

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2016.05.002

· 论 著 ·

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

徐修礼, 周 珊, 白 露, 刘家云, 马越云, 郝晓柯

(第四军医大学西京医院全军临床检验医学研究所, 陕西 西安 710032)

[摘 要] **目的** 了解某院重症监护病房(ICU)金黄色葡萄球菌的耐药特点及分子流行病学特征。**方法** 收集 2014 年 1—12 月该院 ICU 分离的金黄色葡萄球菌, 进行细菌鉴定及药物敏感性试验, 采用金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (spa) 分型及多位点序列分型 (MLST) 方法进行分型。**结果** 160 株金黄色葡萄球菌中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 120 株 (占 75.00%)。MRSA 对红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率均 >80%; MSSA 对头孢唑林敏感, 对红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率分别为 62.50%、35.00%、10.00%。spa 分型和 MLST 结果显示, 120 株 MRSA 主要为 ST239-t030、ST239-t037、ST5-t2460 3 种型别, 其中 ST239-t030 (105 株, 87.50%) 为主要流行菌株, 8 个 ICU 均有检出; MSSA 存在较多型别, ST59-t437 仅在神经内科 (8 株) 和消化科 (2 株) 检出, ST6-t701、ST398-t3625、ST398-t1793 和 ST121-t2092 分别仅在神经内科 (7 株)、麻醉科 (5 株)、神经外科 (4 株) 和心外科 (4 株) 检出。**结论** 该院 ICU MRSA 分离率较高, 以 ST239-t030 克隆株为主, 存在医院内流行; 不同型别 MSSA 在各科室内存在流行趋势。

[关 键 词] 重症监护病房; 金黄色葡萄球菌; spa 分型; MLST; 流行病学; 抗性; 微生物; 耐药性

[中图分类号] R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)05-0294-05

Characteristics of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* isolated from patients in intensive care units

XU Xiu-li, ZHOU Shan, BAI Lu, LIU Jia-yun, MA Yue-yun, HAO Xiao-ke (Institute of Clinical Laboratory Medicine of People's Liberation Army, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To study the characteristics of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in the intensive care units (ICUs) of a hospital. **Methods** Clinical isolates of *S. aureus* collected from ICUs between January and December 2014 were identified and performed antimicrobial susceptibility testing, then typed by staphylococcal protein A (spa) typing and multilocus sequence typing (MLST) methods. **Results** Of 160 isolates of *S. aureus*, 120 (75.00%) were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Resistance rates of MRSA to erythromycin, clindamycin, and levofloxacin were all >80%; methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) were sensitive to cefazolin, resistance rates to erythromycin, clindamycin, and levofloxacin were 62.50%, 35.00%, and 10.00% respectively. spa typing and MLST results showed that the main types of 120 isolates of MRSA were ST239-t030, ST239-t037, and ST5-t2460, the major epidemic strains were ST239-t030 ($n = 105, 87.50\%$), and were isolated from 8 ICUs; MSSA had more types, ST59-t437 were detected only from department of neurology ($n = 8$) and department of digestive diseases ($n = 2$), ST6-t701, ST398-t3625, ST398-t1793, and ST121-t2092 were isolated from departments of neurology ($n = 7$), anesthesiology ($n = 5$), neurosurgery ($n = 4$), and cardiac surgery ($n = 4$) respectively. **Conclusion** Isolation rate of MRSA in ICUs in this hospital is high, ST239-t030 is the main type, which prevailed in hospital; different types of MSSA have epidemic trends in various departments.

[收稿日期] 2015-12-10

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目 (2014JM4188)

[作者简介] 徐修礼 (1962-), 男 (汉族), 吉林省桦甸市人, 副主任技师, 主要从事细菌耐药机制及医院感染分子流行病学研究。

[通信作者] 郝晓柯 E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

[Key words] intensive care unit; *Staphylococcus aureus*; staphylococcal protein A typing; spa typing; multilocus sequence typing; MLST; epidemiology; drug resistance, microbial; drug resistance

[Chin J Infect Control, 2016, 15(5): 294-298]

