

• 论 著 •

新生儿科医务人员鼻拭子与临床分离 MRSA 的分子分型^{*}

赵瑞珍¹, 李迎慧², 胡璐璐³, 杨 琴¹

(1. 深圳市儿童医院 518026; 2. 深圳市疾病预防控制中心 518055; 3. 深圳大学, 广东深圳 510000)

摘要:目的 了解深圳市儿童医院新生儿临床分离株和该科医务人员鼻拭子耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的分子生物学特征及耐药性。方法 收集新生儿科临床分离的 MRSA 以及新生儿科医务人员鼻拭子分离的 MRSA 26 株, 对其进行多位点基因分型(MLST 分型)、spa 分型、SCCmec 分型及脉冲场凝胶电泳(PFGE), 同时检测 pvl 基因, 并进行 14 种抗菌药物药敏试验。结果 在 26 株 MRSA 中, 痰占 53.8%, 医务人员鼻拭子筛查检出 2 株。MLST 分型共 5 种, 其中 ST59 占 76.9%。spa 分型有 8 种, t437 占 65.4%。SCCmec 分型只有 2 种, SCCmecIV 型 20 株(76.9%)、SCCmecV 4 株(15.4%)。PVL 基因检测, pvl 阳性率 15.4%。通过 PFGE 分析, 从新生儿科护理人员的鼻拭子分离的一株 MRSA 与一株从患者分离的菌株 100% 同源。药敏试验结果显示所有 MRSA 对呋喃妥因、奎奴普丁/达福普汀、万古霉素、喹诺酮类抗菌药物 100% 敏感, 而对红霉素、克林霉素和四环素耐药率较高, 均在 50% 以上。结论 本研究新生儿科临床分离的 MRSA 中, 最常见的克隆是 MRSA-ST59-SCCmecIV-t437, 在新生儿 MRSA 的经验性治疗中不宜首选红霉素和克林霉素。

关键词:新生儿; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 分子分型; 抗菌药物耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.014

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)07-0906-03

Molecular classification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from nose swabs of medical staff in neonatal department and clinic

ZHAO Ruizhen¹, LI Yinghui², Hu Lulu³, YANG Qin⁴

(1. Shenzhen Municipal Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China; 2. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China;
Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 510000, China)

Abstract: Objective To understand the biological characteristics and drug resistance of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from neonatal clinic and the nose swabs of medical staff in the neonatal department. **Methods** Twenty-six strains of MRSA clinically isolated from the neonatal department and the nose swabs of medical staff in this department were collected and performed the multilocus sequence typing (MLST), spa typing, *staphylococcus cassette chromosome mec* (SCCmec) typing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. The Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene was simultaneously detected. The antimicrobial susceptibility test of 14 antibacterial drugs was performed. **Results** Among 26 strains of MRSA, 53.8% was isolated from sputum, 2 strains were detected from the nose swab of medical staff. The MLST type had 5 types, ST59 accounted for 76.9%. The spa type had 8 types, t437 accounted for 65.4%. The SCCmec type had only 2 types, 20 strains were SCCmec IV (76.9%, 20/26) and 4 strains (15.4%) were SCCmecV. In the PLV gene detection, the PVL positive rate was 15.4%. One strain of MRSA from the nose swabs of medical staff in the neonatal department was 100% homologous with 1 strain from the patient by PFGE analysis. The drug susceptibility test results showed that all MRSA strains were 100% sensitive to antibacterial drugs of nitrofurantoin, quinupristin/dalfopristin, vancomycin and quinolone, while had higher resistance rates to tetracycline, erythromycin and clindamycin, which were above 50%. **Conclusion** In MRSA strains isolated from the neonatal department in this study, the most common clones were MRSA-ST59-SCCmecIV-t437. Erythromycin and clindamycin should not be preferred in the empiric treatment of newborn MRSA.

