

## • 论著 •

## 重症监护病房患者金黄色葡萄球菌感染的分子流行病学研究

吴财铭<sup>1</sup>,栗俊杰<sup>1</sup>,廖奇峰<sup>1</sup>,吴伟元<sup>2</sup>,吴劲松<sup>2</sup>,卢月梅<sup>2</sup>

(1. 深圳市蛇口人民医院,广东深圳 518067;2. 深圳市人民医院,广东深圳 518020)

**摘要:**目的 通过对重症监护病房患者金黄色葡萄球菌(SA)感染的分子流行病学研究,为临床预防和研究 SA 感染提供科学依据。**方法** 收集重症监护病房近 3 年 SA 培养阳性病例 52 例,(去除同一患者相同和不同部位标本)采用多重 PCR 扩增 SA 的毒素基因 *tst* 和 *sec*,分析毒素基因的存在与发热的关系,通过 PCR 扩增耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)基因组稀有限制区旁的 DNA 序列,对 MRSA 进行基因分型。**结果** 52 例患者中,19 例为对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA),33 例为 MRSA,其中有 22 例 MRSA 携带 *tst* 和 *sec* 基因(66.7%),显著高于 MSSA 7 例携带 *tst* 和 *sec* 基因( $P < 0.05$ );37 例伴有发热,其中 29 例含有 *tst* 和 *sec* 基因,15 例不伴发热,其中 5 例含 *tst* 和 *sec* 基因,发热组携带两种基因比率显著高于不发热组( $P < 0.05$ );稀有限制区 PCR(IRS-PCR)分型表明,2012~2014 年感染 MRSA 的 33 例患者有 22 例为同种基因型。**结论** *tst* 和 *sec* 基因的存在可能与 SA 引起的发热有关,近 3 年该病房存在 MRSA 暴发流行可能。

**关键词:**金黄色葡萄球菌; 分子流行病学; 毒素基因; 稀有限制区 PCR; 基因分型**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1253-02

**Molecular epidemiology study of ICU patients with *Staphylococcus aureus* infection**Wu Caiming<sup>1</sup>, Li Junjie<sup>1</sup>, Liao Qifeng<sup>1</sup>, Wu Weiyuan<sup>2</sup>, Wu Jingsong<sup>2</sup>, Lu Yuemei<sup>2</sup>

(1. Shenzhen Shekou People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518067, China;

2. Shenzhen Municipal People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

**Abstract: Objective** To perform the molecular epidemiology study of ICU patients infected with *Staphylococcus aureus*(SA) to provide a scientific basis for clinical infection prevention and research of SA. **Methods** 52 cases of SA positive culture (excluding the specimens from same and different parts in the same patient) were collected from ICU in the recent three years. The toxin gene *tst* and *sec* of SA were amplified by using multiple PCR, and the relationships between fever and toxin genes was analyzed. The DNA sequence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) genome near infrequent restriction site was amplified by PCR, and the genotyping of MRSA was performed. **Results** In 52 patients, 19 cases were infected by methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*(MSSA) and 33 cases were infected by MRSA. There were 22 cases of MRSA carrying *tst* and *sec* genes(66.7%), which was significantly higher than 7 cases of MSSA carrying *tst* and *sec* genes( $P < 0.05$ ). 29 of 37 cases with fever contained *tst* and *sec* genes, and 5 of 15 cases without fever contained *tst* and *sec* genes. The proportion of carrying two genes in the fever group was significantly higher than that in non-fever group( $P < 0.05$ ). The infrequent restriction site PCR(IRS-PCR) genotyping showed that 22 of 33 patients infected with MRSA had the same genotype during 2012~2014. **Conclusion** Fever caused by SA may be related with *sec* and *tst* genes. MRSA may outbreaks in this ward in the next three years.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; molecular epidemiology; toxin gene; infrequent restriction site PCR; genotype

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是引起医院内感染的主要致病菌之一,是各级医院都面临的一个难题,它可以产生多种致病细菌毒素,其中包括中毒休克综合征毒素-1(TSST-1)和 SEC 肠毒素,前者能引起中毒休克综合征,后者能引起食物中毒,属于危害较严重的两类毒素<sup>[1]</sup>。在临床工作中,MRSA 的感染呈现出病例不断增加及其耐药程度不断加重的趋势,MRSA 也日益受到各国研究人员及临床工作者的重视。近 3 年来,笔者在两家医院的重症监护病房分离到 52 株金黄色葡萄球菌(SA),采用稀有限制区聚合酶链反应(IRS-PCR)对这 52 株 SA 进行了基因分型<sup>[2]</sup>,对其毒素基因 *tst* 和 *sec* 进行了研究和探讨。并通过流行病学研究以及结合患者临床表现分析,得出一些有助于临床治疗的结论。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 通过常规方法鉴定分离出 SA,MRSA 则按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)的抗菌药物敏感试验执行标准,采用苯唑西林药敏纸片法进行筛选。在 2012 年