金黄色葡萄球菌是引起医院感染和社区感染的主要病原体,其感染的发病率和病死率均较高^[1]。金黄色葡萄球菌可以引起多种形式感染,如局部化脓性感染、肺炎、假膜性肠炎、心包炎等局部感染,也可引起血流感染、脓毒症等全身感染;特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),是世界范围内引起医院感染的重要病原菌^[2]。为了解某院重症监护病房(intensive care unit, ICU)分离的金黄色葡萄球菌分子流行病学特征,笔者收集 ICU 2014 年分离的金黄色葡萄球菌进行耐药性分析,并对其进行金黄色葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A, spa)分型,同时进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST),为医院控制金黄色葡萄球菌感染提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2014 年全年 ICU 临床分离的非重复金黄色葡萄球菌 160 株;标准质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923。培养基及药敏纸片购于英国 OXOID 公司,聚合酶链反应(PCR)试剂和溶葡萄球菌素购于上海生工生物工程有限公司, DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen Company,全自动细菌药敏鉴定分析仪 Phoenix-100、基因扩增仪和电泳仪等购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验和 MRSA 鉴定 分别采用 K-B 纸片法和头孢西丁纸片法,运用 Phoenix-100 和 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定分析仪进行检测和鉴定,按美国临床实验室标准化协会(CLSI)2014 年规定的标准判定耐药(R)、中介(I)和敏感(S)。

1.2.2 DNA 提取 依据 Qiagen Company DNA 提取试剂盒标准方法进行全基因组 DNA 提取,取 15~20 个菌株加入 200 μ L TE 和 4 μ L 溶葡萄球菌素,使菌落充分溶解;37 $^{\circ}$ C 100 r/min 温育 1 h, 56 $^{\circ}$ C 100 r/min 温育 30 min,将裂解完全的液体 180 μ L 转

移至 EP 管,加入 25 μ L 蛋白酶 K 和 200 μ L 的 Buffer AL,振荡混匀 5 s,再加入 200 μ L 无水乙醇振荡混匀 5 s,将溶液加入 DNeasy Mini Spin Column 中,8 000 r/min 旋转 1 min,静置后弃废液,用 Wash Buffer 1 和 Wash Buffer 2 冲洗,最后用 100 μ L Elution Buffer 以 8 000 r/min 旋转 1 min 将 DNA 洗脱。

1.2.3 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 Primer 6.0 软件设计上下游引物序列:正向引物:5'-TAA AGACGATCCTTCGGTGAGC-3',反向引物:5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'。以全基因组 DNA 为模板,在退火温度为 60 $^{\circ}$ C 的条件下进行 PCR 操作^[3]。PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行测序,测序后的结果在网站(<http://spa.ridom.de>)进行比对分型。

1.2.4 MLST 依据金黄色葡萄球菌 7 个管家基因(*gmk*、*glpF*、*aroE*、*tpi*、*yqil*、*arcC*、*pta*)对细菌进行分型。PCR 反应引物及反应体系参考文献[4], PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。测序结果在网站上(<http://www.mlst.net>)进行比对,确定 ST 型别。

1.3 数据分析 应用 WHONET 5.6 软件进行数据分析,同源性分析应用 MEGA 5.0 软件进行聚类分析并构建树状图。

2 结果

2.1 菌株来源及药敏结果 160 株金黄色葡萄球菌标本来源为痰 95 株,脓性分泌物 29 株,引流液 15 株,血 13 株,组织和尿各 3 株,脑脊液 2 株。其中 MRSA 120 株(75.00%),甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA) 40 株(25.00%)。MRSA 对红霉素、克林霉素、左氧氟沙星的耐药率均 >80%; MSSA 对头孢唑林敏感,对红霉素、克林霉素、左氧氟沙星耐药率分别为 62.50%、35.00%、10.00%。见表 1。

表 1 ICU 金黄色葡萄球菌对常用抗菌药物的耐药情况

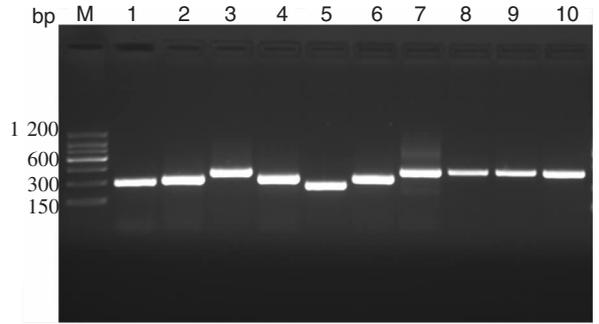
Table 1 Resistance of *S. aureus* to commonly used antimicrobial agents in ICUs

