

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.06.002

· 论 著 ·

感染创面相关环境标本分离葡萄球菌的同源性分析

张越文, 钱子煜, 倪斌君, 赵雪涛

(上海市徐汇区疾病预防控制中心, 上海 200237)

[摘要] 目的 对某医疗机构葡萄球菌感染情况进行持续监测, 对创面感染患者相关医源性环境检出的葡萄球菌进行分子溯源分析。方法 采用实时荧光聚合酶链反应(PCR)和分类培养鉴定相结合的方法, 对该医疗机构 5 例创面感染患者相关的医源性环境进行采样检测, 并进行金黄色葡萄球菌多位点序列分析和 *MecA* 基因的分型分析。结果 采集医源性环境标本 71 份, 葡萄球菌阳性 26 份(36.62%), 其中 23 份检出甲氧西林耐药(*MecA*⁺)株(88.46%, 23/26)。金黄色葡萄球菌甲氧西林耐药株占 77.78%(7/9), 凝固酶阴性葡萄球菌甲氧西林耐药株占 95.00%(19/20)。多位点序列分析结果显示, 分离的金黄色葡萄球菌以 ST239 为主(6 株); SCCMec 分析, 金黄色葡萄球菌以 III 型为主, 凝固酶阴性葡萄球菌以 III、IV 型较多。结论 医源性感染中葡萄球菌污染较多, 且多为耐药株, 应加强对耐药性葡萄球菌的持续监测, 关注其变异对医疗机构医院感染的风险。

[关键词] 葡萄球菌; 金黄色葡萄球菌; 凝固酶阴性葡萄球菌; MRSA; MRCNS; 多位点序列分析; 染色体; 同源性

[中图分类号] R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)06-0327-05

Homology analysis on *Staphylococcus* isolated from infectious wound-related environmental specimens

ZHANG Yue-wen, QIAN Zi-yu, NI Bin-jun, ZHAO Xue-tao (Shanghai Xuhui Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200237, China)

[Abstract] **Objective** To monitor *Staphylococcus* infection in a hospital, and trace the source of *Staphylococcus* isolated from infectious wound-related hospital environment by molecular analysis. **Methods** By combination of fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) and culture method, environmental specimens related to 5 patients with wound infection were taken and performed multilocus sequence and *MecA* gene typing analysis. **Results** A total of 71 environmental specimens were taken, *Staphylococcus* accounted for 36.62% ($n=26$), 88.46% (23/26) of which were *MecA*⁺ methicillin-resistant strains. 77.78% (7/9) of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and 95.00% (19/20) of coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) were methicillin-resistant strains. Multilocus sequence analysis revealed that ST239 ($n=6$) was the most common sequence type in *S. aureus*; Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis showed that the major type of *S. aureus* was type III, and CNS were type III and IV. **Conclusion** *Staphylococcus* is common in healthcare-associated infection, and most *Staphylococcus* are multidrug-resistant, continuous monitor on drug-resistant *Staphylococcus* is necessary, and risk of *Staphylococcus* variant to medical institutes need to be paid attention.

[Key words] *Staphylococcus*; *Staphylococcus aureus*; coagulase negative *Staphylococcus*; MRSA; MRCNS; multilocus sequence analysis; chromosome; homology

[Chin Infect Control, 2014, 13(6): 327-331]

葡萄球菌是一群革兰阳性球菌, 是医源性感染中最常见的病原菌之一^[1]。近年来, 随着抗菌药物的广

泛使用, 耐甲氧西林葡萄球菌所占比例也越来越高, 尤其是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)近年

[收稿日期] 2013-12-20

[作者简介] 张越文(1967-), 女(汉族), 上海市人, 主治医师, 主要从事医疗机构消毒监测及管理研究。

[通信作者] 赵雪涛 E-mail: zhaoxtc@xhcdc.sh.cn

来多见各类报道和研究。我们选取本区域内的某医疗机构某病区,对其医院内葡萄球菌的感染、耐药葡萄球菌的分布和型别作初步研究与分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本采集自徐汇区某医疗机构某病区 5 例创面感染患者相关的医源性环境,病例号标识为 A、B、C、D、E;相应的环境(包括医务人员的鼻腔、手、病床、白大衣等)采样依次以数字标识,分别为 A1—A15、B1—B12、C1—C16、D1—D13、E1—E15。

