

3 株导管相关血流感染鲍曼不动杆菌同源性分析^{*}

孙恒彪, 陈佑明[△], 张 婧, 潘祖汉, 谢俊杰(南方医科大学第三附属医院检验科, 广州 510630)

【摘要】 目的 对分离自同一患者不同血流部位的 3 株鲍曼不动杆菌进行同源性分析, 在基因水平上明确中心静脉导管相关血流感染的实验室诊断, 为临床防治提供依据。**方法** 采用西门子 Microscan Walkaway 40 Plus 微生物鉴定及药敏系统对分离的 3 株鲍曼不动杆菌进行细菌鉴定及药敏分析, 应用肠杆菌科基因组间重复序列聚合酶链反应(ERIC-PCR)及琼脂糖凝胶电泳进行同源性分析。**结果** 3 株鲍曼不动杆菌 ERIC-PCR 均扩增出阳性产物, 3 株细菌均电泳出 13 条位置相同的条带。**结论** 3 株鲍曼不动杆菌属于相同的基因型, ERIC-PCR 可用于鲍曼不动杆菌的同源性分析。

【关键词】 中心静脉导管; 导管相关血流感染; 鲍曼不动杆菌; 同源性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)09-1215-03

Analysis on homology of 3 strains of Acinetobacter baumannii in catheter-related bloodstream infection^{*} SUN Heng-biao, CHEN You-ming[△], ZHANG Jing, PAN Zu-han, XIE Jun-jie (Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

【Abstract】 Objective To analyze the homology of 3 strains of Acinetobacter baumannii isolated from different bloodstream positions in the same patient for defining the laboratory diagnosis of central venous catheter-related bloodstream infection at the gene level to provide the basis for clinical prevention and treatment. **Methods** 3 strains of Acinetobacter baumannii were identified and the drug sensitivity was performed by using Microscan Walkaway 40Plus microbiological identification and drug susceptibility system(Siemens, German). The homogeneous genotyping was performed by using enterobacteria repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) and Agarose gel electrophoresis. **Results** The positive products were amplified from 3 strains of Acinetobacter baumannii. 13 bands with the same location appeared by electrophoresis. **Conclusion** 3 strains of Acinetobacter baumannii belong to the same genotype. ERIC-PCR can be used in the homology analysis of Acinetobacter baumannii.

【Key words】 central venous catheter; catheter-related bloodstream infection; acinetobacter baumannii; homology

随着医疗技术的不断进步与发展,越来越多的侵入性操作用于临床疾病的诊断与治疗,其中中心静脉导管穿刺术是一种临床最常用的治疗手段。通过中心静脉导管可以进行高渗及强刺激药物输注、血液透析、营养支持治疗及动态监测血流动力学,可以避免多次外周静脉穿刺,减少患者痛苦,还可以避免化疗药物外渗,减少因化疗药物引起的静脉炎^[1]。但是随着中心静脉导管的广泛使用,中心静脉导管引起的导管相关血流感染(CRBSI)在普通病房及重症监护病房(ICU)均有发生,不仅增加患者医疗支出及住院时间,而且给患者造成极大的痛苦,甚至威胁患者生命^[2-3]。本次调查通过分析分离自同一患者外周血、中心静脉导管血及中心静脉导管尖端 3 株鲍曼不动杆菌同源性,查找分析造成此次 CRBSI 的可能原因,加深对 CRBSI 诊疗的认识,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,女,84 岁,因“反复胸闷、胸痛 10 年,再发伴头晕、头痛 7 d”收入本院心内科。4 月 26 日为了建立静脉输液通路,监测中心静脉血压,行经锁骨下中心静脉穿刺置

管术。5 月 7 日 12:00 左右患者出现发热,体温 38.3℃,随即分别从中心静脉导管及右上肢抽取静脉血进行血培养,结合患者临床表现经验给予静脉滴注头孢曲松(CRO),当晚 19:00 左右中心静脉导管血细菌培养报阳性,涂片结果为革兰阴性杆菌,立即拔除导管并送检做导管尖端细菌培养及鉴定,5 月 8 日 01:00 左右右上肢静脉血细菌培养报阳性,涂片结果为革兰阴性杆菌。5 月 10 日中心静脉导管血、右上肢静脉血及中心静脉导管尖端培养结果均为鲍曼不动杆菌,中心静脉导管尖端鲍曼不动杆菌半定量计数结果为 20 cfu。5 月 11 日患者体温恢复正常。

