

• 论 著 •

ICU 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速监测及防控^{*}史小英¹, 陈启容², 余新玉³, 周琳瑶², 熊 力², 伏心卓², 袁 璐², 贾淑芳^{2△}

(解放军第 452 医院:1. 消化内科;2. 检验科;3. 重症监护室, 四川成都 610061)

摘要:目的 了解耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在 ICU 的定植、分布及其防控效果。方法 新进入 ICU 病房患者即刻采鼻前庭拭子和 72 h 后符合呼吸道感染指针患者的吸痰导管标本。采用荧光 PCR 快速检测 mecA、nuc 基因。并定期对医护人员鼻腔、手等相关环境标本跟踪监测防控。结果 MRSA 阳性率检出率:患者鼻前庭拭子为 9.9%, 吸痰导管为 2.7%;医护人员鼻前庭拭子为 7.1%、手为 4.0%、袖口为 4.4%;MRSA 阳性医护人员与患者鼻腔采用莫匹罗星擦拭, 手加强消毒后 MRSA 检出率均为 0.0%, 但每季度医护人员鼻腔 MRSA 仍有检出。结论 PCR 方法阳性率明显高于常规培养方法。鼻腔前庭是 MRSA 的主要定植部位, 是主要感染源, 手是重要传播途径, 监测重症监护室患者鼻腔前庭及医护人员的鼻腔前庭、手是控制 MRSA 院内感染的重要防控目标。

关键词:耐甲氧西林葡萄球菌; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; nuc 基因; mecA 基因; 重症监护病房; 预防控制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)07-0877-03

Rapid monitoring and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ICU^{*}Shi Xiaoying¹, Chen Qirong², Yu Xinyu³, Zhou Linyao², Xiong Li², Fu Xinzhuo², Yuan Lu², Gia Shufang^{2△}

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Clinical Laboratory,

; 3. ICU, 452 Hospital of PLA, Chengdu, Sichuan 610061, China)

Abstract: Objective To understand the colonization, distribution and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in ICU. **Methods** The nasal vestibule swabs were immediately taken from new patients in ICU and the sputum suction catheter specimens were collected from the patients conforming to respiratory tract infection at 72 h after entering ICU. The fluorescence PCR was adopted to rapidly detect mecA, nuc gene. The related environment specimens such as nasal cavity and hands in medical staffs were performed the regular tracking monitoring, prevention and control. **Results** The MRSA-detection rates were 9.9% for nasal vestibule swabs, 2.7% for sputum suction catheter; 7.1% for nasal vestibule swabs of medical staffs, 4.0% for hands and 4.4% for cuffs; the medical staffs and patient's nasal cavity with MRSA-positive adopted mupirocin for scrubing, MRSA detection rate in hands after reinforce disinfection was 0.0%, but nasal cavity MRSA in medical staff was still detected out every quarter.

Conclusion The PCR method has significantly higher positive detection rate compared with the conventional culture method. Nasal vestibule is a major colonization site of MRSA and the main infection source of infection, the hands are the important route of transmission, monitoring nasal vestibule in ICU patients and medical staffs and hands in medical staffs is important to control MRSA nosocomial infection.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; nuc gene; mecA gene; intensive care unit; prevention and control

鼻腔尤其是鼻前孔是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的主要定植部位^[1], 可通过接触、飞沫传播给其他人或既往有 MRSA 定植且有侵入性器械操作而引起医源性或内源性感染。特别是在 ICU 患者多数属于多器官衰竭、年老体弱、静脉药物依赖、气管插管、气管切开和免疫功能低下等易感人群的防控尤为重要。为了解本院 MRSA 在 ICU 患者鼻腔定植、呼吸道的感染与气管插管、气管切开侵袭性操作相关性;与医护人员鼻腔定植、手、医疗器械、环境的相关性, 本文对新入 ICU 患者鼻拭子、吸痰管和医护人员鼻拭子、手及环境相关物表进行 MRSA 筛查。为实施科学、合理、有效地预防和控制感染的干预措施提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2012 年 7 月至 2013 年 6 月入住 ICU 行气管切开术患者, 即时采集患者鼻拭子标本和入住 72 小时后, 符

