

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2015.06.002

· 论 著 ·

医院环境中物体表面碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌污染及同源性分析

秦 瑾, 闻海丰

(河北医科大学第三医院, 河北 石家庄 050051)

[摘要] 目的 调查某院重点部门物体表面碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌污染情况及其同源性。方法 对该院重症监护室(ICU)、急诊重症监护室(EICU)、血液透析室、手术室进行环境卫生学监测,采用肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR),对 ICU、EICU 环境中污染的条件致病菌鲍曼不动杆菌进行扩增分型。结果 除 EICU 医务人员手卫生结果达标外,ICU 及 EICU 各检测项目细菌计数均不达标;血液透析室及手术室采样标本均合格。ICU、EICU 物体表面共采集标本 53 份,检出鲍曼不动杆菌 7 株,检出率为 13.21%;此 7 株菌均为碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌,其中 6 株基因型相同,与患者痰中分离的鲍曼不动杆菌基因型相同。结论 该院重点部门环境中物体表面分离的碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌具有同源性,应加强其环境物体表面清洁与消毒,降低医院感染的发生。

[关键词] 物体表面;重症监护室;鲍曼不动杆菌;重复序列聚合酶链反应;同源性

[中图分类号] R181.3⁺2 R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)06-0366-04

Contamination and homology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital environmental object surface

QIN Jin, WEN Hai-feng (The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the contamination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) from object surface of key departments in a hospital, and identify whether these CRAB were homologous. **Methods** Environmental hygienic monitoring in intensive care unit (ICU), emergency intensive care unit (EICU), hemodialysis room and operating room was conducted. *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) isolated from ICU and EICU environmental specimens were amplified and typed by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). **Results** Except hand hygiene of health care workers in EICU was qualified, bacterial count of object surface of ICU and EICU were all unqualified; detection results of specimens from hemodialysis room and operating room were all qualified. A total of 53 specimens were taken from object surface of ICU and EICU, 7 (13.21%) *A. baumannii* isolates were isolated, and all were CRAB isolates, 6 of which were of the same genotype and were identical with *A. baumannii* from patients' sputum. **Conclusion** CRAB isolated from object surface in key departments is homologous, cleaning and disinfection of environmental object surface should be intensified to reduce the occurrence of healthcare-associated infection.

[Key words] object surface; intensive care unit; *Acinetobacter baumannii*; repetitive sequence-based polymerase chain reaction; homology

[Chin Infect Control, 2015, 14(6): 366-369]

[收稿日期] 2014-12-20

[基金项目] 中华医院感染控制研究基金课题(ZYGY028);河北省卫生计生厅重点科技研究计划(20110099)

[作者简介] 秦瑾(1983-),女(汉族),河北省衡水市人,主治医师,主要从事多重耐药菌同源性研究。

[通信作者] 秦瑾 E-mail:shouliudan830313@163.com

医院环境物体表面在特殊情况下可作为病原体的传播媒介和储菌源,具有引起医院感染暴发的潜在危险性,特别是医疗设备按钮,因其医疗过程中必不可少,医护人员常由于不注意手卫生而导致操作键盘的污染。本研究根据全院环境监测资料,选取感染控制重点科室,如重症监护室(ICU)、急诊重症监护室(EICU)、血液透析室、手术室中具有代表性的医疗设备物体表面进行采样。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2012 年 9—10 月对某院 ICU、EICU、血液透析室、手术室进行环境卫生学监测。ICU 及 EICU 采样点主要为 ICU 吊塔台面、医疗设备按钮(其中包括:呼吸机按钮、心电监护按钮、输液泵、血糖仪等)、床旁扶手、床单位升降按钮,以及医护人员手。血液透析室采样点为操作台面、透析机按钮、床旁扶手,以及医护人员手。手术室采样点为操作台面、麻醉设备操作按钮、手术床,以及医护人员手。本院使用中的医疗设备物体表面采样均选在上午 11 点(注:擦拭消毒时间均在上午 8 点进行)。

1.2 样本采集、检测及结果判断 按照 2012 年《医疗机构消毒技术规范》^[1] 物体表面消毒效果监测中标本采样及检测方法进行采样及检测,分离菌株经 ID32E 鉴定试剂卡进行鉴定。结果判断按照 2012 年《医疗机构消毒技术规范》中的要求:手术室、ICU 物体表面细菌菌落总数 ≤ 5 CFU/cm², 血液透析中心(室)物体表面细菌菌落总数 ≤ 10 CFU/cm²。皮肤消毒效果的判定标准按照《医务人员手卫生规范》^[2] 外科手消毒卫生标准^[2]: 卫生手消毒后的菌落总

