

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.07.003

· 论 著 ·

## 内科重症监护病房铜绿假单胞菌医院感染同源性及临床特点

张萍<sup>1,2</sup>, 刘红梅<sup>3</sup>, 陈愉<sup>1</sup>, 赵思宏<sup>1</sup>, 李玉荣<sup>2</sup>, 宋争昌<sup>4</sup>, 赵立<sup>1</sup>

(1 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110004; 2 沈阳市第四人民医院, 辽宁 沈阳 110031; 3 朝阳市第四人民医院, 辽宁 朝阳 122000; 4 泰山医学院附属医院, 山东 泰山 271000)

**[摘要]** **目的** 研究内科重症监护病房(MICU)铜绿假单胞菌(PA)医院感染的同源性及临床特点,以指导临床预防 PA 传播,提高治疗效果。**方法** 对某院 2014 年 1—12 月 MICU 发生医院感染的 25 例患者分离的 55 株 PA 进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)同源性分析及聚类分析,对其临床特点、耐药性及其传播特点进行分析。**结果** 共调查 25 例患者,平均年龄为(69.62±2.13)岁,平均住院时间(49.34±3.18)d;在分离出 PA 之前,84.00%的患者应用广谱抗菌药物>2 周,76.00%的患者入住过 MICU,52.00%的患者使用呼吸机辅助通气。55 株 PA 主要以 A、F、H、K、N、V、W 型为主要的流行菌株;感染 A 型、F 型、H 型及 K 型菌株的患者在各自住院时间上均存在交叉;有 4 例患者不同时期分离菌株的 PFGE 图谱分析显示不同菌型;PA 对头孢他啶(72.73%)、哌拉西林/他唑巴坦(70.91%)、亚胺培南(70.91%)耐药率高,对阿米卡星耐药率最低(25.45%)。**结论** 医疗机构应加强抗菌药物管理,加强医院感染控制措施,防止多重耐药和泛耐药细菌在医院内的播散。

**[关键词]** 重症监护病房;铜绿假单胞菌;脉冲场凝胶电泳;同源性;传播特点;临床分析

**[中图分类号]** R378.99<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)07-0600-06

## Homology and clinical characteristics of healthcare-associated infection with *Pseudomonas aeruginosa* in medical intensive care unit

ZHANG Ping<sup>1,2</sup>, LIU Hong-mei<sup>3</sup>, CHEN Yu<sup>1</sup>, ZHAO Si-hong<sup>1</sup>, LI Yu-rong<sup>2</sup>, SONG Zheng-chang<sup>4</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup> (1 Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; 2 The Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, China; 3 The Fourth People's Hospital of Chaoyang, Chaoyang 122000, China; 4 Affiliated Hospital of Taishan Medical University, Taishan 271000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the homology and clinical characteristics of healthcare-associated infection(HAI) due to *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) in medical intensive care unit (MICU), so as to guide the clinical prevention of *P. aeruginosa* transmission and improve therapeutic effect. **Methods** 55 *P. aeruginosa* strains isolated from 25 patients with HAI in the MICU of a hospital in January-December 2014 were performed pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) homology analysis and clustering analysis, clinical characteristics, antimicrobial resistance, and transmission characteristics were analyzed. **Results** A total of 25 patients were investigated, with an average age of (69.62±2.13) years, mean hospital stay (49.34±3.18) days; prior to the isolation of *P. aeruginosa*, 84.00% of patients were treated with broad-spectrum antimicrobial agents for >2 weeks, 76.00% of patients had been admitted to MICU, and 52.00% had a ventilator-assisted ventilation. 55 strains of *P. aeruginosa* were mainly A, F, H, K, N, V, and W, which were the main epidemic strains; patients infected with A, F, H and K strains all had cross in their hospital stay; PFGE profiles of isolates from 4 patients during different periods showed different strain patterns; resistance rates of *P. aeruginosa* to ceftazidime (72.73%), piperacillin/tazobactam (70.91%), and imipenem (70.91%) were all high, resistance rate to amikacin was the lowest (25.45%).

