

烧伤病房耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 DNA 重复序列 PCR 研究

李洁 曾海涛 徐秀华

【摘要】 目的 研究烧伤病房耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*methicillin - resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) 的分布及传播,探讨烧伤病房医院感染的预防、监测及控制工作。**方法** 采集烧伤患者的创面、鼻前庭,工作人员手、鼻前庭,陪护家属的手、鼻前庭及烧伤科病房各种环境表面共 504 份标本,从中分离到 MRSA 58 株,对苯唑西林敏感的金黄色葡萄球菌 43 株,并对所分离的 MRSA 菌株的基因组 DNA 进行重复序列 PCR 检测。**结果** 53.7% (22/41) 的患者创面分离出 MRSA,其中 5 例鼻前庭分离出 MRSA;19 名工作人员中,3 人手分离出 MRSA,工作人员鼻前庭未分离到 MRSA;43 例患者陪护家属中有 9 人手分离出 MRSA,2 人鼻前庭分离出 MRSA;193 份环境标本共分离 MRSA 13 株。通过 MRSA 细菌基因组 DNA 重复序列 PCR 分析,发现部分患者创面之间及创面与工作人员、陪护和环境之间存在 MRSA 同源株。**结论** (1)MRSA 在烧伤科分布广,其中不乏同源株;(2)基因组 DNA 重复序列 PCR 分析,显示烧伤病室存在两例患者之间的交叉感染,MRSA 在烧伤病房的传染源为患者,传播途径与陪护及工作人员的手污染有关;(3)MRSA 的广泛存在,携带率高,手与环境的污染,是 MRSA 爆发感染的潜在危险。

【关键词】 基因组; DNA 重复序列 PCR; 分子流行病学; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 烧伤; 感染

A study of methicillin - resistant staphylococcus aureus (MRSA) in a burn unit with repetitive - DNA - sequence - based PCR fingerprinting LI Jie, ZENG Haitao, XU Xiuhua. Department of Hospital Infection Control, Xiang Ya Hospital, Hunan Medical University, Changsha 410008 Hu Nan Province, China

【Abstract】 Objective To investigate the distribution and spread of MRSA in a burn ward, so as to explore the measures of the prevention, surveillance and control of hospital infection in a burn ward.

Methods Five hundred and four specimens were isolated from the wounds and nasal vestibules of burn patients, the hands and nasal vestibules of medical staffs and lay attendants and the surfaces of various equipments. From these specimens, 58 strains of MRSA and 43 methicillin - sensitive staphylococcus aureus (MSSA) were isolated. The genome DNA of isolated MRSA strains was analyzed by repetitive DNA - sequence - based PCR analysis. **Results** MRSA strains were isolated from the burn wounds in 22 of 41 (53.7%) patients, and 5 from the nasal vestibules. Moreover, among 19 medical staffs, MRSA strains were isolated from the hands of 9 persons, but not from the nasal vestibules. From the hands in 9 of 43 lay attendants and the nasal vestibules in 2 MRSA strains were found. Thirteen MRSA strains were isolated from 193 specimens from the surrounding items. It was indicated by repetitive DNA - sequence - based PCR analysis of the genome DNA of isolated MRSA strains that there existed homologous strains around the patients' wounds, in the burn wounds, on the skin of medical staffs and lay attendants and also surrounding equipments. **Conclusion** (1) There was wide spread presence of MRSA homologous strains in the burn ward. (2) It was indicated by repetitive DNA - sequence - based PCR analysis of the genome DNA of isolated MRSA strains that there was cross infection among burn patients. The source of the infection of MRSA in burn ward was burn patients, and the route of the infection was hands of medical staffs and lay attendants. (3) MRSA is wide - spread. The contamination of the hands and the environment was potential risk factor of MRSA outbreak in the burn unit.

