

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.02.001

· 论 著 ·

重症监护病房分离金黄色葡萄球菌的分子流行特征

杨玉琪, 徐修礼, 马越云, 史皆然, 周 珊, 周 磊, 郝晓柯

(第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的** 了解某三甲医院重症监护病房(ICU)患者分离金黄色葡萄球菌的分子流行特点及其同源性,为有效控制医院感染的发生提供实验室依据。**方法** 收集该院 2013 年 3—8 月 ICU 患者各类感染标本分离的 62 株金黄色葡萄球菌,采用 PCR 方法扩增 7 个管家基因并进行测序分析,采用多位点序列分型(MLST)技术获得菌株 ST 分型,对 ST 分型进行亲缘关系分析。**结果** 62 株金黄色葡萄球菌均可以扩增出 7 个管家基因的特异性产物;共分为 10 个 ST 基因型,其中 2 个基因型为新发现的 ST 型(STn1 和 STn2),1 个为国内新发现的 ST 型(ST675)。ST239 是 ICU 患者分离的金黄色葡萄球菌主要 ST 型别,占 74.20%,分布于 6 个 ICU,分布范围最广;其次为 ST5,分布于 3 个 ICU。62 株菌株在系统进化树上形成 7 个主要分支,检出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) 55 株,占 88.71%。**结论** 医院 ICU 分离的金黄色葡萄球菌具有一定的同源性,并且少数型别表现出集中分布趋势。

[关键词] 重症监护病房;金黄色葡萄球菌;多位点序列分型;基因;同源性

[中图分类号] R181.3⁺2 R378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)02-0099-05

Molecular epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated in intensive care units

YANG Yu-qi, XU Xiu-li, MA Yue-yun, SHI Jie-ran, ZHOU Shan, ZHOU Lei, HAO Xiao-ke
(Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular epidemiological characteristics and homology of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) isolated from patients in intensive care units (ICUs) of a hospital, so as to provide laboratory basis for the effective control of healthcare-associated infection(HAI). **Methods** 62 *S. aureus* strains isolated from various specimens from ICU patients with infection in March-August 2013 were collected, 7 housekeeping genes were amplified with polymerase chain reaction (PCR), the amplified products were sequenced, ST typing of strains was performed by multilocus sequence typing (MLST), phylogenetic analysis of ST typing was conducted. **Results** 62 *S. aureus* strains were amplified specific product of 7 housekeeping genes; there were 10 ST genotypes, in which 2 ST genotypes(STn1 and STn2) were first discovered, 1 ST genotype(ST675) was first discovered domestically. ST239 was the main ST type of *S. aureus* from ICU patients in this hospital, accounting for 74.20%, which distributed in 6 ICUs, ST5 distributed in 3 ICUs. 62 strains formed 7 main branches in the phylogenetic tree, 55 (88.71%) MRSA strains were detected. **Conclusion** *S. aureus* isolated from hospital ICUs has some homology, and the small number of types showed the trend of concentrated distribution.

[Key words] intensive care unit; *Staphylococcus aureus*; multilocus sequence typing; gene; homology

[Chin J Infect Control, 2017, 16(2): 99-103]

[收稿日期] 2016-04-28

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(2014JM4188);国家仪器重大专项(2012YQ03026107)

