

烧伤病房 MRSA 医院感染暴发的 PFGE 分型研究

孟玉芬¹ 韩 黎^{2*} 吴桂芝² 常 东³ 徐培君¹

(苏州大学医学院病原微生物学教研室 苏州 215123)¹

(解放军疾病预防控制中心医院感染监督中心 北京 100071)²

(解放军总医院 304 临床部临床检验科 北京 100853)³

摘要: 利用表型分型和基因分型的方法解析医院感染常见致病菌——耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 造成医院感染暴发的可能传播途径。本实验对某医院烧伤科、ICU、肿瘤科病房内从患者和环境分离的 19 株 MRSA, 进行了 16 种抗生素的耐药性实验和全基因组稀有位点限制性内切酶酶切脉冲凝胶电泳 (PFGE) 分析, 并聚类分析归纳了菌株之间的相关性。结果发现在 19 株 MRSA 中有 11 株属于同一个菌种 A 型, 在这些菌株中, 有 8 株属于相同的克隆亚型 A1 型, 分别来自烧伤科和 ICU 患者以及烧伤科医生、护士的手。4 株属于 B 型, 均分离自同一烧伤病房。这暗示该医院可能存在 MRSA (A 型) 院内感染的暴发, 并且存在 B 型流行的潜在危险。MRSA 很有可能通过医护人员的手及鼻腔等媒介在患者间传播。因此, 加强医护人员的感染控制观念, 利用灵敏、可靠且分辨率强的分型技术加强 MRSA 感染监控至关重要。

关键词: MRSA, 脉冲场凝胶电泳, 基因分型

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0065-05

PFGE Genotyping of MRSA Outbreak in a Burn Unit

MENG Yu-Fen¹ HAN Li^{2*} Wu Gui-Zhi² CHANG Dong³ XU Pei-Jun¹

(Institute of Pathogenic Microbiology, Medical School of University Suzhou, Suzhou 215007)¹

(Institute of Hospital Infection Control & Research, PLA General Hospital, Beijing 100853)²

(Dep. Clinical Laboratory, 304 Division, PLA General Hospital, Beijing 100853)³

Abstract: To explore the epidemiological character of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by the phenotyping and genotyping methods and to investigate the source, transmission, and the spread of nosocomial MRSA infection, consequently, reducing the nosocomial infection of MRSA. In this study, 19 MRSA strains were isolated from patients and environment in a hospital in two months. Patterns of resistance against 16 antimicrobial agents and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of these strains were analyzed to find the relationship among those isolates. Clustering analysis was made from the patterns. Some isolates with high homology was found in 19 MRSA, 11 of them belong to type A, and 8 of them belong to the same subtype A1. They were endemic in burn ward, oncological ward and ICU. In addition, 4 isolates were clustered into group B, all found in the same ward of burn unit. Thus, our results indicated a outbreak of MRSA (A type) in this hospital and the potential prevalence of MRSA (B type), which might be mediated by health care staff. It is essential to enhance the infection control implementation and to utilize the PFGE genotyping system for the real-time surveillance of MRSA.

key words: MRSA, Pulsed field gel electrophoresis, Genotype

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是

其他作者: 吴旭琴¹ 殷 伟²

* 通讯作者 Tel: 010-66933338, E-mail: hawklihan@yahoo.com

收稿日期: 2005-08-17, 修回日期: 2005-12-25

医源性感染中的重要致病菌之一。自 1961 年由英国 Jeven 首先报道以来, 世界各地相继发现, 特别是进入 20 世纪 80 年代以后, MRSA 感染呈现上升趋势, 甚至引起医院的暴发流行^[1]。2001 年我国报道引发医院感染的革兰氏阳性菌中 MRSA 占 57.8%。2004 年美国 CDC 统计 ICU 内 MRSA 感染在革兰氏阳性菌感染中占 52.3%^[2]。本文对某医院 2004 年 9~10 月内采集的 19 株 MRSA 进行抗生素药敏分析和 PFGE 基因多态性分析比较其同源性, 并结合病人住院情况, 解析 MRSA 可能的传染途径和传染源。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

2004 年 9~10 月自临床标本中分离的 19 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 其中 14 株分离自烧伤科, 4 株分离自 ICU, 1 株分离自肿瘤科。从标本分离部位看, 来自烧伤病人创面分泌物的有 8 株, 医护人员手有 4 株, 鼻腔有 4 株, 其它为 3 株。对照标准菌株为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC6538。