1.2 质控菌株 大肠埃希菌(ATCC 25922)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)均由广东省临床检验中心提供。

1.3 细菌鉴定及药敏试验 采用西门子公司的 Microscan Walkaway 40 Plus 型微生物鉴定及分析系统对分离得到的 3 株鲍曼不动杆菌进行鉴定及药敏试验。药敏试验采用微量肉汤稀释法,药敏试验抗菌药物选择哌拉西林(PIP)、四环素(TET)、替卡西林/克拉维酸(TIM)、头孢他啶(CAZ)、CRO、头

^{*} 基金项目:广东省广州市科技计划项目(2012Y5-00004)。

作者简介:孙恒彪,男,本科,主管检验师,主要从事临床微生物检验。 [△] 通讯作者, E-mail: cym38432@163.com。

孢噻肟(CTX)、头孢吡肟(FEP)、美罗培南(MEM)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN)、妥布霉素(TOB)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、复方磺胺甲噁唑(SXT)14 种药物。药敏试验结果以美国临床和实验室标准化协会指南文件 2010 版作为药敏试验判断标准。

1.4 细菌基因组 DNA 提取 于血平板上挑取单个菌落加入到含 500 μ L 双蒸水的 Eppendorf 离心管中,12 000 r/min 离心 20 s,弃上清液,重复上述步骤洗涤细菌 2 次,最后弃上清液加入 500 μ L 双蒸水,每管再加入 10 mg/mL 的蛋白酶 K 10 μ L,混匀 58 $^{\circ}$ C 温浴 60 min,取出离心管放入 95 $^{\circ}$ C 水浴箱中水浴 10 min 后立即冰浴 20 min,12 000 r/min 离心 1 min,取上清液作为聚合酶链反应(PCR)模板。

1.5 肠杆菌科基因组间重复序列(ERIC)-PCR 反应体系 引物序列为 ERIC2:5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3',由上海生工生物工程有限公司提供^[4-5]。PCR 反应体系:总体积 40 μ L,其中双蒸水 20 μ L,dNTP 4 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 5

μ L,引物 2.0 μ L,模板 2.5 μ L,Taq 酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,MgCl₂6 μ L。

1.6 PCR 扩增 ERIC-PCR 采用罗氏 cobas TaqMan 48 型 PCR 仪进行,ERIC-PCR 反应条件^[6]:先 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;后 92 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共计 35 个循环;最后再 70 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳:采用德国 Biometra Compact M 电泳仪进行电泳,4 μ L 扩增产物加 1 μ L Loading Buffer,共 5 μ L 加入到 1.2% 琼脂糖凝胶中,电压 80 V、电泳 3 h。采用英国 Uvitec Firereader 凝胶成像仪对凝胶进行拍照。采用 Quantity One V4.62 版本对电泳结果进行聚类分析。

2 结 果

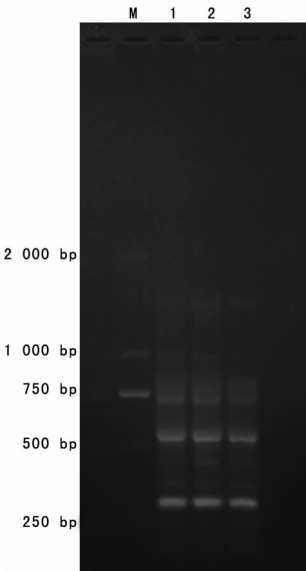
2.1 3 株鲍曼不动杆菌耐药性分析 中心静脉导管血、右上肢静脉血及中心静脉导管尖端分离得到的 3 株鲍曼不动杆菌生物编码均相同,对临床常用抗菌药物敏感性较好。3 株鲍曼不动杆菌对临床常用抗菌药物敏感性见表 1。

表 1 分离自导管静脉血、右上肢静脉血及导管尖端 3 株鲍曼不动杆菌耐药性分析

标本来源	PIP	TET	TIM	CAZ	CRO	CTX	FEP	MEM	AMK	GEN	TOB	CIP	LVX	SXT
中心静脉导管血	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
右上肢静脉血	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
中心静脉导管尖端	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

