

## 医疗环境凝固酶阴性葡萄球菌耐药性监测及耐药基因研究

李 俐, 林 玲, 裴迎新, 孟 琳, 谭金煜, 王炜红

(黑龙江省疾病预防控制中心, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**[摘要]** **目的** 研究医疗环境物体表面及医护人员手凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)分布及耐药性, 为控制医院感染提供科学依据。**方法** 采用细菌生化鉴定仪 WalkaWay-40s1 及微量生化管进行 CNS 的分离与鉴定, K-B 纸片扩散法进行药敏试验, 同时进行耐药基因 *mecA* 的聚合酶链反应(PCR)鉴定。**结果** 采集物体表面标本 478 份, 医护人员手标本 363 份, 共培养分离 CNS 63 株, 检出率 7.49%; 其中 15 株 CNS 分离自物体表面, 38 株分离自护士手, 10 株分离自医生手。24 株(38.09%) CNS 具有 *mecA* 基因, 为耐甲氧西林 CNS(MRCNS), 分别为表皮葡萄球菌(12 株)、溶血葡萄球菌(6 株)、瓦氏葡萄球菌(5 株)、头状葡萄球菌头状亚种(1 株); 药敏结果显示, 表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌和瓦氏葡萄球菌分别对青霉素、阿莫西林、氨苄西林/舒巴坦、红霉素、头孢唑林、亚胺培南耐药率达 87.50% 以上, 对复方磺胺甲噁唑、左氧氟沙星、克林霉素、环丙沙星、四环素、庆大霉素的耐药率达 20.83%~45.83%。**结论** 医疗环境物体表面及医护人员手携带的 CNS 存在多重耐药性, 应引起临床警惕。

**[关键词]** 环境监测; 物体表面; 医护人员; 凝固酶阴性葡萄球菌; 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌; 葡萄球菌属; 抗药性; 微生物; 耐药基因

**[中图分类号]** R378.1<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)02-0097-04

## Drug resistance and resistant genes of coagulase negative *Staphylococcus* in medical settings

LI Li, LIN Ling, PEI Ying-xin, MENG Lin, TAN Jin-yu, WANG Wei-hong (Heilongjiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Harbin 150030, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the distribution and drug resistance of coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) isolated from the object surface and hands of healthcare workers in medical settings, and to provide scientific basis for controlling healthcare-associated infection. **Methods** CNS were isolated and identified with bacterial biochemical identification instrument WalkaWay-40s1 and microbiological tube, antimicrobial susceptibility testing was performed with disk diffusion method, drug-resistant gene *mecA* was detected by polymerase chain reaction method. **Results** A total of 63 isolates of CNS were isolated from 478 object surface samples and 363 hand samples, the isolation rate was 7.49%, 15 CNS isolates were from object surface, 38 were from nurses' hands and 10 were from doctors' hands. 24 (38.09%) isolates carried *mecA* gene and were methicillin-resistant CNS (MRCNS), 12 of which were *Staphylococcus epidermidis*, 6 were *Staphylococcus haemolyticus*, 5 were *Staphylococcus warneri*, and 1 was *Staphylococcus capitis subsp. capitis*; drug resistant rate of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus warneri* to penicillin, amoxicillin, ampicillin/sulbactam, erythromycin, cefazolin, and imipenem was above 87.50% respectively, the resistant rate to trimethoprim/sulfamethoxazole, levofloxacin, clindamycin, ciprofloxacin, tetracycline, and gentamycin were 20.83% - 45.83%. **Conclusion** CNS carried by object surface and hands of healthcare workers in medical settings are multidrug-resistant and should be paid attention.

**[Key words]** environmental surveillance; object surface; healthcare worker; coagulase negative *Staphylococcus*; *Staphylococcus spp.*; drug resistance, microbial; drug-resistant gene

[Chin Infect Control, 2012, 11(2): 97-99, 103]

[收稿日期] 2011-04-02

[基金项目] 黑龙江省卫生厅科研课题(2009-484)

