

医院内水源性感染：常见水系、病原体、采样方法与检验技术

复旦大学附属中山医院
周昭彦




什么是医院内水源性感染？

- ⊕ 水源性感染属于水传播疾病，所有与水使用相关感染的通称；
- ⊕ 涉及菌血症、肺炎、气管支气管炎、尿路感染，手术部位感染等；
- ⊕ 医院内和社区水源性感染区别

- **病原谱**
社区水源性感染与粪便有关的细菌；医院水源性感染主要为非肠道类革兰阴性杆菌
- **感染途径**
社区水源性感染为粪-口传播；医院水源性感染可吸入含病原体的气溶胶、呛入受污染的水、直接或间接接触受污染水

历史背景

- 1883年，德国的Robert Koch第一个发现自来水中含有数量巨大的细菌；
- 1967年¹，Moffet报道医院蒸馏水和吸入治疗设备内有大量微生物存活；
- 1976年，美国退伍军人大会上182人感染的军团菌肺炎；
- 1970年-2001年，许多研究证明水是医院感染的来源，水中病原菌传递耐药基因，产生毒素；
- 水在医院感染中的地位**有争议**
2002年Anaissie写了一篇在医院水源性感染中非常有影响力的综述；2003年另一位德高望重的医院感染专家Hunter P写了另一篇综述进行反驳。新的分子分型技术证实了Anaissie的估计。
- 大约10年前欧美国家大力提倡控制医院水源性感染，提出降低供水系统污染就是降低医院感染。
1.Moffet HL, et al. AJDC.1967;114:7-12.

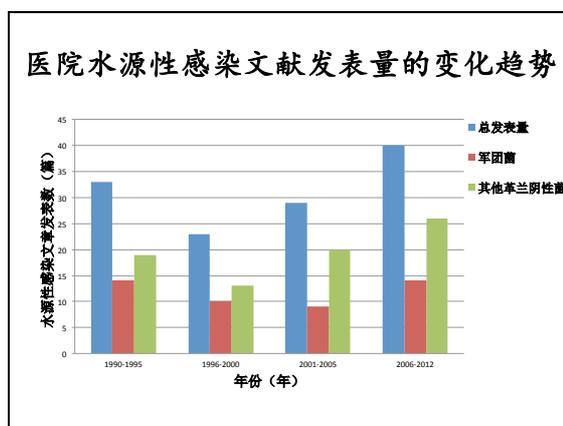
分子生物学分型技术

- **基因分型方法**
 - PFGE
 - Southern Blot Analysis-Ribotyping
 - Plasmid Analysis
 - Typing Methods Using PCR
 - Multiplex PCR
 - Nested PCR
 - AP-PCR
 - AFLP
- **其他PCR相关的分型方法**
 - Nucleotide Sequence-based Analysis
 - SLST
 - MLST



脉冲场凝胶电泳仪 (PFGE)

2010-12-3 5



各病房中水源性感染病原体的分类

病原体	ICU	肿瘤/血液	外科移植	透析/血液透析	其他病房*	未说明
假单胞菌	10	5	1	1	6	1
伯克霍尔德菌	5	1	1	4	2	3
分枝杆菌	0	3	1	1	1	3
肠杆菌	6	0	0	0	1	0
莫拉菌	2	1	0	0	1	0
鞘氨醇杆菌	2	2	0	0	0	0
窄食单胞菌	3	0	0	0	1	0
黄杆菌	3	0	0	0	0	0
气单胞菌	0	0	1	0	1	0
弯曲菌	0	0	0	0	1	0
其他革兰阴性杆菌	1	0	1	1	0	0
总计	32	12	5	7	14	7