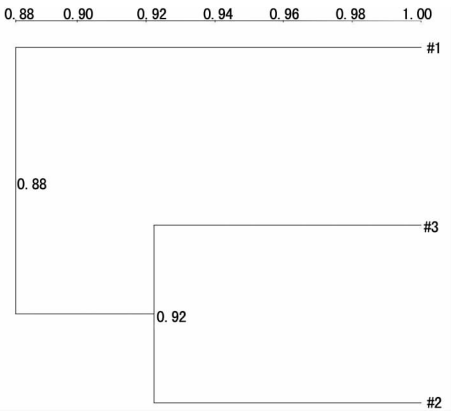
注:S 表示敏感。

2.2 同源性分析 分离得到的 3 株鲍曼不动杆菌采用 ERIC-PCR 进行同源性分析,ERIC-PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并拍照,电泳结果见图 1。PCR 扩增产物条带数量、位置完全相同为同一基因型;主条带相同,副条带相差 1~2 条为基因型相似或密切相关;不符合上述条件者为不同基因型。电泳结果显示,3 株鲍曼不动杆菌扩增产物条带数均为 13 条且位置相同,故认为 3 株鲍曼不动杆菌为同一基因型。聚类分析结果见图 2。



注:1 为中心静脉导管血;2 为右上肢静脉血;3 为中心静脉导管尖端。

图 1 3 株鲍曼不动杆菌 ERIC-PCR 电泳结果



注: #1 为中心静脉导管血; #2 为右上肢静脉血; #3 为中心静脉导管尖端。

图 2 3 株鲍曼不动杆菌聚类分析结果

3 讨 论

CRBSI 是临床一种常见的院内感染,引起 CRBSI 的常见病原菌有凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、真菌等,鲍曼不动杆菌已成为引起临床科室尤其是 ICU 的 CRBSI 的重要病原菌^[7-9]。本次调查通过采用 ERIC-PCR 在基因水平对鲍曼不动杆菌引起的 CRBSI 给予确认,ERIC-PCR 具有应用广泛、简便、快速、敏感性高及重复性好等特点,可用于细菌鉴定、分类及流行病学调查^[10]。随着各种各样导管在临床上的使用,CRBSI 时有发生,引起 CRBSI 有多种多样的原因,常见相关因素有:(1)导管类型及材料。双腔及多腔导管均可增加 CRBSI 发生的概率;聚乙烯材质的导管因细菌易定植,可使 CRBSI 发生率上升。(2)

导管穿刺部位。锁骨下静脉感染率大于颈静脉,颈静脉感染率大于股静脉。(3)敷料的选择。临床常用半透性聚氨酯敷贴可造成皮肤局部潮湿,增加细菌定植及感染概率。(4)导管留置时间。导管留置时间超过 7 d 是引起 CRBSI 的一个重要危险因素。(5)医护人员操作熟练程度。盲穿、穿刺时间过久、操作生疏等均可增加 CRBSI 的发生率。(6)患者因素。高龄、肿瘤、血液病、重症感染、创伤、营养不良、病情复杂、病程长,以及复杂大手术等均是 CRBSI 的易感因素^[11]。在本次调查中,该患者送检的中心静脉导管血培养报阳时间为 4.5 h,右上肢静脉血报阳时间为 11.8 h,比中心静脉导管血报阳时间晚 7.3 h,中心静脉导管血及右上肢静脉血培养结果均为鲍曼不动杆菌,拔除的中心静脉导管尖端也培养出了鲍曼不动杆菌,3 株鲍曼不动杆菌药敏试验结果完全形同,对常用抗菌药物均敏感。依据 CRBSI 判断标准^[12]:导管尖端培养阳性计数大于或等于 15 cfu,中心静脉导管血阳性报警时间比外周血报警时间早 2 h 以上,该患者可确诊为 CRBSI,同时 ERIC-PCR 同源性分析结果在基因水平也显示该患者发生了 CRBSI。该患者病情十分复杂,合并多种疾病:(1)冠心病、稳定型心绞痛;(2)高血压;(3)慢性支气管炎、慢性胆囊炎及慢性胃炎;(4)右肾切除术后、慢性肾衰竭、高钾血症;(5)5 年前阑尾炎穿孔阑尾及直肠切除,乙状结肠造口术后;(6)骨质疏松;(7)轻度贫血。结合上述,高龄、病情复杂、病程长、复杂大手术等均可能是造成该患者此次 CRBSI 的原因,但不能排除其他因素。

