

儿童血流感染病原菌人苍白杆菌的流行种系及耐药特点

李先斌, 刘健龙, 郭宽鹏, 宋春荣, 李梨平, 胡琼

湖南省儿童医院检验中心, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 了解儿童血流感染病原菌人苍白杆菌的流行种系及耐药特点, 为临床诊疗提供依据。 **方法** 收集湖南省儿童医院 2010 年 1 月-2017 年 12 月收治的全自动微生物鉴定分析仪鉴定为人苍白杆菌败血症患儿的 194 株病原菌菌种, 采用质谱仪重新鉴定, 再取其中 61 株用基因测序法鉴定, 同时对药物结果进行统计。 **结果** 194 株原鉴定为人苍白杆菌的菌株有 163 株确定为人苍白杆菌, 占 84.0%, 其他 31 株分别是解糖精假苍白杆菌 26 株, 假贵格纳苍白杆菌 4 株, 中间苍白杆菌 1 株。苍白杆菌对氨曲南 100% 耐药。人苍白杆菌对氨苄西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑啉、头孢他啶耐药率达 90.0% 以上, 对左氧氟沙星、亚胺培南耐药率为 0%, 对环丙沙星、丁胺卡那、庆大霉素耐药率低于 2.0%, 对复方新诺明、头孢吡肟耐药率小于 21.5%。假苍白杆菌对氨苄西林、头孢唑啉耐药率小于 50%, 对头孢他啶、头孢吡肟、丁胺卡那、庆大霉素耐药率低于 10.0%。对左氧氟沙星、环丙沙星、哌拉西林/他唑巴坦、复方新诺明耐药率为 0%, 对亚胺培南则有 16.1% 的耐药率。人苍白杆菌有 AmpC/R 基因, 假苍白杆菌没有。 **结论** 湖南省儿童苍白杆菌血流感染的流行菌株主要是人苍白杆菌, 其次为解糖精假苍白杆菌和假贵格纳苍白杆菌等。传统仪器无法区分苍白杆菌的种系, 而人苍白杆菌和假苍白杆菌的耐药性有差别。人苍白杆菌可选用头孢吡肟, 重症患儿可用亚胺培南; 假苍白杆菌可选用头孢他啶、头孢吡肟、哌拉西林/他唑巴坦。

关键词: 血流感染; 人苍白杆菌; 假苍白杆菌; 耐药

中图分类号: R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2019)05-0532-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.05.006

Epidemic strains and drug-resistance of *Ochrobactrum anthropi* in bloodstream infection in children

LI Xian-bin, LIU Jian-long, GUO Kuan-peng, SONG Chun-rong, LI Li-ping, HU Qiong

Testing Center, Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China

Abstract: **Objective** To study the epidemic strains and drug resistance of *Ochrobactrum anthropi* in bloodstream infection in children, and to provide evidence for clinical diagnosis and treatment. **Methods** One hundred and ninety-four strains of *Ochrobactrum anthropi* identified by automatic microbial identification analyzer were collected from children with *Ochrobactrum anthropi* sepsis in Hunan Children's Hospital from January 2010 to December 2017. The strains were re-identified by mass spectrometry, of which 61 strains of *Ochrobactrum anthropi* were identified by gene sequencing, and the results of drug resistance were statistically analyzed. **Results** Mass spectrometry analysis identified that 84.0% (163/194) strains of bacteria were *Ochrobactrum anthropi*, and other 31 strains of bacteria included *Pseudochrobactrum saccharolyticum* (26/31), *Ochrobactrum pseudogrignone*

基金项目: 湖南省卫生和计划生育委员会科研项目 (C2015-61)