*烧伤病房、泌尿外科、康复科、护理院、心内科

2009年11月第19卷第5期
 基础与应用研究
 论 著

水中分娩缸水细菌污染与母婴感染相关性探讨

廖士霞*, 吴 哲*, 王英探*, 林慧文*, 蔡中瑜*, 陈丽君*, 高晓波*, 彭 军*

摘要: 目的 探讨水中分娩缸水细菌污染率和细菌种类, 以及与母婴感染的相关性。方法 对广州市第十二人民医院 2006年10月至2007年12月水中分娩的产妇 146例和同期采取传统分娩产妇 40例进行回顾性分析。结果 水中分娩缸水细菌污染率 83.3%, 革兰阳性球菌以表皮葡萄球菌为主, 占 20.3%, 革兰阴性杆菌以大肠埃希菌为主, 占 29.7%。新生儿脐拭子细菌培养水中分娩组阳性率 9.1%, 传统分娩组 22.5%, 两者比较差异无统计学意义 ($P=0.05$)。水中分娩组 C 反应蛋白新生儿为 (6.65±7.9)mg/L, 产妇产后为 (35.6±16.0)mg/L, 传统分娩组新生儿为 (6.42±6.8)mg/L, 产妇产后为 (49.7±32.0)mg/L, 其母儿感染临床征象两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 水中分娩缸水有较高的细菌污染率, 但并未增加母婴感染。

关键词: 水中分娩; 缸水污染; 细菌培养; 菌种分析; 母婴感染

中图分类号: R71 文献标志码: A

发帖 | 回帖

标题: [讨论] ICU病房安装水池对与错? (控制病情)

发表于 2013-4-17 20:39:18 | 只看该作者 | 倒序浏览

本贴最后由 四叶草 于 2013-4-26 16:55 编辑

在今年的上海感控年会上, 有几位专家谈到对于水源性医院感染的防控, 在ICU安装水池, 目前国内有两种观点, 一是ICU需要安装水池, 而且数量限定《卫生保健医学学科建设指南》规定为每2张床之间需要安装一个水龙头, 理由大概为提高ICU医务人员卫生的依从性。

二是ICU应该减少水龙头的数量, 其理由为军团菌容易通过水的气溶胶导致ICU患者发生军团菌和真菌感染。想调查一下大家的意见, 贵院现状又是如何? 请大家回帖说明。

本帖投票, 共有 91 人参与投票, 查看投票参与人

投票已经结束

1. ICU应安装数量较多的水池 35.87% (33)

2. 不建议ICU病房安装水池 64.13% (59)

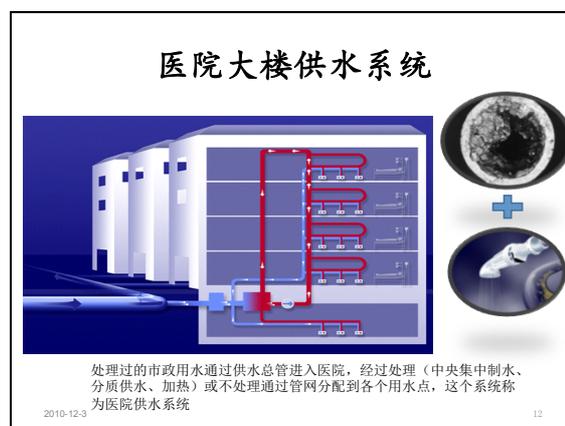
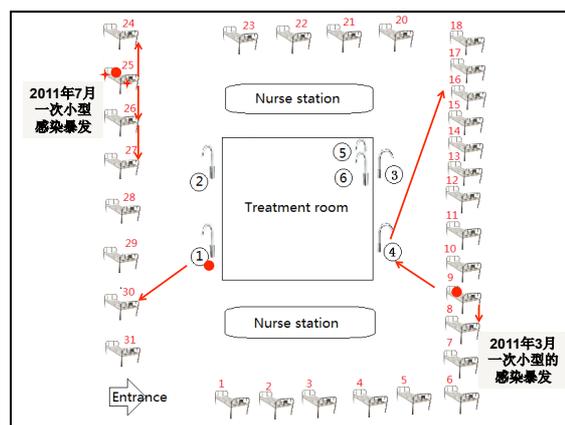
投票截止日期: 2013-11-19

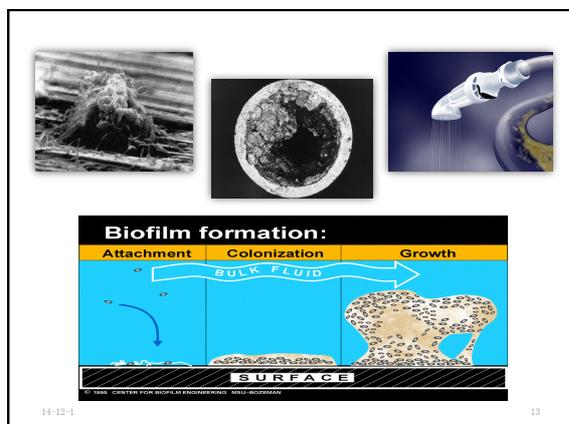
投票已过期, 不能投票

多少, 安装, 水池, ICU病房

分享到: QQ空间 | 腾讯微博 | 腾讯朋友

收藏 | 顶 | 回复





Journal of Hospital Infection

ESBL的分离率为31%

Contaminated sinks in intensive care units: underestimated source of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the patient environment