合卫生部 2001 年颁发《医院感染诊断标准(试行)》中“下呼吸道感染”的诊断标准^[2]的患者采集吸痰导管标本; 每季度跟踪采集医护人员鼻拭子、手、医疗器械、环境标本。

1.2 质控菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC25923、肺炎克雷伯菌 ATCC70063、铜绿假单胞菌 ATCC27853 和临床分离的 MRSA、耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌及 0.5 麦氏单位的标准菌株菌悬液 1 mL, 加入 0.5 麦氏单位 MRSA 悬液 0.1 mL 的混合菌悬液。严格按照 NCCLS 的规则进行质量控制。

1.3 仪器与试剂 CFX-96 PCR 仪(美国伯乐), 耐甲氧西林葡萄球菌基因检测试剂(上海之江生物科技股份有限公司); VITEK32 细菌鉴定仪、鉴定板(法国生物梅里埃)。

1.3 标本采集与方法

1.3.1 鼻拭子标本采集 将藻酸钙棉拭用无菌生理盐水湿润后小心地插入每一个鼻前庭腔轻轻转动 5 s, 置入无菌试管(含

* 基金项目: 四川省卫生厅科研课题项目(120399)。 作者简介: 史小英, 女, 主管护师, 主要从事临床护理管理研究。 △ 通讯作者, E-mail: jsf100ck@163.com。

1 mL 灭菌生理盐水),用无菌棉球将试管塞紧后,立即送检。

1.3.2 吸痰管标本采集 用消毒吸痰管经气管切开向下深入吸出痰液置消毒容器中即刻送检。

1.3.3 医护人员手、医疗器械、床头柜物表标本采集 医护人员手、呼吸机、床头柜、鼠标、门把手物体表面按照医院感染监测要求采集标本,采集的标本投入 2 mL 的无菌生理盐水管内,立即送检。

1.3.4 实时荧光 PCR 法 (1)试剂配制:取 $n \times 36 \mu\text{L}$ MRSA 耐药基因核酸荧光 PCR 检测混合液与 $n \times 0.4 \mu\text{L}$ 酶(Taq+UNG)(n 为反应管数),振荡混匀数秒,3 000 r/min 离心数秒。(2)加样:取上述混合液 $36 \mu\text{L}$ 置于 PCR 管中,然后将阴性对照品、标本和阳性对照品的处理上清液各 $4 \mu\text{L}$ 分别加入各个已有混合液的 PCR 管中,盖好管盖,立即进行 PCR 扩增反应。(3)PCR 扩增:反应管置于定量荧光 PCR 仪上,推荐循环参考设置:37 °C × 2 min;94 °C × 2 min 循环一次,再按 93 °C × 15 s → 60 °C × 60 s,循环 40 次;单点荧光检测在 60 °C,反应体系为 $40 \mu\text{L}$ 。荧光通道检测选择用 FAM 通道和 HEX/VIC/JOE 通道。(4)基线和阈值设定:基线调整取 6~15 个循环的荧光信号,阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点,否则实验视为无效。(5)质量控制:阴性对照品检测结果在 FAM 通道和 HEX/VIC/JOE 通道:Cycle threshold 栏显示 UNDET(ABI PrismR7000)或 40(SLAN 荧光定量 PCR 检测系统);阳性对照品检测结果在 FAM 通道和 HEX/VIC/JOE 通道检测 Ct 值均小于或等于 35,否则实验视为无效。

1.4 培养方法 以上标本同时按常规分离鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,结果均采用 WHONET5.1 软件统计处理。

2 结 果

2.1 实时荧光 PCR 检测 MRSA 结果 鼻拭子 159 份、吸痰

导管 93 份标本,应用荧光 PCR 快速检测 mecA、nuc 基因,见表 1。快速 PCR 检测结果显示,ICU 患者鼻拭子 MRSA 检出率 9.9%,其中 2 份 mecA 基因阴性,10 例 nuc 阳性;吸痰管 MRSA 2.7%。同一标本培养鉴定结果鼻拭子 MRSA 检出率 6.5%,吸痰管 1.07%。2 种方法用 WHONET5.1 软件统计,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 实时荧光 PCR 法检测 MRSA 结果

| 标本 | n | mecA(n) | nuc(n) | MRSA(n) | MRSA(%) |
|------|-----|---------|--------|---------|---------|
| 鼻拭子 | 159 | 81 | 10 | 8 | 9.9 |
| 吸痰导管 | 93 | 37 | 1 | 1 | 2.7 |