抗菌药物	MRSA (n = 120)		MSSA (n = 40)	
	耐药株数	耐药率(%)	耐药株数	耐药率(%)
头孢唑林	120	100.00	0	0.00
头孢西丁	120	100.00	0	0.00
替考拉宁	0	0.00	0	0.00
万古霉素	0	0.00	0	0.00
利奈唑胺	0	0.00	0	0.00
米诺环素	20	16.67	0	0.00
红霉素	111	92.50	25	62.50
克林霉素	96	80.00	14	35.00
替加环素	0	0.00	0	0.00
左氧氟沙星	109	90.83	4	10.00
呋喃妥因	5	4.17	0	0.00

2.2 spa 分型及 MLST 结果 spa 分型将金黄色葡萄球菌菌株分为 10 个型别,其中以 t030 为主(105 株, 65. 63%),其次为 t037(12 株, 7. 50%), t437(10 株, 6. 25%), t701(7 株, 4. 38%), t002(6 株, 3. 75%), t3625(5 株, 3. 12%), t2092、t091 和 t1793(均为 4 株, 7. 50%), t2460(3 株, 1. 87%)。PCR 产物分子量在 300 bp 左右,PCR 产物见图 1。对 7 个管家基因进行 PCR 扩增,PCR 产物分子量在 450~600 bp 之间。见图 2。MLST 共 7 种型别,分别为 ST239(117 株, 73. 13%), ST59(10 株, 6. 25%), ST5、ST398(均为 9 株, 11. 25%), ST6(7 株, 4. 38%), ST121、ST7(均为 4 株, 5. 00%)。对金黄色葡萄球菌分型结果显示,120 株 MRSA 主要为 ST239-t030、ST239-t037、ST5-t2460 3 种型别,以 ST239 为主,117 株(117/120, 97. 50%), ST239 为该院 MRSA 主要流行型别,特别是 ST239-t030(105/120, 87. 50%);而 MSSA 呈现多种分子型别,未发现主要型别。具体分型见表 2。

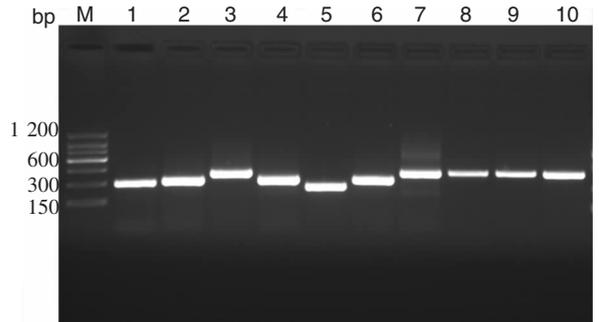
2.3 菌株同源性聚类分析及科室分布 采用 MEGA 软件进行亲缘关系分析,由树状图可知,MRSA 菌株 ST239-t030 和 ST239-t037 亲缘关系较近,而 MRSA 型别与 MSSA 型别之间亲缘关系较远,并且同一科室菌株之间亲缘关系未发现明显一致。ST239-t030 分布广泛,消化科、心外科、神经外科、神经内科、烧伤科、麻醉科、呼吸科和儿科 8 个 ICU 均有检出。ST239-t030 MRSA 菌株为该院主要流行菌株,且存在医院内流行。MSSA 不同型别分布科室间存在较大差异,如 ST59-t437 仅在神经内科(8 株)和消化科(2 株)检出;而菌株 ST6-t701、

ST398-t3625、ST398-t1793 和 ST121-t2092 分别仅在神经内科(7 株)、麻醉科(5 株)、神经外科(4 株)和心外科(4 株)检出。见图 3、表 3。



M: DNA 分子量 Marker; 1—10 泳道分别为 spa-t030、spa-t2092、spa-t1793、spa-t037、spa-t3625、spa-t437、spa-t091、spa-t00、spa-t2460、spa-t701

图 1 ICU 金黄色葡萄球菌不同 spa 型别 PCR 产物电泳图
Figure 1 Electrophoresis of PCR products of different *S. aureus* spa types in ICUs