D. Roux^a, B. Aubier^a, H. Cochard^a, R. Quentin^b, N. van der Mee-Marquet^{a,b,*}, for the HAI Prevention Group of the Réseau des Hygiénistes du Centre

^a Réseau des Hygiénistes du Centre, Hôpital Troseau, Centre Hospitalier Universitaire, Tours, France
^b Service de Bactériologie et Hygiène, Hôpital Troseau, Centre Hospitalier Universitaire, Tours, France

New antibiotic-resistant bacteria discovery

07 April 2011

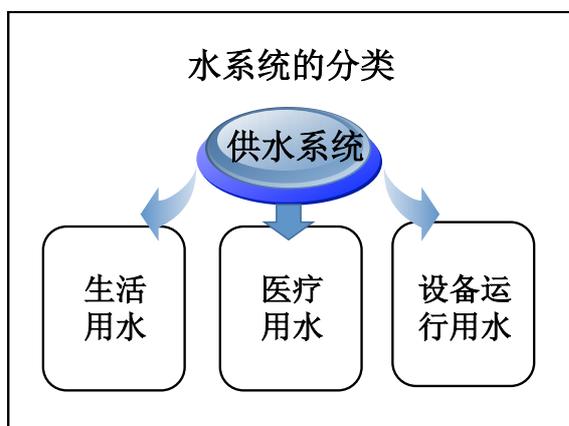
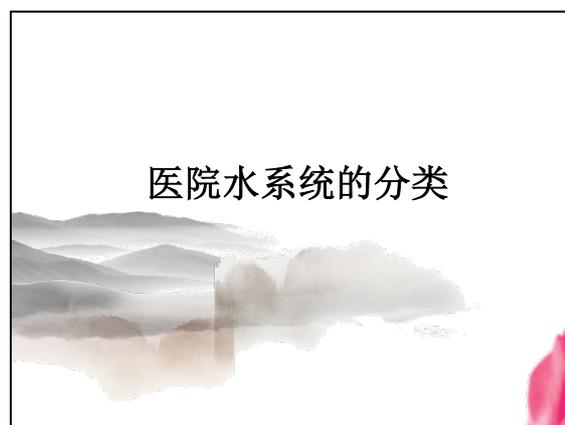
Disease-causing bacteria carrying the new genetic resistance to antibiotics, NDM-1 have been discovered in New Delhi's drinking water supply by a Cardiff-led team.

The team found new strains of resistant bacteria in the Indian capital, including species which cause cholera and dysentery. The findings are the first evidence of the environmental spread of NDM-1, which had previously only been found in hospitals.

Professor Tim Walsh

The scientists are calling for urgent action by health authorities worldwide to tackle the new strains and prevent their global spread. They also highlight the all-round benefits of preventative measures such as better sanitation and appropriate drinking water.

印度新德里饮用水中发现NDM-1型多重耐药菌



- ## 医院水系统
- **生活用水**
 饮用水、洗手、淋浴、病人擦拭、瓶装水、饮水机、制冰机；
 - **医疗用水**
 医疗设备：血液透析仪、口腔科综合治疗台水线、呼吸机、水疗池、内镜清洗仪、婴儿暖箱、湿化瓶；
 清洗和配制用水：配制试剂（口腔洗液、消毒剂、透析液）、冲洗消毒后的医疗器械（内镜）；
 - **设备运行用水**
 空调 冷却塔、蒸馏水制取设备、加湿器。