[作者简介] 李俐(1970-), 女(汉族), 黑龙江省哈尔滨市人, 副主任技师, 主要从事消毒及医院感染控制研究。

[通讯作者] 林玲 E-mail: hljcdclili@126.com

随着抗菌药物的广泛应用,细菌耐药问题及耐药菌株引起的感染日益严重,凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase negative *Staphylococcus*, CNS)引起的医院感染逐年增加<sup>[1]</sup>。我们对 2008—2009 年 88 所医院物体表面及医护人员手的手部带菌状况及耐药性进行研究,为医院环境卫生质量控制和合理使用抗菌药物提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 本组试验菌株分离自 2008—2009 年 88 所医疗机构环境物体表面(医院口腔科治疗台灯把手、儿科门把手、透析机控制面板、ICU 呼吸机控制面板)及医护人员手采集标本,共 841 份。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和 ATCC 43300,由中国菌种保藏中心提供。

1.1.2 试剂与仪器 DNA 引物由上海生工生物工程(上海)有限公司合成,试剂盒购自 TaKaRa 公司宝生物工程(大连)有限公司;聚合酶链反应(PCR)仪 Labcycler、凝胶成像仪 Gel DocXR(BIO-Rad)、电泳系统 JUNI JY600c、细菌生化鉴定仪 Walk-aWay-40s1 及微量生化管购自杭州天和生物有限公司;药敏纸片(19 种):阿莫西林/克拉维酸(AMC)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、苯唑西林(OXA)、呋喃妥因(NIT)、红霉素(ERY)、环丙沙星(CIP)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、克林霉素(CLI)、奎奴普汀/达福普汀(Q-D)、利福平(RIF)、利奈唑胺(LNZ)、氯霉素(CHL)、青霉素(PEN)、庆大霉素(GEN)、四环素(TET)、头孢唑林(CFZ)、万古霉素(VAN)、亚胺培南(IPM)、左氧氟沙星(LVX),为英国 Oxoid 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株的分离鉴定 对采集的标本进行接种分离培养,将分离菌用细菌生化鉴定仪 Walk-aWay-40s1 作菌株鉴定;少数不能鉴定的菌株,采用微量生化管法进行鉴定。

#### 1.2.2 耐药基因检测

1.2.2.1 DNA 模板液制备 用无菌移液 tip 头挑

取平板上数个新鲜菌落,置入 200  $\mu$ L 灭菌纯水离心管中,充分混匀制成菌悬液,然后将盛装此混合物的离心管置 100℃煮沸 10 min 后,在冰上短暂冷却,13 000 r/min 离心 10 min,上清液即为模板液。

1.2.2.2 基因引物序列 *mecA* P1:5'-GAAAT-GACTGAACGTC CG-3'; P2:5'-ACTTAGTTCTTT AGCGAT-3';扩增产物为 393 bp<sup>[2]</sup>。

1.2.2.3 PCR 热循环参数 *mecA* 反应条件:94℃预变性 10 min;94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。反应结束后,将 PCR 扩增产物置 4℃保存。

1.2.2.4 PCR 反应结果检测 将 PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后于紫外凝胶电泳成像仪下观察结果,出现与阳性对照分子相当的条带为阳性,摄像保存。

1.2.3 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法进行药敏试验,测定具有 *mecA* 基因的葡萄球菌属对 19 种抗菌药物的敏感性。试验方法和结果判定按照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)《抗菌药物敏感性试验执行标准》(2009 年)执行<sup>[3]</sup>。

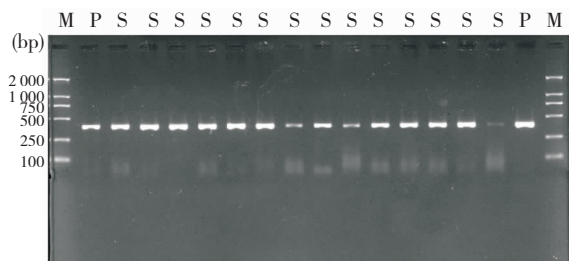
## 2 结果

2.1 CNS 检出情况 采集物体表面标本 478 份,医护人员手标本 363 份,共培养分离 CNS 63 株,检出率为 7.49%;其中 15 株 CNS 分离自物体表面,38 株分离自护士手,10 株分离自医生手。

2.2 耐药基因 *mecA* 检测结果 63 株 CNS 中有 24 株携带耐药基因 *mecA*,为耐甲氧西林 CNS(MRCNS),检测阳性率为 38.09%。PCR 检测结果见图 1~2。

2.3 携带耐药基因病原菌的临床分布 24 株 MRCNS 分别为:表皮葡萄球菌 12 株,溶血葡萄球菌 6 株,瓦氏葡萄球菌 5 株,头状葡萄球菌头状亚种 1 株;其在临床科室的分布见表 1。