Key words: newborn; methicillin resistant *staphylococcus aureus*; molecular typing; antimicrobial resistance

医院获得性感染(HAI)一直是发病率、病死率和超额医疗支出增高的一个主要原因,引起 HAI 的微生物中高达 70% 为多重耐药菌,最多见的革兰阳性菌是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。MRSA 是一个世界性的问题,国外对其危险因素、发病机制、流行病学等方面研究均较多^[1-2],国内对 MRSA 感染问题也越来越重视,对危险因素的研究逐渐增多^[3]。预防 MRSA 必须采取多管齐下,综合防治的方案,如手部卫生、患

者隔离、医疗设备的消毒、抗菌药物合理应用、主动监测培养和目标筛查。实践证明:只对有临床症状的感染患者培养会漏诊 35%~85% 的定植菌携带者;相反,主动监测培养能发现 80% 的定植菌携带者。本文对新生儿科包括儿科重症监护室(NICU)的医务人员的鼻拭子和手进行了主动筛查,并与临床分离的 MRSA 菌株进行了研究,现报道如下。

1 资料与方法

* 基金项目:深圳市科技创新委知识创新计划(JCYJ20140416141331476)。

作者简介:赵瑞珍,女,主任技师,主要从事细菌耐药研究。

1.1 菌株来源和鉴定 收集深圳市儿童医院 2014—2015 年新生儿科临床分离的 24 株 MRSA 菌株,以及筛查了 121 份医务人员鼻拭子和手标本分离到的 MRSA 2 株。通过菌落形态、凝固酶试验及头孢西丁纸片($30 \mu\text{g}/\text{片}$, OXOID)进行筛选。PCR 的方法检测 *mecA* 基因和 *nuc* 基因确定为 MRSA。筛选出符合条件的临床菌株入组。菌株的收集分离鉴定按照《临床检验操作规程》进行。细菌培养、鉴定及药敏由 Vitek-2 compact 全自动微生物分析仪进行。质控菌株 ATCC25923、ATCC29213。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 挑取 MRSA 单个菌落,悬浮于 $200 \mu\text{L}$ 2% 的 Chelex100 Resin 中,煮沸 10 min, $12000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min, 取上清液做反应模板,置于 -20°C 冰箱保存。

1.2.2 SPA 分型方法 依据网站(<http://www.seqnet.org/>)提供的引物序列和相应操作步骤完成。(1)引物序列 SPAF: 5'-ACG ATC CTT CGG TGA GC-3'; SPAR: 5'-CAG 2CA GTA GTG CCG TTT G-3',由 TAKARA 公司合成。(2)反应体系: $10 \times$ buffer $2.5 \mu\text{L}$, 10 mmol/L dNTP $4 \mu\text{L}$, 10 pmol/L SPA 上、下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$, 25 mmol/L 镁离子 $1.5 \mu\text{L}$, 2.5 U/L Taq 酶 $0.3 \mu\text{L}$, DNA 模板 $2 \mu\text{L}$, 用去离子水补足 $25 \mu\text{L}$ 。(3)PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 共 29 个循环; 72°C 延伸 5 min。(4)结果分析: DNA 序列分析使用 Chromas 软件。SPA 分型使用软件 RidomStaphType software version 1.5.12。用 Simpson 相关系数(DI)计算 SPA 的分辨率。

1.2.3 多位点序列分型(MLST) 使用 PCR 检测金葡菌 7 个管家基因,扩增引物参照文献[4]的设计,并通过 MLST 官方网站(<http://saureus.mlst.net/>)进行等位基因的比对,从而判定 ST 分型。

1.2.4 SCCmec 分型及 SCCmec IV 亚型分型 采用多重 PCR 的方法对所有菌株进行 SCCmec 及 SCCmec IV 亚型的判定。

1.2.5 nuc、mecA 和 pvl 基因检测 参照文献[5]进行实时 PCR 检测。

1.2.6 脉冲场凝胶电泳(PFGE) 参照文献[6]报道,将菌悬液与等量低熔点琼脂精混匀后制成胶块。以蛋白酶 K 过夜消化后,用 SmaI 内切酶对染色体 DNA 消化电泳条件为 14°C , $6 \text{ V}/\text{cm}^2$, 120° , 19 h , 线性梯度 $5 \sim 60 \text{ s}$ 。电泳缓冲液为 $0.5 \times$ TBE, 相对分子质量标记物为 λ ladder mark。溴化乙啶染色 $30 \sim 40 \text{ min}$, 紫外灯下观察结果。结果判读按美国疾病控制和预防中心(CDC)推荐的方法:图谱完全相同的定义为一个型;彼此之间相差一个带的定义为同一型的不同亚型;相差 $2 \sim 3$ 个带的认为亲缘关系密切;相差 $4 \sim 6$ 个带的认为可能相关;条带相差 7 个以上的则认为无亲缘关系。