医院水系统

生物膜定植

- 供水管道、水龙头、淋浴喷头、浴盆、热水储水器、水池、下水道、水龙头曝气器
- 饮水机、制冰机
- 空调冷却塔
- 水疗池、透析用水处理管道

自来水还可污染

- 医疗器械，如内镜、呼吸机、口腔科水线
- 口腔洗液、防腐剂和杀菌剂的溶解液
- 加湿器、喷雾器、洗眼装置
- 花瓶、喷泉、注水的玩具

自来水用来清洁

- 将污染更大面积的工作表面、器具、用于的擦拭海绵和纱布

常见水源性感染病原体及感染来源

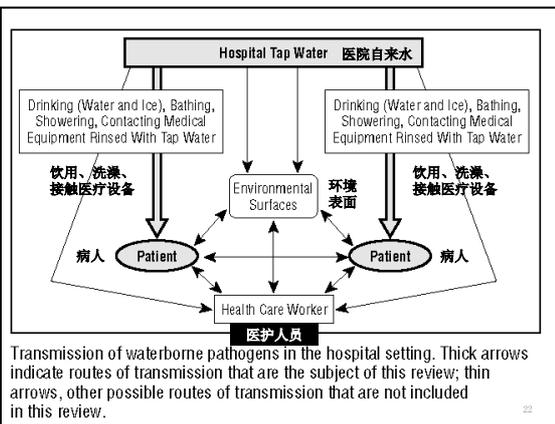
- 自来水系统是最常见的感染来源：主要污染终端，如水龙头、水池、淋浴喷头、澡盆，与很少清洁消毒及使用感应式水龙头有关；
- 自来水的下水道系统主要定植**假单胞菌属**。
- 间接的感染来源：自来水污染了血透仪，水疗池，不恰当的使用自来水稀释试剂和消毒液，清洗医疗装置，自来水准备药物和食物；
- 除了自来水，蒸馏水在生产 and 储存过程中，血液透析系统反渗透过程中容易受到污染；**伯克霍尔德菌**是常见的蒸馏水和无菌水的污染菌；
- 市瓶装装水也会引起医院感染，常见污染菌为**铜绿假单胞菌**；
- 少见或意想不到的感染来源：注水的玩具，洗手的肥皂，制冰机，融化冰冻血浆和人白蛋白的水浴箱，呼吸机和加湿器的冷凝水。

水源性感染主要传播形式

- ① 饮水：污染的水
- ② 直接接触：水疗
- ③ 间接接触：医疗设备
- ④ 吸入：气溶胶
- ⑤ 呛入：污染的水



前三个传播方式为革兰阴性菌和非结核分枝杆菌引起感染的常见模式，受军团菌污染的气溶胶常常导致军团菌感染呼吸道



水源性感染的病原谱



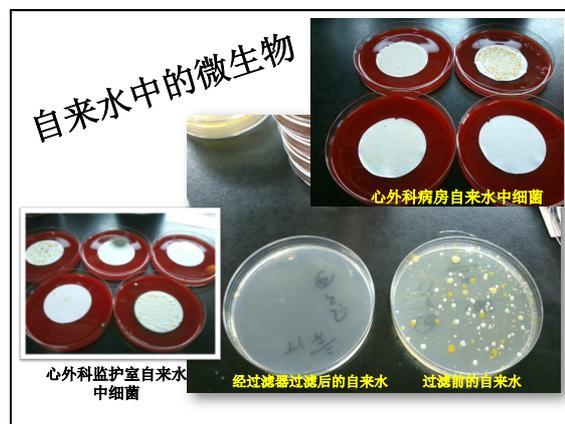
水源性病原体共同之处

- (1) 均在储水系统中出现并繁殖；
- (2) 可形成生物膜；
- (3) 有生长必需条件（理想的生长温度是25℃-45℃，温度太高和太低均抑制生长）；
- (4) 感染与建筑物管道相关联；
- (5) 传播方式包括雾化吸入、摄入和接触。

医院水源性感染的病原微生物

<p>细菌 Bacteria</p> <p>铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 嗜肺军团菌 <i>Legionella pneumophila</i> 分枝杆菌属 <i>Mycobacterium spp.</i> 窄食单胞菌属 <i>Stenotrophomonas spp.</i> 不动杆菌属 <i>Acinetobacter spp.</i> 气单胞菌属 <i>Aeromonas spp.</i> 伯克霍尔德菌属 <i>Burkholderia spp.</i> 克雷伯菌属 <i>Klebsiella spp.</i> 奴卡菌属 <i>Nocardia spp.</i> 肠杆菌属 <i>Enterobacter spp.</i> 沙雷菌属 <i>Serratia spp.</i> 黄单胞菌属 <i>Flavobacterium spp.</i></p>	<p>寄生虫 Parasites</p> <p>小球隐孢子虫 <i>Cryptosporidium parvum</i> 蓝氏贾第鞭毛虫 <i>Giardia lamblia</i> 棘阿米巴原虫 <i>Acanthamoeba spp.</i></p> <p>真菌 Fungi</p> <p>烟曲霉菌 <i>Aspergillus fumigatus</i> 茄病镰刀霉 <i>Fusarium solani</i> 甾氏外瓶霉 <i>Exophiala jeikei</i></p> <p>病毒 viruses</p> <p>诺如病毒 <i>Norovirus</i> 腺病毒 <i>Adenovirus</i></p>
---	--