2.2 质控菌株快速检测 mecA 基因、nuc 基因结果 金黄色葡萄球菌检测出 nuc 基因,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测出 mecA 基因、nuc 基因,耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌检测出 mecA 基因,其他菌株 mecA 基因、nuc 基因均为阴性,混合菌悬液均能检测出 mecA 基因和 nuc 基因。

2.3 医护人员、相关器械及环境标本 PCR 检测 MRSA 结果

ICU 医护人员鼻拭子每季度采集一次,共采集 123 例,环境标本按上述医院感染标本要求进行采集共 303 例次,手 54 例次,均采用快速 PCR 检测 mecA 基因、nuc 基因,结果见表 2。mecA 基因在鼻拭子、手、袖口、鼠标、床头柜、呼吸机表面、呼吸机内部标本中检测分别占 80.1%、46.3%、36.5%、35.0%、26.8%、4.3%、2.1%,门把未检测出 mecA nuc 基因;nuc 基因在鼻拭子、手、袖口标本中检测分别占 5.7%、3.7%、1.6%;MRSA 阳性率依次是鼻拭子 7.1%、袖口 4.4%、手 4.0%。mecA 基因阳性标本培养凝固酶阴性葡萄球菌占 79.5%,未培养出葡萄球菌标本占 2.2%;mecA 基因阴性标本凝固酶阴性葡萄球菌占 7.4%。

表 2 医护人员及相关器械检测结果

| 项目 | 鼻拭子 (n=123) | 呼吸机表面 (n=46) | 呼吸机内部 (n=47) | 床头柜 (n=41) | 鼠标 (n=40) | 手 (n=54) | 袖口 (n=63) | 门把 (n=12) |
|---------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| mecA(n) | 99 | 2 | 1 | 11 | 14 | 25 | 23 | 0 |
| nuc(n) | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| nuc/mecA(n/n) | 7/99 | 0/2 | 0/1 | 0/11 | 0/14 | 1/25 | 1/23 | 0/0 |
| MRSA(%) | 7.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.0 | 4.4 | 0.0 |

表 3 医护人员鼻拭子及相关器械环境检测结果分布(n/n)

| 时间 | 项目 | 鼻拭子 | 呼吸机表面 | 呼吸机内部 | 床头柜 | 鼠标 | 手 | 袖口 | 门把 |
|--------|---------|-------|-------|-------|------|------|-------|------|-----|
| 第 1 季度 | mecA 基因 | 22/26 | 2/10 | 1/10 | 3/9 | 4/6 | 7/7 | 6/11 | 0/4 |
| | nuc 基因 | 2/26 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 0/6 | 1/7 | 1/11 | 0/4 |
| 第 2 季度 | mecA 基因 | 31/36 | 1/13 | 0/13 | 0/11 | 5/10 | 1/15 | 3/2 | 0/4 |
| | nuc 基因 | 2/36 | 0/13 | 0/13 | 0/11 | 0/10 | 0/15 | 0/12 | 0/4 |
| 第 3 季度 | mecA 基因 | 28/37 | 0/12 | 0/12 | 4/10 | 5/12 | 6/8 | 7/16 | 0/4 |
| | nuc 基因 | 2/37 | 0/12 | 0/12 | 0/10 | 0/12 | 0/8 | 0/16 | 0/4 |
| 第 4 季度 | mecA 基因 | 18/24 | 1/11 | 0/11 | 4/11 | 0/12 | 11/24 | 7/24 | 0/4 |
| | nuc 基因 | 1/24 | 0/11 | 0/11 | 0/11 | 0/12 | 1/24 | 0/24 | 0/4 |

