

以脈衝電場電泳法分析 3 株院內血流感染的 *Acinetobacter baumannii*

李文珍¹ 邱南昌¹ 江春雪² 翁麗娟² 楊定一³ 陳銘仁¹ 黃富源
馬偕醫院 ¹小兒科 ²醫學研究科 ³檢驗科

感染症是經初期急救後存活之燙傷病人的重要病因。而 *Acinetobacter baumannii* 是加護中心及燙傷中心院內感染的重要病原菌，因此我們分析了一名罹患毒性表皮壞死 (toxic epidermal necrolysis) 兒童，在燙傷中心治療時，身上分離出之六株 *Acinetobacter baumannii* 它造成兩次的敗血症，我們發現每次血液感染之前，病人的傷口或中央靜脈導管便已有 *Acinetobacter baumannii* 的感染或移生，在給予有效的抗生素治療第一次敗血症後九天，血液再度培養出此細菌，且有多重抗藥性，我們使用脈衝電場電泳法分析三株來自血液的細菌，發現兩株於同一天經中央靜脈導管抽取之細菌，其電泳型式為相同，而和第二次敗血症所分離細菌之電泳型式不同，故 *Acinetobacter baumannii* 的感染，可能在有效之抗生素治療中萌生抗藥菌株，這將是照顧燙傷病患及長期住院，而需要長期留置尿管、中央靜脈導管及全靜脈營養之病人的醫護人員應特別注意的地方。
(感控雜誌 2000;10:326-34)

關鍵詞：靜止桿菌、毒性表皮壞死、脈衝電場電泳法

前言

感染是造成燙傷復原後死亡的主要原因 [1,2]，燙傷病房的感染率為 14.9% (每 100 住院人數)，感染密度為 1.2‰ (每 1000 住院人日數)，其感染率是醫院中所有單位最高的，靜止

桿菌 (*Acinetobacter baumannii*) 是 *Neisseriaceae* 科，*Acinetobacter* 屬，它是院內感染越來越重要的菌種，尤其是在加護病房中 [1,3,10]，而其多重抗藥性是當務之急的問題。

本研究收集了住在燙傷加護病房中，患有毒性表皮壞死 (toxic epider-

民國 89 年 7 月 10 日受理
民國 89 年 7 月 28 日修正
民國 89 年 8 月 16 日接受刊登

聯絡人：李文珍
聯絡地址：台北市中山北路 2 段 92 號
聯絡電話：(02)25433535

mal necrolysis, TEN) 的病人，其血液檢體中分離出 3 株 *A. baumannii*，先收集 2 個來自血液的檢體，然後在給予有效的抗生素治療後的第 9 天，收集第 3 個血液檢體，以脈衝電場電泳法 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 來分析 3 株 *A. baumannii*，以釐清是否 *A. baumannii* 在治療中，仍會產生抗藥菌株。

TEN 病患在開始發病時，會出現皮疹，併隨著類似感冒的症狀然後會很迅速的出現紅斑，通常會在腋下和鼠蹊部出現，接著便會廣泛地脫皮，接著於黏膜的部位出現，其死亡率約為 20-30%，治療與處置方法與治療廣泛性的二度燙傷相似。

個案

一 10 歲男孩，他母親於 31 週時，因前置胎盤而接受剖腹生產，出生時的體重為 2090gm，出生不久後即發現有壞死性腸炎 (necrotizing enterocolitis) 和穿孔，所以執行小腸造瘻手術，在 10 個月大又被診斷出法洛氏四崎型心臟病 (Tetralogy of Fallot) 和肺動脈閉鎖 (pulmonary atresia)，故於隔年進行了 B-T shunt 和 Rastelli 等手術，8 歲時曾因感染心內膜炎而住院，住院期間，亦出現了急性腎絲球腎炎、Steven-Johnson Syndrom，EB 病毒感染，病毒引發了噬血症 (hemophagocytic syndrome)、抽搐和造成聲門下纖維化，幸好他完全康復，沒有產生後遺症。

此次發病住院原因為：在他洗溫泉後 4 天出現發燒及全身發紅的現象，於口服 amoxicillin 和 ibuprophen 1 天後，快速出現紅疹及水泡，於是住進本院的燙傷加護病房，由於全身 98% 的表皮潰爛，於是診斷為 TEN。

