, Yuan JY, He GZ, Chen YX, Pan Q, Liu YJ, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. GigaScience, 2012, 1(1): 2047-217X-1-18
- [18] Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL. Versatile and open software for comparing large genomes[J]. Genome Biology, 2004, 5(2): R12
- [19] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549
- [20] Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013, 41(1): 11-19
- [21] 赵晓姬, 马永能, 张任飞, 彭秀娟, 马瑜珊, 党好. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌分布及耐药谱动态分析[J]. 四川医学, 2017, 38(3): 267-270
- Zhao XJ, Ma YN, Zhang RF, Peng XJ, Ma YS, Dang H. Dynamic analysis of distribution and drug resistance spectrum of *Acinetobacter baumannii* resistant to carbapenem[J]. Sichuan Medical Journal, 2017, 38(3): 267-270 (in Chinese)
- [22] 黎昆, 王洁, 刘家瑞. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(7): 1064-1066
- Li K, Wang J, Liu JR. Analysis of clinical distribution and drug resistance of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2018, 34(7): 1064-1066 (in Chinese)
- [23] 朱秋丽, 卫菊, 胡丹, 陈海威, 车咏梅, 孙喆. 2014-2016 年某医院耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的临床分布和耐药性分析[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(11): 856-858
- Zhu QL, Wei J, Hu D, Chen HW, Che YM, Sun Z. Analysis of clinical distribution and drug resistance of carbapene-resistant *Acinetobacter baumannii* in a hospital between 2014 and 2016[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2018, 35(11): 856-858 (in Chinese)
- [24] 俞云松. 多药耐药鲍曼不动杆菌——21 世纪革兰阴性菌的“MRSA”[J]. 中华临床感染病杂志, 2009(2): 65-68
- Yu YS. Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*-Gram-negative “MRSA” in 21st century[J]. Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases, 2009(2): 65-68 (in Chinese)
- [25] Mammina C, Palma DM, Bonura C, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, Saporito MA, Verde MS, Calà C, Cracchiolo AN, et al. Epidemiology and clonality of

- carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from an intensive care unit in Palermo, Italy[J]. BMC Research Notes, 2012, 5(1): 1-8
- [26] 胡金树, 李珊珊, 袁博. 静脉导管尖端培养的病原菌分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(5): 1019-1021
Hu JS, Li SS, Yuan B. Pathogens cultured from venous catheters tips[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2015, 25(5): 1019-1021 (in Chinese)
- [27] Papp-Wallace KM, Nguyen NQ, Jacobs MR, Bethel CR, Barnes MD, Kumar V, Bajaksouzian S, Rudin SD, Rather PN, Bhavsar S, et al. Strategic approaches to overcome resistance against Gram-negative pathogens using β -lactamase inhibitors and β -lactam enhancers: activity of three novel diazabicyclooctanes WCK 5153, zidebactam (WCK 5107), and WCK 4234[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 61(9): 4067-4086
- [28] 李春, 王中新, 沈继录. 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药机制研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2009, 30(2): 54-58, 62
Li C, Wang ZX, Shen JL. Research advances in carbapenem-resistant mechanism of *Acinetobacter baumannii*[J]. World Notes on Antibiotics, 2009, 30(2): 54-58, 62 (in Chinese)
- [29] Koh TH, Sng LH, Wang GCY, Hsu LY, Zhao Y. IMP-4 and OXA β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(4): 627-632
- [30] Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzman AM, Woodford N, Livermore D, Quinn JP. Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(6): 2001-2004
- [31] Jeon H, Kim S, Kim MH, Kim SY, Nam D, Park SC, Park SH, Bae H, Lee HJ, Cho JH, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Korean hospital that carry blaOXA-23[J]. Infection Genetics & Evolution, 2018, 58:232-236
- [32] 余广超, 陈凤平, 刘菊珍, 温旺荣. 426 株鲍曼不动杆菌的耐药性分析与 OXA-23 型碳青霉烯酶检测[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(12): 1112-1114
Yu GC, Chen FP, Liu JZ, Wen WR. Analysis of the antibiotic resistance and detection of OXA-23 carbapenemase in 426 *Acinetobacter baumannii* strains[J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(12): 1112-1114 (in Chinese)
- [33] Ji S, Chen Y, Ruan Z, Fu Y, Ji J, Fu Y, Wang H, Yu Y. Prevalence of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase genes in *Acinetobacter* spp. isolates in China[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014, 33(6): 989-997
- [34] Zhao YX, Hu KW, Zhang JS, Guo YH, Fan XC, Wang Y, Mensah SD, Zhang XL. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in ICU of the eastern Heilongjiang province, China[J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19(1): 1-7