数应 ≤ 10 CFU/cm², 外科手消毒后的菌落总数应 ≤ 5 CFU/cm²。

1.3 药敏试验 采用琼脂纸片扩散法(K-B 法),按美国临床实验室标准化协会(CLSI)2011 年标准判读结果^[3]。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.4 基因分型 采用肠杆菌科基因间重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)对菌株进行同源性分析。

1.4.1 引物序列 ERIC-PCR 引物^[4-5]为:ERIC1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3', ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'。

1.4.2 反应体系 ERIC1:(10 μ mol/L) 2 μ L, ERIC2:(10 μ mol/L) 2 μ L, DNA 模板 5 μ L, PCR 超纯水 16 μ L, PCR 反应液 Green PCR Master Mix(2 \times) 25 μ L, 总反应体积为 50 μ L。

1.4.3 PCR 热循环参数 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min。

1.4.4 PCR 扩增产物电泳 取 5 μ L 扩增产物进行电泳,电泳条件为 2% 琼脂糖凝胶,电泳缓冲液 1 \times TAE 溶液,电压 110 V,电泳时间 45 min。电泳结束后用凝胶成像仪观察,并与 DNA Marker DL2000 进行对比。

1.5 统计学分析 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 医院环境物体表面细菌污染情况 ICU、EICU、血液透析室、手术室物体表面污染情况见表 1。除 EICU 医务人员手卫生结果达标外,ICU 及 EICU 各检测项目细菌计数均不达标;血液透析室及手术室采样标本均合格。

表 1 医院环境物体表面细菌污染情况(CFU/cm²)

Table 1 Bacterial contamination of environmental object surface in hospital(CFU/cm²)

采样点	ICU		EICU		血液透析室		手术室	
	采样份数	菌落数	采样份数	菌落数	采样份数	菌落数	采样份数	菌落数
台面	15	15.60 \pm 7.61	4	12.18 \pm 1.64	10	0.17 \pm 0.27	15	0.00 \pm 0.00
医疗设备按钮	15	5.25 \pm 1.78	4	19.04 \pm 4.22	30	0.22 \pm 0.19	15	0.43 \pm 0.51
床旁扶手	6	12.83 \pm 8.16	2	21.93 \pm 1.97	15	0.10 \pm 0.14	-	-
医务人员手	5	15.76 \pm 9.76	2	3.01 \pm 1.31	10	0.19 \pm 0.16	5	0.07 \pm 0.12

-: 手术室中床单位无床旁扶手,未作统计。

2.2 ICU、EICU 物体表面鲍曼不动杆菌检出情况 ICU、EICU 物体表面共采集标本 53 份,检出鲍曼不动杆菌 7 株,检出率为 13.21%。见表 2。

2.3 药敏试验结果 8 株鲍曼不动杆菌,其中菌株 1 来自于患者痰标本,菌株 2—8 来自于物体表面,其对常用抗菌药物的耐药情况见表 3。

表 2 ICU、EICU 物体表面鲍曼不动杆菌检出情况

Table 2 Isolation of *A. baumannii* from object surface in ICU and EICU

采样点	ICU			EICU		
	采样份数	检出株数	检出率 (%)	采样份数	检出株数	检出率 (%)
台面	15	1	6.67	4	1	25.00
设备按钮	15	2	13.33	4	1	25.00
床旁扶手	6	1	16.67	2	1	50.00
医务人员手	5	0	0.00	2	0	0.00

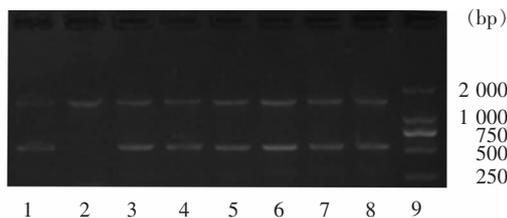
表 3 8 株鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的耐药情况