25



水样采集和检验技术

什么情况下需要采样?

- **常规监测** 检测具有临床意义的经水传播的病原体
- **医院感染暴发** 针对某些水源性致病菌做水源检测
- **防控措施效果评估** 确定各分布系统的终端水质

常规监测的水

- 通常不必要对医疗保健机构供水系统进行常规的水检测（除军团菌）
- 水疗用水：
每周一次（大肠埃希菌/铜绿假单胞菌/异养菌总数/coli菌总数）
- 内镜冲洗液：
每周一次（异养菌总数），每年一次（非结核分枝杆菌NTM），非强制性（铜绿假单胞菌）
- 透析液：
每月一次（异养菌总数，内毒素）

医院食物、水和环境样本微生物检测采样和结果解释指南 DRAFT, 2010.
卫生保健机构的环境感染控制指南, CDC, 2003.

29

自来水/医疗用水/医疗器械管道水

1. **采集最利于微生物生长的一部分水；**
 - ⊕ 温度
 - ⊕ 水流停滞
2. **采水量由水样中微生物的估计浓度决定；**
 - ⊕ 瓶装矿物质水-250ml
 - ⊕ 自来水等经处理的水-100ml
 - ⊕ 污水少量或稀释后的水
 - ⊕ 军团菌计数和检测-1L
3. **拭子采样与水采样相配合。**

生物膜采样

采样点

- 水箱、淋浴喷头、水龙头鼓风机，尤其免疫缺陷病人



步骤

- 棉拭子旋转摩擦内壁直接涂平板；或置pH7.2磷酸盐缓冲液/5-10mL相应采样设备的水样内，低温运至实验室，24小时内完成；
- 震荡和涡旋混匀将样本充分混匀；
- 原液和样本稀释液涂于**非选择性培养基**（如平板计数琼脂或R2A培养基）和**选择性培养基**（如军团菌分离培养基 GVPC）。

结果判读

- 如平板计数超过水样中数目（即每平方厘米面积菌落数与每毫升水中菌落总数相比），则有生物膜形成的可能性。

环境水样微生物检测项目

细菌总数计数

- 异养菌平板计数（heterotrophic plate count, HPC）：异养菌是指水样中活的需氧或兼性厌氧细菌，包括铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌等水源性细菌，NTM和军团菌除外。
- 自来水，纯水，透析液，内镜冲洗液，口腔科用水

水源性病原菌检测

- 军团菌
- 非结核分枝杆菌（NTM）
- 铜绿假单胞菌

32

选择检测方法



- 平板涂布法
- 平板倾注法 → **病原菌含量高，样本容量小**
- 负压或正压膜过滤法 → **病原菌含量低，样本容量大**
- 离心法

- 平板涂布法 0.1-0.5ml
- 平板倾注法 1ml
- 膜过滤法0.1ml-10L

方法学的评价

平板涂布法 ≥ 膜过滤法 > 平板倾注法

33

这些水用哪些方法来检测？

- ✦ 瓶装矿物质水-250ml，膜过滤法
- ✦ 自来水等经处理的水-100ml，1-5CFU/100ml 离心法、膜过滤法
10²-10⁵CFU/ml 涂布法、倾注法
- ✦ 污水少量或稀释后的水，涂布法、倾注法
- ✦ 军团菌计数和检测-1L，膜过滤法
- ✦ 透析用水细菌含量<200CFU/ml，涂布法、膜过滤法