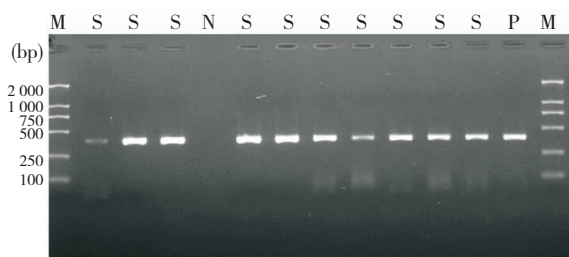
2.4 MRCNS 药敏试验结果 MRCNS 对抗菌药物的药敏试验结果见表 2。



M: DNA relative molecular weight standard; P: Positive control; S: Positive samples (representing isolate 32, 54, 109, 201, 217, 291, 384, 432, 454, mt7, mt32, mt42, mt6, mt59, respectively)

图 1 14 株 CNS 耐药基因 *mecA* PCR 电泳图

Figure 1 PCR electrophoresis map of drug-resistant gene *mecA* in 14 CNS isolates



M: DNA relative molecular weight standard; P: Positive control; N: Negative control; S: Positive samples (representing isolate lt19, lt35, lt54, lt34, t48, t58, 126, 138, 394, DQ133, respectively)

图 2 10 株 CNS 耐药基因 *mecA* PCR 电泳图

Figure 2 PCR electrophoresis map of drug-resistant gene *mecA* in 10 CNS isolates

表 1 24 株携带 *mecA* 的 CNS 在各临床科室分布 (株)

Table 1 Department distribution of 24 CNS isolates with *mecA* gene (isolates)

Department	No. of isolates from object surface	No. of isolates from nurses' hands	No. of isolates from doctors' hands	Rate (%)
Stomatological department	2	—	1	12.50
Pediatrics department	2	—	—	8.34
Hemodialysis center	1	6	—	29.16
Delivery room of obstetrical department	—	5	—	20.83
Treatment room	—	2	—	8.34
Intensive care unit	1	2	2	20.83

表 2 24 株 MRCNS 对 19 种抗菌药物的耐药率

Table 2 Drug-resistant rates of 24 MRCNS isolates to 19 kinds of antimicrobial agents

Antimicrobial agent	No. of drug-resistant isolates	Resistant rate (%)
AMC	21	87.50
SAM	24	100.00
OXA	24	100.00
NIT	0	0.00
ERY	23	95.83
CIP	8	33.33
SXT	5	20.83
CLI	6	25.00
Q-D	0	0.00
RIF	3	12.50
LNZ	0	0.00
CHL	6	25.00
PEN	24	100.00
GEN	11	45.83
TET	9	37.50
CFZ	21	87.50
VAN	0	0.00
IPM	21	87.50
LVX	5	20.83

### 3 讨论

随着介入性诊疗手段、抗菌药物、免疫抑制剂的广泛使用及某些慢性疾病,导致患者免疫力低下,使 CNS 感染成为医院感染的重要致病菌<sup>[4]</sup>。本研究自物体表面及医护人员手采集的 841 份标本中分离出 63 株 CNS,检出率为 7.49%。检出的 63 株 CNS 中,24 株携带 *mecA* 基因,为 MRCNS;24 株 MRCNS 分别为表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、瓦氏葡萄球菌、头状葡萄球菌头状亚种,药敏试验结果表明,除 VAN、LNZ、Q-D、NIT 外,对其他抗菌药物都存在不同程度耐药,其中最显著的是 PEN、AMC、SAM、OXA、ERY、CFZ、IPM 抗生素,耐药率高达 87.50%~100.00%。CNS 已经成为难以控制的多重耐药感染菌株,MRCNS 的多重耐药性给临床治疗有关医院感染性疾病带来了挑战。

在医院感染患者的各种临床标本中分离出耐药性致病菌的报道<sup>[5]</sup>较多,已经对医疗机构环境、医务工作者及患者造成了严重的威胁。此次调查中,MRCNS 检出率就高达 38.09%,应引起临床的高度重视。