**[收稿日期]** 2016-07-24

**[作者简介]** 张萍(1987-),女(汉族),辽宁省铁岭市人,医师,主要从事老年患者肺部感染性疾病的防治研究。

**[通信作者]** 陈愉 E-mail:chenyusy@hotmail.com

**Conclusion** Management of antimicrobial agents should be strengthened in medical institutions, HAI control measures should be strengthened, so as to prevent the transmission of multidrug-resistant and extensively drug-resistant bacteria in hospitals.

**[Key words]** intensive care unit; *Pseudomonas aeruginosa*; pulsed-field gel electrophoresis; homology; spread characteristic; clinical analysis

[Chin J Infect Control, 2017, 16(7): 600-605]

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属于非发酵菌类假单胞菌属。广泛分布于自然界及人和动物体表、肠道中,是一种常见的条件致病菌,尤其在医院环境中 PA 检出率很高。由于 PA 具有易定植、易变异、易耐药等特征,防治多重耐药铜绿假单胞菌(MDR-PA)感染已成为医院感染监测的重点。根据美国医院流行病学协会<sup>[1]</sup>推荐的常见病原菌分型鉴定方法,PA 推荐分型是使用脉冲场凝胶电泳(PFGE),此技术具有很高的特异性和分辨力,能够较好的反映流行病学相关性,是公认的医院感染调查最好的分型方法。本研究对某院 2014 年 1—12 月内科重症监护病房(MICU)发生医院感染的 25 例患者分离出的 55 株 PA 进行 PFGE 同源性分析及聚类分析,对其临床特点、耐药性及传播特点进行分析,以指导临床预防 PA 的传播,提高治疗效果。

## 1 资料与方法

**1.1 资料来源** 选取 2014 年 1—12 月某院 MICU 发生医院感染的 25 例患者,共分离 55 株 PA,其中 52 株来自痰,3 株来自导管引流液。收集并分析 25 例 MICU 患者的临床资料。医院感染诊断标准依据卫生部 2001 年颁发的《医院感染诊断标准(试行)》<sup>[2]</sup>。

**1.2 试剂和仪器** 蛋白酶 K(日本 TaKaRa 公司), SpeI 限制性内切酶(美国 Promega 公司), $\lambda$ Marker、低熔点琼脂糖、CHEF-Mapper XA 型脉冲电泳仪、GIS-700D 数码图像扫描分析系统(美国 Bio-Rad 公司),低温高速台式离心机(美国科峻公司)。

**1.3 PFGE 检测** 将细菌接种于 LB 肉汤振荡培养过夜,12 000 r/min 离心 1 min;CSB 缓冲液 1 mL 洗涤后,8 000 r/min 离心 5 min,弃去上清;应用 EC 缓冲液调整菌液浊度,用 2% 的低熔点琼脂糖迅速混匀加入模具,用蛋白酶 K 进行裂解;加入限制性内切酶 SpeI,37 ℃、24 h 进行酶切;酶切后小胶块包埋于 1% 琼脂糖凝胶中,使用 CHEF Mapper XA 系

统进行电泳;将凝胶置于 EB 溶液中染色,应用紫外透射仪进行拍照。结果参照 Tenover 等<sup>[3]</sup>方法,如 PFGE 图谱一致,说明为相同菌株;1~3 条带不同说明菌株间有相近关系,只有单基因的改变;4~6 条带不同说明菌株间可能有相近关系,有 2 个基因的改变;6 条及以上条带不同,说明有 3 个或更多基因的变化,视为无相关性。

