

## • 论 著 •

# ICU 院感监测铜绿假单胞菌耐药率和同源性分析<sup>\*</sup>

张海云<sup>1</sup>, 栾艳淼<sup>1</sup>, 孙 翩<sup>1</sup>, 汤晓扬<sup>1</sup>, 闫海润<sup>2△</sup>

(1. 黑龙江省牡丹江市第一人民医院检验科 157011; 2. 黑龙江省牡丹江市红旗医院检验科 157011)

**摘要:**目的 分析 2015 年 1—6 月牡丹江市第一人民医院重症监护病房(ICU)检出的铜绿假单胞菌耐药率及其同源性, 明确该菌在 ICU 流行情况, 为合理的院感防控提供依据。方法 采用 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定仪对 2015 年上半年 ICU 通过不同途径检出的 126 株铜绿假单胞菌进行耐药性分析, 根据脉冲场凝胶电泳法对所有菌株进行同源性分析。结果 2015 年 1—6 月 ICU 进行 2 次院感监测, 从护士手、换药车及监护室门把手的物体表面检出 4 株铜绿假单胞菌且均为敏感株; 110 例 ICU 住院患者中, 共检出 122 株铜绿假单胞菌, 其中在 18 例 ICU 住院患者中检出多重耐药株 38 株。38 株多重耐药株及 4 株院感监测检出菌株同源性分析可以分为 5 组(A—E), 以 A、C、D 这 3 个克隆型为主, 院感监测检出菌株均为 B 克隆型。4 例患者检出多个亚型感染。结论 铜绿假单胞菌感染形势在 ICU 比较严峻, 院感监测检出菌株未存在暴发流行, 住院患者间存在多克隆株交叉流行现象。

**关键词:**铜绿假单胞菌; 院感监测; 同源性分析**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.005**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2017)03-0300-03

## Analysis on drug resistance rate and homology of *Pseudomonas aeruginosa* by ICU nosocomial infection monitoring<sup>\*</sup>

ZHANG Haiyun<sup>1</sup>, LUAN Yanmiao<sup>1</sup>, SUN Ying<sup>1</sup>, TANG Xiaoyang<sup>1</sup>, YAN Hairun<sup>2△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Mudanjiang Municipal First People's Hospital, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Red Flag Hospital, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China)

**Abstract: Objective** To investigate the drug resistance rate and homology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ICU in Mudanjiang Municipal First People's Hospital from January to June 2015 to understand its prevalence situation in ICU and provide a basis for the rational prevention and control of nosocomial infection. **Methods** The Vitek-2 Compact fully automatic microbiological identification instrument was adopted to perform the drug resistance analysis on 126 strains of *Pseudomonas aeruginosa* from ICU detected by different pathways in the first half of 2015. The homology of bacterial strains was analyzed by pulse-field gel electrophoresis(PFGE). **Results** Two nosocomial infection monitorings were performed in ICU from January to June 2015. Four strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the nurse hand, medicative cart and doorknob of ICU ward all were sensitive strains; 122 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were detected in 110 ICU inpatients, in which 38 multi-drug resistant strains were detected from 18 ICU inpatients. The homology analysis was performed in 38 multi-drug resistant strains and 4 strains detected by nosocomial infection monitoring, these strains included 5 groups (A—E), which was dominated by the clone types of A, B and C, while the strains detected by nosocomial infection monitoring all were clone type B. Multiple subtype infection was detected in 4 patients. **Conclusion** The infection situation of *Pseudomonas aeruginosa* is serious in ICU, no epidemic outbreak of strains detected by nosocomial infection monitoring exists. The cross prevalence of multiple clone strains exists in inpatients.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; nosocomial infection monitoring; homology analysis

铜绿假单胞菌又称为绿脓杆菌, 属于非发酵革兰阴性杆菌。铜绿假单胞菌具有很强的生存适应性, 可以在周围环境及健康人的皮肤和呼吸道部位广泛分布, 也因此可导致人体各部位的感染, 该菌已成为医院感染的主要病原菌之一<sup>[1]</sup>。最近几年, 尤其是重症监护病房(ICU)抗菌药物的大量不规范使用, 使多重耐药铜绿假单胞菌的检出率大大提高, 给临床控制铜绿假单胞菌的感染造成极大的压力。本研究通过对牡丹江市第一人民医院 ICU 住院患者和物体表面分离的铜绿假单胞菌进行同源性分析和表观耐药率分析, 进而明确 ICU 病房中铜绿假单胞菌菌株克隆播散情况, 在分子流行病学层面为控制铜绿

