

· 临床经验 ·

医院环境监测与临床分离的肺炎克雷伯菌的同源性分析

李悦 崔振泽 于爱民 崔妮
(大连市儿童医院,辽宁 大连 116023)

[中图分类号] R378.99+6 [文献标识码] D [文章编号] 1008-8830(2011)12-0997-02

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella Pneumoniae*, KPN)为条件致病菌,分布于正常呼吸道、消化道中,一旦进入伤口、肺部或泌尿系统后即出现很强的致病力,是社区和医院感染的常见致病菌^[1],可引起肺炎、脑膜炎、败血症等疾病。因其高发及广泛耐药,给临床治疗带来了很大困难,且可导致医院感染的流行和暴发^[2]。为有效控制 KPN 所致医院感染的流行和暴发,本研究采用随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)分型技术对医院感染目标监测与临床分离的 KPN 进行了同源性分析,并观察其耐药情况,以便明确发生医院感染的高危因素,从而采取有针对性的措施,降低医院感染的发生。

1 资料与方法

1.1 资料

- 1.1.1 菌株来源 (1)医院感染目标监测菌株:2009年12月至2010年2月大连市儿童医院医院感染管理科对监护病房、新生儿病房及手术室的物表、洗手液、医务人员的手及鼻腔分泌物进行了采样,选取 KPN 作为目标监测菌予以保留。(2)临床分离菌株:对同期新生儿病房分离自患儿的 KPN 予以保留。
- 1.1.2 药敏纸片及培养基 9种药敏纸片均为英国 OXOID 公司产品。M-H 琼脂购自杭州天和微生物试剂有限公司。
- 1.1.3 试剂 随机引物(5'-GGGATGGAAC-3'), Taq DNA 聚合酶, PCR 反应配套试剂盒及 DNA Marker DL200 均购自大连宝生物有限公司。
- 1.1.4 仪器 法国生物梅里埃公司生产的 ATB 半自动细菌鉴定仪及配套的 D32E 鉴定条;美国 BD9050 全自动血培养仪;美国 ABI 公司 PCR 仪;美

国 Thermo EC 公司的电泳仪;美国 Kodak 公司 Image Station 440 凝胶成像仪。

1.2 方法

- 1.2.1 细菌分离及鉴定 严格遵照《全国临床检验操作规程》进行菌株的培养、纯化、分离,而后行梅里埃 D32E 鉴定。菌株以半固体法保存。质控菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC700603。
- 1.2.2 纸片扩散法药敏试验 采用 K-B 纸片法,按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)2001年提供的标准判读结果。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。
- 1.2.3 DNA 提取 将 KPN 转接到血平板上,37℃培养 16 h,取新鲜菌落溶于无菌 EP 管中,加入 500 μL 双蒸水重悬菌液,10000 转/min 离心 2 min,弃掉上清,经裂解液裂解,加入蛋白酶 K 消化,再用饱和酚、氯仿、异戊醇抽提,最后用无水乙醇将 DNA 沉淀。
- 1.2.4 菌株同源性的检测 采用 RAPD-PCR 扩增法。扩增体系总体积为 25 μL,含引物 2 μL, dNTP 2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL,置 PCR 仪 95℃预变性 5 min;95℃变性 45 s,36℃退火 45 s,72℃延伸 2 min,共 40 个循环;最后 72℃延伸 10 min。取扩增产物 5 μL,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 扩增结果的分析

电泳结果利用凝胶成像分析系统进行观察并扫描记录。根据较通用的判定标准,出现一条大小不同、位置不同的条带时即认为是不同的克隆株。

2 结果

2.1 KPN 的来源及分布情况

[收稿日期]2011-07-18;[修回日期]2011-09-01
[基金项目]大连市科技计划指导性项目(No. 2009E14SF004)。
[作者简介]李悦,女,硕士,副主任医师。

11株KPN分离自2009年12月至2010年2月医院感染管理科的目标监测标本,5株KPN分离自新生儿病房患儿的血或痰液标本。

2.2 KPN 耐药性分析

药敏结果显示,目标监测和临床分离菌株普遍存在多重耐药性。15株KPN菌株对氨苄西林及复方新诺明100%耐药;但对喹诺酮及碳青霉稀类药物100%敏感;对阿莫西林/克拉维酸钾、头孢吡肟、头孢呋辛、头孢曲松、头孢哌酮/舒巴坦和美洛西林的耐药率分别为26.7%、93.3%、93.3%、93.3%、40.0%和83.7%。1例因患儿死亡(16号标本)未作药敏试验。