2.4 4 个季度医护人员及相关器械连续监测 nuc、mecA 基因结果分布 对工作人员 MRSA 阳性的鼻腔进行莫匹罗星连续 5 d 擦拭;病房环境物表严格按照每日分区常规消毒清洁、手卫生消毒规范执行,连续 4 个季度监测 nuc、mecA 基因结果见表 3。经对 ICU 重症监护室医护人员及环境 4 个季度的目标管控监测结果分布显示,鼻拭子、手、袖口、鼠标 mecA 基因、

nuc 基因水平表达数据有明显的下降趋势,鼻拭子 mecA 基因仍然显示高水平表达;从 4 个季度监测数据分布看每个季度在不同的医护人员鼻拭子均能检测出 MRSA 阳性率为 7.1%,其中 1 名医生鼻腔检出 2 次 MRSA;第 2 季度手、袖口 mecA 基因检测低于其他季度是因洗手后立即采样的结果。呼吸机表面、呼吸机内部、门把 nuc、mecA 基因检测低可能与

细菌生长营养和消毒有关。

3 讨 论

纵观金黄色葡萄球菌耐药性的变迁,自检测到耐药青霉素到耐万古霉素,其耐药性如今已经到了严峻时刻,自 1961 年分离第一株 MRSA 以来,MRSA 的感染病死率逐年增加,也是各大医院列入监测的重要目标菌。国内外报道 MRSA 的感染率也呈逐年上升趋势^[3],ICU 呼吸道感染高于普通病房^[4]。因此,连续监测金黄色葡萄球菌的耐药现状,是多耐药医院感染耐药性监测的重点,也是遏制 MRSA 耐药性增长必要手段。

目前,国内医院的临床诊断上大多以纸片法为主,一般需要 48~72 h 才能得出鉴定结果,常常成为医生的“事后诊断”,而且结果受到培养条件等多种因素影响。快速鉴定并检测 MRSA,能在 5 h 发出报告,对指导医生临床合理使用抗菌药物和院感监测中有着重要的意义。根据 MRSA 对甲氧西林耐药机制的 meca 基因和金黄色葡萄球菌具有的特异性胞外热稳定核酸酶的基因(nuc 基因)^[5-6],运用双靶位点荧光实时聚合酶链反应,快速鉴定 MRSA。本试验应用标准菌株及临床分离菌株检测结果说明此 PCR 法快速、简便、可靠。其特异性、灵敏度高于培养法,是否与 ICU 患者气管插管感染大多为多种阴性优势生长,且阴性菌生长快,在导管内易形成菌膜或在培养基上,抑制了阳性球菌生长及与鼻腔细菌的定植量有关,还有待于研究。在患者入进 ICU 即时采集鼻拭子,及对医护人员手、相关器械及环境物品进行 MRSA 筛查,探讨 MRSA 本院 ICU 分布趋势,了解重症监护室医护人员鼻前庭、手及环境物表定植分布及实施实时监测效果,为医院感染防控提供科学依据。据报道医院门诊患者、内科外科普通病房患者鼻腔 MRSA 定植在 3.3%~5.28%^[7-8];ICU 患者鼻腔 MRSA 定植为 13.9%^[9];ICU 医护人员鼻腔 MRSA 定植为 7.0%^[10] 和 17.0%^[10]。本院 ICU 患者鼻腔 MRSA 检出率为 9.9%,医护人员鼻腔 MRSA 定植为 7.1%,低于杨秀洁 13.9% 和 17.7% 的报道,医护人员鼻腔 MRSA 定植与任学芳报道的 7.0% 相近。但均明显高于报道的普通病房。12.5% 的患者同时在鼻拭子、吸痰管标本中检测出 MRSA,证明与鼻腔 MRSA 定植密切相关,侵袭性操作是内源性感染主要因素,入院前鼻拭子 MRSA 筛查显得尤为重要。