2 结 果

2.1 临床资料 新生儿科临床分离出的 26 株 MRSA 中,其中痰分离出 14 株,占 53.8%,脐部分泌物 4 株,静脉血 2 株,脓 2 株,鼻拭子筛查 2 株,手 1 株,咽拭子 1 株。新生儿肺炎是最常见的疾病,占 65.2%(15/23),其次是新生儿脐炎占 17.4%(4/23)、高胆红素血症占 8.7%(2/23)、腹腔感染占 8.7%(2/23)等。

2.2 药敏试验结果 药敏试验结果显示所有 26 株 MRSA 对呋喃妥因、奎奴普丁/达福普汀、万古霉素、左氧氟沙星和莫西

沙星 100% 敏感。而对红霉素(76.9%)、克林霉素(76.9%)、和四环素(53.8%)耐药率较高。MRSA 分离株的抗菌药物耐药性结果,见表 1。

2.3 分子特征 26 株 MRSA 中,MLST 分型共 5 型,其中 ST59 20 株(76.9%),ST1 3 株(11.5%),ST72、ST338 和 ST488 只有各 1 株。spa 分型有 8 种型别,其中 17 株(65.4%)为 t437,2 株为 t114 有,其他 6 种 t324、t172、t5132、t3590、t360、t14774 每种只有各 1 株,有 1 株未分出 spa 型。SCCmec 分型只有 2 种,SCCmec IV 型 20 株(76.9%)、SCCmec V 4 株(15.4%),此外有 2 株未能分型。此次新生儿科临床分离的 MRSA 分离株中,最常见的克隆是 MRSA-ST59-SCCmec IV-t437,共 14 株,占 53.8%。PVL 基因:26 株 MRSA 中有 4 株(15.4%)为 pvl 阳性。PFGE:通过脉冲场凝胶电泳分析,在电泳图像上,每株菌得到了 $16 \sim 20$ 个条带。本研究发现有 10 株菌有超过 80% 的电泳图谱相似(图 1)。1 株是新生儿的护理人员,其中 1 株患者的菌株与护理人员 100% 同源。

表 1 MRSA 对抗菌药物的耐药情况($n=26, \%$)

抗菌药物	耐药	中介	敏感
苯唑西林	100.0	0.0	0.0
呋喃妥因	0.0	0.0	100.0
磺胺甲噁唑/甲氧苄啶	7.7	0	92.3
红霉素	76.9	0.0	23.1
环丙沙星	0.0	3.8	96.2
克林霉素	76.9	0.0	23.1
奎奴普汀/达福普汀	0.0	0.0	100.0
利福平	0.0	7.7	92.3
青霉素	100.0	0.0	0.0
庆大霉素	3.8	0.0	96.2
四环素	53.8	0.0	46.2
万古霉素	0.0	0.0	100.0
左氧氟沙星	0.0	0.0	100.0
莫西沙星	0.0	0.0	100.0

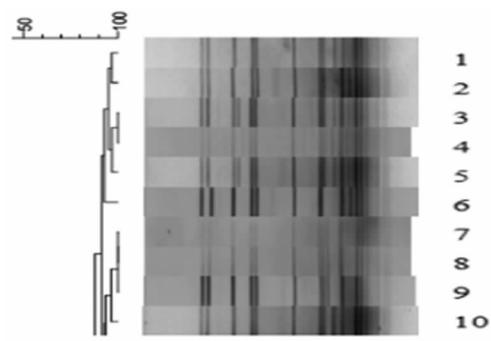


图 1 10 株 MRSA 菌株 PFGE 结果

3 讨 论

过去的 10 年来,MRSA 已成为一个值得关注的公共卫生问题,是感染的主要原因。随着 MRSA 在医院和社区传播的能力日益增多,给医院的感染控制提出了一个重大的挑战。

新生儿是一个相对独立的群体,新生儿免疫系统尚未发育完善,更容易受到病原菌的侵袭,是医院感染的高危人群,其感

染细菌构成及耐药情况有其自身特点。多数学者认为细菌定植虽然不是感染,但可能是感染的重要来源和高危因素,是发生医院感染的先兆。陈先云等^[7]报道也证实 NICU 有致病菌定植的新生儿的感染率高于无致病菌定植的新生儿,定植菌与感染有极大的相关性。而 MRSA 因其对多种抗菌药物的耐药特性,一旦导致医院感染发生或暴发,危害极大。因此,新生儿的 MRSA 定植菌筛查可以为控制 MRSA 感染源,切断感染传播途径及保护易感人群提供重要依据。