住院的 2 個月期間，病童每天接受更換傷口敷料。由於大範圍的皮膚受損且身上有中心靜脈導管及留置尿管，且營養不足、長期施打全靜脈營養及白蛋白注射，住院的第 8 天時，傷口培養出 *A. baumannii* (標示為「檢體 a」) 第 11 天時，在病童的中心靜脈之導管抽取血液檢體亦培養出 *A. baumannii* (標示為「檢體 b」和「檢體 c」) 在第 15 天時給予做傷口培養 (標示為「檢體 d」) 給予 ceftazidime 和 amikacin 治療 6 天後，血液已無菌，但在第 9 天時卻開始發現敗血症的症狀，在動脈血液檢驗出 *A. baumannii* (標示為「檢體 f」)。在抽血之前 2 天，取中心靜脈導管的導管做導管培養，培養出的 *A. baumannii* 的菌株 (標示為「檢體 e」)。此後病人又出現 *Candida parapsilosis* 的敗血症和 *Pseudomonas aeruginosa* 的血流感染，*Geotrichum candidum* 引起的泌尿道感染，在住院的 2 個月後，他死於全身性的黴菌感染，包括敗血症和肺炎。

材料與方法

我們採取病人身上培養出的 3 株 *A. baumannii*，再加上最近其他加護

表一 抗生素敏感試驗結果

Isolates	AM	AMC	C	CFT	CMZ	CP	CXM	FOM	FOX	GM	NN	SXT	AN	ATM	CAZ	CFP	CIP	CTX	CRO	IPM	NET	TZP	TIM	FLO	ZOX	LOM	FEP	
a	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	I	R	R	R	S	
b	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	I	R	R	R	S
c	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	I	R	R	R	S
d	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
e	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
f	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R

a 菌為住院後第 8 日所收集之傷口所培養。

b 菌及 c 菌是第 11 日抽取自 CVP 的血液。

d 菌則為第 15 日自病人身上傷口所分離者。

e 菌是第 18 天病人身上之中央靜脈導管培養所長。

f 菌是第 20 日抽取動脈血液所培養的。用以測試敏感性的抗生素如下：ampicillin (AM), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), chloramphenicol (C), cefotiam (CFT), cefmetazole (CMZ), cephalothin (CP), cefuroxime (CXM), fosfomicin (FOM), cefoxitin (FOX), gentamicin (GM), tobramycin (NN), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), amikacin (AN), aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ), cefoperazone (CFP), ciprofloxacin (CIP), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CRO), imipenem (IPM), netilmicin (NET), piperacillin/tazobactam (TZP), ticarcillin/clavulanic acid (TIM), flomoxef (FLO), ceftizoxime (ZOX), lomefloxacin (LOM), 及 cefepime (FEP)。

「R」表示此菌對所測試的抗生素有抗藥性，「I」表示中度抗藥，「S」為有效。

病房中院內感染的 5 株 *A. baumannii*，一起做進一步分析。

8 個檢體是在 37°C，5% 的二氧化碳中培養，經以下之生化試驗確認為 *A. baumannii*，氧化酶陰性、葡萄糖陽性 mannitol 陰性、nitrate 陰性、esculin 陰性、無 motility，在 44°C 和 42°C 間均會生長。

一、抗生素敏感試驗情形

抗生素敏感試驗情形是以 BBL Sensi-Disc 抗生素敏感性試驗試紙 (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD) 製造商依據 National Committee for clinical Laboratory Standards。

二、PFGE 的方法

將單一菌落種入 5ml BHI 培養液中於 37°C 的環境下隔夜培養。離心、洗滌後和 1% Seaplaque GTG agarose

(FMC Bioproducts, Rockland Maine, USA) 混合後，置入塞子內。以 1mg/ml proteinase K (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, USA) 溶解。再經緩衝液洗滌多次。再使用限制酶 *Apa* I (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) 分解細菌之 DNA，分解後之 DNA 置於 1.1% Seakem GTG agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, Maine, USA)，以 CHEF II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 執行電泳分析，條件為 6V/cm，14°C，22.5 小時，脈衝時間為 5 至 8 秒。最後以 ethidium bromide 在螢光下呈色，lambda DNA (Pharmacia Biotech, Up-

