

· 调查报告 ·

儿童烧伤患者感染 MRSA 的耐药性及分子流行病学研究

陈华桂^{1,2}, 周秀萍^{2△}

(1. 怀化市第三人民医院检验科, 湖南怀化 418000; 2. 怀化医专检验系, 湖南怀化 418000)

摘要: 目的 调查儿童烧伤患者耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药性及分子流行病学情况, 为控制感染提供科学依据。方法 通过 PCR 扩增 *mecA* 基因鉴定 MRSA 菌株, K-B 纸片法检测菌株耐药性, 随机扩增多态性 DNA(RAPD)对其进行同源性分析。结果 从住院烧伤儿童临床标本分离得到的 52 株金黄色葡萄球菌中 MRSA 占 44.2%(23/52), 且对多种抗菌药物均耐药。23 株 MRSA 经 RAPD 分析可分为 4 型, 以Ⅱ型为主。结论 儿童烧伤患者分离 MRSA 菌株具有多重耐药性, 应根据药敏试验结果合理选用抗菌药物进行治疗; RAPD 技术能为控制感染提供分子流行病学依据。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 耐药性; 随机扩增多态 DNA 技术; 烧伤; 儿童

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.019

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)03-0299-03

The resistance and molecular epidemiology analysis of MRSA isolated from clinical samples of burn injured children

Chen Huagui^{1,2}, Zhou Xiuping^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of huaihua, Huaihua, Hunan 418000, China;

2. Department of Laboratory Medicine, the Medical College of Huaihua, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: Objective To investigate the status of antibiotics resistance and the genetic homology of *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from clinical samples of burn injured children and provide scientific basis for MRSA infection control. **Methods** MRSA strains was identified by PCR of *mecA*. Drug resistance was detected by using K-B method. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to identify the genotypes. **Results** MRSA strains accounted for 44.2% (23/52) in the *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples of children suffering from burn injury. All 23 stains MRSA produced fingerprints can be classified into four genotypes, of which type Ⅱ was the dominated genotype. **Conclusion** The MRSA isolated from clinical samples of children suffering from burn injury has multi-drug resistance, and antibiotics should be chosen according to drug susceptibility test results.

Key words: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; resistance; random amplified polymorphic DNA technique; burns; child

儿童由于好奇心强、活泼好动, 往往容易被热油、热水、热牛奶烫伤, 是目前家庭烧伤的主要受害者, 儿童烧伤患者占住院烧伤患者的 30%~40% 或更高^[1]。由于儿童各系统均未发育完全, 免疫功能低下, 对细菌的抵抗力较成人弱, 因此烧伤后更容易发生感染。感染是目前影响儿童烧伤患者恢复及致死的重要原因。研究表明金黄色葡萄球菌是烧伤患者感染最常见的病原菌^[2-3], 特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA), 近年来的检出率有逐年上升的趋势。笔者对某院儿童烧伤患者分离的 MRSA 菌株进行了耐药性检测及随机扩增多态性 DNA(RAPD)基因分型研究, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2012 年 1 月至 2013 年 3 月怀化市第三人民医院 0~14 岁住院烧伤患者分离培养出的金黄色葡萄球菌共 52 株(非重复)。

1.2 仪器与试剂 DNA 扩增仪为 PE480 型 PCR 热循环仪(美国 PE 公司), GENE GENIUS 图像分析处理系统(美国 Stratagen 公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天为时代公司), 琼脂糖、dNTPs、Taq 酶、引物等 PCR 相关试剂均购自上海生物工程有限公司, marker 为 MBI 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 *mecA* 基因检测 参照 DNA 提取试剂盒说明书操作, 提取金黄色葡萄球菌的全基因组 DNA。扩增 *mecA* 基因的上

游引物序列为 5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'; 下游引物序列为 5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3', 目的片段为 533 bp。反应体系为 10×buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 25 μmol/L 上下游引物各 1 μL, 模板 DNA 5 μL, 2.5 U Taq 酶, 灭菌双蒸水补足 25 μL。扩增条件为 94 °C 变性 5 min, 然后 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 100 s 共 35 个循环, 最后 72 °C 5 min。扩增完成后取 6 μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 30 min。