异养菌平板计数样本采集关键点

容器

- 无菌玻璃瓶、无菌聚乙烯瓶或无菌塑料袋

培养基

~~高营养培养基：巧克力平板~~
低营养培养基：TSA、HPC



送检

- 尽快送检，如不能及时处理4℃保存，24h内完成

温度

- 20℃-22℃

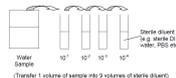
时间

- 5-7天

35

平板倾注法

样本稀释



Water Sample 10¹ 10² 10³

(Transfer 1 volume of sample into 9 volumes of sterile diluent)

培养基和培养条件

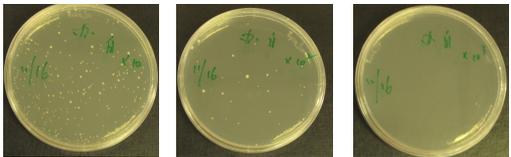
- R2A
 - 25℃ 孵育 14d
 - 一块 22℃ 孵育 5-7d，另一块 30℃ 孵育 3d
- YEA/TGEA
 - 自来水：一块 22℃ 68±4 h，另一块 37℃ 44±4 h
 - 冷却塔水：30℃ ± 1℃ 孵育 49±1 h
 - 纯水：21℃ ± 1℃ 孵育 7d

操作步骤



配培养基 保温 加入样本 倾注培养基 混匀 静置 密封 孵育

36



原液稀释10倍 原液稀释100倍 原液稀释1000倍

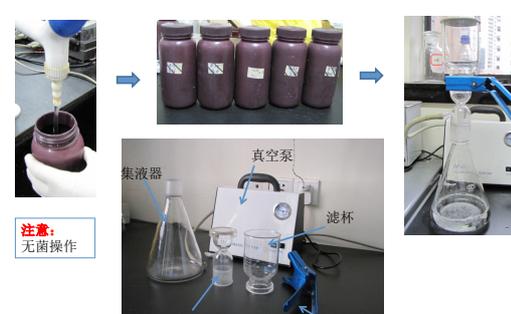
结果判读

- ① 选择合适的样本量和稀释倍数 使平板上细菌总数在30-300之间
- ② 计数整块平板上的菌落数

$$ACC \text{ per mL of water} = \frac{\text{Number of colonies}}{\text{Volume Tested}} \times \text{Dilution Factor}$$

37

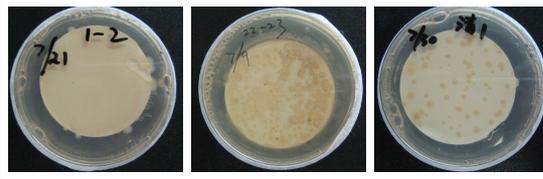
负压膜过滤法



注意: 无菌操作

集液器 真空泵 滤杯 接口装置 固定夹

38



非结核分枝杆菌 >1000CFU 革兰阴性杆菌230CFU 非结核分枝杆菌44CFU

选择合适的滤过液体量- 滤膜上有20-200个菌落

- 瓶装矿物质水-250ml
- 自来水等经处理的水-100ml
- 污水少量或稀释后的水
- 军团菌计数和检测-1L

39

商品化的异养菌计数装置



Aquasafe Water Test Kit Hach Paddle Tester MILLipore HPC Count Sampler Pall Aquasafe bacteria test strips

40

铜绿假单胞菌

Pseudomonas aeruginosa

- 列于医院获得性感染病原菌的前五位, 36-42% 医院获得性铜绿假单胞菌感染与污染的自来水有关;
- 通过接触受污染的水传播
- 大部分暴发是由于用自来水冲洗烧伤部位和冲洗消毒后的医疗器械
- 容易培养
- 铜绿假单胞菌是构成生物膜的常见细菌
- 对消毒剂相当耐受



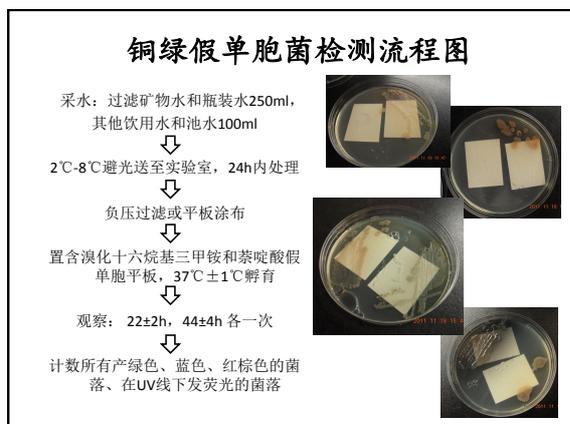
14-12-1 41

铜绿假单胞菌污染氧气湿化瓶?