[作者简介] 杨玉琪(1987-),女(汉族),陕西省西安市人,技师,主要从事临床微生物检验及病原菌分子流行病学研究。

[通信作者] 郝晓柯 E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为革兰染色阳性球菌,是一种重要的病原菌,也是近年来引起医院感染的主要病原菌之一^[1]。金黄色葡萄球菌由于传播途径广、致病性强、抵抗力较强,在医院内的传播较为广泛,已经成为医院感染预防和控制棘手问题^[2]。金黄色葡萄球菌尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),已经引起临床医务人员越来越多的重视,而且金黄色葡萄球菌医院内传播也成为医院感染控制的重点问题。因此,分析临床分离的金黄色葡萄球菌分子流行病学特点,并对其进行基因同源性分析,有助于及时判断医院感染的传染源,明确传播途径,对预防和控制医院感染具有重要意义。本研究对重症监护病房(ICU)分离收集的 62 株金黄色葡萄球菌进行菌株鉴定及药敏试验,同时应用多位点序列分型技术(MLST)进行分子流行病学研究,采用 eBURST 软件分析其基因同源性,了解金黄色葡萄球菌在医院 ICU 的传播及流行状况,为临床合理使用抗菌药物及有效控制医院感染提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集某医院 2013 年 3—8 月 ICU 住院患者各种感染标本分离的 62 株金黄色葡萄球菌,并排除同一患者的重复菌株。

1.1.2 仪器与试剂 全自动细菌鉴定分析仪 Phenix 100(美国 BD 公司),Mueller-Hinton 琼脂培养基(北京奥博星生物技术有限公司),溶葡萄球菌酶(BBI 生命科学有限公司),QIAamp DNA 纯化试剂盒(德国凯杰公司),DU800 核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司),聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 ABI 公司),DNA 凝胶电泳系统(美国 Bio-Rad 公司),凝胶电泳成像系统(上海复日科技有限公司),PCR 反应所用试剂(上海生工生物工程股份有限公司),药敏纸片(英国 Oxoid 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离、鉴定 采用常规培养分离方法,操作方法依据《全国临床检验操作规程》,应用 Phenix 100 全自动细菌鉴定分析仪鉴定细菌。

1.2.2 药敏试验 药敏试验采用 K-B 法和头孢西丁纸片法,按美国临床实验室标准化协会(CLSI)2014 年^[3]规定的标准判定耐药(R)、中介(I)、和敏

感(S)。

1.2.3 细菌 DNA 的提取 使用 QIAamp DNA 纯化试剂盒提取细菌 DNA,首先对分离纯化得到的对数生长期的单菌落进行细菌 DNA 的提取,然后用 Beckman DU800 核酸蛋白分析仪检测提取的 DNA 纯度和浓度,确保提取的 DNA 质量。

1.2.4 引物的设计与合成 参照金黄色葡萄球菌 MLST 数据库(<http://saureus.mlst.net/>)推荐的 7 个独立的管家基因(*arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi*、*yqil*)设计引物^[4],引物由上海生工生物工程股份有限公司提供,合成引物序列见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌 MLST 各管家基因引物序列及片段长度

Table 1 Primer sequence and fragment length of housekeeping genes of *S. aureus* MLST

管家基因	引物(5' - 3')	片段长度(bp)
<i>arcC</i>	F:TTGATTACCAGCGCGTATTGTC R:AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
<i>aroE</i>	F:ATCGGAAATCCTATTTACATTC R:GGTGTGTATTAATAACGATATC	456
<i>glpF</i>	F:CTAGGAAGTCAATCTTAATCC R:TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
<i>gmk</i>	F:ATCGTTTTATCGGGACCATC R:TCATTAACATAACGTAATCGTA	429
<i>pta</i>	F:GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG R:GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	474
<i>tpi</i>	F:TCGTTCAATCTGAACGTCGTGAA R:TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402
<i>yqil</i>	F:CAGCATAACAGGACACCTATTGGC R:CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

1.2.5 PCR 反应体系与扩增条件 PCR 反应体系 25 μ L,其中 Premix Taq 12.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,DNA 模板 2 μ L,加无菌蒸馏水至 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.6 扩增产物的验证、测序与比对分析 首先通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,然后将 PCR 产物送北京柏林罗核酸技术有限公司进行双向测序,并利用 BioEdit 软件对测序结果进行校正、拼接。

1.2.7 MLST 型别 拼接后的结果与金黄色葡萄球菌 MLST 数据库的数据进行比对分析,获得对应的 7 个管家基因的等位基因,然后根据 7 个等位基因型进一步获得该菌株的 ST 型别。

1.2.8 同源性分析 使用 eBURST V3 软件(访问

地址: <http://eburst.mlst.net>)对 62 株金黄色葡萄球菌的 ST 基因型进行亲缘关系分析,借助 BURST 算法绘制类似于网络结构的辐射状图。本实验参考菌株为中国临床菌株,使用 eBURST 软件按照严格标准^[4]绘制菌株 ST 亲缘关系分布图。