作者简介: 李先斌 (1964-), 男, 湖南湘乡人, 副主任检验师, 主要从事临床微生物工作。

- [5] 赵丽燕. 婴幼儿肺炎支原体肺炎急性期与恢复期免疫功能及炎症因子变化[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(1): 86-88.
- [6] 陈玮, 邓中华, 刘俊. 小儿肺炎支原体肺炎患儿支气管肺泡灌洗液 IL-6、IL-10 表达情况研究[J]. 实用预防医学, 2015, 22(3): 303-304.
- [7] 陈波, 张经. 支原体肺炎患儿血清体液免疫检测的临床研究[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(6): 1045-1046.
- [8] 戚应杰, 刘忠, 刁联硕. 慢性丙型肝炎患者血清球蛋白水平与病毒载量的相关性研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(4): 354-355.
- [9] 王金行, 周立平, 阎莉莉, 等. 血清蛋白电泳在类风湿性关节炎诊治中的应用[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(8): 729-731.
- [10] 邓会英, 高岩. 血清蛋白电泳与尿蛋白电泳在儿科肾脏疾病中的联合应用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(3): 156-157.
- [11] 林宗泽, 吴亮. 红霉素序贯疗法对支原体肺炎患儿免疫球蛋白、细胞因子水平的影响研究[J]. 中国全科医学, 2017, 20(7): 118-120.
- [12] 杨香红, 李艳莉, 罗春玉. 肺炎支原体肺炎患儿免疫功能的变化及其与病情程度和疾病分期的关系[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(1): 113-116.
- [13] 王全, 蒋健飞, 赵德育. 肺炎支原体肺炎发生肺外并发症的危险因素[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2013, 28(10): 749-751.
- [14] 陈晓颖, 董汉权, 郭伟, 等. 417 例肺炎支原体肺炎肺外并发症临床分析[J]. 天津医药, 2013, 55(7): 668-670.
- [15] 李艳红, 陈永森. 不同肺炎支原体感染病期婴幼儿免疫功能及炎症因子的动态变化[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(2): 240-243.
- [16] 刘芳, 赵宇华, 陈霜慧. IL-6、IL-8 及 IL-10 在肺炎支原体肺炎患儿血清中的表达及临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(1): 61-63, 66.
- [17] 聂红国. 小儿肺炎支原体肺炎的临床分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2012.

收稿日期: 2018-04-12

(4/31) and *Ochrobactrum intermedium* (1/31). *Ochrobactrum* was resistant to aztreonam (100%). The resistance rates of *Ochrobactrum anthropi* to ampicillin, piperacillin/tazobactam, cefazolin and ceftazidime were all over 90.0%, those to levofloxacin and imipenem 0.0%, those to ciprofloxacin, amikacin and gentamicin less than 2.0%, and those to compound sulfamethoxazole and cefepime less than 21.5%. The resistance rates of *Pseudochrobactrum* to ampicillin and cefazolin were less than 50%, those to ceftazidime, cefepime, amikacin and gentamicin less than 10.0%, those to levofloxacin, ciprofloxacin, piperacillin/tazobactam, and compound sulfamethoxazole 0.0%, and those to imipenem were 16.1%. Gene sequencing analysis showed that *Ochrobactrum anthropi* carried the AmpC/R gene, but *Pseudochrobactrum* did not. **Conclusions** The main epidemic strains in children with bloodstream infection caused by *Ochrobactrum* in Hunan Province were *Ochrobactrum anthropi*, followed by *Pseudochrobactrum saccharolyticum* and *Ochrobactrum pseudogrignonense*. Traditional instruments cannot distinguish the strains of *Ochrobactrum*, but the drug resistance results are different between *Ochrobactrum anthropi* and *Pseudochrobactrum*. Cefepime can be used for the treatment of *Ochrobactrum anthropi* infection, imipenem for severe infection in pediatric patients, and ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam for *Pseudochrobactrum* bacteremia infection.

Key words: bloodstream infection; *Ochrobactrum anthropi*; *Pseudochrobactrum*; drug resistance

苍白杆菌(*Ochrobactrum*)毒力较弱,为条件致病菌,感染后可引起败血症、脑膜炎、腹膜炎等疾病。随着分子生物技术的应用,人们发现 Vitek 2 仪器鉴定的人苍白杆菌,实际上包含了人苍白杆菌和假苍白杆菌(*Pseudochrobactrum*)等多个菌种^[1]。为了明确苍白杆菌的病原学特征,对湖南省儿童医院 2010 年 1 月-2017 年 12 月用 Vitek 2 仪器法鉴定为人苍白杆菌的菌株重新用全自动质谱仪法和基因测序法进行菌种鉴定和药敏分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株 2010 年 1 月-2017 年 12 月湖南省儿童医院收治的苍白杆菌败血症患儿 194 例,均符合败血症诊断标准^[2],所有病原菌均进行了药物敏感试验并留取了菌株。

1.2 仪器与试剂 VITEK MS 及配套的质谱靶板、全自动微生物鉴定药敏分析仪 VITEK2compact 及 GN 鉴定卡、AST-GN13 药敏卡均由法国生物梅里埃公司提供,哥伦比亚血平板由博赛生物研究所提供。ABI Veriti 96 孔热循环仪(美国 ABI 公司);NanoDrop2000 C 分光光度计(Thermo Fisher Scientific);全自动凝胶成像系统(英国 Syngene 公司);TaqTM 酶体系、DL 2000 Marker 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒(大连 TaKaRa 公司);引物合成及测序交由上海英捷维基公司完成。CHEF Mapper XA 脉冲场电泳仪(美国 Bio-rad 伯乐);PFGE 分析所需的蛋白酶 K(美国 Sigma 公司)、XbaI 和 SpeI 内切酶(大连 TaKaRa 公司)。

