

• 论 著 •

重症监护室与普通病房金黄色葡萄球菌分子分型及其临床特征分析

殷 杏, 翁志骏, 胡海清, 陈险峰, 刘耀婷, 侯珊珊, 周庭银, 周 琳[△]

(第二军医大学附属长征医院实验诊断科, 上海 200003)

摘要:目的 对重症监护病房与普通病房的金黄色葡萄球菌进行分子流行病学分析, 并对其临床特点进行比较。方法 收集 2015 年 9 月至 2016 年 4 月临床分离的金黄色葡萄球菌共 96 株, 分别来自于急救科和神经外科重症监护病房 43 株和普通病房 53 株, 进行细菌鉴定及抗菌药物的药物敏感性试验, 采用金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (spa) 分型方法对其进行分子分型。结果 96 株金黄色葡萄球菌中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 检出率为 40.6% (39/96), 重症监护病房 43 株为 62.8% (27/43), 普通病房 53 株为 22.6% (12/53)。重症监护病房菌株对庆大霉素、左氧氟沙星、克林霉素、磷霉素、米诺环素耐药率分别为 23.3%、48.8%、46.5%、32.6%、32.5%, 普通病房分别为 7.5%、24.5%、18.9%、2.1%、0。Spa 分型结果显示, 重症监护病房主要为 t002、t091、t311 3 种型别, 其中 t002 (16 株, 37.2%) 为主要流行菌株, 主要来自于急救科重症监护病房 (12 株), 普通病房菌株分为 26 个型别, 主要为 t189、t377、t571、t034、t091、t127。结论 重症监护病房 MRSA 检出率高于普通病房, 对常规抗菌药物耐药率高, t002 为主要流行株, 普通病房 spa 分型型别较多, 遗传多样性高。

关键词:金黄色葡萄球菌; 分子流行病学; 基因分型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.07.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)07-0933-03

Analysis on molecular typing and clinical characteristics of *Staphylococcus aureus* in ICUs and general wardsYIN Xing, WENG Zhijun, HU Haiqing, CHEN Xianfeng, LIU Yaoting, HOU Shanshan, ZHOU Tingyin, ZHOU Lin[△](Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Affiliated Hospital of
Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: Objective To conduct the molecular epidemiologic analysis of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in the intensive care units (ICUs) and general wards and to compare their clinical characteristics. **Methods** Ninety-six clinically isolated strains of *S. aureus* (43 strains from the emergency intensive care unit (EICU) and neurosurgical intensive care unit (NICU) and 53 strains from the general wards) collected from September 2015 to April 2016 were performed the bacterial identification and antibiotic susceptibility test. The molecular typing was performed by adopting staphylococcal protein A (spa) typing method. **Results** Among 96 strains of *S. aureus*, the detection rate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was 40.6% (39/96), which among 43 strains in ICU was 62.8% (27/43) and which among 53 strains in the general wards was 22.6% (12/53). The resistance rates of strains from ICUs to gentamicin, levofloxacin, clindamycin, fosfomycin and minocycline were 23.3%, 48.8%, 46.5%, 32.6% and 32.5% respectively, while which from the general wards were 7.5%, 24.5%, 18.9%, 2.1% and 0% respectively. The Spa typing results showed that the main types of ICUs were t002, t091 and t311. The major epidemic strain was t002 ($n=16$, 37.2%) and mainly isolated from EICUs (12 strains), 26 spa types were identified among the general wards strains, mainly were t189, t377, t571, t034, t091, t127. **Conclusion** The detection rate of MRSA in ICUs is higher than that in the general wards, these strains have high resistant rate to routine antibacterial drugs. t002 is the major epidemic strain. The general wards have more spa types with higher genetic diversity.

Key words: *staphylococcus aureus*; molecular epidemiology; genotype

金黄色葡萄球菌是人类重要的致病菌, 是引起医院感染和社区感染的主要病原体之一, 其感染的发病率和病死率均较高^[1]。金黄色葡萄球菌可以产生多种毒素, 从而引起多种形式感染, 如局部皮肤软组织感染、肺炎、胃肠炎、心内膜炎等, 也可引起血流感染、脓毒血症等全身感染。金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (staphylococcal protein A, spa) 分型技术是针对单个基因片段测序, 其简单易行、敏感性较高, 适用于研究由金黄色葡萄球菌感染引起的短期暴发流行及长期院感监测。为了了解临床分离的金黄色葡萄球菌的分子流行病学特征, 比较重症监护病房和普通病房的金葡菌流行情况和其临床特征, 作者收集了 2015 年 9 月至 2016 年 4 月分离的金黄色葡萄球菌进行耐药性分析, 并对其进行了 spa 分型, 为临床治疗和医院感染控制提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 连续收集长征医院 2015 年 9 月至 2016 年 4