psala, Sweden) 為小大標記。

結 果

住院後第 8 天所收集之膿瘍所培養出的 *A. baumannii* (檢體 a) 和 2 株自中央靜脈導管培養出來的 *A. baumannii* (檢體 b 和 c) 其抗生素敏感試驗結果非常相似和自傷口及中央靜脈導管以及動脈血培養分離出的 *A. baumannii* (檢體 d, e, f) 之抗生素敏感試驗差異非常大，其只對 imipenem (IPM) 有效，第二次敗血症之前，從傷口和中央靜脈導管培養出為多重抗藥性菌種，與之後的血液檢體培養出之 *A. baumannii* 有相同的抗生素敏感測試結果。

表二 191 位燙傷病患的院內感染菌種

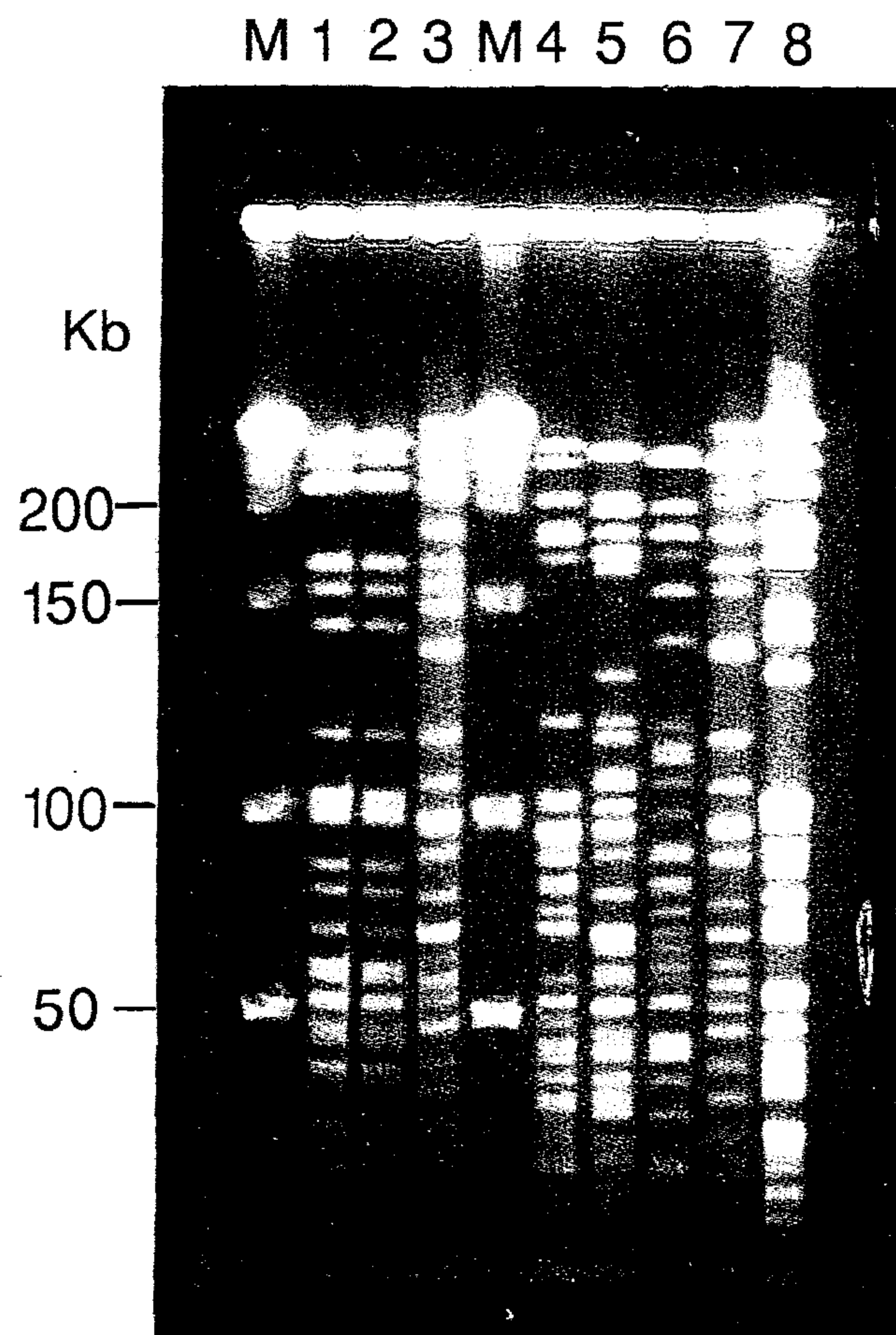
Burn wounds			Urine(>10 ⁵ /ml)			Blood		
Rank	Organism	No. of patients	Rank	Organism	No. of patients	Rank	Organism	No. of patients
1	<i>S. epidermidis</i>	180	1	Yeast	19	1	Yeast	16
2	<i>Enterococcus</i> spp.	134	2	<i>Acinetobacter</i> spp.	19	2	<i>Enterococcus</i> spp.	16
3	<i>Corynebacterium</i>	102	3	<i>Klebsiella</i> spp.	19	3	<i>S. epidermidis</i>	14
4	<i>P. aeruginosa</i>	101	4	<i>E. coli</i>	17	4	<i>Acinetobacter</i> spp.	10
5	<i>E. coli</i>	96	5	<i>Enterococcus</i> spp.	15	5	<i>P. aeruginosa</i>	9
6	<i>Bacillus</i> spp.	89	6	<i>P. aeruginosa</i>	15	6	<i>Klebsiella</i> spp.	7
7	<i>Acinetobacter</i> spp.	84	7	<i>Citrobacter</i> spp.	3	7	<i>S. marcescens</i>	6
8	<i>S. aureus</i>	83	8	<i>Proteus</i> spp.	3	8	<i>Enterobacter</i> spp.	5
9	<i>Klebsiella</i> spp.	79	9	<i>S. epidermidis</i>	3	9	<i>E. coli</i>	3
10	Yeast	69	10	<i>Enterobacter</i> spp.	3	10	<i>Proteus</i> spp.	2
11	<i>Enterobacter</i> spp.	69	11	<i>S. marcescens</i>	2	11	<i>S. aureus</i>	2

