

ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌医院感染的同源性分析

毛 璞, 单靖岚, 叶 丹, 郑 蕾, 李莲娜, 黎毅敏

(广州医学院第一附属医院, 广东 广州 510120)

[摘要] **目的** 对某院重症监护室(ICU)流行的多重耐药鲍曼不动杆菌感染进行同源性分析。**方法** 收集该 ICU 鲍曼不动杆菌感染流行期间住院患者标本中分离的 9 株以及环境中分离的 24 株鲍曼不动杆菌, 采用基因外重复回文序列聚合酶链反应(REP-PCR)技术对其进行基因分析, 建立 DNA 指纹图谱; 同时应用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验。**结果** 9 株临床分离的鲍曼不动杆菌共分为 4 个基因型, 其中 E1 和 E2 型分别有 4 株和 3 株, E3 和 E4 型各 1 株; 环境样本分离的 24 株中, 17 株属 E1 型。药敏结果显示, 临床分离株均为多重耐药株, 环境分离株中 19 株为多重耐药株。**结论** 此次 ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌感染的流行主要是由 E1 和 E2 基因型在患者之间的相互传播所致, 同时患者所处环境也被明显污染。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; 重症监护室; 医院感染; 流行病学; 多重耐药; 抗药性; 微生物; 同源性

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)01-0006-05

Homology analysis on ICU multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infection

MAO Pu, SHAN Jing-lan, YE Dan, ZHENG Lei, LI Lian-na, LI Yi-min (The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective** To investigate an outbreak of nosocomial infection (NI) with multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) in an intensive care unit (ICU). **Methods** Nine strains isolated from patients and 24 strains isolated from ICU environment during NI outbreak with MDR *A. baumannii* were typed by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction (rep-PCR) and antimicrobial susceptibility was tested by Kirby-Bauer method. **Results** Nine strains isolated from patients were divided into 4 genotypes by rep-PCR, type E1 and E2 had 4 and 3 strains respectively, both type E3 and E4 had 1 strain. 24 strains of *A. baumannii* were isolated from the environmental samples, 17 of which belonged to type E1. Antimicrobial sensitivity test results showed that all clinical isolates and 19 environmental isolates were multidrug-resistant strains. **Conclusion** The MDR *A. baumannii* outbreak in ICU was caused by transmission of E1 and E2 genotype *A. baumannii* among patients, and environment was also contaminated.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; intensive care units; nosocomial infection; epidemiology; multidrug resistance; drug-resistance, microbial; homology

[Chin Infect Control, 2010, 9(1): 6-9, 14]

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)虽为条件致病菌, 但已逐渐成为医院感染的重要病原菌, 且多重耐药菌株日趋严重, 泛耐药株时有出现, 给临床治疗带来极大难度, 并且危及患者生命^[1]。由于该菌在自然界中分布广泛, 加之重症监护室(ICU)收治患者大都具有病情危重、侵入性检

查治疗较多、免疫功能低下的特点, 故极易发生医院感染。因此, 及早发现并判断这些耐药菌是否来源于同一菌株, 对于防止医院感染具有非常重要的意义。本研究采用基因外重复回文序列聚合酶链反应(REP-PCR)技术对某医院 ICU 患者标本及病房环境样本分离的多重耐药 AB 进行指纹图谱分析, 现

[收稿日期] 2009-09-01

[作者简介] 毛璞(1981-), 女(汉族), 湖北省枝江市人, 讲师, 主要从事医院感染管理研究。

[通讯作者] 黎毅敏 E-mail: lyimin98@gmail.com

报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 AB 临床分离株来自于 2007 年 1 月某院 ICU 住院患者痰标本,共 9 株;环境分离株采自病房环境及呼吸机管道,共 24 株。

1.2 菌株鉴定及药敏试验 采用 VITEK-2 微生物自动检测仪鉴定菌种;美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的 K-B 纸片扩散法测定 AB 对哌拉西林(PFP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、替卡西林/克拉维酸(TIM)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、头孢曲松(CRO)、亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、米诺环素(MIN)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、复方磺胺甲噁唑(SXT)等 15 种抗菌药物的敏感性。以大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 为质控菌株,结果判定参照 CLSI 2009 标准。应用酶抑制剂增强纸片确证法检测 β-内酰胺酶(β-La)。