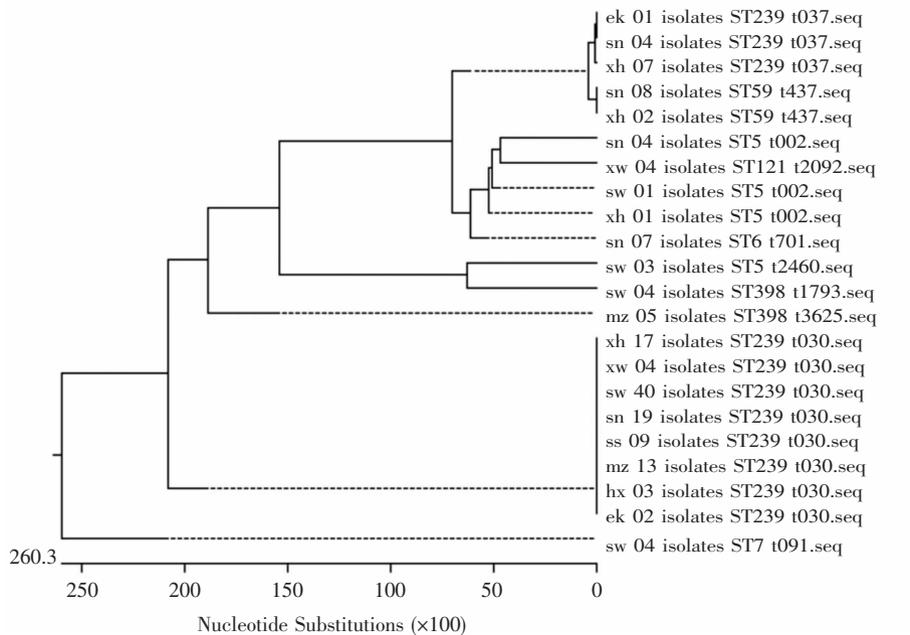


M: DNA 分子量 marker; 1—7 泳道分别为 gmK、glpF、aroE、tpi、yqil、arcC、pta 基因

图 2 ICU 金黄色葡萄球菌 MLST PCR 产物电泳图
Figure 2 Electrophoresis of PCR products of *S. aureus* MLST in ICUs

表 2 ICU 160 株金黄色葡萄球菌 spa 分型及 MLST 结果
Table 2 Typing of spa and MLST of 160 *S. aureus* isolates in ICUs

分型方法	MRSA	MSSA
spa	t030、t037、t2460	t437、t701、t3625、t2092、t1793、t091、t002
MLST	ST239、ST5	ST59、ST6、ST398、ST121、ST7、ST5
MLST-spa	ST239-t030、ST239-t037	ST59-t437、ST6-t701、ST398-t3625、ST398-t1793、ST121-t2092



xh:消化科,xw:心外科,sw:神经外科,sn:神经内科,ss:烧伤科,mz:麻醉科,hx:呼吸科,ek:儿科;
如 sw 04 isolates ST7 t091 表示,神经外科分离出 4 株型别为 ST7 t091 的金黄色葡萄球菌

图 3 ICU 160 株金黄色葡萄球菌亲缘关系树状图

Figure 3 Phylogenetic tree of 160 *S. aureus* isolates in ICUs

表 3 ICU 160 株金黄色葡萄球菌不同型别科室分布情况

Table 3 Distribution of different types of 160 *S. aureus* isolates in various ICUs

型别	神经外科 (n = 52)	神经内科 (n = 42)	消化科 (n = 27)	麻醉科 (n = 18)	烧伤科 (n = 9)	心外科 (n = 6)	呼吸科 (n = 3)	儿科 (n = 3)	
MRSA	ST239-t030	40	19	17	13	9	2	3	2
	ST239-t037	0	4	7	0	0	0	0	1
	ST5-t2460	3	0	0	0	0	0	0	0
MSSA	ST59-t437	0	8	2	0	0	0	0	0
	ST6-t701	0	7	0	0	0	0	0	0
	ST398-t3625	0	0	0	5	0	0	0	0
	ST398-t1793	4	0	0	0	0	0	0	0
	ST121-t2092	0	0	0	0	0	4	0	0
	ST7-t091	4	0	0	0	0	0	0	0
	ST5-t002	1	4	1	0	0	0	0	0