PFGE 自中央靜脈導管 (標示為 b,c) 所分離出的 2 株 *A. baumannii*，雖抗生素敏感試驗結果出現對 Ceftazidime(CAZ) 的抗藥性不同，但其 PFGE 型態完全相同 (見圖 1)，而從週邊血的血液檢體則出現不同的型態，另外，5 株其他單位分離的 PFGE 基因型態的不同，表示本研究所做的脈衝電泳法是分離不同的 *A. baumannii*，也顯示自中央靜脈導管檢

體所分離的兩株 *A. baumannii* 為同一株菌。

討 論

這個案因皮膚的完整性被破壞、營養較差，且有中央靜脈導管、留置尿管和呼吸器等侵入性治療，以及住院日很長，所以在燙傷單位裏的感染率較高 [1]，在一回溯法的研究中 [1] 監測 9 年內院內感染的平均感染率為



「M」表示 lambda DNA 為大小標記；「1」為 b 菌，「2」為 c 菌 (即為第 11 日抽取自中央靜脈導管的血液)，「3」則為 f 菌 (為第 20 日抽取動脈血液所培養)，「4-8」為其他加護病房所分離出之 *A. baumannii*

圖一 *A. baumannii* 的電泳分析圖

22.8%，在燙傷病房內，較常見的菌種為：*Pseudomonas aeruginosa* (23.1%)，*Staphylococcus aureus* (11.8%)，*Enterococcus* spp. (11.3%) and *Acinetobacter* spp. (10.6%)[11]。在世界上其他地區的研究報告中，*Acinetobacter* spp. 造成院內感染率從1到9.7%不等，在法國1994年6月到1995年的6月發生一個*A. baumannii*的群突發，其感染密度為0.6‰(每1000位人日數)[1]。在其他的研究報告中，在加護病房的感染菌種中，*A. baumannii*佔了28.4%，其感染率為12.4%(或8個感染人次每1000人日數)[8]，另有一研究指出，燙傷病人產生之敗血症菌種中，*Acinetobacter* spp. 佔第四位。