Table 3 Antimicrobial resistance of 8 *A. baumannii* isolates

抗菌药物	菌株编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
哌拉西林	R	R	R	R	R	R	R	R
哌拉西林/他唑巴坦	R	R	R	R	R	R	R	R
头孢曲松	R	R	R	R	R	R	R	R
头孢哌酮	R	R	R	R	R	R	R	R
头孢他啶	R	R	R	R	R	R	R	R
头孢吡肟	R	R	R	R	R	R	R	R
头孢哌酮/舒巴坦	S	S	S	S	I	S	S	S
亚胺培南	R	R	R	R	R	R	R	R
阿米卡星	R	R	R	R	R	R	R	R
庆大霉素	R	R	R	R	R	R	R	R
左氧氟沙星	R	S	I	R	R	I	R	R
环丙沙星	R	R	R	R	R	R	R	R

S:敏感, I:中介, R:耐药

2.4 ERIC-PCR 基因分型结果 ICU、EICU 物体表面分离的 7 株多重耐药鲍曼不动杆菌经 ERIC-PCR 分型,分为 2 个基因型,根据电泳条带的多少及分子量不同分别用 A、B 表示(见图 1),其中 A 型 6 株, B 型 1 株。A 型为主要的流行株,分布在 ICU、EICU 物体表面,与患者痰中分离的鲍曼不动杆菌基因型相同。



泳道 1 为患者痰标本; 2—8 为物体表面标本; 1 与 3—8 为 A 型, 2 为 B 型; 9 为 DNA Marker DL2000

图 1 鲍曼不动杆菌 ERIC-PCR 基因分型结果

Figure 1 Molecular profile of *A. baumannii* by ERIC-PCR

3 讨论

血液透析室、手术室环境物体表面(台面、医疗设备按钮、床旁扶手)和医务人员手进行细菌菌落计数,血液透析室及手术室采样标本结果较好,均达到要求。除 EICU 的医务人员手卫生结果达标,ICU 与 EICU 各检测项目的细菌计数均高于血液透析室和手术室,结果不理想。病原菌在物体表面存活能力很强,当物体表面被污染后,隐患将持续存在^[6],其中医院感染常见的不动杆菌在干燥物体表面存活时间可达 3 d 至 5 个月,肠球菌属细菌存活时间可达 5 d 至 4 个月,金黄色葡萄球菌存活时间可达 7 d 至 7 个月,作为医院感染高发科室 ICU、EICU 医务人员手和医疗设备细菌菌落总数超标,可导致病原菌通过污染的物体表面发生接触传播。本研究 53 份标本中检出多重耐药鲍曼不动杆菌 7 株,阳性率为 13.21%, 低于 Aygun 等^[7]报道的 39.3%。

鲍曼不动杆菌作为医院感染的重要病原菌^[8-9],由于其较强的耐干燥能力,能够在医院环境中长期存活,增加了病原菌通过接触传播发生医院感染的概率。易感者主要为住院时间长、免疫力低下、进行侵入性操作(呼吸机插管、留置导尿管、静脉插管、手术等)的患者。碳青霉烯类抗生素曾是治疗鲍曼不动杆菌重症感染的首先药物,其中代表性的抗菌药物为亚胺培南与美罗培南。随着该类药物的广泛使用,近年来鲍曼不动杆菌对此类药物也出现了严重的耐药。本研究中,环境物体表面分离的 7 株鲍曼不动杆菌对头孢哌酮/舒巴坦均未表现出耐药,但对亚胺培南的耐药率高达 100%。

为探索鲍曼不动杆菌的流行和传播方式,许多分子分型方法用于鲍曼不动杆菌的流行病学调查,如脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技术、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)和以 PCR 为基础的分型方法有随机引物 PCR(random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, RAPD-PCR)、重复序列 PCR 和扩增限制性片段长度多态性分析(amplified fragment length polymorphism, AFLP)等。重复序列 PCR 技术又分为基因外重复回文序列(repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction, REP-PCR)和 ERIC-PCR 两种。ERIC 是由 Sharples 等^[10]在大肠埃希菌中发现的,在 ERIC 的中心有一段长约 44 bp 的保守性很强的反向重复序列,Versalovic 等^[11]根据这一重复序列发展了 ERIC-PCR 技术,ERIC 在不同种属甚至同一种不同菌株之间的拷贝数和定位都不同,被用于