- 无菌瓶或针筒取水5ml;
- 取1 mL 样本经0.22μm滤膜过滤; 或0.1ml涂布
- 平板: 溴化十六烷基三甲铵和萘啶酸假单胞平板;
- 35 °C 孵育3-5 天



7



嗜肺军团菌 *Legionella pneumophila*

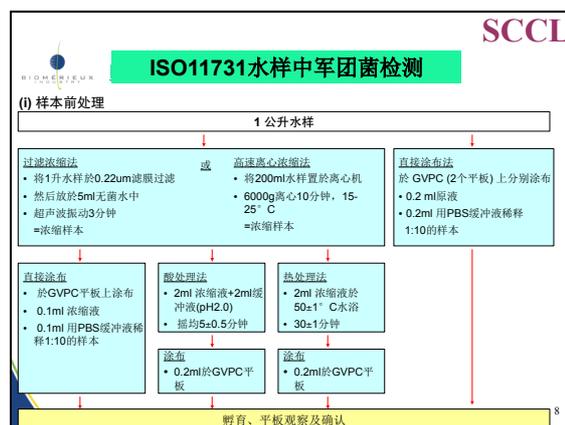
- 临床表现为肺炎型和非肺炎型(类似流感的庞蒂亚克热)两种；
- 吸入或呛入受污染的气溶胶或水，尚未有人传人的证据；
- 大部分人感染军团菌预后良好，但新生儿、老人和免疫抑制病人死亡率近50%；
- 在自由生活阿米巴体内繁殖，阿米巴保护作用下对含氯消毒剂敏感性降低；
- 消毒处理后，军团菌非常容易再次定植；
- 医院热水循环系统水温>55℃，是抑制和杀灭军团菌最有效的方法之一。

44

军团菌感染的来源

• 自来水供水系统	34例
• 热水	29例
• 冷热水	4例
• 冷水	1例
• 装置	7例
• 制冰机	3例
• 装饰性喷泉	2例
• 冷却塔	1例

军团菌感染中，最常见是1型66.7%，其次为6型14.6%，3型占10.4%，5型6.2%。医院感染的病死率为37%，社区获得的感染病死率为6.8%。



结果判读和鉴定

	结果观察		判读
血平板	BCYE不添加L-半胱氨酸	BCYE添加L-半胱氨酸	军团菌存在
+生长或-不生长	+生长	+生长	否
-不生长	-不生长	+生长	是

45

非结核分枝杆菌 *Mycobacteria spp.*



14-12-1

- 引起感染的范围广：手术部位感染、注射脓肿、透析相关感染、导管相关感染、气管镜和内窥镜污染；
- 不恰当的使用自来水是许多暴发和假暴发的原因，如用自来水冲洗器械；
- 在水环境中有很强的存活能力，对极端温度和许多消毒剂天然耐受；
- 在原生动物体内复制，原动物保护其以抵御常规水消毒；
- 定期监测清洗和消毒过程，在早期发现和鉴别NTM暴发和假暴发中起重要作用。

49

非结核分枝杆菌

方法：去污染+特殊培养基
采集500ml水样，膜过滤或离心浓缩

方案1
去污染 十六烷基吡啶CPC, 0.05%, 30min
培养基 Middle-brook7H10琼脂 (添加OADC)

方案2
去污染 NaOH, 1%-2%, 15min
培养基 LJ培养基

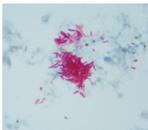


十六烷基吡啶

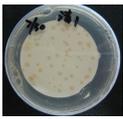
鉴定和分型：
抗酸染色/生化反应/16srRNA PCR, PFGE/ hsp65 PRA/测序