2 结果

2.1 菌株分布 62 株金黄色葡萄球菌分离自神经外科 ICU(26 株)、神经内科 ICU(16 株)、消化科 ICU(6 株)、呼吸内科 ICU(6 株)、麻醉科 ICU(4 株)、心脏外科 ICU(2 株)、烧伤科 ICU(1 株)和儿科 ICU(1 株),其中痰标本 56 株、咽拭子 2 株、分泌物、引流液、组织和粪便标本各 1 株。患者年龄 0~94 岁,平均 48 岁,男女性别比为 1.95 : 1(41/21)。

2.2 PCR 扩增产物的鉴定结果 62 株金黄色葡萄球菌均可以扩增出 7 个管家基因的特异性产物,扩增产物的大小为 402 ~ 516 bp,扩增产物的电泳结果见图 1。

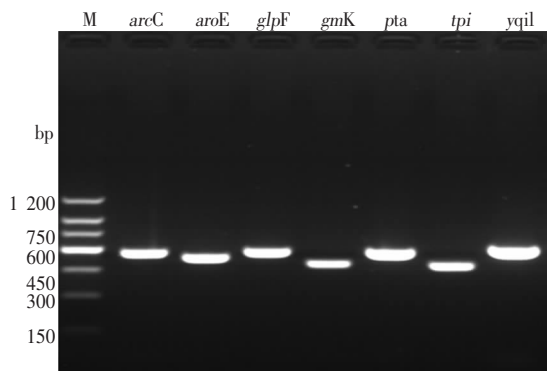


图 1 金黄色葡萄球菌管家基因 PCR 扩增电泳图

Figure 1 PCR amplification electrophoresis map of house-keeping genes of *S. aureus*

2.3 MLST 分型结果 62 株金黄色葡萄球菌共分为 10 个 ST 基因型,其中 2 个基因型为新发现的 ST 型(STn1 和 STn2),1 个为国内新发现的 ST 型(ST675)。ST239 是金黄色葡萄球菌主要的 ST 型别,占 74.20%,且分布于 6 个 ICU,分布范围最广。其次为 ST5,分布于 3 个 ICU。ST630 与 ST239 相比较,仅管家基因 *arcC* 的等位基因不同。ST675 和 STn2 与 ST5 相比较,分别表现为管家基因 *aroE* 和 *glpF* 不同。62 株金黄色葡萄球菌 MLST 分型结果及其在各科室的分布情况详见表 2。

表 2 62 株金黄色葡萄球菌科室分布及 ST 型别

Table 2 Department distribution and ST genotypes of 62 *S. aureus* strains

ST 基因型	等位基因谱 (arcC-aroE-glpF-gmk-pta-tpi-yqil)	科室分布	株数	构成比 (%)
ST239	2-3-1-1-4-4-3	神经外科 ICU、神经内科 ICU、烧伤科 ICU、麻醉科 ICU、呼吸内科 ICU、消化科 ICU	46	74.20
ST5	1-4-1-4-12-1-10	神经外科 ICU、神经内科 ICU、消化科 ICU	8	12.91
ST20	4-9-1-8-1-10-8	呼吸内科 ICU	1	1.61
ST59	19-23-15-2-19-20-15	儿科 ICU	1	1.61
ST188	3-1-1-8-1-1-1	神经内科 ICU	1	1.61
ST630	12-3-1-1-4-4-3	心脏外科 ICU	1	1.61
ST675	1-36-1-4-12-1-10	神经外科 ICU	1	1.61
ST944	18-18-6-59-13-15-18	心脏外科 ICU	1	1.61
STn1	1-4-1-23-12-240-10	麻醉科 ICU	1	1.61
STn2	1-4-327-4-12-1-10	神经内科 ICU	1	1.61