1.2 标本核酸提取 吸取增菌液 100 μL,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液后加入含有 300 U/mL 溶

菌酶的 TE 溶液 100 μL;平板生长的菌落则挑取单个菌落加入含有 300 U/mL 溶菌酶的 TE 溶液 100 μL,37℃ 孵育 30 min 后,用 95℃ 10 min 灭活溶菌酶,再使用酚-氯仿-异戊醇纯化 DNA 后复溶备用。

1.3 实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测 mg²⁺ 浓度为 5 mmol/L,上下游引物浓度各为 250 nmol/L,探针浓度为 150 nmol/L,DNTP 浓度为 0.2 mmol/L, Taq 酶为 2 IU,模板 3 μL,用^{dd}H₂O 补足总体积为 30 μL。扩增条件:37℃ 2 min,94℃ 10 min,1 个循环;94℃ 10 s,60℃ 40 s,40 个循环;在 60℃ 时同时检测 FAM/HEX/ROX 3 个通道荧光值,CT<35 为阳性,FAM 通道为 *TuF* 片段,HEX 通道为 *MecA* 片段,ROX 通道为 *Nuc* 片段。引物探针序列见表 1。

表 1 葡萄球菌属、耐甲氧西林基因、金黄色葡萄球菌引物和探针序列

Table 1 Primers and probe sequences of *Staphylococcus SPP.*, methicillin-resistant gene and *Staphylococcus aureus*

基因	引物探针序列对	序列(5'—3')	片段长度(bp)
<i>TuF</i>	TuF-F	GGGTWGAATGTTCCGTAA	74
	TuF-R	ACACCACGTAATAAHGCA	
	TuF-tq	fam-ATGTTGTCACCAGCTTCAGCG-bhq1	
<i>MecA</i>	MecA-F	CTGCTCAACAAGTTCCAG	70
	MecA-R	AYCCAATCATTGCTGTAA	
	MecA-tq	hex-ACAACCTTCACCAGGYTCAACTCA-bhq1	
<i>Nuc</i>	Nuc-f	AGTGCAACTTCAACTAAA	95 (V01281;460—554)
	Nuc-r	GGTTGACCTTTGTACATTA	
	Nuc-tq	ROX-AACCGTATCACCATCAATCGCTT-bhq1	

W 为 A/T 简并,Y 为 C/T 简并,H 为 A/T/C 简并

1.4 葡萄球菌的培养与鉴定 采用生理盐水涂抹擦拭环境后分别置于 7.5% 氯化钠肉汤和 3% 氯化钠肉汤进行 12 h 增菌,接种于金黄色葡萄球菌显色平板(CHROMAGAR[®])和血琼脂平板进行 24 h 培养分离,如有形态可疑菌落生长,经革兰染色证实为革兰阳性球菌后,挑取单个菌落于 Vitec-compact 的 GP 卡片进行种属鉴定,AST-GP67 进行药敏鉴定。

1.5 多位点序列分析 按金黄色葡萄球菌多位点序列分型(MLST)网站(<http://saureus.mlst.net>)上提供的 7 个管家基因(housekeeping gene)引物序列,合成 7 对上下游引物,扩增菌株的 7 个管家基因。核酸提取采用上述方法,引物序列见表 2。扩增条件为:94℃ 10 min,1 个循环;然后 94℃ 30 s,55℃ 90 s,72℃ 60 s,35 个循环;最后 72℃ 15 min。扩增产物送上海生工公司测序,测序结果与标准序列比对;序列经校准后提交网站,确定等位基因数和

序列类型(STs)。

1.6 葡萄球菌甲氧西林耐药盒式染色体分型 所分离的葡萄球菌按照上述方法进行核酸抽提。分型引物及 PCR 反应体系参照文献[2],分型引物序列见表 3。扩增条件:94℃ 5 min,1 个循环;94℃ 45 s,65℃ 45 s,72℃ 1.5 min,10 个循环;94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1.5 min,25 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖(含 0.5 g/mL EB)电泳检测。

