

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2022. 13. 002

MLST 方法用于支气管镜检查治疗室院内感染调查研究^{*}

杨玉琪¹,周磊¹,贺文芳¹,杨佩红¹,张云玲¹,王美珠²,周柯^{1△},刘家云^{1▲}
空军军医大学第一附属医院:1. 检验科; 2. 疾病预防控制科,陕西西安 710032

摘要:**目的** 对该院支气管镜检查治疗室进行院内感染调查,同时采用多位点序列分型(MLST)方法对 2 次可疑院内感染分离菌株进行同源性分析,以期发现其传播流行规律,从而为可疑院内感染提供有效判断和预防控制依据。**方法** 采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行菌株鉴定和药敏试验,采用 K-B 药敏纸片扩散法对部分药敏试验结果进行复核及补充;采用 QIAamp DNA 纯化试剂盒对分离菌株进行 DNA 提取,并将提取的细菌 DNA 进行 PCR 扩增后采用 MLST 方法对分离菌株进行同源性分析。**结果** 2 次集中分离的 23 株肺炎克雷伯菌(KP),其菌落均具有高黏性特征,并且对所做的 21 种抗菌药物均呈高度敏感性。MLST 方法结果显示,第 1 批分离出的 11 株 KP 中有 5 株均为 ST23 型,但未从其共同使用的支气管镜中分离出相应菌株;第 2 批分离出的 12 株 KP 中有 10 株为 ST375 型,包括从其共用的 1 号支气管镜管腔内分离出的 1 株 KP 菌株。**结论** MLST 方法可以明确院内感染的发生,从而为查找感染源,切断传播途径,降低或阻止院内感染发生提供有力证据。

关键词:肺炎克雷伯菌; 多位点序列分型; 院内感染
中图分类号:R446. 1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)13-1733-04

Nosocomial infection investigation of MLST method used in bronchoscopy treatment room^{*}
YANG Yuqi¹, ZHOU Lei¹, HE Wenfang¹, YANG Peihong¹, ZHANG Yunling¹,
WANG Meizhu², ZHOU Ke^{1△}, LIU Jiayun^{1▲}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Disease Prevention and Control,
The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Objective An Nosocomial infection investigation was conducted in the bronchoscopy treatment room of the hospital. In order to find the spread law, use the multilocus sequence typing (MLST) method to analyze the homology of the two suspicious nosocomial infection isolate strains, and also provide effective judgment and basis for prevention and control of suspicious nosocomial infection. **Methods** The strains were identified and tested the antibiotics sensitivity by VITEK 2 Compact automatic microbial identification and antimicrobial susceptibility analysis system. The K-B drug susceptibility paper diffusion method was used to review and supplement of the drug susceptibility test. Used the QIAamp DNA purification kit to extract DNA from the isolated strains and performed PCR amplification on them, and then used the MLST method to analyze the homology of the isolated strains. **Results** A total of 23 strains of Klebsiella pneumonia (KP) were isolated twice, and the colonies were all characterized by high viscosity. These 23 strains of KP showed high sensitivity to the 21 antibacterial drugs conducted. MLST method results showed that 5 of the 11 KP strains isolated in the first batch were all ST23 type, but the corresponding strains had not been isolated from their co-used bronchoscopies. Among the 12 KP strains isolated in the second batch, 10 were ST375 type, included 1 KP strain isolated from its shared No. 1 bronchoscopy lumen. **Conclusion** The MLST method could clarify the occurrence of nosocomial infection. Thereby it could also provide strong evidence for finding the source of infection, cutting off the route of transmission, and reducing or preventing the occurrence of nosocomial infection.

Key words: Klebsiella pneumonia; multilocus sequence typing; nosocomial infection

下呼吸道感染的诊断与治疗除需要影像学支持外,还需要病原学支持,目前临床常采用无创性痰液检测方法获取病原学依据。然而,因上呼吸道存在大量定植菌,如草绿色链球菌、表皮葡萄球菌、不动杆菌

^{*} 基金项目:空军军医大学第一附属医院学科助推项目(XJZT19ML08)。
作者简介:杨玉琪,女,主管技师,主要从事临床院内感染相关研究。△ 通信作者,E-mail:zhouke@fmmu.edu.cn。▲ 共同通信作者,E-mail:jiayun@fmmu.edu.cn。