2.4 药敏结果 62 株金黄色葡萄球菌对头孢西丁耐药的 MRSA 共 55 株,占 88.71%。所有菌株对 11 种常见抗菌药物的药敏结果见表 3,只有敏感及耐药菌株,无中介菌株。46 株 ST239 型金黄色葡萄球菌均为 MRSA,表现出较强的耐药性;而 ST20 型、ST188 型、ST944 型和 STn1 型金黄色葡萄球菌对 11 种常见抗菌药物的敏感性相对较高。

表 3 62 株金黄色葡萄球菌对抗菌药物的药敏结果

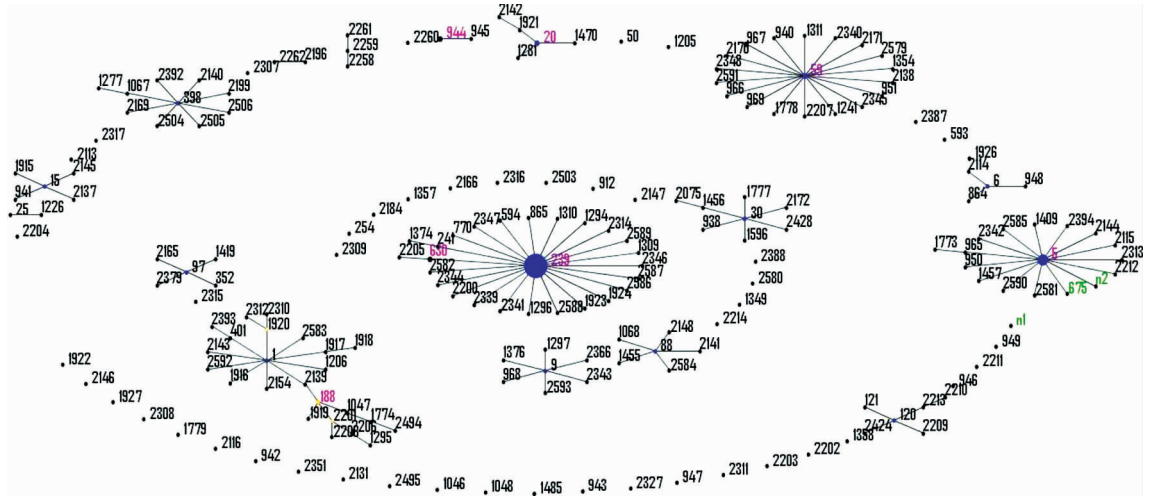
Table 3 Antimicrobial susceptibility testing results of 62 *S. aureus* strains

抗菌药物	检测株数	耐药株数	耐药率 (%)	敏感株数	敏感率 (%)
头孢唑林	62	55	88.71	7	11.29
头孢西丁	62	55	88.71	7	11.29
阿米卡星	44	40	90.91	4	9.09
替考拉宁	59	0	0.00	59	100.00
万古霉素	62	0	0.00	62	100.00
利奈唑胺	61	0	0.00	61	100.00
红霉素	62	55	88.71	7	11.29
克林霉素	62	45	72.58	17	27.42
左氧氟沙星	62	53	85.48	9	14.52
呋喃妥因	62	0	0.00	62	100.00
利福平	44	36	81.82	8	18.18

2.5 eBURST 分析结果 eBURST 分析结果显示,62 株金黄色葡萄球菌 10 个 ST 型分布于中国临床菌株分群的 6 个克隆群和 1 个散点(新型别 STn1)。见图 2。在每个独立的克隆群中,不同的 ST 型别用长度不等的直线相连,直线的长度表示不同

ST 型别之间亲缘关系的远近。6 个克隆群中,最大的克隆群为 ST239 克隆复合群,ST239 为此克隆复合群中其他各 ST 型别共同的祖先(Founder),ST630 是 ST239 的一个亚群。第二大的克隆群为 ST1 克隆复合群,存在 1 个一级亚群(ST188)和