NTM感染暴发或假暴发时，不要忘了监测水！

2010-12-3 50



涂片抗酸染色



非结核分枝杆菌



样本点种于钢板

鉴定

- 抗酸染色
- 生化反应
- DNA探针和PCR
- 测序
- HPLC
- MALDI-TOF MS

分型

- RFLP
- PFGE
- MLEE

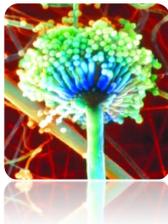


MALDI-TOF MS 鉴定仪

14-12-1 52

曲霉菌 *Aspergillus spp.*

- 近年来，许多研究表明医院内真菌感染与医院供水系统有关。除了空气外，医院供水系统也是医院曲霉菌感染的感染源；
- 淋浴中产生的曲霉菌气溶胶增加了空气中曲霉菌浓度，病房浴室空气中曲霉菌的浓度是其他区域曲霉菌浓度的6倍；
- 侵入性曲霉菌病总的死亡率为60%，在严重免疫抑制病人中的死亡率高达 80-90%；
- 对许多水消毒措施耐受；
- 在供水系统中，曲霉菌可在生物膜内快速增殖。



14-12-1 52

透析液和透析用水监测

血液净化标准操作规程 2010 版

一. 透析用水的水质监控

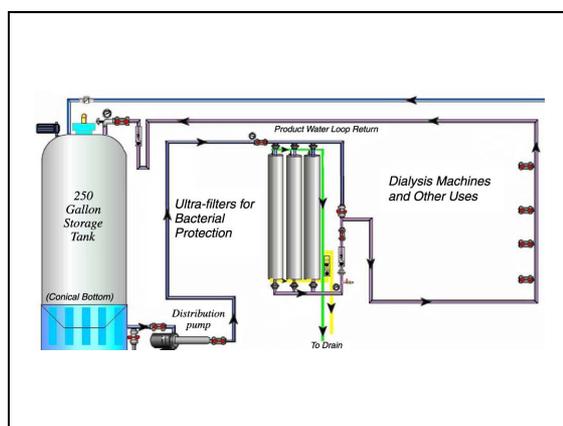
(二) 细菌培养应每月1次，要求细菌数 < 200 cfu/ml；
采样部位为反渗透水输水管路的末端。

(三) 内毒素检测至少每3个月1次，要求内毒素 < 2 EU/ml；
采样部位同上。

二. 透析液

- 细菌培养应每月1次，要求细菌数 < 200 cfu/ml。
- 透析液的内毒素检测至少每3个月1次，内毒素 < 2 EU/ml。
透析液的细菌、内毒素检测每台透析机至少每年检测1次。

53





透析用水采样方法

打开反渗系统，关上球阀，把连接透析机的管道拆下(注意：无菌操作防止反污染反渗水管内部)。打开球阀，用反渗水冲洗球阀内部60秒。可以不消毒，或70%的酒精消毒反渗水管球阀下的快接头外侧。酒精完全挥发后，无菌瓶收集 约50-500 ml水，注意瓶子口不能碰到快接头外侧。

培养方法

推荐膜过滤法，平板涂布法为备选

- TSA (胰蛋白酶大豆琼脂)
35 °C-37 °C 48h-72h
- TGEA (胰蛋白酶葡萄糖琼脂)
17°C-23°C 7天
- R₂A培养基 20°C-22°C 5天

注意!

- 禁止使用定量接种环
- 禁止使用血平板和巧克力平板

56

口腔科综合治疗台用水

我国

目前无相关口腔综合治疗台用水和监测要求



2003年美国CDC “Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings”

- ① 外科手术需要使用无菌盐水或无菌水作为冷却液或灌注液
- ② 口腔科综合治疗台用水应满足饮用水标准，即异养菌总数小于500CFU/ml

美国环保署、美国公共健康协会 (AHPA)、美国自来水厂协会 (AWWA) 设定的市政水系统中异养菌总数为 <500CFU/ml

57

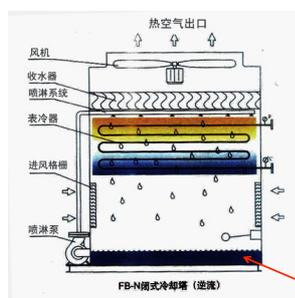
综合治疗台用水的采集



口腔科水过滤器和储水罐



医院冷却塔系统



采样处

总结

- 水源性致病菌在医院内无处不在，时刻警惕水源性感染！
- 微生物标本采样和检测需考虑：
采样部位、采样量、培养基、检测方法、结果判读：
- 透析液和口腔科用水检测异养菌总数，培养关键是使用 R₂A 平板、收集50-500 ml水、室温和延长培养时间

“降低供水系统污染就是降低医院感染”

感谢
您的聆听。
Thanks for listening.