

• 论 著 •

基于脉冲场凝胶电泳分型技术的多重耐药铜绿假单胞菌交叉感染防控研究*

黄秋兰¹, 范德平¹, 刘红绸¹, 薛娜丽¹, 蔡徐山^{2△}

(1. 上海市嘉定区南翔医院检验科 201802; 2. 上海市嘉定区妇幼保健院检验科 201821)

摘要:目的 对医院获得性感染铜绿假单胞菌(PA)进行同源性分析,探讨防控交叉感染的思路和方法。方法 收集 2016 年 1 月至 2017 年 4 月从各病区分离的 PA,对其进行菌种鉴定和药敏试验,对其中 16 株多重耐药 PA,采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行同源性分析,实施“降阶梯防控策略”。结果 16 株 PA 共获得 4 种 PFGE 分型,11 株为 A 型,3 株为 B 型,C 型、D 型各 1 株,存在型别 100% 相同克隆株;采取“降阶梯防控策略”后,无其他患者再出现多重耐药 PA 交叉感染。结论 PFGE 是研究 PA 分子流行病学的较好方法,“降阶梯防控策略”是防控多重耐药 PA 交叉感染的有效策略。

关键词:铜绿假单胞菌; 医院获得性感染; 防控; 脉冲场凝胶电泳

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.020 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)22-3332-02

Prevention and control of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection based on pulse field gel electrophoresis typing technique

HUANG Qiulan¹, FAN Deping¹, LIU Hongchou¹, XUE Nali¹, CAI Xushan^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Nanxiang Hospital of Jiading District, Shanghai 201802, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Jiading District Maternal and Child Health Care Hospital, Shanghai 201821, China)

Abstract: **Objective** To conduct the homologous analysis of hospital acquired infection *Pseudomonas aeruginosa*(PA) and to investigate the thinking and method for preventing and controlling cross-infection. **Methods** PA isolated from various wards areas were collected from January 2016 to April 2017 and performed the bacterial species identification and drug susceptibility test, in which 16 strains of multi-drug resistant PA were performed the homologous analysis by adopting the pulsed field gel electrophoresis (PFGE), the de-escalation prevention and control strategy was implemented. **Results** Among 16 strains of PA, 4 PFGE types were obtained, 11 strains were type A, 3 strains were type B, 1 strain was type C and 1 strain was type D, the same clone strain with 100% same type existed; after adopting the de-escalation prevention and control strategy, no other patients appeared multi-drug PA cross-infection again. **Conclusion** PFGE is a better method for studying the PA molecular epidemiology, the de-escalation prevention and control strategy is an effective strategy for preventing and controlling the cross-infection of multi-drug resistant PA.

Key words: *pseudomonas aeruginosa*; nosocomial infection; prevention and control; pulsed field gel electrophoresis

铜绿假单胞菌(PA)是临床常见的条件致病菌,广泛存在于人体皮肤、医疗器械等环境中,对多种抗菌药物天然耐药。近年来,PA 已经成为医院感染最常见的病原菌之一^[1-3]。PA 易引起爆发流行,如何防止多重耐药克隆株的传播已成为广泛关注的问题。本研究采用精确的脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型方法,了解感染菌株的同源性,探索医院内多重耐药 PA 交叉感染的防控措施。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2017 年 4 月上海市嘉定南翔医院重症监护室(ICU)、呼吸内科等各病区送检的痰、尿及创面等体液标本分离到多重耐药 PA 患者。试验菌株为同期各病区送检标本分离到的 16 株多重耐药 PA。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定药物敏感度试验 细菌的分离培养严格按照《全国临床检验操作规程》进行,鉴定和药敏试验采用 MICROSCAN 微生物鉴定和药敏分析仪。根据 2015 年美国临床

和实验室标准协会(CLSI)的相关标准判断结果,以大肠埃希菌的 ATCC25922 和 PA 的 ATCC27853 为质控菌株。

1.2.2 PFGE 试验 对 16 株多重耐药 PA 进行 PFGE 试验。使用限制性内切酶 Spe I, 37 °C 酶切 3 h,电泳参数为电压 6 V/cm,电泳时间 19 h,脉冲参数 3~50 s,电泳角度 120 °,温度 14 °C。染色后所获图谱使用 BioNumerics Software 7.0 软件,选择 Dice 相关系数和非加权组平均法(UPGMA)进行 PFGE 结果处理和聚类分析,将具有 85% 以上相同条带的菌株认为是相同的菌株。

1.2.3 降阶梯防控策略 在收集和更新患者病原学及相关交叉感染危险因素的基础上,评价患者的危险程度。参考美国疾病预防控制中心(CDC)标准预防措施,采取降阶梯分级防控措施。(1)一级防控。对象:入科前或住院期间病原学验证实感染或携带全耐药/多重耐药菌株;有与全耐药/多重耐药菌株感染者接触史患者,来自近 1 个月内有全耐药/多重耐药菌株流行科室;有皮肤黏膜破损等交叉感染高危因素。措施:单间