1.7 仪器 BIORAD 公司 IQ5 荧光定量 PCR 仪;Vitec-compact 微生物鉴定及药敏系统,为法国生物梅里埃公司产品。

1.8 试剂与耗材 细菌培养分离用培养基,由科玛嘉生物技术公司提供;Vitec-compact 专用检测 GP 卡,由法国生物梅里埃公司提供;PCR 引物与探针及 DNTP 等生化试剂,均由上海赛百盛生物技术有限公司合成。

表 2 多位点序列分析 7 对引物序列

Table 2 Seven primer sequences of multilocus sequence analysis

基因	片段标识	引物序列(5'—3')	片段长度(bp)
<i>arc</i>	arc-F	TTGATTCACCAGCGGTATTGTC	456
	arc-R	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
<i>aro</i>	aro-F	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	456
	aro-R	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	
<i>glp</i>	glp-F	CTAGGAAGTCAATCTTAATCC	465
	glp-R	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
<i>gmk</i>	gmk-F	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
	gmk-R	TCATTAACACTACAACGTAATCGTA	
<i>pta</i>	pta-F	GTTAAAATCGTATTAGCTGAAGG	474
	pta-R	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
<i>tpi</i>	tpi-F	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA	402
	tpi-R	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
<i>yqi</i>	yqi-F	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
	yqi-R	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

表 3 葡萄球菌 *MecA* 盒式染色体基因分型 PCR 扩增序列

Table 3 Primer sequences of SCCmec

SCC 分型基因	引物序列(5'—3')	扩增长度(bp)
SCCmec I	GCTTTAAAGAGTGTGCTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	613
SCCmec II	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398
SCCmec III	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTGTAACAGATCG	280
SCCmec IV a	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTCTGAAAAGCGTCG	776
SCCmec IV b	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	493
SCCmec IV c	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200
SCCmec IV d	CTCAAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881
SCCmec V	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325

2 结果

2.1 医源性环境标本检测结果 医源性环境标本共 71 份,其实时荧光 PCR 结果见表 4。葡萄球菌

阳性标本 26 份,阳性率为 36.62%(26/71),其中 23 份检出甲氧西林耐药(*MecA*⁺)株,占 88.46%(23/26);检出金黄色葡萄球菌(*Nuc*⁺)9 株,检出率为 12.68%(9/71),金黄色葡萄球菌占葡萄球菌整体检出率的 31.03%(9/29)。

表 4 医源性环境标本实时荧光 PCR 检测结果

Table 4 Results of FQ-PCR of environmental specimens

标本编号	TuF	<i>MecA</i>	<i>Nuc</i>	结果
A2, A4, A7, B10, C2, C3, C4	+	+	+	MRSA 或 MRSA/MSSA + CNS(7 例)
A9, B1—B3, B11, B12, C7, C9, D1—D8	+	+	-	MRCNS(16 例)
E5, E11	+	-	+	MSSA 或 MSSA + MSCNS(2 例)
D12	+	-	-	MSCNS(1 例)
其余	-	-	-	未检出葡萄球菌

MSSA:对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌;MRCNS:耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌;MSCNS:对甲氧西林敏感的凝固酶阴性葡萄球菌

2.2 葡萄球菌耐药结果与 *MecA* 片段检测结果比较
共检出凝固酶阴性葡萄球菌 20 株,金黄色葡萄球菌 9 株,*MecA* 阳性结果与分离培养结果一致,见表 5。

表 5 凝固酶阴性葡萄球菌与金黄色葡萄球菌甲氧西林耐药与 *MecA* 阳性检测情况(株)

Table 5 Nucleic acid test for *MecA*⁺ in CNS and *S. aureus* (No. of isolates)

菌株	<i>MecA</i> 核酸检测		合计
	阳性	阴性	
MSSA	0	2	2
MRSA	7	0	7
MSCNS	0	1	1
MRCNS	19	0	19
合计	26	3	29