**1.4 聚类分析** 根据 PFGE 电泳的基因图谱将条带转换为二进制数据,其中“1”代表有,“0”代表无。将数据导入 SPSS 16.0 统计软件中,应用谱系聚类分析绘制树状图。

**1.5 药敏试验** 采用美国临床实验室标准化协会(CLSI)2014 年版推荐的纸片扩散(K-B)法测定 55 株 PA 对 9 种抗菌药物的耐药率。敏感性判定根据 CLSI 的标准进行判读。

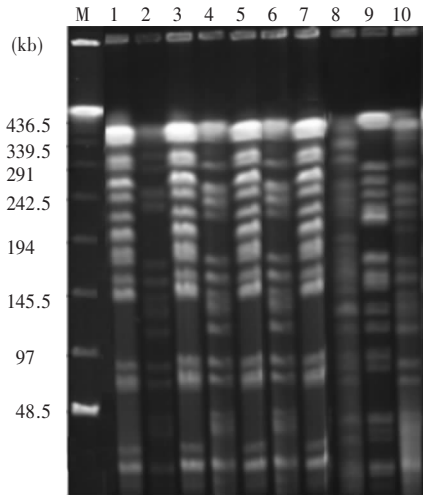
## 2 结果

**2.1 一般情况** 共调查 25 例患者,其中男性 18 例,女性 7 例;平均年龄为(69.62 ± 2.13)岁,平均住院时间(49.34 ± 3.18)d;既往有高血压、糖尿病及冠心病等不同基础疾病的患者 19 例。

**2.2 临床资料** 20 例患者有发热,体温为 37.4~40.0 ℃。23 例患者伴有咳嗽、咳痰,其中 1 例患者痰中带血,所有患者肺部听诊均为呼吸音粗或散在干湿啰音。实验室检查结果显示 18 例患者白细胞升高,11 例患者丙氨酸氨基转移酶升高,11 例患者有低蛋白血症。所有患者胸部放射线检查均提示肺部多叶段炎症。患者在分离 PA 之前,均使用过广谱抗菌药物,在分离 PA 之后,根据药敏结果选用抗菌药物治疗,同时还给予化痰及调节免疫等治疗。经系统诊治,3 例患者死亡,年龄均 >60 岁,既往均有基础疾病。18 例患者病情好转出院,2 例患者未待病情稳定自行出院,2 例患者病情相对平稳,仍呼吸机辅助通气继续住院治疗。

**2.3 危险因素** 25 例患者中 19 例(76.00%)患者既往有基础疾病;17 例(68.00%)患者年龄 >60 岁;

既往有手术史患者 12 例(48.00%),其中气管切开后患者 6 例。在分离出 PA 之前,21 例(84.00%)患者应用广谱抗菌药物 2 周以上;19 例(76.00%)患者入住过 MICU;13 例(52.00%)患者行呼吸机辅助通气;12 例(48.00%)患者使用呼吸机超过 1 周;11 例(44.00%)患者有低蛋白血症;7 例(28.00%)患者留置导尿管;4 例(16.00%)患者应用糖皮质激素。



M:Marker;1,3,5,7 为 A 型菌株;2,4,6 为 F 型菌株;8 为 H 型菌株;9 为 K 型菌株;10 为 V 型菌株

图 1 铜绿假单胞菌 PFGE 图谱

Figure 1 PFGE map of *P. aeruginosa*

2.4 PFGE 电泳结果 55 株 PA 染色体经酶切后,产生 15~23 条 DNA 片段,片段大小约为 20~420 kb,见图 1。聚类分析结果可见,PA 为 A~W 共 23 型,其中 A、F、H、K、N、V、W 型为主要的流行菌株;其中 A 型 6 株,分 2 个亚型(48 号、51 号、52 号、54 号及 55 号为同一亚型),F 型 5 株,H 型 4 株,K 型 7 株,N 型 3 株,V 型 7 株;W 型 3 株,分 2 个亚型(28 号和 30 号为同一亚型)。见图 2。

2.5 药敏结果 55 株 PA 对头孢他啶的耐药率为 72.73%、对哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南的耐药率均为 70.91%;对阿米卡星的耐药率最低,为 25.45%。对其他常见抗菌药物的耐药情况见表 1。