【Key words】 Genome; Repetitive - DNA - Sequence - Based PCR; Molecular Epidemiology; Methicillin - Resistant Staphylococcus Aureus; Burn; Infection

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (*methicillin - resistant Staphylococcus aureus* MRSA) 是医院感染的

重要病原菌之一,可引起多部位感染。MRSA 在世界各地流行情况不同。1990 年到 1991 年,丹麦和瑞典一些医院的分离率低于 5%,而西班牙则高于 30%,1992 年,美国国家医院感染监控系统显示 29% 金黄色葡萄球菌感染为 MRSA 感染,在美国,

作者单位:410008 长沙,湖南医科大学湘雅医院医院感染科 (李洁、徐秀华);湖南医科大学分子生物学研究中心(曾海涛)

各医院也有所不同,在同一所医院,MRSA 分布也有差异,烧伤科、ICU 病房及某些外科病房为 MRSA 暴发流行的高危区,为此采用 DNA 重复序列 PCR 方法对本院烧伤科进行流行病学调查,以达到促进烧伤科预防和控制 MRSA 感染的目的。

资料与方法

1. 菌株来源:金黄色葡萄球菌(包括 MRSA 及 MSSA)均来自 1999 年 3 月~1999 年 5 月本院烧伤科,标本来源于烧伤患者创面、鼻前庭、手及各种环境标本(包括床架、床旁桌、输液架、推车、门把手、一次性手套等)。

2. 试剂与设备:金黄色葡萄球菌分离鉴定培养基及用于鉴定 MRSA 的 MH 琼脂培养基均购自浙江军分区后勤部卫生防疫检疫所。引物序列为 5'-AAGTAAGTACTGGGCTGAGCG-3'^[1](上海生物工程公司),Taq DNA 聚合酶和 dNTPs(美国 Promega 公司),溶葡萄球菌素(美国 Sigma 公司)。752 紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂);Hema 480 基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司);紫外透射仪(美国 Fotodyne 公司);离心机(德国 Eppendorf 公司)。

3. MRSA 的鉴定:采用苯唑青霉素盐琼脂平板确定试验。^[2]

4. 基因组 DNA 重复序列 PCR(rep-PCR)检测:(1)MRSA 基因组 DNA 的制备按照 Van Belkum 方法制备^[1]。(2)重复序列 PCR(rep-PCR)PCR 反应体系的组成如下:取无菌蒸馏水 29 μl,10 × 反应缓冲液 5 μl,2 mmol/L 的 dNTPs 5 μl,10 pmol/μl 的引物 5 μl,1 ng/μl 的 MRSA 基因组 DNA 5 μl,0.2U/μl 的 Taq DNA 聚合酶 1 μl。混匀后加矿物油 30 μl,PCR 反应步骤:94℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min,64℃ 1 min,72℃ 2 min,40 个循环,循环完成后 72℃ 5 min。扩增反应完成后,取 10 μl 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5μg/ml 溴乙锭)中电泳,电压为 5V/cm,紫外透射仪上观察,一次性成像系统照像。

结果

1. MRSA 的分离:本调查共采集烧伤科各种标本 504 份,共分离出金黄色葡萄球菌 101 株,其中 MRSA 58 株,占金黄色葡萄球菌的 57.4%,MSSA 43 株,占金黄色葡萄球菌的 42.6%,MRSA 总分离率为 11.5%,烧伤创面 MRSA 的分离率达 43.3%,其次为陪护的手,占 14.5%,菌株分布见表 1。

表 1 烧伤科 MRSA 及 MSSA 菌株分布

Tab 1 Distribution of MRSA and MSSA Isolated from

	Burn Unit							合计
	患者		工作人员		陪护		环境	
	创面	鼻前庭	手	鼻前庭	手	鼻前庭		
标本总数	60	60	43	24	62	62	193	504
MRSA 总数	26	5	3	0	9	2	13	58
MSSA 总数	8	9	4	0	3	2	17	43
MRSA 的标本分离率(%)	43.3	8.3	7.0	0	14.5	3.2	6.7	11.5

2. 烧伤程度与 MRSA 的关系:本调查共采集 41 例烧伤患者创面,其中重度烧伤 11 例,中度烧伤 16 人,轻度烧伤 14 例,分离出 MRSA 的人数分别为重度 9 例(81.8%),中度 11 例(68.8%),轻度 2 例(14.3%)。