1.3 细菌的质谱鉴定和基因测序鉴定 194 株经 VITEK2 鉴定为人苍白杆菌的菌株,复苏后均用全自动质谱仪重新鉴定,取其中再次鉴定为人苍白杆菌的菌株 30 株及所有鉴定为非人苍白杆菌的菌株用基因测序法鉴定。方法是按照说明书采用试剂盒提取细菌基

因组 DNA,PCR 扩增细菌 16S rRNA、recA 基因和 ampC/R 基因,引物序列见表 1。16S rRNA 基因的扩增参数如下:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 7 min;4 ℃ 保温;recA 基因的扩增参数如下:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,32 个循环;72 ℃ 7 min;4 ℃ 保温。扩增产物经 1% 浓度琼脂糖凝胶电泳进行鉴定后,送与上海英捷维基公司进行基因双向测序。测序的 16S rRNA 基因以 EzTaxon 数据库(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)进行序列比对,recA 基因以 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列比对。16S rRNA 基因序列比对结果的解释,主要参考美国临床和实验室标准化协会(CLSI)MM18-A 通用解释标准相关内容,recA 基因序列比对结果的解释则主要参考相关新种的命名文献^[1],并结合生化实验结果进行最终的菌种判定。ampC/R 基因扩增参数及测序结果解释见文献^[3]。

表 1 基因分析引物

引物名称	序列
16S 基因	27f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
	1492r 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'
rec A 基因	recA-BrucOchro-f 5'-ATGTCTCAAAATTCATTGCGAC-3'
	recA-BrucOchro-r 5'-AGCATCTTCTTCGGTCCGC-3'
ampC 基因	ampC-BrucOchro-f 5'-CGCCAGCGCAAGTATCGTAT-3'
	ampC-BrucOchro-r 5'-GCGGCCTATTGCTTGTGTC-3'
ampR 基因	ampR-BrucOchro-f 5'-CTCAGTTGTTGCGGCGCATCT-3'
	ampR-BrucOchro-r 5'-AATACGCGCAGTGCTGAGGA-3'

1.4 质量控制 用大肠埃希菌 ATCC 25922,铜绿假单胞菌 ATCC 27853 对所有鉴定用试剂及药敏分析用抗生素进行质量控制,结果均符合预期结果和美国临床和实验室标准协会(CLSI)规定的标准。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计学分析,计数资料的比较用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 菌株来源及患者信息 194 例苍白杆菌血流感染患儿中,142 例来自农村,占 73.2%,男 139 例,女 55 例;年龄 4 d~12 岁,其中<28 d 8 例(4.1%),28 d~3 岁 156 例(80.4%),>3 岁 30 例(15.5%);入院首位诊断为败血症的有 79 例,感染性腹泻 23 例,婴儿腹泻 14 例,迁延性腹泻 2 例,支气管肺炎 32 例,肺部感染 14 例,川崎病 12 例,皮肤巩膜黄染 2 例,急性淋巴结炎 4 例,新生儿肺透明膜病 2 例,肝炎综合症 2 例,脑疝 1 例,颅内感染 5 例,外科手术后 2 例。以上患儿出院时均诊断为败血症。

2.2 菌种种系分布 194 株用传统进口全自动微生物鉴定分析仪鉴定为人苍白杆菌的儿童血流感染病原菌,用全自动质谱仪鉴定只有 163 株是人苍白杆菌,在其中随机取 30 株用基因测序法鉴定也均是人苍白杆菌,另 31 株质谱鉴定为非人苍白杆菌的菌株用基因测序法鉴定分别是:解糖精假苍白杆菌 26 株,假贵格纳苍白杆菌 4 株,中间苍白杆菌 1 株,质谱法与基因序列鉴定法结果基本一致,基因鉴定结果的解读参照 CLSI MM-18 中 16S rRNA 基因序列鉴定细菌的通用解释标准。