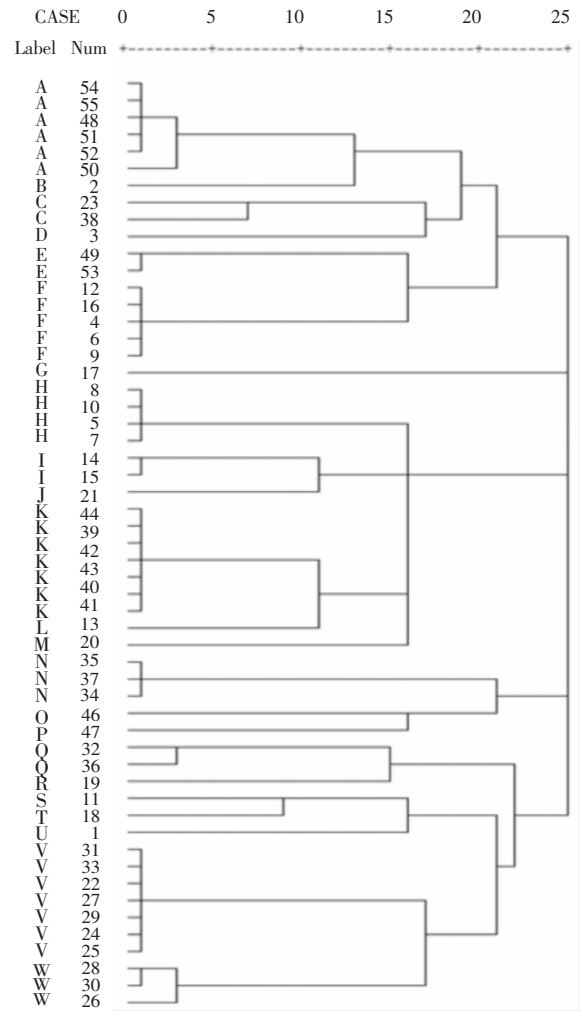


图 2 铜绿假单胞菌 PFGE 的聚类分析

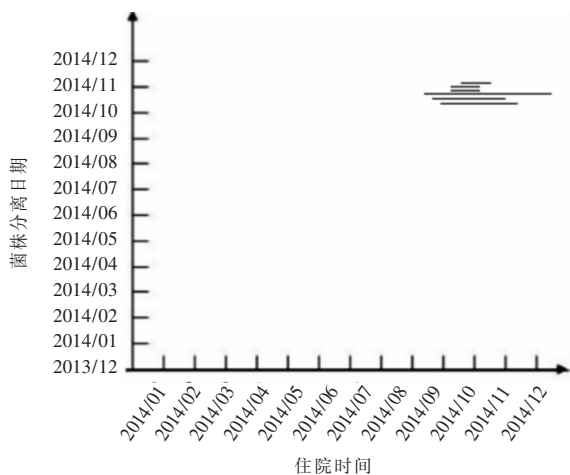
Figure 2 Clustering analysis on PFGE of *P. aeruginosa*

表 1 55 株 PA 对 9 种常用抗菌药物的耐药情况

Table 1 Resistance of 55 strains of *P. aeruginosa* to 9 commonly used antimicrobial agents

抗菌药物	耐药菌株	耐药率(%)
哌拉西林/他唑巴坦	39	70.91
头孢他啶	40	72.73
头孢吡肟	23	41.82
亚胺培南	39	70.91
妥布霉素	16	29.09
庆大霉素	15	27.27
阿米卡星	14	25.45
环丙沙星	27	49.09
左氧氟沙星	25	45.45