及念珠菌等,从而会对临床诊断及治疗造成干扰^[1]。有研究表明,相对于常规痰液培养,通过支气管镜灌洗获取的下呼吸道深部标本,可以有效避免上呼吸道定植菌的干扰,肺泡灌洗液中分离出的细菌,可以更明确地为临床诊断提供依据,对临床治疗也更具有指导意义^[2]。但值得注意的是,支气管镜是一种有可能为患者带来一定损伤的侵入性操作,而且也因其具有结构复杂、材料特殊、管腔清洗具有死角等特点,可能会发生清洗、消毒不彻底,从而导致医源性感染传播的情况^[3-4]。本研究在持续监测本院肺泡灌洗液培养结果时发现,2 次肺泡灌洗液肺炎克雷伯菌(KP)集中被检出,通过分析患者基本情况、菌株抗菌药物药敏试验结果及应用多位点序列分型(MLST)方法对菌株进行分型分析,以期根据菌株间是否具有同源性发现其传播流行规律,从而为可疑院内感染发生提供有效的判断和预防控制依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 共收集 KP 菌株 23 株,其中第一批(2020 年 3 月 25 日至 3 月 28 日)11 株分离自肺泡灌洗液标本,编号为 1~11;第 2 批(2020 年 8 月 29 日至 9 月 2 日)11 株分离自肺泡灌洗液标本,编号为 21~31,第 2 批还有 1 株分离自 1 号支气管镜管腔内。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统、GN 细菌鉴定卡片、AST-GN13 细菌药敏卡片;Mueller-Hinton 培养基;K-B 药敏纸片扩散法所用药敏纸片;Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 所用试剂;Beckman DU800 核酸蛋白分析仪;ABI 2720 PCR 扩增仪;DNA 凝胶电泳系统;凝胶电泳成像系统。

1.3 质控菌株 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706、大肠埃希菌 ATCC 25922 均购自中华人民共和国国家卫生健康委员会临床检验中心。

1.4 方法

1.4.1 抗菌药物药敏试验 常规培养分离细菌,按照《全国临床检验操作规程》进行操作;采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行细菌鉴定和药敏试验,采用 K-B 药敏纸片扩散法进行药敏试验复核(亚胺培南和美罗培南)及其他补充药物的药敏试验,结果判断参照美国临床和实验室标准协会 2020 年标准执行。

1.4.2 细菌 DNA 提取 采用 QIAamp DNA 纯化试剂盒对分离纯化得到的对数生长期单菌落进行细菌 DNA 提取,并用 Beckman DU800 核酸蛋白分析仪检测 DNA 纯度和浓度,确保提取的 DNA 质量。

1.4.3 MLST 方法 参照 pasteur 数据库推荐的引物,选取 7 个独立管家基因构建肺炎克雷伯菌 MLST 研究方案,分别为 rpoB、gapA、mdh、pgi、phoE、infB、tonB^[5],引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。将提取的细菌 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应

条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s、50 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定为单一条带后,送上海生工生物工程股份有限公司测序,采用 BioEdit 软件对测序结果进行校正、拼接。将各管家基因拼接后的结果在 pasteur 数据库进行比对分析,从而获得所对应的 7 个管家基因的等位基因型,进一步将其组合可获得菌株 ST 型别。

1.4.4 内镜清洗消毒效果监测 依据《医院消毒卫生标准:GB 15982-2012》^[6] 进行采样并检测。支气管镜采样部位为内腔面,取清洗消毒后的支气管镜,用无菌注射器抽取 50 mL 含相应中和剂的洗脱液,从活检口注入冲洗内镜管路,全量收集后 2 h 内送检。取充分混合后的洗脱液 1 mL 接种平皿,清洁用水、在用消毒液使用中和剂中和后,接种方法相同。再取 15~20 mL 冷却至 40~45 ℃ 的营养琼脂培养基倾注入平皿中,冷却凝固后置于 37 ℃ 孵箱中培养,48 h 后进行观察。

2 结果

2.1 药敏试验结果 2 次集中分离的 23 株 KP 对青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类和碳青霉烯类等抗菌药物均敏感,且具有相同的耐药表型。23 株 KP 对各抗菌药物敏感结果见表 1。