由于中心静脉导管的广泛使用及易发生 CRBSI 的特性,这就要求在日常工作中严格无菌操作,组织医护人员进行培训,规范导管操作技术,提高导管护理水平,每天更换敷贴,对导管进行肝素化,防止血栓形成,根据病情及时拔除导管,积极治疗原发疾病,伴有复杂疾病的老年人做好支持治疗,提高患者免疫力^[13]。同时,在怀疑 CRBSI 时应及时送检血培养及导管尖端细菌培养,为临床诊断及治疗提供依据。

参考文献

- [1] 熊琼,任小红. 中心静脉导管相关血流感染的研究进展[J]. 护理研究,2010,24(6):475-478.
- [2] Pronovost PJ, Goeschel CA, Colantuoni E, et al. Sustaining reductions in catheter related bloodstream infections in Michigan intensive care units: observational study [J]. BMJ, 2010, 340(4):309-319.
- [3] Nabi Z, Anwar S, Barhamein M, et al. Catheter related in-

fection in hemodialysis patients [J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2009, 20(6):1091-1095.

- [4] Guimaraes AS, Dorneles EM, Andrade GI, et al. Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using ERIC-PCR [J]. Vet Microbiol, 2011, 153(3/4):299-306.
- [5] Ye Y, Jiang Y, Fan T, et al. Resistance characterization, virulence factors, and ERIC-PCR fingerprinting of *aeromonas veronii* strains isolated from diseased trionyx sinensis [J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(11):1053-1055.
- [6] 周云芳,袁维荣,曹清. 医院多重/泛耐药鲍曼不动杆菌的同源性分析[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(6):518-522.
- [7] 芮晓艳,胡杰贵,熊自忠. 耐亚胺培南鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶检测及同源性分析[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(2):154-157.
- [8] Qasim M, Zafar A, Ejaz H, et al. Changing trends in frequency and antimicrobial susceptibility of pathogens causing catheter related infections in children [J]. African J Microbiol Res, 2013, 5(7):351-360.
- [9] 郑妍,刘纹,刘晓敏,等. 520 例肿瘤患者外周置入中心静脉导管相关感染病原菌分布分析[J]. 现代诊断与治疗, 2012, 23(9):1554-1555.
- [10] Chakraborty RD, Surendran PK, Joseph TC. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from Marine fin-fish/shellfish landed along south-west coast of India [J]. Indian J Fish, 2013, 60(1):87-96.
- [11] Frasca D, Dahyot-Fizelier C, Mimoz O. Prevention of central venous catheter-related infection in the intensive care unit [J]. Crit Care, 2010, 14(2):212-218.
- [12] Mermei LA, Allon M, Bouza E, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular Catheter-Related infection; 2009 update by the infectious diseases society of America [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(1):1-45.
- [13] 王亚霞,刘亚新,沈培琼. 中心静脉导管相关感染 128 例的临床分析和预防措施[J]. 解放军护理杂志, 2010, 27(9):680-682.

(收稿日期:2014-11-15 修回日期:2015-01-18)

(上接第 1214 页)

- [11] CLSI. EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline-second edition [S]. PA, SUA:CLSI, 2010.
- [12] 丛玉隆. 国内凝血试验常规检查的热点话题与思考[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(1):18-21.
- [13] 郭野,寿玮龄,吴卫,等. INNOVANCE 试验和 PLUS 试验检测 D-二聚体方法比较[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(7):638-642.

- [14] de Moerloose P, Palareti G, Aguilar CA, et al. A multicenter evaluation of a new quantitative highly sensitive D-dimer assay for exclusion of venous thromboembolism [J]. Thromb Haemost, 2008, 100(3):505-512.

- [15] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2):143-145.

(收稿日期:2014-11-03 修回日期:2015-01-22)