1.2 试剂及仪器

溶菌酶 (lysozyme)、溶葡萄球菌素 (lysostaphine) 由上海生工生物工程公司提供, 蛋白酶 K 和限制性核酸内切酶 *Sma*I 分别是 Merck 和纽英伦公司产品, 低熔点琼脂糖、电泳用琼脂糖为 sigma 公司产品。脉冲场电泳仪是 Bio-Rad 公司的 Gene^{path} system, 高速离心机为 TGL-16G 型, 紫外光栅分光光度计为 752 型, VITEK-AMS 自动微生物分析仪等。

1.3 抗生素敏感性实验

挑取一定量菌, 用 0.45% 的无菌生理盐水稀释。利用 VITEK-AMS 自动微生物分析仪的 GPI 卡, 完成阿莫西林/克拉维酸、阿莫西林/舒巴坦胺、 β -内酰胺酶、头孢唑林、环丙沙星、克林霉素、红霉素、庆大霉素、呋喃妥因、苯唑西林 MIC、青霉素、利福平、四环素、磺胺甲氧苄啶、万古霉素、左氧氟沙星等 16 种抗生素敏感性试验。

1.4 全基因组稀有位点限制性内切酶酶切脉冲凝胶电泳 (PFGE)

PFGE 分型参照 Lescat M 的方法^[3]。将分离得到的 MRSA 菌株接种于营养肉汤, 孵育 18~20h ($OD_{600} \approx 2 \sim 3$), 取定量菌悬液于 eppendorf 管中, 离心收集菌体并用 500 μ L TEN 缓冲液洗一次。加入 84 μ L EC 缓冲液, 6 μ L (100 μ g/mL) 的溶葡萄球菌素, 10 μ L (10mg/mL) 的溶菌酶, 50 $^{\circ}$ C 温浴中加入 100 μ L 用 EC 液溶解的 1.6% 低熔点琼脂糖, 室温静置形成凝胶块。胶块置入含 1mg/mL 溶菌酶, 1 μ g/mL 溶葡萄球菌素的 EC 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 过夜。加入 1 μ L FSP 溶液, 50 $^{\circ}$ C 静置过夜。用含 2mmol/L 的 PMSF 的 TE 缓冲液, 室温洗涤胶块 3 次, 置 TEN 透析液中。取胶条 2mm 进行酶切 (125 μ L 酶解缓冲液, *Sma*I 内切酶 25u, 25 $^{\circ}$ C、6h) 后上样电泳。Gene^{path} 脉冲场电泳系统, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE, 脉冲时间 5~45s, 时间 20h, 以 λ -ladder (Roche 公司) 作为分子量标准和条件控制。

1.5 数据处理

对各菌株的抗生素谱和 PFGE 条带数据组进行聚类相似性分析^[4]。抗生素谱相似性系数: $S = 1 - (2 \times W) / (A + B)$ (W : 两菌株具不同敏感性的抗生素种类数; $A + B$: 两菌株所测抗生素的种类数之和), 相似性系数 90% 以上可视为同一菌型; PFGE 图谱

分型标准为：酶切图谱相同的为同一型别，有 3 条及 3 条以下条带差异的为同一型别
的不同亚型，3 条以上差异者为不同型别。同一型别的各亚型间认为在基因上有相关性，
而不同型别的菌株认为在流行病学上无相关性^[4]。PFGE 图谱相似性系数： $S = 1 - (2 \times W) / (A + B)$ (W：两菌株差异条带数，A + B：两菌株条带数之和)。

2 结果

2.1 19 株 MRSA 的 PFGE 及相似性分析

经 *Sma*I 酶切的 MRSA 染色体 DNA 在脉冲场中电泳后，产生 10 ~ 20 条带，大小范
围约在 10 ~ 800kb 之间。根据 PFGE 图谱的分型标准，实验中 19 株 MRSA 的 PFGE 图
谱（见图 1）可分为 6 型（A ~ F）（见表 1）。其中，A 型又可分为 4 个亚型：A1
（S575、S588、S590、S592、E35、E78、E79、E82），A2（E98，与 A1 的 S 为
90.8%），A3（E64，与 A1 的 S 为 90%），A4（S574，与 A1 的 S 为 82.7%）；B 型分
为 2 个亚型，B1（S600、S555、E65，与 A1 的 S 为 72.7%），B2（S596，与 B1 的 S 为
82.6%）；C 型（S571，与 A1 的 S 为 26.1%）；D 型（E63，与 A1 的 S 为 19.3%）；E
型（S576，与 A1 的 S 为 47.8%）；F 型（E81 与 A1 的 S 为 30.4%）。