1.3 菌株培养及 DNA 提取 挑取单个菌落接种在 LB 培养基中,37℃ 18 h。应用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取细菌的 DNA。离心收集 5 mL 培养物,567 μL TE 重悬后,加入 30 μL 10% SDS、5 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K,37℃ 1 h。100 μL 5 mol/L NaCl 充分混匀后,加入 80 μL CTAB/

NaCl, 65℃ 10 min。加入等体积的酚/氯仿,充分混匀后 10 000 r/min 10 min。取上清,加入 0.6 倍体积的异丙醇后,随即可见白色絮状物,用 70% 乙醇洗涤后于空气中晾干。TE 溶解,RNase 处理后即可作为 PCR 模板。

1.4 REP-PCR 引物序列 REP 1:5′-IIIGCGC-CGICATCAGGC-3′;REP 2:5′-ACGTCTTAT-CAGGCCTAC-3′,由英潍捷基贸易有限公司合成。25 μL 的反应体系[宝生物工程(大连)有限公司]包括 10× 缓冲液 2.5 μL,dNTP mix(各 2.5 mmol/L) 4 μL,引物(20 μmol/L)各 1 μL,模板 400 ng,Taq 酶 0.3 μL。扩增条件:95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 1 min,45℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共循环 30 次,最终 72℃ 延伸 16 min^[2]。将扩增产物取 20 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,90 V,30 min。EB 染色后成像。

2 结果

2.1 环境样本分离菌株鉴定结果 从环境中共采集 151 份样本,对其进行生化鉴定发现在病房的隔帘、治疗车表面、床栏、床边回风口防护网、呼/送气呼吸管储水杯、吸痰管消毒瓶、吸痰碗气道侧均分离鉴定出 AB。其中吸痰碗气道侧 AB 的分离率达 45.45%,呼气呼吸管储水杯和床边回风口防护网 AB 分离率分别为 15.91% 和 36.36%,详见表 1。

表 1 环境样本分离菌株鉴定结果

Table 1 Identification results of *A. baumannii* strains isolated from ICU environmental samples

床位	隔帘 (n=8)	治疗车 (n=11)	床栏 (n=11)	床边回风口防护网 (n=11)	呼吸管储水杯 ^a (n=44)	送气管储水杯 ^a (n=44)	吸痰管消毒瓶 (n=11)	吸痰碗气道侧 (n=11)	临床分离株
2 床					25-2B		F2	G2	医院感染 AB
4 床				J4	24-4B	24-4A/25-4A			外院带入 AB
5 床					D5	23-5A		G5	医院感染 AB
7 床									医院感染 AB
8 床		B8		J8	D8			G8	医院感染 AB
9 床			C9		23-9B		F9		医院感染 AB
10 床								G10	医院感染 AB
12 床				J12					铜绿假单胞菌
14 床				J14					金黄色葡萄球菌
15 床		B15			D15			G15	外院带入 AB
16 床					D16				医院感染 AB

因 1、3、6、11、13 床未住患者,因此未进行环境采样

a:呼/送气管储水杯连续监测 4 d

2.2 AB 的耐药性分析 AB 临床分离株和环境分离株对 15 种抗菌药物的耐药情况见表 2。药敏结

果显示,临床分离株普遍存在多重耐药。24 株环境分离株中 19 株为多重耐药,与临床分离株有着相似

的耐药谱,对青霉素类、β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂复合物、头孢类 100% 耐药;而环境样本分离的非

流行株对抗菌药物的敏感性明显高于流行菌株,如 B8、D8、D15、J12。

表 2 AB 临床分离株和环境分离株对抗菌药物的耐药分析

Table 2 Drug resistance of *A. baumannii* isolated from patients and environmental samples