患者鼻腔 MRSA 定植高于医护人员,对鼻拭子 MRSA 阳性患者和医护人员采用莫匹罗星清除后再采集检测均未检出 MRSA,说明莫匹罗星清除有效。经采取主动预防在患者和医护人员鼻腔中 MRSA 定植明显下降,但在每季度医护人员的鼻拭子 MRSA 监测中仍然能检测出 MRSA 菌株,说明在鼻拭子 MRSA 的定植是医院内感染的潜在感染源。因此,对进入 ICU 患者及医护人员建立 MRSA 筛查制度是减少 MRSA 感

染的重要防护措施。

在环境监测中,手与袖口日常生活关系密切,与手相关的袖口 meca 基因相近。手的 MRSA 检出与袖口相近,说明手的清洁卫生至关重要。外环境中门把、呼吸机内外部物表 meca 基因明显少于床头柜、鼠标。可能与物表的清洁消毒、微生物缺乏生长的营养环境条件有关,而鼠标、床头柜可能提供一定的微生物生长营养物质有关。

在分离培养鉴定结果中凝固酶阴性葡萄球菌 meca 基因表达占 79.5%,meca 基因明显高于 nuc 基因表达,是否与耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌有关,需要进一步证实。

随着监控防控实施,mece 基因、nuc 基因检出率明显降低,除门把外,鼻腔、手、鼠标时有检出 meca 基因,仍然以鼻腔高表达。而 meca 基因可通过基因转座子或质粒在菌株间传播,因此对凝固酶阴性耐甲氧西林葡萄球菌监测也不可忽视。meca 基因和 nuc 基因仍以鼻拭子、手为主。说明鼻拭子、手仍然是传播 MASR 菌院内感染主要媒介,加强环境消毒、手卫生是不可忽视的监控主要环节。

参考文献

- [1] 陈文森,徐燕,谈智.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的医院检测与控制[J].中国消毒学杂志,2009,26(6):664.
- [2] 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.
- [3] 龚雅利,罗阳,刘春江.1009 株金黄色葡萄球菌耐药现状分析[J].中华医院感染学杂志,2010,20(11):1586-1588.
- [4] 李娟,韩艳.连续 5 年金黄色葡萄球菌耐药性监测[J].中华医院感染学杂志,2010,20(24):4008-4010.
- [5] 周义正,李向阳.临床分离 MRSA 中 meca 基因表达的定量测定[J].中华医院感染学杂志,2011,21(8):865-866.
- [6] 裴标,高峻.医院环境中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的鉴定及噬菌体分型[J].中国卫生基因杂志,1992,15(2):210-211.
- [7] 孙菊芳.心脏手术前予脱污染治疗在预防院内感染的效果观察[J].护士进修杂志,2012,27(23):2173-2174.
- [8] 张卫,孔秋菊,刘华,等.河北医科大学附属华北石油总医院门诊患者鼻腔 MRSA 带菌情况调查[J].中国耳鼻喉颅底外科杂志,2013,19(1):24-26.
- [9] 杨秀洁,会驹,林小茂,等.鼻拭子筛查及局部用药用于重症监护室耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的防治[J].安徽医药,2009,12(2):191-192.
- [10] 任学芳,叶婷,祝禾辰.重症监护室工作人员鼻腔带菌状况调查[J].中国消毒学杂志,2010,27(3):294-295.

(收稿日期:2014-12-10)

《四川兵工学报》增设“军事医学与卫生装备”栏目 欢 迎 赐 稿

《四川兵工学报》正在申请更名为《兵器装备工程学报》,系军事科技类综合性学术期刊,中国科技核心期刊,中国科技论文统计源期刊,RCCSE 中国核心学术期刊。为使本刊栏目设置涵盖军事科技各学科专业领域,彰显本刊学术交流平台价值功能的效益最大化,服务于更多领域的学者和专家,本刊拟增设“军事医学与卫生装备”栏目。主要刊登军事医学及相关学科的创新性论著,辅以研究简报,技术方法及有一定指导性的文献综述。内容涉及放射医学、微生物学与流行病学、药理学与毒理学、药物化学、基础医学、卫生学与环境医学、卫生装备、临床医学及医学高新技术等领域。欢迎赐稿。

联系电话:023-68852703,62569336

办公邮箱:scbgxb@126.com

本刊网址:<http://scbg.qks.cqut.edu.cn/>

四川兵工学报编辑部