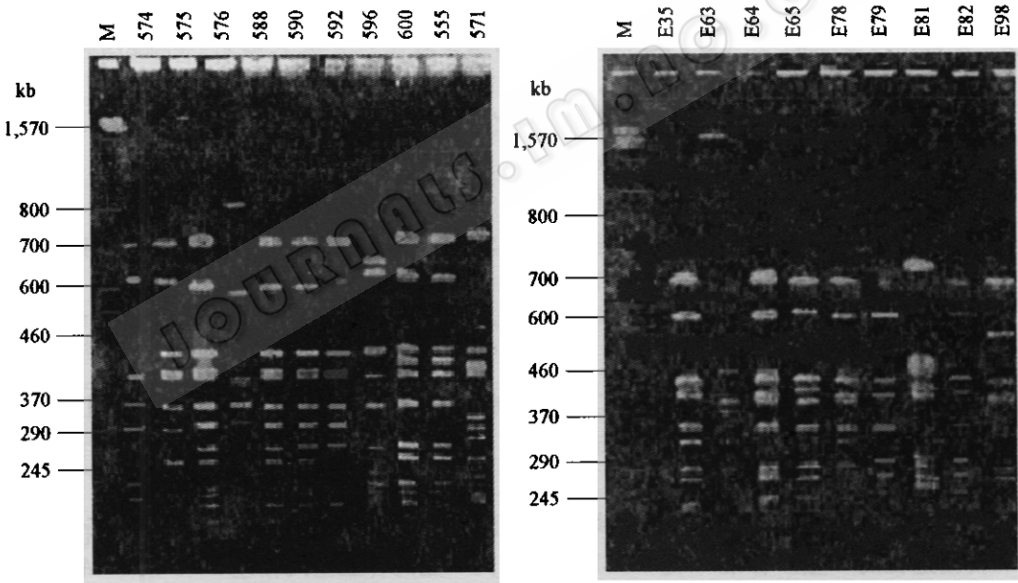


图 1 MRSA 的 PFGE 图谱

表 1 19 株 MRSA 的抗生素敏感性及 PFGE 分型

No. of Strains	Clinical dep. & wards	Isolation sites	Typing by antimicrobial susceptibility	Genotyping by PFGE
S555	Ward 2, burn unit	Wound	I	B1
S571	Ward 1, burn unit	Wound	II	C
S574	Ward 2, burn unit	Wound	III	A4
S575	Ward 1, burn unit	Wound	I	A1
S576	Ward 1, burn unit	Wound	II	E

续表 1

S588	Ward 1, burn unit	Wound	I	A1
S590	Tumor unit	Ventilation catheter	I	A1
S592	ICU	Wound	I	A1
S596	ICU	Intravenous catheter	II	B2
S600	Ward 2, burn unit	Wound	II	B1
E35	ICU	Nurse's nasal cavity1	II	A1
E63	Ward 2, burn unit	Nurse's nasal cavity2	IV	D
E64	Ward 1, burn unit	Nurse's nasal cavity3	I	A3
E65	Ward 2, burn unit	Nurse's nasal cavity4	I	B1
E78	Ward 1, burn unit	Doctor's hand 1	I	A1
E79	Ward 1, burn unit	Doctor's hand 2	I	A1
F81	Ward 2, burn unit	Nurse's hand 1	II	F
E82	ICU	Nurse's hand 2	I	A1
E98	Ward 1, burn unit	Nurse's pencil	II	A2

2.2 MRSA 菌株的药敏及 PFGE 分型结果

实验中 MRSA 菌株对大部分抗菌素, 如阿莫西林/克拉维酸、阿莫西林/舒巴坦胺、 β -内酰胺酶、头孢唑林、环内沙星、克林霉素、红霉素、庆大霉素、苯唑西林 MIC、青霉素、四环素、左氧氟沙星耐药, 仅对万古霉素、利福平、呋喃妥因、磺胺甲氧苄胺嘧啶等少数药物敏感。根据抗生素谱相似性系数将 19 株 MRSA 分为四种菌型 (I ~ IV), 其中 10 株菌属于 I 型, 7 株菌属于 II 型。I 型中, 从分离部位来看, S555、S575、S588、S590、和 S592 均是创口分泌物的分离株, E64、E65、E78、E79 和 E82 均是来自环境中的分离株, 从分离科室来看, S590 来自肿瘤科, S592 和 E82 来自 ICU, 其它均来自普通烧伤病房。II 型中只有 S596 和 E35 来自 ICU。