本研究通过对医院感染高危科室 ICU、EICU、

细菌基因组图谱的研究。由于该方法简便,结果可靠,适合于大批量菌株的分类和鉴定。本研究 7 株鲍曼不动杆菌经 ERIC-PCR 分型,其中 6 株为相同基因型(A 型),这表明 6 株鲍曼不动杆菌可能具有同源性,而且此 6 株鲍曼不动杆菌与患者痰标本分离的鲍曼不动杆菌基因型相同。医院环境物体表面出现与患者痰具有同源性的多重耐药菌,提示有医院感染鲍曼不动杆菌的潜在高风险性。对于 ICU 及 EICU 涉及多科室患者,若感染控制措施欠缺,易导致本科室患者感染多耐药鲍曼不动杆菌,并且将此细菌传播至各医院科室,引起全院多重耐药鲍曼不动杆菌暴发。本次鲍曼不动杆菌同源性研究及药敏试验进一步证实多重耐药菌医院感染传播的可能性,此型菌株在本院呈科室间流行状态。虽然研究的结果很难判断物体表面的鲍曼不动杆菌与患者感染鲍曼不动杆菌之间的因果关系,但其相关性应该引起我们的关注。进一步明确耐药基因型流行趋势与科室的关系,还需积累更多的临床菌株进行研究。通过同源性研究数据,可以为临床医生用药提供依据,特别是临床广泛使用的碳青霉烯类抗生素(如亚胺培南),不应该再作为医院感染鲍曼不动杆菌患者的经验用药。

有效预防接触感染的发生,是控制医院获得性感染发生的重要环节^[12]。污染的医护人员手和医疗设备的物体表面可作为媒介,在医护人员诊疗和护理操作过程中经医疗设备/床单元-医务人员手-患者引起接触感染。Alfandaria 等^[13]通过加强手卫生,采取患者隔离,环境清洁与消毒等措施,有效控制了 ICU 中鲍曼不动杆菌医院感染的暴发。Consales 等^[14]同样研究证实,采取环境干预可有效降低感染发生率。本课题组对临床分离鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因携带的研究^[15]中发现,临床中常用浓度的含氯消毒剂可有效将鲍曼不动杆菌杀灭,提示医院物体表面细菌菌落数超标的隐患存在于含氯消毒剂的不规范使用。所以,合理的消毒剂浓度配比,执行对高危科室物体表面擦拭消毒,可有效预防医院获得性感染的发生。

[参 考 文 献]

[1] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构消毒技术规范[S]. 北京, 2012, 13-19.

- [2] 中华人民共和国卫生部. WS/T311-2009 医务人员手卫生规范[S]. 北京, 2009.
- [3] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement, M100-S21 [S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- [4] Fouad M, Attia AS, Tawakkol WM, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring the OXA-23 carbapenemase in intensive care units of Egyptian hospitals [J]. Int J Infect Dis, 2013, 17(12): e1252-1254.
- [5] Eser OK, Ergin A, Tunckanat F, Hascelik G. In vitro activity of tigecycline as a therapeutic option against multidrug-resistant *Acinetobacter spp.* [J]. New Microbiol, 2008, 31(4): 535-542.
- [6] 朱仁义,沈伟. 从循证医学角度看物体表面消毒在医院感染预防和控制中的作用[J]. 中国消毒学杂志, 2008, 25(1): 60-63.
- [7] Aygün G, Demirkiran O, Utku T, et al. Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit[J]. J Hosp Infect, 2002, 52(4): 259-262.
- [8] Cristina ML, Spagnolo AM, Cenderello N, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak: an investigation of the possible routes of transmission[J]. Public Health, 2013, 127(4): 386-391.
- [9] 黄勋,邓子德,倪语星,等. 多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(1): 1-9.
- [10] Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6503-6508.
- [11] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [12] 周燕飞,邓敏. 连续 3 年临床分离鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(1): 42-44.
- [13] Alfandari S, Gois J, Delannoy PY, et al. Management and control of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit[J]. Med Mal Infect, 2014, 44(5): 229-231.
- [14] Consales G, Gramigni E, Zamidei L, et al. A multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit: antimicrobial and organizational strategies[J]. J Crit Care, 2011, 26(5): 453-459.
- [15] 于文静,闻海丰,秦瑾,等. 临床分离鲍曼不动杆菌耐消毒剂基因携带情况分析及其消毒对策[J]. 河北医药, 2014, 36(6): 825-828.

(本文编辑:李春辉)