1 个二级亚群(ST2201)。在 ST5 克隆复合群中,本研究中的 ST675、STn2 均为中国临床参考菌株中第一次出现的新的 ST 型别。新发现的 STn1 因为不属于任何 1 个克隆复合群,在分析中以散点的形式分布。



* 红色数字代表本研究和数据库均有的 ST 型;绿色数字代表仅在本研究中发现的 ST 型;黑色数字代表仅数据库中有 ST 型

图 2 62 株金黄色葡萄球菌与中国临床菌株亲缘关系分布图

Figure 2 Diagram of genetic relationship between 62 *S. aureus* strains and Chinese clinical isolates

3 讨论

金黄色葡萄球菌是我国引起医院感染的重要病原菌之一,在该院也位居医院感染分离病原菌的前三位^[5]。近年来,金黄色葡萄球菌的耐药率呈逐年升高趋势^[6],尤其是 MRSA 在医院感染中的比例大幅上升,导致临床抗感染治疗过程中可供选择的药物日益减少,使临床抗感染治疗变得更加棘手。研究^[7]发现,2005 年我国医院 MRSA 的平均分离率在 50% 左右,而上海的医院 MRSA 分离率可达 78.4%。对金黄色葡萄球菌不同菌株间的亲缘关系进行分子生物学分析,可以帮助我们了解临床分离的金黄色葡萄球菌的传播特点和趋势,及时发现传染源和寻找传播途径,为有效预防和控制金黄色葡萄球菌医院感染暴发流行提供实验室依据。

本研究采用国际公认的 MLST 方法,对医院感染金黄色葡萄球菌进行基因分型^[8],该方法通过直接扩增金黄色葡萄球菌的多个管家基因,并将管家基因测序分析与数据库比对,从而确定菌株的基因型,获得的基因型可与国内外其他医院或实验室进行数据共享。MLST 分型结果显示,62 株金黄色葡萄球菌 10 个 ST 型共分布于 6 个克隆群和 1 个散

点,其中 ST239 克隆复合群为流行优势菌群,占 74.20%;其次为 ST5 克隆复合群,占总菌株的 12.91%。该结果与 Xiao 等^[9]的研究结果相符,该研究对中国大陆 2011 年 27 个省 45 个城市 69 家医院分离的 1 141 株 MRSA 菌株进行 MLST 分型,结果表明 ST239 克隆群为流行优势菌群(整体流行率为 75.37%),其次为 ST5 克隆群(整体流行率为 12.62%)。Liu 等^[10]的研究报道,我国大部分地区 MRSA 流行株为 ST239 型菌株,说明该院金黄色葡萄球菌 MLST 分型结果与全国大部分医院的结果一致,以 ST239 克隆复合群和 ST5 克隆复合群为主,且菌株分布具有集中趋势。

金黄色葡萄球菌 ST 型别与科室分布关系显示,ST239 为 ICU 患者感染的主要 ST 型别,分布于 6 个 ICU,包括神经外科 ICU、神经内科 ICU、烧伤 ICU、呼吸内科 ICU、消化科 ICU 和麻醉科 ICU,分布范围最广;而 ST5 的流行范围仅次于 ST239,分布于 3 个 ICU,包括神经外科 ICU、神经内科 ICU 和消化科 ICU。62 株金黄色葡萄球菌,主要分布于神经外科 ICU (26 株,41.94%) 和神经内科 ICU (16 株,25.81%);菌株来源主要为痰标本(56 株,90.32%),可能与大多数神经外科 ICU 和神经内科 ICU 的住院患者本身疾病有关,患者通常无正常吞

咽和咳嗽的能力,痰难以咳出,细菌容易在痰中滋生和繁殖,从而容易发生坠积性肺炎^[11];同时,一部分患者由于接受了吸痰、气管插管和呼吸机辅助呼吸等具有侵入性的操作^[12],导致呼吸道的正常防御屏障遭到损害,从而导致肺部感染。