2.3 KPN 同源性分析

采用RAPD分型法对分离到的KPN进行了同源性分析。16株KPN均能产生指纹图谱,重复实验的结果基本一致。条带数目在1~5条之间,见图1。结果显示医务人员的手与医用洗手液分离菌、患儿与洗手盆分离菌、患儿与患儿分离菌之间分别存在着同源性。

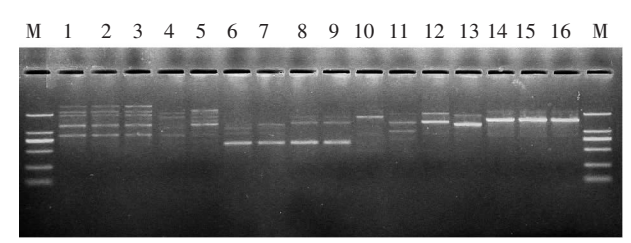


图1 16株KPN进行RAPD扩增后的电泳图 1、2、3号,8、9号菌株及14、15、16号菌株具有同源性。1、2、3号菌株分别来自医务人员手、监护室洗手液1及监护室洗手液2;4、5、6、7号菌株分别来自手术室洗手液1、监护室洗手液3、内二科洗手液及内三科洗手液;8、9号菌株分别来自新生儿洗手盆及患儿1的血标本;10、11、12、13号菌株分别来自手术室洗手液2、手术室洗手液3、患儿2的痰标本及医务人员鼻分泌物;14、15、16号菌株分别来自患儿3的痰标本、患儿4及患儿5的血标本。M为marker。

3 讨论

医院感染监测是预防和控制医院感染的基础,而目标性监测能够集中有限的资源用于重点部门和重点环节的监测,正在成为医院感染监控工作的一种发展趋势。本研究把KPN作为医院感染监测的目标菌,统计了其耐药率及同源性。结果提示目标监测和临床分离菌株普遍存在多重耐药性,但对含β-内酰胺酶抑制剂的抗生素仍较敏感,可考虑优先使用。亚胺培南即为敏感抗生素,在重症患儿中可考虑使用。本研究未监测到全耐药KPN,但一旦发生势必将引起医院感染的暴发流行,因此必须密切

监控并严格掌握抗菌药物的合理使用原则,以减少耐药菌株的产生。

将传统的微生物学技术与现代分子生物学技术相结合是研究医院感染传播机制的重要手段^[3]。RAPD是运用随机引物扩增进行基因分型,从而确定检测菌株的同源性,具有快速、简易、灵敏等特点,已广泛用于细菌等微生物的基因分型^[4]。本研究运用此技术对分离到的16株KPN进行了同源性分析,结果显示医务人员的手与医用洗手液分离菌、患儿与洗手盆分离菌、患儿与患儿分离菌之间分别存在着同源性。因此应注意保持洗手用品的清洁,否则单纯的强调洗手次数的增加,并不一定就代表着洗手质量的提高。根据《医院感染管理办法》将医疗机构或其科室的患儿中,短时间内发生3例以上同种同源感染病例的现象定义为医院感染暴发的标准^[5],本研究中分离到15、16号菌株的患儿为双胞胎,且母孕期有感染史,考虑为来自同一家庭的院前感染病例,虽然与分离到14号菌株的患儿发生了交叉感染,但尚未达到医院感染暴发的数量,而是存在潜在的危险,应引起该科室医务人员的高度重视。

医院感染监测是医院感染管理的一个重要组成部分,需长期、系统、连续地收集相关资料并进行分析。本研究是对一个季度的部分目标监测资料进行了分析,尚不能完全代表医院感染相关因素的整体情况。同时对于采取措施后KPN的耐药率及环境污染改善情况需做进一步的研究。

志谢:感谢大连市疾病预防控制中心对本研究所给予的技术支持。

[参 考 文 献]

[1] 麦菁芸,朱敏丽,陈春,贺孝良,林振浪. 新生儿肺炎克雷伯菌败血症临床特点和药敏分析[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(9):700-703.

[2] Veen A, Zee A, Nelson J, Speelberg B, Kluytmans J, Buiting A. Outbreak of infection with a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain associated with contaminated roll boards in operating rooms [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 4961-4967.

[3] Liebana E, Guns D, Garcia-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley FA, Davies RH. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(10): 3609-3616.

[4] Olmos A, Camarena JJ, Nogueira JM. Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(6): 1128-1134.

[5] 中华人民共和国卫生部. 医院感染管理办法 [R]. 2006,第三十六条.

(本文编辑:邓芳明)