Acinetobacter spp. 是腋下、鼠蹊及腳趾縫皮膚之正常菌數[4]。7%的成人和嬰孩在喉部會有短暫的移生[12-3]，它是醫院工作人員的皮膚上持續帶菌之最常見的G(-)菌種、病患住院2個星期後，即可產生*A. baumannii*之移生[5]，有報告指出在住院後自第1次培養出*A. baumannii*的時間為11天[15]，*Acinetobacter* spp. 可以在無生命的物體上存活數天[3,4]。*A. calcoaceticus*及*A. baumannii*的存活時間甚至和*S. aureus*一樣長[3,16-8]。它的存活時間會因存在牛血清蛋白中而更延長，所以*A. baumannii*會常在工作人員的手、醫院環境和病患的皮膚和腸胃道等處被發現，尤其是住院日數過長的病患的身上會發現，特別

是病人有補充高營養液，如全靜脈營養、白蛋白和脂肪乳劑的時候。

回顧此個案，他的皮膚上有大範圍的傷口，和長時間的留置中央靜脈導管和尿管，以及長期的給予全靜脈營養和白蛋白輸液，均是感染*A. baumannii*很大的危險因子。在他傷口有*A. baumannii*移生後，血流感染繼續發生，大部份的燙傷病患有血流感染時，同時也會有傷口感染，血流感染可能是直接由燙傷的傷口或注射部位進入[11]。檢體a、b和c的抗生素敏感試驗是完全相同的(除了檢體c對ceftazidime是有效的)，這暗示細菌侵襲血流之前常會有表皮的移生。

在第二次的敗血症發生之前，於中央靜脈導管和燙傷傷口的檢體均培養出*A. baumannii*，這3株均是多重抗藥性菌種，只對imipenem有效，但並無證據證實是經由導管而導致的血流感染，有時臨床上要證實血流感染乃是經導管而造成的是有困難的，導管的培養報告，有時是較不準確的，Maki和其研究生所發表的報告中以半定量的方法，定義出導管培養必須等於或大於15個菌落數[19-20]，自導管抽取血液做培養容易遭受污染，其偽陽性(主要是*Staphylococcus epidermidis*)為5%，而有大於2%的機會，是偽陰性的結果。

近幾年來，分子生物的技術被廣泛的應用在院內感染的診斷，也有著不錯的成果。

既然細菌的移生常出現在侵襲性

感染之前，是否我們要用抗生素治療移生之細菌呢？答案是不可以。專家建議，應盡速將病人移出加護病房拔除不必要的管線以避免細菌之移生。經由 PFGE 之確認發現在第一次的敗血症時，從中央靜脈導管抽取血液中所分離的 2 株 *A. baumannii* 是同一菌株，在有效的抗生素治療中，再度造成敗血症的 *A. baumannii* 可能是來自皮膚和中央靜脈導管的移生菌。經由 PFGE 及抗生素敏感試驗的鑑定結果，我們得知 *A. baumannii* 會在有效之抗生素治療過程中，產生對原來有效抗生素具有抗藥性之菌株。

有文獻報告 [22]，使用頭孢菌素治療 *A. baumannii* 敗血症的當中會有引發含 β -lactamases 的抗藥菌株的可能。所以此病人在第一次敗血症發現後的 9 天之內產生一株新的高抗藥性的菌株感染。在台灣最近的報告中，發現造成院內感染的 *A. baumannii* 對 imipenem 的抗藥性為 19% [6]，故我們不可忽視燙傷病房中 *A. baumannii* 造成院內感染的情況，由於此菌會移生在病人傷口上，並進一步造成侵襲性感染，監測病人傷口，移除不必要之插管，以及審慎選擇和管制抗生素，可以避免高抗藥菌在院內之散佈。

參考文獻

1. Huskins WC, Goldmann DA: Nosocomial infections. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of Pediatric Infectious Disease. Philadelphia: WB Saunders. 1998: 2545-85.