3 讨论

该院 ICU 2014 年 1—12 月共分离金黄色葡萄球菌 160 株,其中 MRSA 菌株 120 株(占 75.00%),MSSA 菌株 40 株(占 25.00%),可见 MRSA 的分离率远高于 MSSA,且高于全国统计数据^[5]。MRSA 对多种抗菌药物,如青霉素类、大环内酯类、林可霉素类和喹诺酮类等均有较高耐药率,给临床抗感染治疗带来较大困难。目前,该院分离菌株尚未发现对万古霉素、利奈唑胺和替加环素耐药或中介的金黄色葡萄球菌。但近年来,已有报道对利奈唑

胺耐药及万古霉素中介的葡萄球菌属细菌,应引起临床科室的高度重视;替加环素是新上市的抗菌药物,目前仍未有耐药或中介的葡萄球菌属细菌报道,对其感染具有较为理想的抗菌活性。

ICU 中若发现 MRSA 感染,需要及时给予有效的抗感染治疗^[6],从而可以较快地控制病情发展,降低病死率。因此,明确不同医院及病区金黄色葡萄球菌分子型别,可以为临床医生给予有效、及时治疗提供可靠的流行病学依据^[7]。spa 分型是基于 spa 基因 x 区多态性建立的分型方法,MLST 是基于 7 对管家基因序列测定分析而建立的分型技术。本研究联合 spa 分型与 MLST 方法对 160 株金黄色

葡萄球菌进行分子分型,以增加菌株型别鉴定的准确性,同时便于国际间比对^[4]。试验结果显示,该院 MRSA 以 ST239-t030 为主,所有 ICU 均有检出,是主要克隆株;该型别菌株 MLST 的等位基因(*arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi*、*yqil*)序列号为:2-3-1-1-4-4-3, *spa* 重复序列编号为:15-12-16-02-24-24。ST239-t030 菌株主要在亚洲等地检出,我国上海、浙江等地区也有报道,且该克隆株为多重耐药菌株^[8-9]。因此,ST239-t030 菌株的医院流行、播散,应当引起医院感染管理部门和临床科室高度重视。MSSA 感染分布显示,不同病区间存在差异,如菌株 ST6-t701、ST398-t3625、ST398-t1793 和 ST121-t2092 分别仅在神经内科、麻醉科、神经外科和心外科检出,上述流行趋势表明,MSSA 菌株存在科室内传播,应当加强科室内部感染控制工作^[10]。

以上实验数据表明,该院金黄色葡萄球菌 ST239-t030 克隆株的感染存在医院内播散趋势,这可能与不同菌株的地域分布差异有关。MSSA 菌株在各科室内部分布也存在差异,可能与科室性质不同有一定关系。我们应该加强医院感染控制工作,采取有效措施,降低金黄色葡萄球菌医院内和科室内的播散。综上所述,联合两种分型结果及药敏数据分析,可以为医院控制金黄色葡萄球菌感染流行提供帮助。

[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.

- [2] 赵春江,王辉,刘颖梅,等. 北京四家医院社区获得性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染的流行病学调查[J]. 中华检验医学杂志, 2012,35(3): 237 - 242.
- [3] 邹自英,韩黎,熊杰,等. 金黄色葡萄球菌临床分离株 *spa* 分型和耐药特征研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(2): 142 - 145.
- [4] 徐修礼,王师,高佳节,等. 某院近 5 年痰标本分离病原菌及耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2015,14(2):89 - 93.
- [5] 贺文强,陈宏斌,赵春江,等. 2010—2011 年中国 10 个主要城市金黄色葡萄球菌分子流行病学研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(4):247 - 251.
- [6] 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.
- [7] 郭青青,陈惠清. 老年患者医院获得性金黄色葡萄球菌下呼吸道感染耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2014, 13(2): 115 - 116.
- [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: 153.
- [9] Li Y, Cao B, Zhang Y, et al. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* T0131, an ST239-MRSA-SCCmec type III clone isolated in China[J]. J Bacteriol, 2011, 193(13): 3411 - 3412.
- [10] 牛瑞兵,郭利平,王新刚,等. 医院获得性与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性差异[J]. 中国感染控制杂志, 2015,14(7): 476 - 478.

(本文编辑:左双燕)