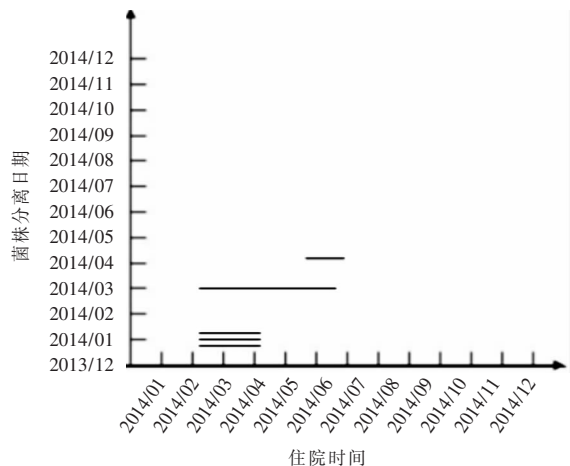
2.6 传播特点 25例患者分离的55株PA主要包括A、F、H、K、N、V、W7种基因型。A型菌株中5例患者在住院时间上存在交叉,其中51号、52号为同一患者分离的菌株,见图3。F型菌株中3例患者在住院时间上存在交叉,其中4号、6号、9号为同一患者分离的菌株,见图4。H型菌株中2例患者在住院时间上存在交叉,其中5号、8号、10号为同一患者先后分离的菌株,见图5。K型菌株中5例患者在住院时间上存在交叉,其中41号与42号、43号与44号为同一患者分离菌株,见图6。N型菌株、V型菌、W型菌为同一患者分离菌株。



注:从上至下依次为48、51、52、50、54、55号菌株,其中51、52号菌株来源于同一患者

图3 A型PA分离日期及来源患者住院时间分布图

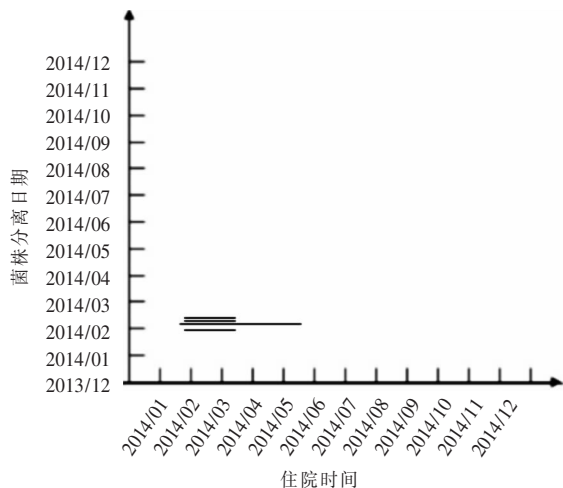
Figure 3 Distribution of isolation date of type A *P. aeruginosa* and hospitalization time of source patients



注:从上至下依次为12、16、4、6、9号菌株,其中4、6、9号菌株来源于同一患者

图4 F型PA分离日期及来源患者住院时间分布图

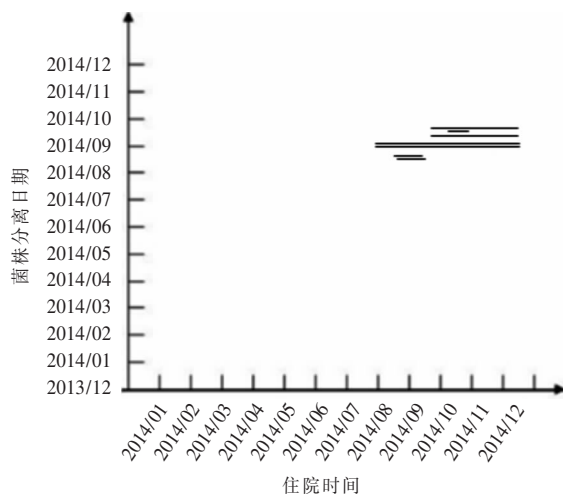
Figure 4 Distribution of isolation date of type F *P. aeruginosa* and hospitalization time of source patients



注:从上至下依次为8、10、7、5号菌株,其中5、8、10号菌株来源于同一患者

图5 H型PA分离日期及来源患者住院时间分布图

Figure 5 Distribution of isolation date of type H *P. aeruginosa* and hospitalization time of source patients