药敏试验和 MLST 分型结果显示,62 株金黄色葡萄球菌中 MRSA 55 株(88.71%),且 MLST 型别均属于 ST239 克隆复合体和 ST5 克隆复合体;而 ST20、ST188、ST944 和 STn1 型别菌株的药物敏感性却表现为对 11 种抗菌药物均敏感,由此推测菌株的药物敏感性与其遗传背景具有一定的相关性。对 55 株 MRSA 进行分析,发现其具有相似的耐药谱,进一步证明菌株间的遗传背景与药物敏感性相关。我们已将新发现的两株 ST 基因型菌株信息及其双向测序的峰图文件提交至 MLST 数据库,等待数据库最终命名。

综上所述,该院 ICU 感染的金黄色葡萄球菌以 ST239 基因型为主,且分布范围较广;菌株亲缘关系分析结果显示,62 株金黄色葡萄球菌具有集中分布趋势,以 ST239 和 ST5 克隆复合群为主,两种克隆复合群具有相似的耐药谱;说明该院 ICU 金黄色葡萄球菌的感染存在医院内播散的趋势,该结果与之前的研究结果^[13]相符。因此,我们应加强对临床医护人员的医院感染预防控制的教育,严格按照医疗器械污染后导致感染的风险高低选择相应的灭菌或消毒方法,及时采取有效的预防和控制措施,防止医院感染的暴发流行^[14]。

本研究采用 MLST 方法进行细菌分子流行病学方面的研究,该方法由于具有操作简单、用时较少且便于比较等优点,现已被广泛应用于微生物的分型研究^[15-16]。但由于本实验收集菌株数量相对较少,研究时间跨度相对较短,所以本研究结果在不同科室内是否存在主要 ST 型别尚未得出结论,需要完善实验设计,扩大样本量,开启多中心、多地区相关流行病学研究进一步验证。

[参考文献]

[1] Fukuta Y, Cunningham CA, Harris PL, et al. Identifying the risk factors for hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection among patients colonized with MRSA on admission[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2012, 33(12): 1219-1225.

[2] Jeljaszewicz J, Mlynarczyk G, Mlynarczyk A. Present and future problems of antibiotic resistance in gram-positive cocci

[J]. Infection, 1998, 26(1): 1-6.

- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement (M100-S24)[S]. CLSI, 2014.
- [4] Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data[J]. J Bacteriol, 2004, 186(5): 1518-1530.
- [5] 姚蕾,徐元宏. 金黄色葡萄球菌致病毒素的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22): 3080-3082.
- [6] 李耘,吕媛,薛峰,等. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín) 2011—2012 年革兰阳性菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3): 251-259.
- [7] Wang H, Liu Y, Sun H, et al. In vitro activity of ceftobiprole, linezolid, tigecycline, and 23 other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates in China[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 62(2): 226-229.
- [8] Bartual SG, Seifert H, Hippler C, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4382-4390.
- [9] Xiao M, Wang H, Zhao Y, et al. National surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China highlights a still-evolving epidemiology with 15 novel emerging multilocus sequence types[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3638-3644.
- [10] Liu Y, Wang H, Du N, et al. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2): 512-518.
- [11] 邱秀兰,邱丽萍. 神经外科病房医院感染因素分析与对策探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(14): 2902-2903.
- [12] 李妍,曾萍. 神经外科患者医院感染的危险因素及预防措施[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(23): 5714-5715.
- [13] 徐修礼,周珊,白露,等. ICU 患者分离金黄色葡萄球菌的耐药性及分子流行病学特征[J]. 中国感染控制杂志, 2016, 15(5): 294-298.
- [14] Li Y, Guo Q, Wang P, et al. Clonal dissemination of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing an OXA-23 β -lactamase at a teaching hospital in Shanghai, China[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2015, 48(1): 101-108.
- [15] Du P, Hou X, Xie Y, et al. Genotyping of *Nocardia farcinica* with multilocus sequence typing[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(5): 771-778.
- [16] Van Vliet D, Wiens GD, Loch TP, et al. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from three Oncorhynchus spp. in the United States, as revealed by multilocus sequence typing[J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(11): 3246-3255.