月临床分离的金黄色葡萄球菌 96 株 (去除同一患者重复菌株), 分别来源于重症监护病房共 43 株, 普通病房共 53 株, 临床分离菌主要来自于痰液、血液、伤口分泌物、腹腔引流液等。质控菌株为 ATCC 25923 和 ATCC 29213, 均购自上海市临检中心。

1.2 主要仪器与试剂 法国梅里埃 VITEK-II 全自动微生物分析系统及配套 GP 鉴定卡和 AST-GP67 药敏卡; 药敏纸片购自英国 Oxoid 公司; 美国 ABI Veriti PCR 扩增仪; 美国 BIO-RAD MPTETTA 微型槽电泳仪; 中国天美 TANON-2500 凝胶成像系统; 德国 eppendorf centrifuge 5424 离心机; 扩增金黄色葡萄球菌 A 蛋白 spa 引物序列: spa-F: TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C; spa-R: CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT。上述引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成; Taq PCR Master Mix 试剂购自上海莱枫生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株的鉴定和药敏试验 所有菌株均采用法国梅里埃 VITEK-II 全自动微生物分析仪进行菌种鉴定,采用 AST-GP67 药敏卡联合琼脂纸片扩散法(K-B 法)检测菌株抗菌药物敏感性,结果参照 2014 年 CLSI M100-S24^[1] 标准判断。

1.3.2 提取细菌基因组 DNA 将保存于-80℃冰箱的金黄色葡萄球菌复苏后,接种于血平板上,37℃培养 18~24 h 后,挑取若干菌落研磨至含 300 μL 灭菌双蒸水的离心管中,将离心管置于 100℃沸水煮沸 10 min,再置于冰上冷却 5 min,14 000 r/min 离心 10 min,将上清液吸到另一无菌的离心管中,即为 PCR 反应模板,保存于一20℃,备用。

1.3.3 spa 分型 从 GenBank 数据库中检索出 spa 基因 DNA 序列,对应两端保守序列用 Primer6.0 软件设计上下游引物序列:spa-F:TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C;spa-R:CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT。以金黄色葡萄球菌全基因组 DNA 为模板,2×Taq PCR Master Mix10 μL,上下游引物各 1 μL,去离子水 8 μL,模板 1 μL,反应体系为 20 μL。PCR 反应条件为:预变性:94℃ 30 s;循环:变性 94℃ 30 s,退火 55℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,共 30 个循环;终延伸:72℃ 5 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。将 PCR 产物送上海铂尚生物技术有限公司进行测序,所得序列结果在网站(<http://spa.ridom.de>)进行比对分型。

1.4 统计学处理 WHONET5.6 软件及 SPSS18.0 软件进行数据分析。

2 结 果

2.1 临床标本的细菌鉴定 2015 年 9 月至 2016 年 4 月从临床标本中分离出金黄色葡萄球菌 96 株,耐甲氧耐金黄色葡萄球菌(MRSA)检出率 40.6%(39/96),其中 43 株来自急救科和神经外科重症监护病房,53 株来自普通病房。43 株重症监护病房菌株患者男性 72.1%,女性 27.9%,标本来源为痰液 72.1%,伤口分泌物 16.3%,血液 9.3%,其他 2.3%,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检出率为 62.8%(27/43)。53 株普通病房患者男

性 52.8%,女性 47.2%,标本来源为伤口分泌物 43.4%,痰液 39.6%,血液 9.4%,其他 7.6% MRSA 检出率为 22.6%(12/53)。

表 1 96 株金黄色葡萄球菌对常用药物耐药率(%)

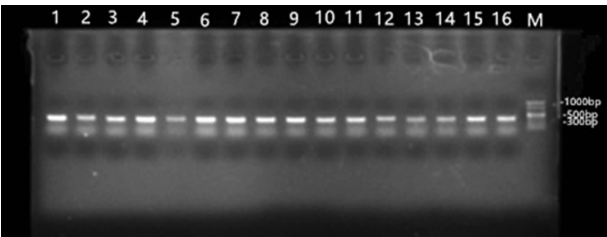
抗菌药物	重症监护病房(n=43)	普通病房(n=53)
苯唑西林	62.8	22.6
青霉素	97.7	84.9
庆大霉素	23.3	7.5
左氧氟沙星	48.8	24.5
复方磺胺甲噁唑	4.7	5.7
红霉素	60.5	45.3
克林霉素	46.5	18.9
利福平	0.0	2.1
磷霉素	32.6	0.0
万古霉素	0.0	0.0
利奈唑胺	0.0	0.0
米诺环素	32.5	2.2