表 1 KP 对 21 种抗菌药物的敏感结果

抗菌药物	药敏试验方法	1~11 号	21~31 号	1 号支气管镜
氨苄西林/舒巴坦	MIC 法	敏感	敏感	敏感
头孢呋辛	K-B 纸片扩散法	敏感	敏感	敏感
头孢曲松	MIC 法	敏感	敏感	敏感
头孢他啶	MIC 法	敏感	敏感	敏感
头孢吡肟	MIC 法	敏感	敏感	敏感
头孢哌酮/舒巴坦	K-B 纸片扩散法	敏感	敏感	敏感
哌拉西林/他唑巴坦	MIC 法	敏感	敏感	敏感
氨曲南	MIC 法	敏感	敏感	敏感
亚胺培南	MIC 法	敏感	敏感	敏感
厄他培南	MIC 法	敏感	敏感	敏感
美罗培南	K-B 纸片扩散法	敏感	敏感	敏感
比阿培南	K-B 纸片扩散法	敏感	敏感	敏感
环丙沙星	MIC 法	敏感	敏感	敏感
左氧氟沙星	MIC 法	敏感	敏感	敏感
妥布霉素	MIC 法	敏感	敏感	敏感
庆大霉素	MIC 法	敏感	敏感	敏感
阿米卡星	MIC 法	敏感	敏感	敏感
四环素	K-B 纸片扩散法	敏感	敏感	敏感
替加环素	K-B 纸片扩散法	敏感	敏感	敏感
头孢替坦	MIC 法	敏感	敏感	敏感
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	MIC 法	敏感	敏感	敏感

2.2 KP 的 MLST 结果 23 株 KP 经过 MLST 后共得到 10 种 ST 型别。第 1 批分离的 11 株 KP 以 ST23 型为主(5 株),其余 6 株分别为 ST374、

ST1265、ST2159、ST347、ST65、ST86;第 2 批分离出的 12 株 KP 以 ST375 为主(10 株),其余 2 株分别为 ST268、ST412;各管家基因序列及各 ST 型别分离菌株数见表 2。

表 2 KP 的 MLST 结果								
ST 型别	分离	管家基因序列						
	株数	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB
ST23	5	2	1	1	1	9	4	12
ST374	1	2	3	58	37	10	27	9
ST1265	1	2	1	1	1	10	4	12
ST2159	1	4	7	1	37	177	4	6
ST347	1	16	24	21	27	47	22	67
ST65	1	2	1	2	1	10	4	13
ST86	1	9	4	2	1	1	1	27
ST375	10	43	1	2	1	10	4	13
ST268	1	2	1	2	1	7	1	81
ST412	1	2	1	2	1	9	1	112

注:ST375 的 10 株 KP 中包含第 2 批肺泡灌洗液 9 株和第 2 批中共用的 1 号支气管镜管腔内 1 株。

2.3 资料分析 22 例患者初步诊断以可疑肺炎、肺部占位待查、肺结核待查为主,其中男 12 例,女 10 例,未见明显性别差异;年龄 29~69 岁,平均(53.1±11.2)岁。本院支气管镜检查治疗室目前在用的支气管镜共 4 个,分别编为 1~4 号,其中第 1 批 11 株 KP 菌株在使用了 4 个支气管镜的患者肺泡灌洗液中分别检出,以 ST23 型为主,共 5 株(45.5%,5/11),且该 5 例患者均使用的是 2 号支气管镜;第 2 批 11 株 KP 除 2 株分离自 2 例使用了 2 号、3 号支气管镜的患者肺泡灌洗液中,其余 9 例均分离自使用了 1 号支气管镜的患者肺泡灌洗液中,且均为 ST375 型(81.8%,9/11);第 2 批采样的 1 号支气管镜管腔内也分离出 ST375 型 KP。22 例患者肺泡灌洗液分离 KP 菌株 ST 型别及其使用支气管镜编号情况见表 3。

表 3 KP 菌株 ST 型别分离情况		
支气管镜编号	第 1 批	第 2 批
1 号	ST374(1 株)、ST1265(1 株)	ST375(10 株)
2 号	ST23(5 株)、ST86(1 株)	ST268(1 株)
3 号	ST2159(1 株)、ST347(1 株)	ST412(1 株)
4 号	ST65(1 株)	—

注:一代表未从该编号支气管镜分离出相应菌株;1 号支气管镜第 2 批 10 株 ST375 型 KP 中 9 株为患者肺泡灌洗液,另 1 株为支气管镜管腔内 KP。