1 月至 2014 年 6 月间,选取资料记录详细的 52 例感染 SA 的重症监护患者,分离培养出 SA 的标本分别来自痰液、中段尿、脓液、血液、分泌物等。

**1.2 仪器与试剂** 梯度 PCR 循环扩增仪、凝胶成像仪、电泳槽、电泳仪、高速低温离心机、恒温水浴箱均由美国 BioRad 公司提供。扩增毒素基因 *tst* 引物序列: *tst*-F: GCT TGC GAC AAC TGC TAC AG; *tst*-R: TGG ATC CGT CAT TCA TTG TTA T。上述寡聚核苷酸序列由上海生物工程有限公司合成,DNA 标志物购自申能博采生物技术有限公司,Tap DNA 聚合酶、dNTP、PCR 反应配套试剂、T4DNA 连接酶及连接缓冲液、限制性内切酶 *Hha*I 和 *Xba*I 酶切反应缓冲液均购自上海生物工程有限公司。

**1.3 方法**

**1.3.1 SA 染色体 DNA 的制备提取** 各株 SA 的染色体 DNA 通过 DNA 抽提试剂盒提取。

**1.3.2 IRS-PCR 模板 DNA 的制备及适配子构建** 用双蒸水

200  $\mu\text{L}$  稀释寡聚核苷酸 AH1 和 AH2, 并取 62.6  $\mu\text{L}$  AH1 和 20  $\mu\text{L}$  AH2(确保相等的 AH1 和 AH2 摩尔量) 分别于 PCR 缓冲液混合, 混合溶液达到 200  $\mu\text{L}$ , PCR 缓冲液的终浓度为 1 倍。将混合溶液置于 90  $^{\circ}\text{C}$  的恒温器孔中加热 2 min, 再将恒温器降到 25  $^{\circ}\text{C}$ , 待混合溶液(浓度为 7.75 mol/L) 逐渐冷却后取出置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。AX 适配子(浓度为 7.865 mol/L) 的构建与上述方法相同, 取 10  $\mu\text{L}$  已抽提好的 SA DNA 用 5 U 的 Hha I 和 Xba I 在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴箱中消化 1 h, 将 T4 DNA 连接酶 50 U, 10 倍连接酶缓冲液 2  $\mu\text{L}$ , AX、AH1、AH2 适配子及酶消化后的产物混合后共 20  $\mu\text{L}$  在 16  $^{\circ}\text{C}$  中孵育 1 h, 待适配子连接到被消化的基因组 DNA 上, 再用 5 U 的 Hha I 和 Xba I 在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴箱中消化 15 min。

**1.3.3 毒素基因的扩增** 通过特异引物, 采用多重 PCR 检测 SA 编码 TSST-1、SEC 的基因 tst 和 SEC, 先在 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 然后开始循环: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 2 min, 57  $^{\circ}\text{C}$  退火 2 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 共进行 30 个循环, 然后在 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 7 min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳 40 min, 用 EB 染色并用凝胶成像仪观察 PCR 产物的条带并进行分析, tst 和 SEC 片段的大小分别为 326 bp 和 451 bp。

**1.3.4 IRS-PCR 基因分型** 扩增条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  下预变性 5

min, 然后开始循环: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 共进行 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 5 min。延伸产物在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电压为 3.5 V/cm, 12 h 后观察条带分布, 并参照 PFGE 基因图谱分型方法进行分析。

**1.4 统计学处理** SPSS11.0 软件进行数据分析, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 临床标本细菌学鉴定** 2012~2014 年从 52 例患者的临床标本中分离出 MSSA 19 株和 MRSA 33 株。3 年期间, MSSA 感染患者分别为 8、7、4 例, MRSA 感染患者分别为 14、12、7 例, 见表 1。