凝集,与诊断血清的交叉凝集或不发生凝集。本实验鉴定的大肠埃希菌可与沙门 O 抗血清发生凝集反应,提示该菌株的 O 抗原可能与沙门菌属高度近似。O 抗原的特异性和多样性由脂多糖中的寡糖单位侧链中单糖的种类、排列以及修饰情况决定<sup>[6]</sup>。Wang 等<sup>[7]</sup>研究表明,沙门菌 O<sub>6</sub> 与大肠埃希菌 O<sub>17</sub>、O<sub>44</sub>、O<sub>73</sub>、O<sub>77</sub>、O<sub>106</sub> 血清型具有极为近似的寡糖骨架(Backbone)结构。O 抗原的表达与加工本质上由一系列相关基因调控。有学者发现沙门菌属中 O<sub>58</sub> 型与大肠埃希菌 O<sub>123</sub> 型的 O 抗编码基因簇全序列具有极高的同源性<sup>[8]</sup>。上述研究结果证明,至少特定血清型的大肠埃希菌与沙门菌等肠道细菌具有相同的进化祖先。因此,基于表型鉴定的诊断方法存在固有的漏诊、错诊概率。

为提高诊断的准确性,本研究在表型鉴定的基础上,对待检菌的 16S rRNA 序列进行分析。16S rRNA 是细胞生物进化的标记分子,通过序列分析发现个别碱基的差异即可辨别大肠埃希、沙门菌属等肠杆菌成员。目前核酸扩增方法和序列测定已经非常普及,基因型的鉴定可为临床分离菌的鉴定提供有力的依据,同时血清学特异性的基于多重 PCR<sup>[9-10]</sup>、基因芯片或生物分子质谱检测方法的建立对于提高实验室与疾控体系的诊断能力,完善诊断技术储备都具有重要意义。

#### [参 考 文 献]

[1] Wang L, Wang Q, Reeves P R. The variation of O antigens in

gram-negative bacteria[J]. Subcell Biochem, 2010, 53: 123 - 152.

- [2] 何剑锋,叶金奶. 与福氏志贺氏菌有共同抗原的两株肠杆菌科细菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 1168, 1174.
- [3] 高雯洁,张建平,沈志英,等. 一株与福氏志贺菌 1a 交叉凝集的低活性大肠埃希菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 2115 - 2116.
- [4] 董路宁,党荣理,刘栓奎,等. 感染性腹泻细菌病原学监测结果分析[J]. 实用预防医学, 2010, 17(12): 2389 - 2390.
- [5] Jozefczuk S, Klie S, Catchpole G, et al. Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli* [J]. Mol Syst Biol, 2010, 6: 364 - 379.
- [6] Wang L, Wang Q, Reeves P R. The variation of O antigens in gram-negative bacteria[J]. Subcell Biochem, 2010, 53: 123 - 152.
- [7] Wang W, Perepelov A V, Feng L, et al. A group of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* O antigens sharing a common backbone structure[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 7): 2159 - 2167.
- [8] Liu B, Perepelov A V, Li D, et al. Structure of the O-antigen of *Salmonella* O66 and the genetic basis for similarity and differences between the closely related O-antigens of *Escherichia coli* O166 and *Salmonella* O66[J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 6): 1642 - 1649.
- [9] Clark C G, Kropinski A M, Parolis H, et al. *Escherichia coli* O123 O antigen genes and polysaccharide structure are conserved in some *Salmonella enterica* serogroups[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 7): 884 - 894.
- [10] DebRoy C, Roberts E, Davis M, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for detection of nonserotypable Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O147[J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(11): 1407 - 1414.

(上接第 99 页)

(致谢:对中国疾病预防控制中心传染病预防控制所新病原室的熊衍文博士及赵爱兰、白雪梅老师对本研究的大力支持表示感谢!)

#### [参 考 文 献]

- [1] 张建萍,朱婉,褚云卓,等. 连续 6 年凝固酶阴性葡萄球菌的耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(11): 1410 - 1414.
- [2] 黄革,周晓红,蒋文玲,等. 金黄色葡萄球菌苯唑西林及红霉素

耐药基因多重 PCR 快速检测[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(4): 533.

- [3] 孙长贵译. 抗菌药物敏感性试验执行标准(第十九版信息增刊)[S]. M100 - S19. 美国:美国临床实验室标准化研究所, 2009: 47 - 55.
- [4] 任南. 实用医院感染监测方法与技术[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2006: 306.
- [5] 韩佳音,卢次勇,林立丰. 医院感染病原菌分布及耐药性研究[J]. 中国消毒学杂志, 2008, 25(3): 249.