3 讨 论

随着现代医学技术的不断发展,各种内镜诊疗技术在临床的应用逐渐普遍化,随之带来的因内镜下检查与治疗所致的感染也时有报道^[7-8]。做好内镜清洗、消毒工作,在预防和控制患者医院获得性感染中起至关重要的作用,防止交叉感染将成为 21 世纪内

镜检查面临的重大问题^[9]。

肺泡灌洗液是通过将纤维支气管镜插入气道,使用无菌生理盐水反复灌洗病变部位后,回收到的肺泡表面衬液^[10],其用于病原微生物学检查,可有效避免上呼吸道定植菌群污染,从而能有效分离并确定感染病原菌,对合理选择用药方案有积极的指导意义^[11]。本研究 2 次集中分离的 23 株 KP 其菌落均有高黏性特征,并且对所做的 21 种抗菌药物均呈高度敏感性,所以单从菌落特征和药敏试验表型来看,并不能区分其是否具有相关性及同源性。MLST 用作细菌分型,通过对菌株 ST 型别及亲缘关系进行分析,可以判断菌株间的同源性,其作为暴发流行的溯源工具,具有较高的准确性和分辨率,且可重复性好^[12-13]。本研究针对 2 次集中分离出的 23 株 KP 采用 MLST 方法进行型别分析,以期发现其是否具有同源性。MLST 结果显示,第 1 批分离出的 11 株 KP,其中有 5 株(45.5%)均为 ST23 型,短期内发现同一 ST 型别 KP 的高比率检出,且该 5 例患者使用的均是同一个支气管镜(2 号支气管镜),提示可能存在器械性检查操作所造成的院内感染。然而遗憾的是,同时对在用的 4 个支气管镜的各段管腔、清洁用水、在用消毒液分别进行采样培养,均未从中分离出 KP。支气管镜因管腔内部结构的影响,采样难度高,从而造成监测结果有假阴性的可能,然而集中分离出同一型别同一菌株的情况,应引起院内感染监测的重视。持续观察期间,第 2 批分离出的 12 株 KP(包括 1 号支气管镜管腔),其中使用了 1 号支气管镜的 9 例患者分离出的 KP 菌株均为 ST375 型(81.8%),且该次同时对在用的 4 个支气管镜的各段管腔、清洁用水、在用消毒液分别进行了采样培养和调查分析,从 1 号支气管镜管腔内分离出的 KP 菌株为 ST375 型,可以看出其具有同源相关性,提示确实存在器械性检查操作所造成的院内感染。对 2 次集中病例进行初步诊断可以看出,2 次集中从肺泡灌洗液中分离的 KP,首例患者均初步诊断为肺炎,考虑其肺部存在 KP 感染,可能造成检查过程中对支气管镜的污染,从而导致器械性检查操作所造成的其他患者发生院内感染。KP 作为一种可以定植于人体呼吸道和消化道的条件致病菌,会在机体抵抗力下降时引发肺部感染、血流感染等。据报道,KP 引起的社区获得性和医院获得性感染逐年增加,而近几年关于 KP 引起的医院获得性感染的增加主要与各种器械性操作和创伤性诊疗技术增多有关^[14]。

针对此次疑似支气管镜院内感染的发生,医院感染专职人员和微生物室进行共同采样及检测,并在采样的同时对支气管镜清洗、消毒的方式和流程,以及所使用的清洗消毒液种类和清洗消毒时间等也进行了调查监测。流行病学调查结果显示,本院对支气管镜不耐热部位的消毒采用的是高水平消毒液邻苯二甲醛,怀疑使用该消毒液对支气管镜管腔进行浸泡时发生了消毒效果不良事件。邻苯二甲醛作为一种用

于处理不耐热医疗器械的高水平消毒液,使用时应将器械完全浸入 20℃ 以上的邻苯二甲醛消毒液最少 5 min,灌满所有管腔并排除气泡,以消灭所有致病微生物。在消毒之前,必须完全清洗污染的可重复使用的器械,因为残留的含有污渍或润滑油的污染物会降低消毒剂的有效性;每次使用前应使用邻苯二甲醛消毒液浓度测试试纸确认邻苯二甲醛的浓度应符合要求(有效消毒浓度应不低于 0.3%);同时,使用期间建议使用温度计和定时器确保符合最佳条件^[15]。支气管镜消毒合格率要达到 100% 具有一定的难度,支气管镜使用后,及时、彻底、规范清洗,可有效阻止生物膜形成,是保证支气管镜消毒成功的关键和基础^[7]。提高清洗、消毒工作人员的操作规范性,加强支气管镜清洗、消毒效果监测,同时结合分子分型方法等检测手段,可以确保支气管镜等内镜的消毒质量,从而有效降低或阻止院内感染发生。