注:从上至下依次为41、45、42、43、44、40、39号菌株,其中41号与42号、43号与44号分别来源于同一患者

图6 K型PA分离日期及来源患者住院时间分布图

Figure 6 Distribution of isolation date of type K *P. aeruginosa* and hospitalization time of source patients

### 3 讨论

PA是医院感染最常见的革兰阴性条件致病菌之一。2013年我国CHINET细菌耐药性监测<sup>[4]</sup>数据显示,PA在临床分离的不发酵糖革兰阴性杆菌中占第2位。全球性细菌耐药监测SENTRY连续多年监测数据也显示,PA是引起医院获得性肺炎和呼吸机相关肺炎最多见的革兰阴性杆菌<sup>[5]</sup>。近年

来,随着各种抗菌药物在临床的广泛使用,出现了多重耐药 PA,甚至全耐药 PA。MDR-PA 已经成为各地区临床治疗的棘手问题。

本文研究的 25 例 PA 医院感染患者,平均年龄为(69.62 ± 2.13)岁,平均住院时间为(49.34 ± 3.18)d,76.00%的患者有基础疾病。在分离出 PA 之前,19 例患者入住过 MICU;84.00%的患者应用广谱抗菌药物大于 2 周;13 例患者病情危重需行呼吸机治疗,其中 7 例为气管插管,6 例为气管切开后,患者气道开放,肺损伤加重,更容易感染病原菌。4 例患者使用过糖皮质激素,44.00%的患者为低蛋白血症;病情危重患者机体免疫力低下,糖皮质激素的应用,也降低了机体免疫力,使其极易发生医院感染,以上结果与 Falagas 等<sup>[6]</sup>报道相一致。虽经积极治疗,仍有 3 例患者死亡,年龄均大于 60 岁,既往均有基础疾病。

本研究的药敏试验结果显示,PA 对头孢他啶、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南呈高耐药性,耐药率均达 70% 以上,高于杨旭辉等<sup>[7]</sup>的报道,也高于 2011 年我国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药监测<sup>[8]</sup>报道 PA 的耐药率。分析其原因考虑一是由于 25 例患者来自 MICU,既往基础疾病重,需要长期应用广谱抗菌药物,并且存在留置多种导管、机械通气、人工吸痰等因素,使感染耐药菌的机会大大增加<sup>[9-11]</sup>;二是可能与医院近年来广泛使用该类药物有关,所以近期应该限制性使用该类药物,待其敏感性恢复。2010 年我国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药监测报道不同临床科室分离的 PA 耐药率不同,ICU 病房分离 PA 耐药率高于其他科室<sup>[12]</sup>。PA 临床感染逐渐增多,其对碳青霉烯类抗生素耐药率亦有逐年上升的趋势<sup>[13]</sup>。

此外,本研究也发现 PA 对一些抗菌药物较敏感,如喹诺酮类(环丙沙星和左氧氟沙星)、β-内酰胺类(头孢吡肟)、氨基糖苷类(阿米卡星、庆大霉素和妥布霉素),其中阿米卡星耐药率最低。多个全球性耐药监测,如 SENTRY、SMART 及 SERNIR 等数据也显示,PA 对阿米卡星耐药率最低,原因可能是该类物质对多数氨基糖苷类钝化酶稳定,并且在临床中的用量较其他类药物少<sup>[5,14-15]</sup>。临床应依照药敏试验结果,选用抗菌活性强的药物,对严重感染者需联合用药,防止或减慢耐药菌株的产生<sup>[16]</sup>。轮换使用抗菌药物可以分散抗菌药物选择性压力,选择耐药率低的抗菌药物进行轮换,亦有助于恢复细菌的耐药性<sup>[17]</sup>。