* 基金项目:上海市嘉定区科学技术委员会基金资助项目(2014-KW-15)。

作者简介:黄秋兰,女,副主任技师,主要从事临床微生物及形态学方面的研究。△ 通信作者,E-mail:cai139149@126.com。

隔离或同类感染患者放在同一个病房;床边警示,床边挂隔离标志且患者牌封面贴警示标识;接触隔离,区分患者治疗用具,医护及工勤人员接触患者体液及其他相关操作时应穿专用隔离衣等,患者环境严格消毒清洁。(2)二级防控。对象:有病原菌感染或携带但非全耐药/多重耐药菌株;来自非高危科室,近 1 个月内无全耐药/多重耐药菌株流行科室;一级防控的感染或携带全耐药/多重耐药菌株患者经治疗已清除者。措施:接触隔离(同一级防控)。(3)三级防控。对象:未感染或携带病原菌,无皮肤黏膜破损者。措施:依据美国 CDC 标准预防措施进行常规防护,不需隔离。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 PA 对 9 种抗菌药物产生不同的耐药模式。16 株 PA 对亚胺培南全部耐药。根据药物敏感度试验结果,分子 A 型 PA 的耐药表型各异,仅 2 株产生完全相同的耐药表型。3 株 B 型 PA 对哌拉西林、头孢他啶、亚胺培南和阿米卡星的药敏结果一致,但其余 5 种抗菌药物的药敏试验结果各异。C 型和 D 型 PA 的耐药表型各不相同。患者平均年龄 70 岁,多来自于呼吸内科或 ICU。

2.2 PFGE 同源性分析 PA 的全基因组 DNA 经过 Spe I 酶切后电泳产生数量不一的条带,相对分子质量为 $(20 \sim 1\ 200) \times 10^3$ 。PFGE 条带相似度为 71%~100%。将相似度 85% 以上者视为同型株,可将 16 株多重耐药 PA 分为 A、B、C 和 D 型。其中,优势菌株 A 型共 11 株(68.75%),B 型 3 株(18.75%),C 型 1 株(6.25%),D 型 1 株(6.25%)。见图 1。

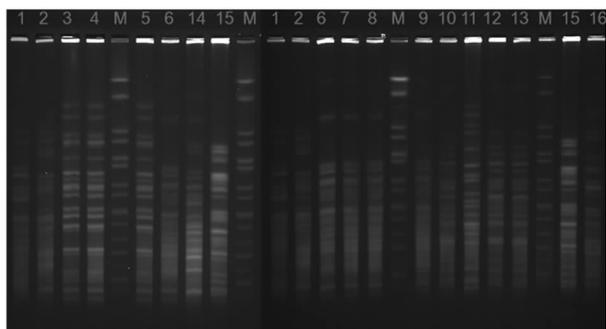


图 1 16 株 PA PFGE 指纹图

2.3 降阶梯防控效果 16 例多重耐药 PA 感染发生后,采取降阶梯防控策略,之后未再现多重耐药 PA 克隆株的流行,有效控制了多重耐药 PA 的交叉感染。

3 讨 论

PA 是革兰阴性杆菌,属假单胞菌属,在自然界广泛分布,易于生长,是医院获得性感染的重要条件致病菌。由于 PA 具备产生灭活或修饰抗菌药物的酶,可改变药物的靶位,主动外排及形成生物膜等众多耐药机制^[4-5],临床耐药问题严重。本研究显示,16 株 PA 对亚胺培南全部耐药,由于该药被认为是治疗多重耐药细菌的理想药物,特别是对产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)和 β 内酰胺酶(AmpC)的细菌。临床合理选用抗菌药物治疗 PA,避免细菌产生耐药性显得尤为重要。

医院感染菌株的同源性分析有多重方法,二级及以下医院通常依靠细菌耐药表型模式。随着分子技术的发展,出现了众

多分型方法:质粒指纹图分析、探针指纹、PFGE 分析等。各种方法特点各异,其中检测细菌染色体 DNA 稀有位点限制性内切酶酶切片段的 PFGE 方法被认为是细菌流行病学分析最可靠的方法^[6-7]。本研究显示,较长时间内,尽管耐药表型不支持 PA 院内交叉感染,但病区存在多重耐药 PA 流行,且相对集中在 ICU 及呼吸内科的老年群体。因此,二级医院预防多重耐药 PA 克隆株的传播不仅要注重 ICU 等有创操作科室,也要加强对老年及其他免疫力相对低下的住院患者的监测。在同一时期出现多重耐药菌株,无论耐药表型是否相同,都应警惕是否为一来源细菌的克隆传播。

在收集并鉴定出住院患者多重耐药 PA 后,特别是在经 PFGE 同源性分析揭示病区交叉感染的严峻情况下,笔者会同医院感染科,提出并推行了防止多重耐药 PA 交叉感染的降阶梯防控策略^[8];根据不同危险程度分 3 个等级,防控不同患者,好转者降级防控,通过分层并动态防控不同患者,达到预期目的。院内交叉感染的防控不仅需要临床、职能部门和检验科的密切合作,更需要精准的分子分型方法和有效的防控措施。

参考文献

- [1] Fjtitani S, Sun HY, Yu VL, et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source[J]. *Chest*, 2011, 139(4): 909-919.
- [2] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2012, 12(5): 321-329.
- [3] 李淑芳, 郑玲, 王芬. 1 335 株铜绿假单胞菌感染分布特征及耐药性研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2015, 32(10): 985-987.
- [4] Khosravi Y, Tay ST, Vadivelu J. Analysis of integrons and associated gene cassettes of met allo-β-lactamase-positive *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia[J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(7): 988-994.
- [5] Juan C, Zamorano L, Mena A, et al. Met allo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(3): 474-478.
- [6] 庞杏林, 陈守义, 邓志爱, 等. 重症监护病房医院感染铜绿假单胞菌耐药性及脉冲场凝胶电泳分型[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 10(1): 17-20.
- [7] 万强, 李娟, 陈杨. 辽宁省大连市耐亚胺培南铜绿假单胞菌产金属 β-内酰胺酶基因检测及脉冲场凝胶电泳分型[J]. *疾病监测*, 2017, 32(1): 38-42.
- [8] 李梅玲, 黄洁, 赵昱瑾, 等. 重症监护病房多重耐药菌交叉感染降阶梯防控策略的临床应用研究[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15(6): 552-556.