编号	PFP	TZP	TIM	CAZ	CTX	FEP	CRO	IPM	MEM	AMK	GEN	MIN	CIP	LVX	SXT	β-La
2	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	I	R	R	R	+
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	+
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	+
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	R	R	S	+
15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	S	+
8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	+
10	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	+
16	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	R	R	R	+
9	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	R	I	R	+
D5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	+
23-5A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	+
G5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	+
25-4A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	+
G2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	+
F2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	+
B15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	+
G8	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	+
C9	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	+
D16	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
F9	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	+
G15	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	+
J4	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
J8	R	R	I	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
J14	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
23-9B	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
24-4A	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
24-4B	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
25-2B	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	+
G10	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	+
J12	R	I	I	I	R	I	R	S	S	S	I	S	R	R	S	+
D8	I	I	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	+
D15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+
B8	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	+

S:敏感;I:中介;R:耐药;+:阳性

编号中数字代表对应床号所住患者临床分离 AB;23-5A 代表 23 日 5 床患者送气呼吸管储水杯分离的 AB;23-9B 代表 23 日 9 床患者呼气呼吸管储水杯分离的 AB,余以此类推

2.3 AB 的同源性分析 采用 REP-PCR 对临床分离株和环境分离株进行 DNA 的同源性分析。根据较通用的辨定标准,出现一条大小位置不同的条带时,即认为是不同克隆株,条带产物量的多少不作为判定的因素^[3]。REP-PCR 结果显示,9 株临床分离株分别属于 4 个基因型,即 E1、E2、E3、E4,其中 9、4、2、16 床的患者所感染的病原菌为同一克隆株 E1;7、8、15 床的患者所感染的病原菌为同一克隆株 E2;10 床和 5 床患者感染的病原菌分别属于 E3 和 E4 基因型。见图 1。

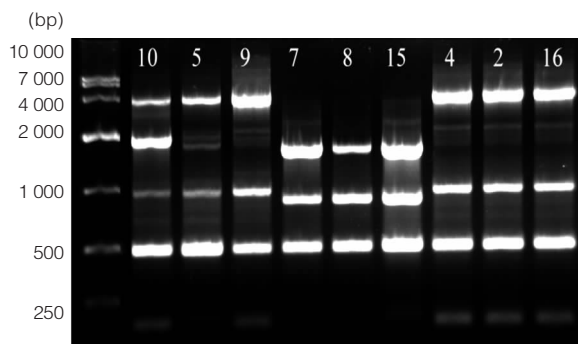


图 1 临床分离株 REP-PCR 电泳结果
Figure 1 Repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction fingerprints of *A. baumannii* from clinical isolates

REP-PCR 分析 24 株环境分离株,结果显示,F2、G2、J4、G5、G8、J8、C9、F9、G10、G15、D16、23-5A、23-9B、24-4A、24-4B、25-4A、25-2B 属于 E1 基因型;J14 属于 E2 基因型。环境分离株中多重耐药菌都属于本次流行的 E1 和 E2 基因型。见图 2。

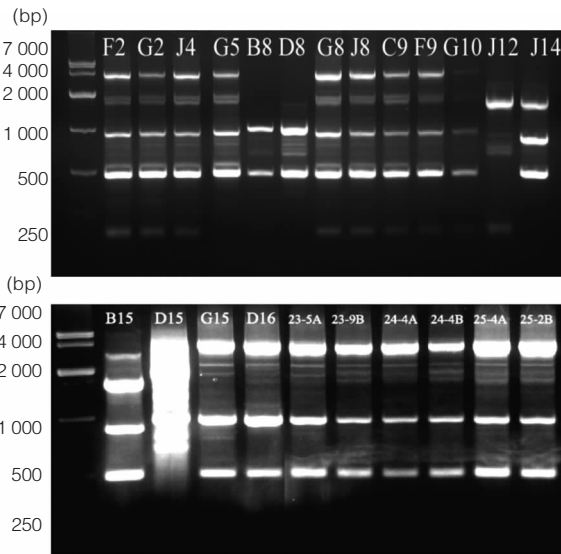


图 2 环境分离株 REP-PCR 电泳结果

Figure 2 Repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction fingerprints of *A. baumannii* from environmental isolates