假单胞菌感染提供可靠依据。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 2015 年 1—6 月收集牡丹江市第一人民医院 ICU 检出的铜绿假单胞菌 126 株, 其中 4 株为医院院内感染监测分离培养出来, 其余均为住院患者标本中检出。质控菌株为 ATCC27853。

**1.2 细菌培养鉴定和药敏** 所有菌株均采用 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定仪进行鉴定和药物敏感试验, 最终药敏结果参照 CLSI 2014 年的标准进行判读。

**1.3 方法** 采用脉冲场凝胶电泳法(PFGE)进行同源性分析。

<sup>\*</sup> 基金项目: 黑龙江省卫生计生委科研立项(2016-344); 黑龙江省牡丹江市科技攻关项目(Z2015s0054)。

作者简介: 张海云, 男, 主管技师, 主要从事微生物耐药机制研究。 △ 通信作者, E-mail: yanhairun581022@sina.com。

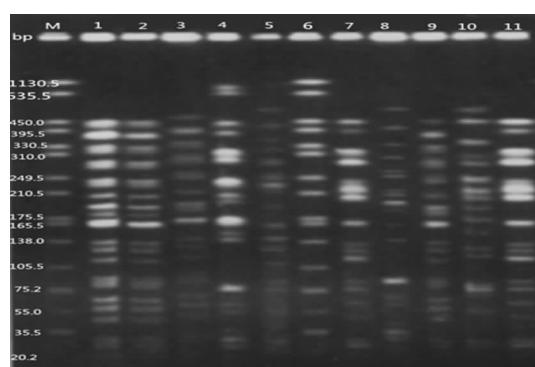
挑取纯培养的铜绿假单胞菌菌落配制成 1.0 麦氏单位的菌液，再另行配制等体积的浓度为 2% 的低熔点琼脂糖，将二者均匀混合倒入模具。待凝固后，用手术刀片切成 3 mm 宽 4 mm 长的小胶块放入到蛋白酶 K 溶液中过夜，清洗消化完毕后的胶块再放入到含有 35 μL 限制性内切酶 SPe I 的 PE 管中酶切，酶切环境为 37 ℃ 水浴震荡过夜。酶切后的胶块在进行 2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳，标志物选择沙门菌 H9812 进行对照。电泳参数设置：电压 12 V/cm，夹角 160°，恒温 15 ℃，共计进行 24 h 电泳，前 12 h 脉冲时间设成 5~15 s，后 12 h 脉冲时间设置为 15~50 s。电泳完毕后，将胶块完全浸入到 1.5 mg/L 的溴化乙啶中染色 30 min，染色完成后用流水小心脱色 30 s，最后将胶块置 VerSaDoc 300 凝胶成像仪内显像抓图。根据 Tenover 等<sup>[2]</sup>总结归纳的判读标准进行同源性分析，即为含有 1~3 条不同条带数判断为同一克隆株，而有 6 条或以上的不同条带数则判断为与流行病学无关的不同克隆株。

## 2 结 果

**2.1 菌株分布和耐药率** 2015 年 1~6 月，在 110 例 ICU 住院患者中检出 122 株铜绿假单胞菌，其中在 18 例 ICU 住院患者中检出多重耐药株 38 株，该菌多重耐药株具体耐药率情况见表 1。

表 1 38 株多重耐药铜绿假单胞菌对 11 种抗菌药物的耐药率[n(%)]

抗菌药物	耐药	中介	敏感
头孢吡肟	8(21.1)	12(31.6)	18(47.4)
多西环素	24(63.2)	4(10.5)	10(26.3)
阿米卡星	24(63.2)	0(0.0)	14(36.8)
亚胺培南	14(36.8)	0(0.0)	24(63.2)
氨曲南	18(47.4)	1(2.6)	19(50.0)
哌拉西林/他唑巴坦	27(71.1)	2(5.3)	9(23.7)
妥布霉素	29(76.3)	0(0.0)	9(23.7)
头孢曲松	31(81.6)	0(0.0)	7(18.4)
庆大霉素	26(68.4)	3(7.9)	9(23.7)
左氧氟沙星	19(50.0)	4(10.5)	15(39.5)
多黏菌素 B	2(5.3)	0(0.0)	36(94.7)