3 讨论

GM-PFGE (全基因组 DNA 稀有位点限制性内切酶酶切脉冲电场电泳) 是用稀有位点限制性内切酶对 MRSA 的染色体进行酶切, 产生 DNA 大片段在脉冲场中进行分离。这种分型方法不受质粒 DNA 影响, 从整体上反映不同菌株全部基因的相关性, 分辨力高, 重复性好, 是公认的对临床分离的同种菌种进行分子流行病学分析、追踪传染源和传播途径的“金”标准^[5,6]。PFGE 分型中同一型的各亚型间相差 1~3 条 DNA 片段, 理论上是由同一克隆株演变产生的, 基因的突变、插入、丢失和颠倒造成酶切位点消失或增加, 使限制性 DNA 片段的数目和大小发生变化^[7]。通过烧伤科病房、ICU 和肿瘤科患者分离株的 PFGE 分析, 我们发现 5 株属于 A 型菌株的不同克隆亚型, 其中 4 株是高度同源的 A1 亚型。感染 A 型菌株的患者分别来自烧伤病房 1 (S575、S588) 及同一楼层的相邻 ICU (S592) 及肿瘤科病房 (S590), 而且, 各菌株的检出分离时间上有一定连续性。这表明, 在此段时间内该医院的烧伤科及其相邻病房内可能存在 MRSA 暴发。那么, 环境中哪些因素引起了这种 MRSA 传播呢?

实际工作中, 在从患者身上检出 MRSA, 尤其是 ICU 及肿瘤科患者同时分离到 MRSA 后, 我们在相关病房环境及医护人员的手及鼻腔中分离得到 9 株 MRSA, 并进行了抗生素敏感性和 PFGE 分析。从菌株分离来源看, 在烧伤病房 1 主管医生的手上的 MR-

SA 分离株 E78、E79 与该病房内患者感染的 S575、S588 为高度同源的 A1 亚型, 在护士鼻腔中发现了 A3 (E64)、护士站记录笔上发现了 A2 (E98) 亚型。这暗示医生、护士在工作中介导了 MRSA 在病房内传播, 尤其是烧伤病房内医生的手可能是 MRSA 流行的重要传播中介^[8]。分析烧伤科与 ICU 病人 MRSA 感染的关系, 我们发现从 ICU 病房护士的手和鼻腔菌株分离的 E35、E82 均为烧伤科流行的 A1 亚型, 且检出时间要晚。在此期间, 没有患者从烧伤科病房 1 转入 ICU, 但曾有医护人员的科间会诊与查房, 因此可能存在烧伤科医护人员传至 ICU 患者的感染途径。另外, PFGE 图谱高度同源的 B 型菌, 全部集中在烧伤科病房 2 中, 说明这株菌造成的院内感染暴发可能还没有扩散。由此可见, 利用 PFGE 对 MRSA 的院内感染进行监控, 可较为准确地解析其传播途径, 从而有效抑制其感染暴发。另外, 来自烧伤患者的 S555、S575、S588 和病房医护人员手、护士鼻腔中分离的 MRSA 抗生素敏感性具有较高的相似性, 而肿瘤科及 ICU 患者导管及伤口检出的 S590、S592 菌株也与烧伤科病房中患者 MRSA 株的抗生素敏感性基本一致。因此, 菌株耐药性图谱可作为临床感染暴发调查中的传播途径分析的重要参考。

本研究通过对烧伤病房及其周围环境分离的 19 株 MRSA 的耐药性和 PFGE 图谱进行分析, 有力阐明了医护人员是造成 MRSA 医院感染的重要因素。医务人员在接触 MRSA 感染患者前后必须严格执行感染管理的相关规定, 彻底切断传播途径, 从而减少 MRSA 的医院感染。

参 考 文 献

[1] Zetola N, Francis J S, Nuernberger E L, *et al.* *Lancet Infect Dis*, 2005, 5: 275 ~ 286.

[2] *Am J. Infect Control*, 2004, 32: 470 ~ 485.

[3] Lescaï M, Dupeyron C, Faubert E, *et al.* *J Hosp Infect*, 2004, 57: 253 ~ 257.

[4] 韩 黎, 吴桂芝, 陈世平. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19: 338 ~ 341.

[5] Shopsis B, Kreiswirth B N. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7: 323 ~ 326.

[6] 王建春, 刘 静, 黄文红, 等. *微生物学通报*, 2005, 32 (2): 73 ~ 77.

[7] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R C, *et al.* *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 2233 ~ 2239.

[8] Merrer J, Pisica-Donose G, Leneveu M, *et al.* *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2004, 25: 515 ~ 517.