**2.2 毒素基因与 SA 引起的发热性感染** 临床诊断判定由 SA 引起的感染(伴或不伴发热)包括肺部感染、尿路感染、伤口感染、菌血症等。如表 1 所示, 带有 tst 和 SEC 基因的 MRSA 感染病例显著多于 MSSA 感染病例( $P < 0.05$ )。在 37 例伴发热的患者中, 29 例患者的 SA 扩增出 tst 和 SEC 基因(78.4%), 不伴发热的患者 15 例, 仅有 5 例患者的 SA 扩增出 tst 和 SEC 基因(33.3%), 发热患者携带的这两种基因显著多于不发热者(表 1)( $P = 0.014$ )。

表 1 SA 的分布及其毒素基因分布( $n$ )

年份	分离出 SA 患者数		SA 感染患者伴发热数		tst		SEC	
	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA
2012	8	14	5	13	3	10	3	10
2013	7	12	3	9	3	8	3	8
2014	4	7	2	5	1	4	1	4

**2.3 IRS-PCR 基因分型** 采用 IRS-PCR 基因分型法, 对来源于相同患者不同部位分离出的 MRSA 进行同源性鉴定, 发现来自同一患者不同部位 MRSA 的基因分型相同。对来源于 33 例患者的 MRSA 进行 IRS-PCR 分型, 经鉴定发现有 4 种基因型, 其中 2012 年分离的 MRSA 有 2 种基因型(A, B), 2013 年为 3 种基因型(A, C, D), 2014 年为 2 种基因型(B, C)。

## 3 讨 论

SA 是临幊上毒性较强的致病细菌, 是医院感染或术后感染的重要病原菌之一, 其感染几乎遍及世界, 因治疗困难, 病死率高, 其耐药特性及流行病学特征已成为医务工作者关注的热点。SA 对  $\beta$ -内酰胺类药物的耐药机制, 主要包括产生  $\beta$ -内酰胺酶以及青霉素结合蛋白(PBPs)的改变, 研究表明 MRSA 的耐药机制主要是其染色体上 meca 基因编码表达的一种独特型青霉素结合蛋白(PBP-2a)可以结合抗菌药物<sup>[3]</sup>, 而且由于 PBP-2a 的表型各不相同, 所以 MRSA 菌株的耐药表型也各不相同。MRSA 的感染途径主要为接触传播, 并可通过耐药基因的转移获得新的耐药性, 有利于其进一步扩散。患者一旦感染 MRSA, 治疗非常棘手, 因为抗菌药物的选择比较局限, 目前确定对 MRSA 有效的抗菌药物仅为糖肽类抗菌药物(包括万古霉素和替可拉宁), 甚至有些地方已发现对万古霉素耐药的 MRSA, 因此对 MRSA 致病机制的研究具有非常重要的临床意义<sup>[4]</sup>。

SA 的致热原性毒素超抗原 TSST-1 和 Ses 具有以下特点: 超抗原性、致热原性、增强宿主对内毒素的敏感性、导致内皮细胞死亡以及高水平的结构同源性。因此 TSST-1 和 ses 被

认为是 SA 的主要毒力因素, 但是这些毒素的致病性在临床治疗中并没有受到足够的重视。

在本文中, 笔者对单纯的 SA 感染(伴或不伴发热)病例进行了研究, 发现在 SA 感染并伴发热的病例中, 表达 tst 和 SEC 基因的 SA 显著多于不伴发热的感染病例。该发现提示 tst 和 SEC 基因的存在可能是 MRSA 更容易导致败血症和引起发热的主要原因。Mazurek 等<sup>[5]</sup>的研究报道亦发现产毒素的 MRSA 更容易导致菌血症及败血症。因此, SA 携带的 tst 和 SEC 基因大量表达 TSST-1 和 SEC, 应该与 SA 感染患者的发热有直接关系。

## 参考文献

- 1 丁晓萍, 张燕萍, 姜燕南, 等. 综合重症监护病房患者医院感染目标性监测分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(21): 3295-3297.
- 2 刘明华, 府伟灵, 陈鸣, 等. 压电基因传感器阵列检测 MRSA 的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(1): 20-22.
- 3 陈华桂, 周秀萍. 儿童烧伤患者感染 MRSA 的耐药性及分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(3): 299-300.
- 4 刘雪梅, 谈华, 迟富丽, 等. 分离自儿童血培养标本耐甲氧西林葡萄球菌菌种分布和耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(5): 541-542.
- 5 Mazurek GH, Reddy V, Marston BJ, et al. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(10): 2386-2390.