2. Ekenna O, Sherertz RJ, Bringham H: Natural history of blood stream infections in a burn patient population: the importance of candidemia. *Am J Infect Control*; 21: 189-95.
3. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. eds: Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000: 2339-44, 3005-20.
4. Yu VL, Merigan TC, Barriere SL. eds: Antimicrobial Therapy and Vaccines. 1999: 3-9.
5. Weingarten CM, Rybak MJ, Jahns BE, et al: Evaluation of *Acinetobacter baumannii* infection and colonization, and antimicrobial treatment patterns in an urban teaching hospital. *Pharmacotherapy* 1999; 19: 1080-5.
6. Lai SW, Ng KC, Yu WL, et al: *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *Kaohsiung J Med Scien* 1999; 15: 406-13.
7. Biendo M, Laurans G, Lefebvre JF, et al: Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using a combination of antibiotyping and ribotyping. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2170-5.
8. Villari P, Iacuzio L, Vozzella EF, et al: Unusual genetic heterogeneity of *Acinetobacter baumannii* isolates in a university hospital in Italy. *Am J Infect Control* 1999; 27: 247-53.
9. Regev R, Dolfin T, Zelig I, et al: *Acinetobacter* septicemia: a threat to neonates? Special aspects in a neonatal intensive care unit. *Infection* 1993; 21: 392-6.
10. Thurn J, Crossley K, Gerds A, et al: Enteral hyperalimentation as a source of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 1990; 15: 203-17.
11. Chiu NC, Shen SH, Lai MC, et al: Nosocomial infections in a burn unit. *J Infect Dis Soc ROC* 1995; 6: 19-24.
12. Rosenthal S, Tager IB: Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. *Ann Intern Med* 1975; 83: 355-7.
13. Baltimore RS: Epidemiology of pharyngeal colonization of infants with aerobic gram-negative rod bacteria. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 91-5.
14. Larson EL: Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands. *Am J Infect Control* 1981; 9: 112-9.
15. Okpara AU, Maswoswe JJ: Emergence of multidrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Am J Hosp Pharm* 1994; 51: 2671-5.

16. Hirari Y: Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 1995; 13: 252-60.
17. Wendt C, Dietze B, Dietze E, et al: Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1394-7.
18. Jawad A, Heritage J, Snelling AM, et al: Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2881-7.
19. Maki D, Jarrett F, Sarafin H: A semiquantitative method for identification of catheter-related infection in the burn patient. *J Surg Res* 1977; 22: 513-20.
20. Maki D, Weisa C, Sarafin H: A semiquantitative method for identifying catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296: 1305-9.
21. Tonnesen A, Peuler M, Lockwood W: Cultures of blood drawn by catheters vs. venipuncture. *JAMA* 1976; 235: 1877.
22. Anstey NM: Use of cefotaxime for treatment of *Acinetobacter* infections(Letter). *Clin Infect Dis* 1992; 15: 374.

Pulsed Field Gel Electrophoresis Patterns of Three Nosocomial Bloodstream Isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Patient with Toxic Epidermal Necrolysis

Wen-Chen Li¹, Nan-Chang Chiu¹, Chuen-Sheue Chiang²,
Nai-Yu Wang², Dine-Ie Yang³, Ming-Ren Chen¹, Fu-Yuan Huang¹

¹ Departments of Pediatrics, ² Medical Research, and ³ Clinical Laboratory, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan

Infections remain the major cause of death among patients with burns after their resuscitation phase. *Acinetobacter baumannii* has become an increasingly important nosocomial pathogen, particularly in intensive care units. Multiple-drug resistance is a difficult problem to manage. We collected six isolates of *A. baumannii* from a patient with toxic epidermal necrolysis (TEN) during his stay at the burn intensive care unit. Before the two episodes of blood stream invasion by this organism, we found the wound infection and central venous catheter colonization by this organism. After 9 days of effective antibiotic treatment for the first episode of septicemia, a multi-drug resistant *A. baumannii* emerged in his blood. We carried out the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of three isolates, two from the blood during the first episode of septicemia, and the third from the second episode 9 days later. We found the PFGE pattern of two isolates from the same day to be identical; whereas the third isolate demonstrated a clearly different pattern. The result indicates that the drug-resistance of the *A. baumannii* with a different PFGE pattern will develop during antimicrobial therapy. (Nosocom Infect Control J 2000; 10:326-34)

Key words: *Acinetobacter baumannii*, toxic epidermal necrolysis (TEN), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)