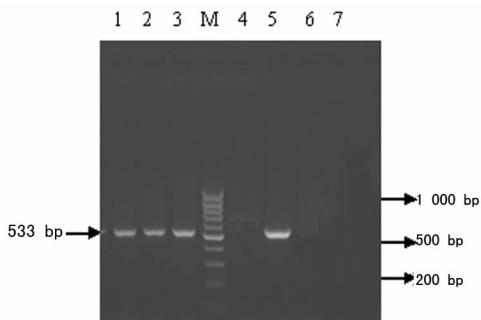
1.3.2 药敏试验 药敏纸片有: 氨苄西林(10 μg), 青霉素(10 U), 哌拉西林/他唑巴坦(100/10 μg), 美罗培南(10 μg), 头孢噻肟(30 μg), 红霉素(15 μg), 头孢吡肟(30 μg), 阿米卡星(30 μg), 利福平(5 μg), 环丙沙星(5 μg), 替考拉宁(30 μg), 万古霉素(30 μg), 均购自英国 OXOID 公司。药敏试验采用 K-B 纸片法。

1.3.3 RAPD 检测 引物设计及 RAPD 的反应体系均参照文献[4]进行, 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 25 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。扩增完成后取 10 μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中 60 V 电泳 100 min, 凝胶成像系统成像拍照。

2 结 果

2.1 MRSA 检测结果 52 株金黄色葡萄球菌经 *mecA* 基因

PCR 扩增,共检出 MRSA 23 株,占 44.2% (23/52),见图 1。



M: DNA 标准带; 1~3: 阳性菌株; 4: *meca* 阴性标准菌株 ATCC25923; 5: *meca* 阳性标准菌株 ATCC43300; 6~7: 阴性菌株。

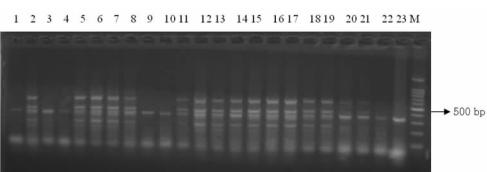
图 1 *meca* 基因 PCR 扩增后电泳图

2.2 药敏试验结果 MRSA 菌株对氨苄西林、青霉素、哌拉西林/他唑巴坦、头孢噻肟、美罗培南、环丙沙星和红霉素均耐药,对阿米卡星和利福平耐药率较高,本院内没有发现耐万古霉素和替考拉宁的菌株,见表 1。

表 1 23 株 MRSA 药敏试验结果[n(%)]

药物名称	敏感菌株	中介菌株	耐药菌株
氨苄西林	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
青霉素	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
哌拉西林/他唑巴坦	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
头孢噻肟	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
头孢吡肟	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
美罗培南	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
阿米卡星	8(34.8)	3(13.0)	12(52.2)
环丙沙星	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
红霉素	0(0.0)	0(0.0)	23(100.0)
利福平	3(13.4)	0(0.0)	19(82.6)
替考拉宁	23(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
万古霉素	23(100.0)	0(0.0)	0(0.0)

2.3 RAPD 试验结果 23 株 MRSA 经 RAPD 扩增,均获得数量不等的条带,条带数在 1~6 条之间,见图 2。根据片段的大小及条带的数目将 23 株 MRSA 分为 4 型,见表 2。



M: DNA 标准带; 1~23: 菌株编号。

图 2 23 株 MRSA 的 RAPD 电泳图

表 2 23 株 MRSA 的 RAPD 分型结果

型别	菌株数(n)	菌株编号
I	7	1,3,4,9,10,22,23
II	13	2,5~8,12~19
III	2	20,21
IV	1	11

3 讨 论

儿童烧伤为儿童创伤中的常见病与多发病,烧伤创面由于是开放性,加上儿童的生理特点,如免疫功能较成人低下,对体液的调节能力比较弱等,极易发生创面细菌污染和定植^[5]。自上世纪 90 年代至今,金黄色葡萄球菌是引起临床感染的一种主要病原菌,在烧伤创面感染中占据十分重要的位置^[6-7],特别是近年来 MRSA 的检出率逐年上升。本研究中共检出 MRSA 23 株,分离率高达 44.2%。儿童皮肤娇嫩,创面一经感染,很容易加深,因此儿童烧伤患者愈合时间较长,在治疗过程中抗菌药物的应用在所难免。本研究显示 MRSA 对氨苄西林、青霉素、哌拉西林/他唑巴坦、美罗培南、头孢噻肟、头孢吡肟、环丙沙星、红霉素耐药率均达到 100%;对阿米卡星和利福平耐药率也较高,说明本院检出的 MRSA 菌株具有高耐药性和多重耐药性,因此在治疗过程中要避免经验用药,应根据药敏试验结果合理选用抗菌药物。烧伤病房应建立抗菌药物使用及致病菌耐药性监测制度,以最大限度地减少耐药菌引起的烧伤病房医院感染的发生。本研究虽未发现耐万古霉素和替考拉宁的 MRSA 菌株,但国外已有检出的报道,国内也已发现对万古霉素敏感性降低的 MRSA 菌株,且目前对于这两类细菌尚无有效的治疗药物,应引起临床高度重视。