注：M 为 DNA 标志物；1~11 为试验菌株。

图 1 不同克隆株的铜绿假单胞菌的 PFGE 图谱

**2.2 同源性分析结果** 通过图 1 可以看到经过酶切后的菌株染色体 DNA 可以产生 16 条以上的清晰条带，根据带型的分布差异，对菌株进行同源性分析。38 株多重耐药株及 4 株院

感监测检出菌株经过分析后可以分为 5 个组（A~E），部分同源性聚类分析结果见图 2（见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”），其中 A 组有 10 株，C 组 12 株，D 组 9 株，院感监测检出 4 株菌均为 B 克隆型。4 个患者检出多个亚型感染。根据患者标本送检时间不同，可以看到 A、C、D 这 3 组克隆型的菌株检出几乎贯穿于整个调查期间。

## 3 讨 论

铜绿假单胞菌对环境具有极强适应性，使其在医院内广泛存在并很难消除。ICU 住院患者病情较重，因此其铜绿假单胞菌的感染率远高于其他临床科室。通过研究显示，本院 ICU 住院患者铜绿假单胞菌多重耐药株检出率与同类别其他医院检测结果相似<sup>[3-5]</sup>。

多重耐药铜绿假单胞菌感染是当前 ICU 临床治疗和医院感染监测控制面对的难点、重点问题<sup>[6]</sup>。为达到控制和预防多重耐药铜绿假单胞菌的流行与产生，应有针对性地加强对 ICU 住院患者细菌培养鉴定的目标性监测，并实施合理有效的预防控制方案。完善的耐药表观流行病学监测系统是医院感染控制的重要前提，通过对 ICU 住院患者进行的细菌培养鉴定目标性监测，可合理控制 ICU 住院患者医院感染的发生。ICU 一线临床医生对患者病原菌感染情况及药敏结果需及时掌握并结合实际情况合理使用抗菌药物，在非必要的情况下，尽量减少侵入性操作，遵循无菌操作原则，降低患者感染的风险。

依据较可靠和稳定的脉冲场凝胶电泳法对 ICU 临床分离出的 38 株多重耐药株及 4 株院感监测检出菌株进行同源性分析。结果显示，42 株菌以 A、C、D 型为主，多数菌株具有相似或相同的谱型，间接证明铜绿假单胞菌在本院 ICU 病房内存在医院感染，并且同时是多个克隆株发生流行。结合每个菌株检出时间的不同，A、C、D 这 3 个克隆谱型几乎贯穿于半年内所有的时间节点，表明院感防控工作还是不够细致，并没有完全阻断克隆株的流行播散。另有 4 例患者在半年内不同时间检出的铜绿假单胞菌的 PFGE 图谱分析显示存在至少 3 个克隆谱型的感染，针对这种较为明显的交叉感染现象，应给予足够的重视，及时对患者进行隔离，同时对 ICU 内部的消毒水平有效提升，并实施合理和安全诊疗操作，才能够行之有效地控制铜绿假单胞菌的 ICU 感染水平。院感监测检出的 4 株铜绿假单胞菌均属于 B 克隆型且患者检出菌株均与该组克隆型不相关，一定程度表明本院 ICU 医护人员洗手效果较好并且无菌操作规范合理，最大限度地降低了住院患者的医源性感染<sup>[7-8]</sup>。由于铜绿假单胞菌相对于其他革兰阴性杆菌对化学药物具有较强的耐药性<sup>[9]</sup>，应使用消毒液按时擦拭 ICU 所有设施，同时医护人员应减少在病房内的非必须走动<sup>[10]</sup>。

综上所述，为了有效控制多重耐药铜绿假单胞菌在医院病区内部间的传播流行，对 ICU 住院患者除了及时进行细菌培养鉴定，关注铜绿假单胞菌耐药表型变化，还要严格医院感染控制加强院感监测，对各种可能的传播流行环节做到及时发现并有效阻断，防止其进一步播散，从而对耐药菌株的暴发和流行做到有效控制。

## 参考文献

- [1] 刘欢乐,陈舒影,吴小乐,等.耐亚胺培南(下转第 304 页)