3. 基因组 DNA 重复序列 PCR 扩增产物电泳:分离的 58 株 MRSA 在本实验条件下,均有扩增产物,电泳图谱中,可见扩增产物的长度从 200~1500 bp 之间,可分辨区带的数目为 3~7 条,每株 MRSA 均有一条长度为 200bp 左右的区带,大多数区带的长度在 200~600 bp 之间。26 份患者创面分离的 MRSA,有 2 例患者创面所分离株 rep-PCR 扩增产物的电泳图谱相同,另 3 例患者不同时期 2 次分离的 MRSA 均分别有相同的 PCR 扩增产物,其余患者创面分离株 PCR 扩增产物均不相同(见图 1,2)。3 例患者创面分离的 MRSA 分别与各自的输液架、床

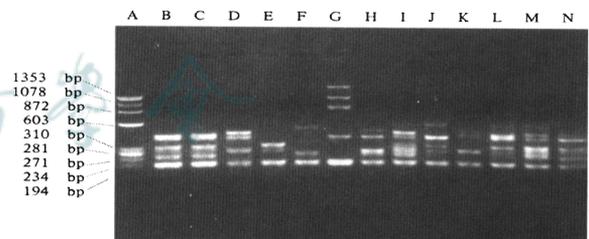


图 1 1-13 份患者创面 MRSA 的 rep-PCR 扩增产物电泳图谱 B、C 为 1、2 号患者创面 MRSA;D-N 为 3-13 号患者创面 MRSA;A 为 Marker

Fig 1 rep-PCR amplification of MRSA from burn area of patients

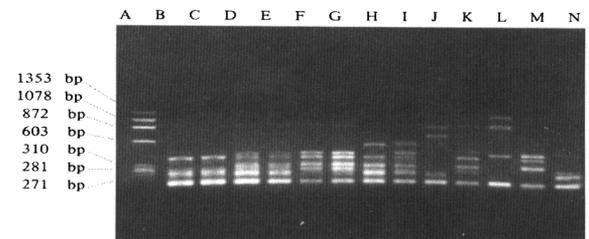


图 2 14-26 份患者创面 MRSA 的 rep-PCR 扩增产物电泳图谱 B、C 为 14 号患者不同时期分离的 MRSA;D、E 为 15 号患者不同时期分离的 MRSA;F、G 为 16 号患者不同时期分离的 MRSA;H、I 为 17 号患者不同时期分离的 MRSA;J-N 为其它患者分离的 MRSA;A 为 Marker

Fig 2 rep-PCR amplification of MRSA from burn area of patients

架、床旁桌分离的 MRSA 有相同的 rep - PCR 电泳图谱,1 例患者创面与工作人员手套、门把手具有相同的电泳图谱(图 3)。部分患者创面及部分患者陪护、工作人员手所分离的 MRSA 有相同的 rep - PCR 扩增产物电泳图谱(图 4)

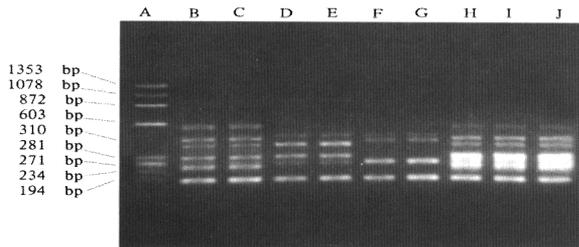


图 3 部分环境与创面 MRSA 的 rep - PCR 扩增产物电泳图谱 B、C 为 17 号患者创面(第二次分离)及输液架分离的 MRSA;D、E 为 19 号患者创面及床架分离的 MRSA;F、G 为 15 号患者创面及床旁桌分离的 MRSA;H、I、J 为 12 号患者创面、工作人员手套及门把手分离的 MRSA;A 为 Marker

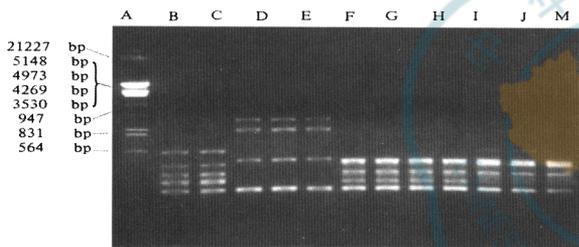


图 4 部分患者创面、鼻前庭及陪护、工作人员所分离的 MRSA 的 rep - PCR 扩增产物电泳图谱 B、C 为 17 号患者创面(第一次分离)、鼻前庭分离的 MRSA;D、E、F 为 20 号患者创面及其陪护的手、鼻前庭分离的 MRSA;G、H、I、J 为 1 号患者创面及其陪护的手、2 号患者创面及其陪护的手所分离的 MRSA;K、L、M 为 11 号患者创面及其床单、工作人员手所分离的 MRSA;A 为 Marker