2.3 医源性环境葡萄球菌增菌分离培养结果 共检出金黄色葡萄球菌 9 株,与 PCR 结果一致,检出

金黄色葡萄球菌的标本中有 6 份同时检出凝固酶阴性葡萄球菌;检出凝固酶阴性葡萄球菌的环节标本共 20 份,其中有 3 份同时检出金黄色葡萄球菌。凝固酶阴性葡萄球菌甲氧西林耐药株占 95.00% (19/20),金黄色葡萄球菌甲氧西林耐药株占 77.78% (7/9)。

2.4 金黄色葡萄球菌多位点序列分析 9 株金黄色葡萄球菌 7 个片段的测序结果按标准长度与 MLST 网络数据库的相应序列比对后,得到 3 个 ST 类型,其中 6 株属于 ST239,2 株属于 ST9,1 株为 ST97。6 株 ST239 均为 MRSA;1 株 ST97 为 MSSA;2 株 ST9 中,分别为 MRSA 和 MSSA。

2.5 葡萄球菌甲氧西林耐药盒式染色体基因分型 共检测 7 株 MRSA 和 19 株 MRCNS,MRSA 主要以 SCCmec III 型为主;MRCNS 中,以 SCCmec III、IV 较多。详见表 6。

表 6 金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌甲氧西林耐药株 SCCmec 分型结果(株)

Table 6 SCCmec typing of CNS and *S. aureus* (No. of isolates)

菌株	SCCmec Type								合计
	I	II	III	IV a	IV b	IV c	IV d	V	
MRSA	-	1	5	1	-	-	-	-	7
MRCNS	-	-	10	5	4	-	-	-	19
合计	-	1	15	6	4	-	-	-	26

3 讨论

金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌是医源性感染中最常见的病原菌,其中的 MRSA 传播速度很快,影响大,是引起难治愈的医源性感染的主要病原菌之一,已引起各界普遍重视,并成为公共卫生的重大关注点。

葡萄球菌的耐药可以是固有耐药,也可能是获得耐药性质粒,无论是哪一种耐药机制,都有 PCR 检测 *MecA* 基因阴性,但培养检测却耐药的报道^[3];而另一方面,单纯的 *MecA* 基因存在,并不能完全独立表达 PBP2,还有赖于甲氧西林耐药必需因子(*femA*、*femB* 等)^[4]。因此,采用 PCR 方法于 *MecA* 单位点检测甲氧西林耐药有一定的局限性^[5],故而美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐将传统培养和 PCR 方法相结合,从表型和基因型两方面确认甲氧西林耐药,以保证结果的准确和可靠^[6]。

本研究对某医疗机构某病区的 5 例创面感染患者的医源性环境进行采样,采用实时荧光 PCR 和传

统培养鉴定及药敏试验的方法对 71 份标本进行检测,并对检出的 9 株金黄色葡萄球菌进行多位点序列分型,对 7 株 MRSA 和 19 株 MRCNS 的葡萄球菌染色体盒式基因进行检测分型。结果显示:(1)金黄色葡萄球菌的 MLST 分型以 ST239 为主,在相关的文献^[2]报道中,ST239 和 ST5 这两个序列类型是医源性感染最常见的类型;(2)在 26 株甲氧西林耐药株中,SCCmec III 型是最主要的类型,据以往的文献^[7]报道,这一型别 SCCmec 所携带的耐药基因众多,是最容易出现多重耐药的基因型别;另外,两个较多的型别 SCCmec IV a 和 IV b,携带毒力基因较少,常见于社区感染病例^[8]。

MLST 作为大多数常见病原菌的新的分析溯源方法,分辨力高,重复性好;建立了有大型数据库的国际网站,可直接将试验结果提交数据库进行比较,为全球金黄色葡萄球菌的流行病学研究提供了巨大的信息资源,并可分析菌株的遗传相关性,特别是在菌株的地理信息上有特殊的意义,适合长期大范围的流行病学调查研究^[9]。SCCmec 是一个可移动的携带有 *MecA* 基因的复合体结构,也被称为耐