2.2 金黄色葡萄球菌对常用抗菌药物敏感性试验 所有 96 株金黄色葡萄球菌均对万古霉素和利奈唑胺敏感,相比普通病房,重症监护病房的金黄色葡萄球菌对庆大霉素、左氧氟沙星、克林霉素、磷霉素、米诺环素耐药率较高,表 1。

2.3 spa 分型 PCR 产物相对分子质量在 300 bp 左右,电泳图见图 1。重症监护病房 43 株金葡菌的 spa 型别有 21 种,主要为 t002(37.2%)、t091(7.0%)、t311(7.0%)3 种型别,其中 t002 型主要分离自急救科重症监护病房痰液标本。普通病房 53 株金黄色葡萄球菌的 spa 分型可分为 t189(11.3%)、t377(9.4%)、t571(9.4%)等 26 个型别,标本类型以伤口分泌物居多(表 2),并发现两种新的型别,其重复序列分别为 04-12-20-12-17-20-17-12-17-17 和 08-21-17-13-34-34-34-34-34-34-33-13,前者是 MSSA 株,后者是 MRSA 株。

表 2 96 株金黄色葡萄球菌 spa 分型结果

spa 分型	重症监护病房(n=43)			spa 分型	普通病房(n=53)		
	数量(n)	百分比(%)	标本来源		数量(n)	百分比(%)	标本来源
t002	16	37.2	痰(n=13),血(n=2),伤口分泌物(n=1)	t189	6	11.3	伤口分泌物(n=2),痰(n=2),血(n=1),引流液(n=1)
t091	3	7.0	血(n=1),脑脊液(n=1),痰(n=1)	t377	5	9.4	伤口分泌物(n=2),痰(n=2),血(n=1)
t311	3	7.0	痰(n=2),伤口分泌物(n=1)	t571	5	9.4	痰(n=2),伤口分泌物(n=1),血(n=1),引流液(n=1)
其他	21	48.8	痰(n=15),伤口分泌物(n=5),血(n=1)	其他	37	69.8	伤口分泌物(n=18),痰(n=15),血(n=2),穿刺液(n=2)



注:1~16 号泳道为菌株 spa 分型 PCR 产物,M 为 DNA 相对分子质量 Marker。

图 1 金黄色葡萄球菌 spa 分型 PCR 产物电泳图

3 讨 论

金黄色葡萄球菌是临床上分离最多的革兰阳性球菌,其通过释放多种细胞外毒素,如肠毒素、溶血素、杀白细胞素等而表现出较强的致病力^[2]。上世纪 60 年代以来 MRSA 的出现,随之在全球范围内广泛传播,金黄色葡萄球菌成为了医院感染最重要的病原菌之一。重症监护病房患者往往免疫力低下,侵入性操作破坏机体自然屏障功能,住院时间长,抗菌药物使用时间长,成为金黄色葡萄球菌感染的易感人群^[3]。特别是重症监护病房中若发现 MRSA 流行株感染,需要及时干预,并给予及时有效的抗感染治疗^[4]。2014 年上海细菌耐药监测报告中,MRSA 在三级医院的平均检出率为 79.9%^[5],本研究中本院 96 株

金黄色葡萄球菌 MRSA 检出率为 40.6%，重症监护病房病房 43 株为 62.8%，普通病房 53 株为 22.6%，均低于上海市三级医院平均水平。重症监护病房病房金黄色葡萄球菌相较于普通病房，对青霉素类、氨基糖苷类、林可霉素类、喹诺酮类等多种抗菌药物均有较高的耐药率，给临床抗感染治疗带来较大困难，患者预后较差。本次研究未发现对糖肽类药物不敏感的菌株。