讨 论

1. MRSA 在烧伤科的分布:本调查从烧伤患者及陪护、工作人员和环境均分离出 MRSA,创面的 MRSA 分离率明显高于其他来源的分离率($P < 0.05$),重症患者尤为突出,说明烧伤创面为 MRSA 的最大“贮菌池”。患者鼻腔中分离出的 MRSA 可能为入院时带入,更可能是在医院内通过交叉感染或自身细菌移位而获得;本院烧伤科医务人员鼻腔未检测出携带 MRSA,其原因可能为:(1)医务人员注意戴口罩;(2)工作人员可能存在短暂携带,由于调查时间所限暂未分离出;(3)近年来,手的采样显示少数卫生员及陪护手上存在 MRSA,说明存在手的污染,应对他们加强医院感染预防控制的教育,烧伤科环境物品也存在与烧伤患者创面的 MRSA 同源株,提示加强消毒隔离措施是切断感染传播途径

重要的环节。

2. MRSA 基因组 DNA 重复序列 PCR 分析:本研究选择细菌基因组 DNA 重复序列中高度保守的序列作为引物进行 rep - PCR 扩增,对所分离的 MRSA 进行分型。从分型中找到了烧伤科 MRSA 感染的传播途径可能为手,并查到一起患者之间的交叉感染。两名患者创面同期分离的 MRSA 菌株具有相同的 rep - PCR 扩增产物,说明两株菌为同源菌,可能与某一患者抗菌药物使用多,MRSA 易定植,并成为传染源,通过某一传播媒介传播给另 1 患者有关,事实上,两例患者陪护的手也分离出与创面 rep - PCR 扩增产物电泳图谱相同的 MRSA,说明 MRSA 的传播可经陪护的手直接或间接传播,所以,对于 MRSA 感染者,应接触隔离,并严格消毒措施。另 3 例患者的创面在不同时期分离的 MRSA 均分别具有相同的 rep - PCR 电泳图谱,揭示 MRSA 由于具有多重耐药性而不易消除,还有 1 例患者不同时期创面分离的 MRSA rep - PCR 电泳图谱不同,说明 MRSA 只为短暂携带,尚未定植,菌型易发生改变,本调查发现工作人员 MRSA 携带率不高,说明医务人员大部分能做到随时消毒和终末消毒,但也有少数卫生员和环境与患者创面存在同源株,说明仍存在感染爆发的危险,应加强消毒措施,并对 MRSA 患者进行隔离治疗。综上所述,在 MRSA 的流行病学调查中,rep - PCR 具有实用价值,便于制定 MRSA 感染的预防控制方案。

参 考 文 献

- 1 Van Belkum A, Bax R, Perrlooms P, et al. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin - resistant Staphylococcus aureus strains. J Clin Microbiol, 1993, 31: 798 - 803.
- 2 徐秀华, 易霞云, 吴安华, 主编. 临床医院感染学. 湖南: 湖南科技出版社, 1997. 424 - 425.
- 3 Tenover F, Arbeit R, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol, 1994, 32: 407 - 415.
- 4 Van Der A, Verbakel H, Van Zon J, et al. Molecular genotyping of Staphylococcus aureus: Comparison of repetitive element Sequence - based PCR with various epidemicity marker. J Clin Microbiol, 1999, 37: 342 - 349.
- 5 Lessing M. P. A, Jordens J. z, Bowler I. C. J, et al. Molecular epidemiology of a multiple strain outbreak of methicillin - resistant Staphylococcus aureus amongst patients and staff. J Hosp Infect, 1995, 31: 253 - 260.
- 6 Peivecchio V, Petroziello J, McCleskey F, et al. Molecular genotyping of methicillin - resistant Staphylococcus aureus in fluorophore - enhanced repetitive - Sequence PCR. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2141 - 2144.

(收稿日期: 2000 - 03 - 04)

(编辑: 赵云)