药基因岛 (gene island), 它可以整个地从染色体中自发剔除, 也可从一个菌细胞转移整合到另一个菌细胞染色体中。MRSA 的产生, 是 MSSA 通过 SCC 从其他菌株中获得 *MecA* 的结果, 它同样可以使其他抗菌药物耐药基因在葡萄球菌间传递, 这可能是 MRSA 容易获得多重耐药的根源原因^[9-12]。本研究中大多数凝固酶阴性葡萄球菌和金黄色葡萄球菌都有类似的 SCCmec 型别特征, 提示作为聚居的环境, 为不同种葡萄球菌之间的耐药基因的转移提供了可能。

[参考文献]

[1] Lowy F D. *Staphylococcus aureus* infections[J]. New England J Med, 1998, 339(2): 520 - 532.

[2] Zhang K, McClure J A, Elsayed S, et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3): 5026 - 5033.

[3] Wolk D M, Picton E, Johnson D, et al. Multicenter evaluation of the Cepheid Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) test as a rapid screening method for detection of MRSA in nares [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(6): 758 - 764.

[4] Arbefeville S S, Zhang K, Kroeger J S, et al. Prevalence and genetic relatedness of methicillin-susceptible *Staphylococcus*

aureus isolates detected by the Xpert MRSA nasal assay[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 2996 - 2999.

[5] Ibrahem S, Salmenlinna S, Virolainen A, et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococci* and their SCCmec types in a long-term-care facility [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(1): 32 - 37.

[6] Rasheed M, Ahmed Z. Phenotypic methods of greater accuracy to detect the *mecA* gene product for the recognition of MRSA in resource constraint settings [J]. Asian Pacific J Trop Med, 2010, 3(1): 741 - 744.

[7] 王新, 黄山, 周娟, 等. 猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及其 SCCmec 基因分型研究[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(12): 975 - 977.

[8] 周海东, 范学工, 黄勋, 等. 实时荧光 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中国感染控制杂志, 2008, 7(3): 162 - 166.

[9] 悦春霞, 蒲万霞, 胡永浩, 等. 金黄色葡萄球菌基因分型方法研究进展[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(10): 64 - 68.

[10] 欧阳范献, 胡永华, 黄惠琴, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的两种新 SCCmec 型别及抗药性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 890 - 894.

[11] 卜平凤, 欧阳范献, 黄惠琴, 等. 携带新 SCCmec 型别菌株的耐药特点及 PCR 图谱多位点序列分析[J]. 中国感染控制杂志, 2013, 12(1): 5 - 11.

[12] 赵俊英, 王晓彦. 葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2011, 11(6): 162 - 166.

(本文编辑:任旭芝)

(上接第 326 页)

[9] 魏丽华, 余兰. 肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶研究进展[J]. 医学信息, 2011, 24(3): 1464 - 1466.

[10] Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, et al. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1323 - 1332.

[11] 毛静, 贾蓓, 黄文祥, 等. 2008 年至 2010 年 3 年细菌的耐药监测研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, (10): 752 - 755.

[12] Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini G M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams[J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(5): 381 - 393.

[13] Chu Y W, Afzal-Shah M, Houang E T, et al. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter spp.* collected in Hong Kong between 1994 and 1998[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(3): 710 - 714.

[14] Xiong J, Hynes M F, Ye H, et al. *Bla*(IMP-9) and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa*

isolates from the People's Republic of China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(1): 355 - 358.

[15] Li B, Sun J Y, Liu Q Z, et al. First report of *Klebsiella oxytoca* strain coproducing KPC-2 and IMP-8 carbapenemases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6): 2937 - 2941.

[16] 姚芬. 肺炎克雷伯菌和假单胞菌耐药机制研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2007.

[17] 李响新, 席雅莉, 王圣钦, 等. 一株洛菲不动杆菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(3): 246 - 249.

[18] 吴丹丹, 蔡加昌, 刘进. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的感染现状[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(1): 1 - 6.

[19] 张小兵, 张丽, 张丽华, 等. 538 株肠杆菌科细菌感染分布及其耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2013, 12(5): 337 - 380.

(本文编辑:任旭芝)