Spa 分型是基于编码 spa 基因 X 区含有 2~15 个长 21~27 bp 的重复序列，其数目和排列顺序不同具有高度的多态性而建立的分子分型方法。许多研究报道指出，spa 分型技术分辨率虽不如脉冲场凝胶电泳 (PFGE)，但优于多位点序列分型 (MLST)，具有操作简单、快速、重复性好、成本较低等优点^[6-7]。spa 分型在国际上有标准统一的命名系统，能够实现在不同实验室、地区、国家之间的对比，适用研究群体生物性和长期大范围、全球性的分子流行病学调查研究。本研究显示上海长征医院临床分离的金黄色葡萄球菌 spa 分型，在重症监护病房病房和普通病房类型不同，重症监护病房病房以 t002 型 (37.2%) 为主要型别，标本类型多源于痰液，这跟我国多个城市报道的以 ST239-t030 型为主要克隆株并不一致^[8-9]，但与上海仁济医院报道的结果一致^[10]，这说明金黄色葡萄球菌的流行存在地区差异性，上海地区重症监护病房病房的主要型别可能为 ST5-t002 型，医院应对此加强对重症监护室的管理和院感控制工作。普通病房金黄色葡萄球菌 spa 分型类型较多，以 t189 (11.3%)、t377 (9.4%)、t571 (9.4%) 为多，来源多为伤口感染，对临床常用抗菌药物耐药率普遍不高，但查阅病史资料发现有部分患者反复感染，治疗效果并不佳，这可能与这些型别的金黄色葡萄球菌毒力较高抑或生物膜形成能力较强有关，还待后续进一步研究。

参考文献

- [1] 潘云军,刘慧,郭卫红,等.医院感染金黄色葡萄球菌的临床特征及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2014,35(4):482-484.
- (上接第 932 页)
- of coagulation with 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 in cesarean section[J]. Korean J Anesthesiol, 2012, 62(4): 337-342.
- [9] 徐世琴,彭宇竹,沈晓凤,等.腰-硬联合麻醉剖宫产容量治疗对母婴的影响[J].临床麻醉学杂志,2013,29(7):675-678.
- [10] 刘金山,马华山,李田华,等.不同麻醉方案对 TURP 患者围手术期生命体征及凝血功能的影响[J].中国地方病防治杂志,2015,30(5):417-420.
- [11] 何绮霞,卢燕,姚业兴.硬膜外麻醉和腰硬联合麻醉对老年患者肾素-血管紧张素-醛固酮系统影响的比较[J].实用医学杂志,2011,27(13):2371-2374.
- [12] Yousef AA, Salem HA, Moustafa MZ. Effect of mini-dose epidural dexmedetomidine in elective cesarean section using combined spinal-epidural anesthesia: a randomized

- [2] Otto M. Staphylococcus aureus toxins[J]. Curr Opin Microbiol, 2014, 17(1): 32-37.
- [3] 范珊红,李颖,戈伟,等. ICU 患者 MRSA 定植与感染的危险因素研究[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(3): 174-177.
- [4] 林琳,王晶,万献尧,等.重症监护病房金黄色葡萄球菌分离株基因分型研究[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(11): 1822-1825.
- [5] 郭燕,杨洋,朱德妹,等. 2014 年上海市细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(2): 105-116.
- [6] Said B, Ismail J, Campbell J, et al. Regional profiling for determination of genotype diversity of mastitis-specific Staphylococcus aureus lineage in Canada by use of clumping factor A, pulsed-field gel electrophoresis, and spa typing[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 375-386.
- [7] Babouee B, Frei R, Schultheiss E, et al. Comparison of the DiversiLab repetitive element PCR system with spa typing and pulsed-field gel electrophoresis for clonal characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(14): 1549-1555.
- [8] Li T, Song Y, Zhu Y, et al. Current status of Staphylococcus aureus infection in a central teaching hospital in Shanghai, China[J]. BMC Microbiol, 2013, 13(2): 153.
- [9] Yang L, Boyang C, Yongfu Z, et al. Complete genome sequence of Staphylococcus aureus T0131, an ST239-MRSA-SCCmec type III clone isolated in China[J]. J Bacteriol, 2011, 193(30): 3411-3412.
- [10] 袁挺,应春妹.成人和儿童金黄色葡萄球菌感染分子流行病学研究[J]. 检验医学, 2015, 30(11): 1119-1124.

(收稿日期:2016-12-11 修回日期:2017-02-13)

- double-blinded controlled study[J]. J Anesth, 2015, 29(5): 708-714.
- [13] 何绮霞,卢燕,顾晓霞,等.预注右美托咪定对甲状腺手术全麻苏醒期肾素-血管紧张素-醛固酮系统的影响[J].实用医学杂志, 2015, 31(1): 125-128.
- [14] Zhong D, Liu Q, Zhao N, et al. A randomized trial to compare pain control using oral analgesia with epidural analgesia after cesarean section following combined spinal-epidural anesthesia[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(70): 7086-7093.
- [15] 刘纳新,黄杏琼,江金环,等.不同方式腰硬联合麻醉剖宫产患者术后自控镇痛效应的比较[J]. 广东医学, 2015, 36(5): 712-715.

(收稿日期:2016-11-14 修回日期:2017-01-06)