3 讨论

AB 是医院感染常见的条件致病菌,近年关于 AB 引起的医院感染暴发流行的报道次数明显增加^[2,4]。本次 AB 引起 ICU 感染流行,住 ICU 的 12 例患者中有 9 例分离出多重耐药的 AB。我们采用 REP-PCR 方法建立指纹图谱及耐药谱,分析流行菌株的同源性。同时采集了大量的环境样本进行分离鉴定,以确定感染源头,及时切断感染途径。

REP-PCR 是分子分型各种技术中运用较为广泛的技术之一,它具有高分辨力、简单易行和良好的可再现性等特点,决定了其在目前以及今后一段时间内是最佳的病原微生物分子分型技术^[5]。本组 REP-PCR 结果表明,此次 AB 的流行主要有 4 种基因型,其中 E1 和 E2 是主要流行株的基因型。在 9 例 AB 感染患者中,有 2 例在转入我院 ICU 之前痰培养 AB 阳性,且基因型分别为 E1、E2 型。以上实验结果提示,此次 AB 的流行可能是由于外院带菌患者转院与本院 ICU 患者的交叉感染引起。

由于 AB 院内流行与环境、医疗器械的污染有

很强的关联性^[6],因此,我们对 ICU 整个环境进行了采样分析。病床间的隔帘、运送支纤镜推车的物体表面、治疗室及医生办公室的洗手皂液、病床间、医生办公室及茶水间的自来水、进入病房的内进门把手及医护人员对患者实施医疗护理后或洁肤柔消毒后的手采样培养等,均未分离到 AB;然而,11 个床边回风口防护网的检查中发现 4 个风口防护网分离出 AB,其中 3 株菌的基因型为此次流行株基因型。因此,我们推测此次 AB 的流行可能是通过含有 AB 菌的气溶胶经空气流动传播。同时在 2 例已经确定 AB 感染患者的床栏(C9)及治疗车物表(B15)分离出 AB,且菌株分别与相对应的临床分离株的基因型相同。尽管在抽查医护人员的手卫生时未分离到 AB,但也不能排除因接触患者而使病原菌扩散的可能性。

我们同时对呼/送气管中冷凝水、吸痰管消毒瓶及吸痰碗气道侧表进行了监测。4 例患者的呼气管冷凝水中、2 例患者的吸痰管消毒瓶分离出的 AB 为基因型 E2,与临床分离株同源;吸痰碗内表面共分离出 5 株 AB,均与此次主要流行菌株同源。这些极易被患者污染的物品分离出病原菌属于正常现象,但同时也表明,这些物品极有可能成为患者再次感染的源头。我们在事件发生后,连续 3 天监测 ICU 所有住院患者呼/送气管冷凝水,发现仍有 3 例患者的冷凝水中存在与临床分离株同源的 AB。有报道^[7],在接近插管处的冷凝水中平均细菌浓度可高达 2×10^5 CFU/mL,是引发呼吸机相关性肺炎的重要污染源。日常护理工作中,要求将储水瓶保持在呼吸管路的最低位,及时排空储水瓶,以防止冷凝水反流。但对吸痰管消毒瓶及吸痰碗的更换时间的研究并未见相关报道。

此次 AB 的流行发生在春节前夕,虽然医院已准备充足的人员与物质,但在节前工作人员精神上的放松是事件发生不可忽视的原因。因此,节前对医院感染重点科室进行防止医院感染的强调是有必要的。事件发生后,ICU 采取了相应的消毒隔离措施,迅速控制了交叉感染的蔓延。

[参考文献]

- [1] Bergogne-Bérézin E, Towner K J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features [J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9(2): 148 - 165.