本文 PFGE 图谱及聚类分析树图显示,55 株 PA 以 A、F、H、K、N、V、W 基因型为主要流行株,说明 MICU 中存在 PA 的克隆传播。由传播特点可见,A 型、F 型、H 型及 K 型菌株在各自住院时间上均存在交叉,表明出现了同一医疗单元即同病房的同型菌株的克隆传播,通过医疗器械及治疗处置时造成交叉感染的可能性大。另外,有 4 例患者不同时期分离菌株的 PFGE 图谱分析显示不同菌型,43 号、44 号、47 号、48 号为同一患者感染菌株检出 K 型、P 型及 A 型,药敏试验结果提示对左氧氟沙星由敏感转为耐药;23 号、26 号、28 号、30 号、38 号为同一患者感染菌株检出 C 型和 W 型,药敏试验结果提示对左氧氟沙星、环丙沙星由敏感转为耐药;14 号、16 号为同一患者感染菌株检出 I 型和 F 型,为全耐药菌型;51 号、52 号、53 号为同一患者感染菌株检出 A 型和 E 型,药敏试验结果提示对头孢吡肟及阿米卡星由敏感转为耐药,这与王继东等<sup>[18]</sup>报道患者 PA 医院感染存在多克隆感染或反复不同株感染相类似。由于广谱抗菌药物在临床上广泛使用,容易导致出现 MDR-PA,甚至泛耐药铜绿假单胞菌(PDR-PA)。PDR-PA 大多分离来自 ICU,且多为克隆传播<sup>[11]</sup>,易引起医院感染暴发流行。

本文通过 PFGE 方法分析 PA 菌株之间的亲缘关系,监测是否有克隆播散,可追踪暴发流行来源及传播途径,有效控制医院感染。因此,医疗机构应加强细菌耐药监测,关注我国细菌耐药性的发展趋势,加强抗菌药物管理,加强医院感染控制措施,防止多重耐药和泛耐药细菌在医院内的播散。

#### [参 考 文 献]

- [1] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6): 426-439.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[S]. 北京, 2001.
- [3] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [4] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 365-374.
- [5] Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial

- pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia[J]. Clin Infect Dis, 2010, 51 (Suppl 1): S 81 - S 87.
- [6] Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature[J]. J Hosp Infect, 2006, 64(1): 7 - 15.
- [7] 杨旭辉, 赵勇. 创伤外科 62 株铜绿假单胞菌体外抗菌药物敏感性分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(15): 1913 - 1914.
- [8] 施晓群, 孙景勇, 倪语星, 等. 2011 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(3): 218 - 221.
- [9] Master RN, Clark RB, Karlowsky JA, et al. Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 1997 to 2009[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(4): 291 - 295.
- [10] Lee K, Kim MN, Kim JS, et al. Further increases in carbapenem-, amikacin-, and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter spp.* and *P. aeruginosa* in Korea; KONSAR study 2009[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(5): 793 - 802.
- [11] Harris AD, Johnson JK, Thom KA, et al. Risk factors for development of intestinal colonization with imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit setting[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011, 32(7): 719 - 722.
- [12] 张祎博, 倪语星, 孙景勇, 等. 2010 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(3): 161 - 166.
- [13] 许宏涛, 陈东科, 俞云松, 等. 多重耐药铜绿假单胞菌产  $\beta$ -内酰胺酶耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(1): 20 - 22.
- [14] Liu YM, Chen YS, Toh HS, et al. In vitro susceptibilities of non-Enterobacteriaceae isolate from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region from 2003 to 2010: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) [J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40 (Suppl): S11 - S17.
- [15] Xiao M, Wang Y, Yang QW, et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in China; a review of two multicentre surveillance programmes, and application of revised CLSI susceptibility breakpoints[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(5): 445 - 449.
- [16] 张鸿, 申建维, 孙秀琴, 等. 医院感染铜绿假单胞菌的耐药性变迁分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(2): 449 - 451.
- [17] 展冠军, 詹莹, 邵华. 铜绿假单胞菌对抗菌药物耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(20): 5025 - 5026, 5032.
- [18] 王继东, 金辉, 糜祖煌, 等. 医院感染铜绿假单胞菌菌株亲缘性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(12): 1337 - 1339.

(本文编辑:刘思娣)