MRSA 导致的感染治疗较困难、病死率较高,因此,采用有效的流行病学分型手段监测 MRSA,分析其来源、分布,对确定 MRSA 引起的感染暴发及其传播途径,进而采取有效的控制非常必要。目前对病原菌进行同源性分型的方法有很多,其中 RAPD 分型由于简便快速、分型率高,在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌医院感染研究中应用相当广泛^[8-10]。本实验中 23 株 MRSA 经过 RAPD 扩增,均获得数量不等的条带,条带数在 1~6 之间,分型率达 100%。基因分型结果提示,2,5~8,12~19 号共 13 株同属 II 型,是本院的主要流行菌株,其次是 I 型检出 7 株,这是一个危险的信号,说明在本院内存在着同源菌的流行趋势,有引起感染暴发流行的可能,具体什么原因造成的流行还需进一步调查。

儿童烧伤后一旦发生感染,将给患儿带来更多的痛苦,延迟疾病的恢复,甚至可能发生死亡,后果非常严重。全面健全并且强化烧伤病房的管理制度,严格执行消毒隔离、无菌操作技术,掌握抗菌药物使用适应证,加强监测,落实多重耐药菌控制制度,实施创面、呼吸道、泌尿道、消化道等的综合护理措施,是预防、减少烧伤儿童感染的重要措施。

参考文献

- [1] 陶豫洁. 1438 例儿童烧伤的致伤原因和预防措施[J]. 中国伤残医学, 2012, 20(2): 43~45.
- [2] 尤志富, 林巧燕, 林国友, 等. 严重烧伤患者创面病原学改变的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(4): 838~840.
- [3] 周有旺, 梁业飞. 百色市人民医院 2008~2012 年烧伤病房患者感染致病菌的分布和耐药性分析[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5): 772~775.
- [4] 陈华桂. 随机扩增多态性 DNA 反应体系优化的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(14): 1724~1726.
- [5] 戴昆琦, 奕利娟, 陈群英. 儿童烧伤创面感染细菌种类分布及耐药情况[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(6): 484~486.
- [6] 栾丽莉, 朱琪, 温岩, 等. 烧伤患者医院感染的监测与控制[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(8): 894~895.
- [7] 高敏. 烧伤患者创面感染的菌群分布[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(16): 1383~1384.

(下转第 303 页)

的基础。除了疾控机构专门组织大规模的流行病学调查外,临床实验室定期对一段时期内大量临床患者筛查 HBV 血清标志物的结果和相关资料进行回顾性整理、分析、对比,进而得出结论,可以补充当地这方面的基础性资料,在一定程度上也能指导当地乙型肝炎的预防免疫及临床诊疗。

2008~2012 年,5 项 HBV 血清标志物的阳性率均逐年缓慢下降,但依然处于一个较高的水平。其中,HBsAg 各年的阳性率均高于 2008 年卫生部公布中国 1~59 岁人群 HBsAg 携带率为 7.18%^[4],这可能与本研究的抽样有关,也可能与地区差异有关。5 项标志物中阳性率最高的为 HBcAb,其余 HBV 血清标志物阳性率从高到低依次为 HBsAb、HBeAb、HBsAg、HBeAg。

总人群的 HBsAg 的阳性率有所下降,但不明显,而低龄人群明显下降。1992 年以后出生的人群 HBsAg 检出率明显低于 1992 年前出生人群检出率,且逐年下降趋势明显,这表明自 1992 年将乙型肝炎疫苗纳入计划免疫管理以来,陇东地区乙型肝炎控制取得显著成果,因此在当地应该进一步提高乙型肝炎疫苗接种的覆盖率,同时应提高儿童对乙型肝炎疫苗的应答,对于无应答或低应答情况,应及时采取相应的措施,如增加接种剂量、改变疫苗种类、增加接种频度、改变接种途径及增加佐剂使用等,以促进免疫应答^[6]。