表 2 人苍白杆菌和假苍白杆菌的耐药率

抗菌药物	人苍白杆菌 耐药株数	耐药率 (%)	假苍白杆菌 耐药株数	耐药率 (%)	χ^2 值	P 值
亚胺培南	0	0.0(0/163)	5	16.1(5/31)		0.00 *
丁胺卡那	1	0.6(1/163)	1	3.2(1/31)		0.295 *
庆大霉素	3	2.0(3/149)	1	3.2(1/31)		0.534 *
环丙沙星	2	1.2(2/163)	0	0.0(0/31)		0.705 *
左旋氧氟沙星	0	0.0(0/163)	0	0.0(0/31)		
复方新诺明	16	9.8(16/163)	0	0.0(0/31)		0.079 *
氨曲南	152	100.0(152/152)	31	100.0(31/31)		
哌啦西林/他唑巴坦	149	91.4(149/163)	0	0.0(0/31)	122.16	0.00
头孢吡肟	35	21.4(35/163)	1	3.2(1/31)	5.74	0.017
头孢他啶	155	95.1(155/163)	3	9.7(3/31)	125.73	0.00
头孢替坦	147	90.2(147/163)	7	22.6(7/31)	72.72	0.00
头孢唑啉	158	96.9(158/163)	13	41.9(13/31)	75.39	0.00
氨苄西林	159	97.5(159/163)	15	48.4(15/31)	68.01	0.00

注: * 采用 Fisher 确切概率法。

2.3 药敏分析 163 株人苍白杆菌和 31 株假苍白杆菌药敏结果见表 2。人苍白杆菌对氨苄西林、头孢唑啉、头孢替坦、头孢他啶耐药率较高,对头孢吡肟较敏感,对庆大霉素、丁胺卡那、环丙沙星、左旋氧氟沙星、亚胺培南等抗菌药物耐药率低。假苍白杆菌对氨苄西林、头孢唑啉耐药率较高,对头孢替坦、头孢他啶、头孢吡肟、哌啦西林/他唑巴坦耐药率低。人苍白杆菌和假

苍白杆菌均对氨曲南 100% 耐药。随机选取耐药的 30 株苍白杆菌基因测序结果显示:有 16 株扩增出 AmpC/R 基因,这 16 株均耐哌啦西林/他唑巴坦,均是人苍白杆菌,其测序结果与 CP000758 比对,相似度达到 98%,无 Gap(0.00%),表明人苍白杆菌有 AmpC/R 基因,假苍白杆菌没有^[6]。人苍白杆菌对哌啦西林/他唑巴坦、头孢吡肟、头孢他啶、头孢替坦、头孢唑啉、氨苄西林耐药率高于假苍白杆菌,而对亚胺培南的耐药率明显低于假苍白杆菌,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

人苍白杆菌(包括假苍白杆菌)是土壤和污水中常见的细菌,致病力较弱,但对人体有潜在的威胁性^[3],低龄儿童好奇心强,自知力差,尤其男孩更好动,接触污泥污水的机率大,当机体免疫力降低时可能出现血流感染^[4],本研究显示,73.2%的患儿来自农村,男孩占 71.6%(139/194)也证明了这点。人苍白杆菌和假苍白杆菌感染患儿中,28 d~3 岁年龄段感染率达 80.4%是因为此年龄段来自母体的抗体逐渐减少、自体主动免疫尚未完全成熟所致,表明人苍白杆菌是婴幼儿败血症的重要病原菌^[5]。本研究中有 2 例苍白杆菌感染患儿来自外科,可能与用污染的医疗器械进行侵入性操作有关。本文同时提示假苍白杆菌同样可导致婴幼儿败血症。因为假苍白杆菌在 VITEK2 等微生物鉴定药敏分析仪数据库范围内暂时没有资料,故一律鉴定成了人苍白杆菌。本研究显示,用 VITEK2 鉴定为人苍白杆菌的 194 例血流感染患儿中,用质谱和测序确定 163 株是人苍白杆菌,占 84.0%,26 株为解糖精假苍白杆菌,占 13.4%,4 株为假贵格纳苍白杆菌,占 2.1%,1 株为中间苍白杆菌,占 0.5%。表明湖南人苍白杆菌的种系分布以人苍白杆菌为主,同时表明用传统方法鉴定为人苍白杆菌时其结果不一定准确,需要进一步鉴定,也表明假苍白杆菌可以在临床检出,而且菌种较多。

药敏结果显示,人苍白杆菌和假苍白杆菌对氨曲南均 100% 耐药。但假苍白杆菌对氨苄西林、头孢唑啉耐药率不到 50%,明显比人苍白杆菌耐药率低。假苍白杆菌对头孢替坦、头孢他啶、头孢吡肟、哌啦西林/他唑巴坦耐药率低于 23%,可用于常规治疗用药物,这点和人苍白杆菌有显著性差异,但是假苍白杆菌对亚胺培南有 16% 的耐药率,比人苍白杆菌高,但对照菌株号,根据前期研究的耐药基因检测显示没有在假苍白杆菌菌种中扩增出 AmpC/R(AmpC 耐药酶)基