二重感染。本次研究对入住 ICU 前及入住 ICU 后抗菌药物的使用分别进行了分析,单因素分析时均显示有统计学意义,但在多因素分析时却未发现抗菌药物的使用与鲍曼不动杆菌感染有关。可能与入住 ICU 的患者多为转科或转院,多数患者在入住前已接受过抗菌药物的治疗,而入住该 ICU 的患者大多数都有并存感染,抗菌药物使用率极高,在病例组与对照组间无差别有关。但也有可能是 ICU 鲍曼不动杆菌医院感染与抗菌药物的使用无关,这需要在多家医院收集更多的病例资料来深入研究。

侵入性治疗也常被认为是医院感染的危险因素。在进行侵入性操作时常会破坏机体正常的黏膜屏障,还有可能将外界的微生物带入而导致感染。内科 ICU 的侵入性操作主要为呼吸道、消化道、泌尿道及血液系统 4 个方面。我们对这 4 个方面分别进行了分析,发现留置鼻饲管及使用呼吸机是鲍曼不动杆菌医院感染的独立危险因素,并且其危险性随着留置鼻饲管及使用呼吸机天数的增加而增大。大多数机械通气的患者处于应激状态,能量消耗增加,机体抵抗力和排痰功能的下降,均增加了感染的机会。而留置鼻饲管则可能造成消化道分泌物的反流,并使胃液酸度降低,胃内细菌大量繁殖,增加呼吸道、消化道感染的可能性。

综上所述,在 ICU 中,治疗原发病的同时应尽量改善患者的机体情况,增强患者的免疫力,减少各种侵入性操作,重视对患者的关怀,这对减少鲍曼不动杆菌医院感染的发生具有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] 罗彦丽. 综合 ICU 病房 10 年间病菌构成及耐药性变迁分析 [J]. 中国现代医药杂志, 2009, 11(1): 85 - 88.

[2] 曾峰, 潘桂常, 林雅. 内科 ICU 和呼吸科病房临床分离菌的变迁及耐药性监测研究 [J]. 现代医院, 2008, 8(11): 10 - 13.

[3] Perez F, Hujer A M, Hujer K M, et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471 - 3484.

[4] 熊劲芝, 黄强, 王红卫, 等. 鲍曼不动杆菌感染分布及耐药性分析 [J]. 中国感染控制杂志, 2009, 8(2): 120 - 121.

[5] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行) [J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5): 314 - 320.

[6] 王力红, 马文晖, 张京利, 等. APACHE-II 评分与医院感染相关性研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(6): 651 - 653.

[7] 刘丁, 陈萍, 陈伟, 等. 鲍曼不动杆菌医院感染的危险因素及基因分型研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(2): 140 - 142.

[8] 齐晓红, 区少珍. ICU 患者医院感染危险因素监测分析 [J]. 中国感染控制杂志, 2005, 4(2): 142 - 144.

[9] 许能锋, 李阳, 陈娟娟, 等. 医院感染危险因素病例对照研究 [J]. 中国感染控制杂志, 2005, 4(2): 127 - 130.

[10] Bergogne-Bérézin E, Towner K J. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features [J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9(2): 148 - 165.

[11] 魏雪芳. 合肥地区部分医院医院感染的流行病学研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2003.

[12] 谈藏文, 吴光驰, 周新宇. 肺炎和腹泻患儿维生素 A 状况的分析 [J]. 中国儿童保健杂志, 2001, 9(3): 168 - 171.

[13] Laaksi I, Ruohola J P, Tuohimaa P, et al. An association of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 86(3): 714 - 717.

(上接第 9 页)

[2] Chang H L, Tang C H, Hsu Y M, et al. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan [J]. Infect Control and Hosp Epidemiol, 2009, 30(1): 34 - 38.

[3] 张志臣, 张秀奎, 张元媛, 等. 呼吸机管路系统管理与呼吸机相关性肺炎 [J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(4): 323 - 324.

[4] Scott P, Deye G, Srinivasan A, et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex* infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(12):

1577 - 1584.

[5] Olive D M, Bean P, et al. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1661 - 1669.

[6] Denton M, Wilcox M H, Parnell P. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit [J]. Intensive Crit Care Nurs, 2005, 21(2): 94 - 98.

[7] 张婧, 徐丁, 田菲, 等. 鲍曼不动杆菌的基因分型及耐药性分析 [J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(4): 372 - 374.