据报道,SPA 在各个地区均有不同,在南部德国 t041 是常见的^[8],而 t044 广泛在欧洲国家^[9]。在本研究中,MRSA 主要是 SPA t437,占 65.4%,与北京检测的结果相一致^[10]。

曾经,SCCmec 分型对 MRSA 的分子流行学很重要。但是 2005 年,SCCmec IV 型即在 HA-MRSA 中发现^[11],并逐渐增多^[12],这与本研究结果,只有 SCCmecIV 和 SCCmecV 相同。因此,SCCmec 的分型已经不再适用于 MRSA 的分子流行学分类。

研究表明,独特的地理分布都有其 MRSA 流行的克隆株,例如亚太地区是 ST59,在欧洲主要是 ST80,ST30 分布在世界范围各地,包括美国、西太平洋地区、欧洲、中国香港、日本^[13-14]。在我国儿童显示当前普遍的克隆 ST5^[15]。在本研究中,通过分子分型,发现主要序列类型为 ST59。

在本研究中发现,临床标本中新生儿科的呼吸道标本 MRSA 检出率高,药敏结果表明对红霉素、克林霉素、四环素耐药率高,在 50% 以上;MRSA-ST59-SCCmec IV-t437 是新生儿科主要的流行株(占 53.8%)。

由于不断暴露在医院环境中,医务人员增加了传播 MRSA 的危险。在本研究中,患者发现从新生儿科分离的 10 株 MRSA,其中包括一名护士和另外 9 名新生儿患者,通过 PFGE 分型表现出高度遗传相似性。通过流行病学追踪显示,医护人员直接接触了 1 名新生儿患者而未接触其他 9 名患者,分析可能是其他患者通过其他媒介,如被污染的医疗器械等原因造成。这些发现表明 MRSA 的携带者可能导致 MRSA 菌株在医院与社区之间的传播。

因此,这项研究表明医护人员鼻咽部携带的 MRSA 与新生儿科患儿 MRSA 的院内感染密切相关,应该引起高度重视。

接触传播是 MRSA 增加的一个主要原因,通过有效的预防措施(筛查+隔离),可使患者间的交叉感染降低,唯有主动的定植筛查,才能了解 MRSA 感染的真实状况,这是干预措施实施和评估的基础。

参考文献

- [1] Cordova SP, Heath CH, Mcgechie DB, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Western Australian teaching hospitals, 1997-1999: risk factors, outcomes and implications for management[J]. *J Hosp Infect*, 2004, 56(1):22-28.
- [2] Koulenti D, Myrianthefs P, Dimopoulos G, et al. Hospital-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Enferm Infect Microbiol Clin*, 2005, 23(1):37-45.
- [3] 黄琴香,吴旭丽,李毓芹.耐甲氧西林葡萄球菌感染的相关因素分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(13): 2830-2832.
- [4] Strommenger B, Braulke C, Heuck D, et al. Spa typing of *staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(2):574-581.
- [5] McDonald RR, Antonishyn NA, Hansen T, et al. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12):6147-6149.
- [6] Oliveira GA, Faria JB, Levy CE, et al. Characterization of the Brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) from hospitals throughout Brazil[J]. *Braz J Infect Dis*, 2001, 5(4):163-170.
- [7] 陈先云,李茂军,王晓敏,等.新生儿重症监护病房定植菌筛查临床应用研究[J].中华医院感染学杂志,2011,21(20):4237-4239.
- [8] Fenner L, Widmer AF, Dangel M, et al. Distribution of spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence University Hospital[J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(6):612-616.
- [9] Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(3):222-235.
- [10] Wu D, Wang Q, Yang Y, et al. Epidemiology and molecular characteristics of community-associated methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from skin/soft tissue infections in a children's hospital in Beijing, China[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 67(1):1-8.
- [11] Huang YH, Tseng SP, Hu JM, et al. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(7):717-724.
- [12] Kang YC, Hsiao CH, Yeh LK, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Ocular Infection in Taiwan: Clinical Features, Genotyping, and Antibiotic Susceptibility[J], Medicine (Baltimore). 2015, 94(4):e1620.
- [13] Ho PL, Chuang SK, Yf C, et al. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: skin and soft tissue infections in Hong Kong[J]. *Diagn Micr Infec Dis*, 2008, 61(2):245-250.
- [14] Chuang YY, Huang YC. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia[J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(6):698-708.
- [15] Wang L, Liu Y, Yang Y, et al. Multidrug-resistant clones of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children and the resistance genes to clindamycin and mupirocin[J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61(9):1240-1247.