男性各项标志物检出率均高于女性,有资料表明:男性更容易形成 HBsAg 携带,男性发展为慢性感染的比例是女性的 1.5 倍,女性对治疗的应答较男性好,这是因为机体的免疫反应存在性别差异,女性中具有 HLA-B8、HLA-B12 两种组织相容性抗原的人较多,在感染 HBV 后,产生 HBsAb 的能力较强,而男性具有这两种组织相容性抗原的人较少,产生 HBsAb 的能力较低^[7]。

有关乙型肝炎标志物模式种类的报道差异较大,可能与研究人群、检测技术、统计方法等因素有关,但常见模式基本一致,笔者归纳出了当地常见的 13 种模式,其中,“全阴性”模式检出率排第一位,模式 5“仅 HBsAb 阳性”的检出率呈逐年上升。需要关注的是,模式 4“仅 HBcAb 阳性”的检出率接近 15%,排在第 4 位。这种模式多属于乙型肝炎恢复期或 HBV 隐性感染,其中有 16.67% 的患者仍然存在 HBV 复制,血清中可以检测到低水平的 HBV DNA^[8],报道认为与同时感染 HCV 有一定关系,这可能是由于 HCV 干扰了 HBV 合成 HBsAg^[9~10]。由于 HBcAb 是 HBV 感染机体后持续时间较长的特异性血清学指标,又因为低龄人群的 HBsAg 携带率已经较低且呈下降趋势,因此,HBcAb 阳性在以后很可能成为 HBV 感染的主要血清学证据,再结合 HBV DNA PCR 检测技术,研究 HBcAb 阳性的临床意义将会变得非常重要。对于模

式 12“仅 HBsAg、HBsAb、HBcAb 阳性”,比较少见,但仍有其重要临床意义,可能原因是正处于血清学转化过程,HBsAb 出现的早期,因灵敏度提高而检出,也可能由于 HBV S 区基因突变,以前产生的 HBsAb 不能中和变异后 HBsAg。

以上的回顾性研究显示,近年来通过采取预防接种等积极有效的措施,甘肃省陇东地区,尤其是低龄人群的 HBV 携带率已显著降低,但总人群携带率仍然处于较高的水平,离目标还有一定的距离。在未来相当长的时期内仍需巩固乙型肝炎免疫接种成效,进一步加强对低龄人群保护,积极为乙型肝炎患者提供新的抗病毒治疗方案,不断提高临床实验室 HBV 检测水平,有利于降低总人群 HBV 携带率,有力地推进乙型肝炎的诊疗及防控水平。

参考文献

- [1] World Health Organization. Hepatitis B[DB/OL]. (2008-07-28). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- [2] 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(12):881-891.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学分会. 慢性乙肝防治指南(续一)[J]. 医药导报,2006,25(5):421-431.
- [4] 卫生部. 卫生部公布全国人群乙肝血清流行病学调查结果:我国乙肝免疫防御工作取得显著成绩[EB/OL]. (2008-4-21). <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohbgt/s3582/200804/33253.htm>.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 2006 年~2010 年全国乙型病毒性肝炎防治规划[J]. 中国实用乡村医生杂志,2006,13(8):1-4.
- [6] Sjogren MH. Prevention of hepatitis B in nonresponders to initial hepatitis B virus vaccination[J]. Am J Med, 2005, 118(suppl 1): S34-39.
- [7] Silva JAD. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses[J]. Ann Rheum Dis, 1995, 54(1): 6-16.
- [8] 陈俊,王晓昌. 1006 例甘肃省陇东地区 HBV 患者血清标志物与 HBV DNA 的对比分析[J]. 分子诊断与治疗杂志,2011,03(1): 36-38.
- [9] Weber B, Melchior W, Gehrke R, et al. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals[J]. J Med Virol, 2001, 64(3): 312-319.
- [10] Drosten C, Nippraschek T, Manegold C, et al. Prevalence of hepatitis B virus DNA in anti-HBc-positive/HBsAg-negative sera correlates with HCV but not HIV serostatus[J]. J Clin Virol, 2004, 29(1): 59-68.

(收稿日期:2013-09-18)

2012,22(14):2964-2966.

- [8] 邓玲萍,韩晓斌. 金黄色葡萄球菌 RAPD 基因分型研究[J]. 中国热带医学,2011,11(9):1056-1057,1060.
- [9] 雷金娥,刘军辉,田普训,等. 肾移植病房耐甲氧西林金黄色葡萄球菌随机扩增多态 DNA 分型研究[J]. 中华医院感染学杂志,

(收稿日期:2013-09-10)