参考文献

- [1] 张真,田磊,陈中举,等. 2013—2015 年某院患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(6):516-520.
- [2] 雷莉莉,徐春华,李春梅. 2014—2018 年支气管镜肺泡灌洗液主要病原菌及其耐药性分析[J]. 实用心脑血管病杂志, 2020, 28(4):91-95.
- [3] 刘倩雯,李练,叶婉华,等. 新型过氧乙酸对软式内镜消毒效果的评价[J]. 中国药物经济学, 2016, 11(8):69-72.
- [4] 李传霞,张彤,刘慧媛,等. 2013—2018 年济南市医疗机构内镜清洗消毒效果监测分析[J]. 医学食疗与健康, 2020, 18(1):190-191.
- [5] 贺文芳,周柯,徐修礼,等. MLST 和 PFGE 在耐碳青霉烯

类肺炎克雷伯菌医院感染监测中的应用[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(6):533-538.

- [6] 中华人民共和国卫生部. 医院消毒卫生标准:GB 15982-2012[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.
- [7] 李建英. 新规范下消化内镜清洗消毒质量管理与控制[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(104):1503-1504.
- [8] 温宪芹,李子尧,刘雷,等. 山东省医疗机构消化内镜消毒状况调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6):738-740.
- [9] NORONHA A M, BROZAK S. A 21st century nosocomial issue with endoscopes[J]. BMJ, 2014, 19:348-351.
- [10] 周道银,吴茅,郑瑞,等. 支气管肺泡灌洗液细胞形态学检验中国专家共识:2020 版[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6):4-8.
- [11] 张炫炜,姚建军,高刘炯,等. 儿童急性重症肺炎伴呼吸衰竭急救体会及病原学分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(6):941.
- [12] DIANCOURT L, PASSET V, VERHOEF J, et al. Multi-locus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8):4178-4182.
- [13] 杨晨,胡仁静,胡锡池,等. MLST 在碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学分析中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(23):5514-5516.
- [14] MORADIGARAVAND D, MARTIN V, PEACOCK S J, et al. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland[J]. mBio, 2017, 8(1):e01976-16.
- [15] 徐东平,潘勤勤,张亮亮,等. 软式内镜消毒灭菌方法进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 21(6):957-960.

(收稿日期:2021-12-08 修回日期:2022-04-22)

(上接第 1732 页)

- [12] YU G, KIM Y, JEON S, et al. Thromboelastography for prediction of hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke[J]. Am J Emerg Med, 2020, 38(9):1772-1777.
- [13] CHI T, LIU Y, ZHU H, et al. Thromboelastography-derived parameters for the prediction of acute thromboembolism following non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal bleeding: a retrospective study[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3):2257-2266.
- [14] 解红,刘学政,刘新桥,等. 进展性缺血性脑卒中的发病机制和危险因素研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(6):612-614.
- [15] 杨婧,吴冰洁,田惠杰,等. 血栓弹力图预测急性脑梗死患者转归的临床研究[J]. 河北医药, 2017, 39(21):3306-3308.
- [16] 焦晓园,曹春艳,张灿飞,等. 进展性大动脉粥样硬化型脑

梗死的危险因素分析[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(4):411-414.

- [17] 刘爱芹,岳冬雪,张津溶,等. 不同 mRS 评分的急性缺血性脑卒中患者血清 PTX3、GAL3、Npt 水平[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(21):4617-4619.
- [18] 王平平,高颖,刘璐,等. NIHSS 绝对值变化与 NIHSS 变化率对脑梗死患者残疾预测能力的比较研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28(2):156-158.
- [19] LORENZANO S, ROST N S, KHAN M, et al. Oxidative stress biomarkers of brain damage: hyperacute plasma F2-Isoprostane predicts infarct growth in stroke[J]. Stroke, 2018, 49(3):630-637.
- [20] 李洁,张颜波. 急性脑梗死血清标记物研究进展[J]. 包头医学院学报, 2021, 37(12):109-114.

(收稿日期:2021-11-15 修回日期:2022-04-10)