明显提高早期 RA 的诊断特异度, 提高准确率, 这样就可以诊断出因单独检测 RF 而造成 RA 阴性漏诊的病例; 同时, GPI 还可以作为 RA 活动指标<sup>[8]</sup>。有研究发现, 抗 CCP 抗体的阳性患者, 其关节畸形的概率比抗 CCP 抗体阴性的患者更高<sup>[9]</sup>。

抗 RA33 抗体在自身免疫病的患者也能检出, 这个有可能是因为和含有针对小核糖核蛋白(snRNP)中的 A2 发生了交叉反应, 也有可能是预测到系统性红斑狼疮患者会发展为侵蚀性关节炎, 这需要临床继续跟踪和检测<sup>[10-12]</sup>。

综上所述, 诊断 RA 的 4 项相关检测中, RF 的敏感度最高, GPI、抗 RA33 抗体敏感度最低, 但是, GPI 和抗 RA33 抗体特异度最好, 而 RF 特异度最低。抗 CCP 抗体的敏感度和特异度都处于中间, 4 项指标联合检测, 就可以诊断出因 RF 阴性时造成 RA 的漏检病例, 还可提高早期 RA 的诊断特异度。

## 参考文献

- [1] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. Nature, 2003, 423(6937):356-361.
- [2] 中华医学会风湿病学分会. 类风湿关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4):265-270.
- [3] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 365(23): 2205-2219.
- [4] 艾脉兴, 曾小峰. 类风湿关节炎自身抗体的新认识[J]. 中华风湿病学杂志, 2002, 15(3):327-328.
- [5] Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies[J]. Inter J Medicine, 2010, 103(3):139-146.
- [6] 邵丽佳, 吴俊琪, 方莉萍, 等. 血清 RF、抗 CCP 抗体对诊断类风湿性关节炎的临床价值[J]. 中国卫生检验杂志,
- [7] Sun J, Zhang Y, Liu L, et al. Diagnostic accuracy of combined tests of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: a meta-analysis[J]. Clin Exper Rhe, 2013, 32(1):11-21.
- [8] 吴乔, 李德卫, 王洪林, 等. 葡萄糖-6-磷酸酶是一种潜在类风湿关节炎新自身抗原[J]. 免疫学杂志, 2016, 22(7): 596-600.
- [9] Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis[J]. Art Rhe, 2000, 43(8):1831-1835.
- [10] Shi J, Knevel R, Suwannalai P, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(42): 17372-17377.
- [11] Smolen JS, Robert L, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the managements of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update[J]. Annals Rhe Dis, 2010, 69(6):964-975.
- [12] Tsuge A, Uchida H, Ishimoto G. Erythrocyte S-formyl-glutathione hydrolase polymorphism in Japanese and the relation to erythrocyte esterase D polymorphism[J]. Am J Hum Genet, 1987, 41(2):93-96.

(收稿日期:2016-09-16 修回日期:2016-11-06)

(上接第 301 页)

- 铜绿假单胞菌的检出率与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 22(2):265-267.
- [2] 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):22-33.
- [3] 黄敏, 吕庆排, 沈亚萍, 等. 某院 2014 年医院感染现患率调查与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 36(2):51-55.
- [4] 李娟娟, 夏国莲, 左阿芳, 等. ICU 耐美罗培南铜绿假单胞菌感染的治疗分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 23(9):2038-2040.
- [5] 谭庆, 廖小平, 周小梅, 等. 1 508 株非发酵菌临床分布及耐药性研究[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(4):22-26.
- [6] 杨春, 厉建芝, 朱效茹, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 30(2):173-176.

- [7] 李倩, 武元星, 唐明忠, 等. 神经外科重症监护病房细菌流行及耐药性的 20 年监测[J]. 临床神经外科杂志, 2016, 13(1):49-55.
- [8] 陈雯, 邹传仁, 谢丽珍, 等. 呼吸内科患者多药耐药菌感染的分析及其护理[J]. 抗感染药学, 2015, 20(5):698-700.
- [9] 舒彩敏, 冯兰芳, 方秋雁, 等. 住院患者肺部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, 2015, 25(24):5572-5574.
- [10] 黄秋兰, 封卫征, 范德平, 等. 多药耐药铜绿假单胞菌感染危险因素的荟萃分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(5):970-972.

(收稿日期:2016-07-29 修回日期:2016-10-23)

