



医患鼻前庭携带耐甲氧西林金黄色葡萄球菌与医院感染菌同源性的研究

近年来,细菌耐药问题显得日益突出,给临床治疗感染性疾病尤其是医院感染带来了前所未有的困难。而医护人员的鼻前庭带菌,特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),被一些学者认为是造成医院感染流行的潜在危险因素之一。本调查研究我院金葡菌感染较多的某科医护人员和患者鼻前庭携带MRSA的情况,通过细菌培养、菌种鉴定及药物敏感试验,并借助随机引物扩增多态DNA(RAPD)检测方法,拟探讨医院医患鼻前庭带菌的相互关系和对发生与控制医院感染的影响,为预防医院感染发生提供必要的依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2005年5~7月本院某科室医务人员62人次和住院患者88人次的鼻前庭进行采样,用无菌生理盐水棉拭子采取医务人员和住院患者双侧鼻前庭标本。

1.2 菌株分离鉴定

按常规方法进行形态学初步鉴定为葡萄球菌属,然后做血浆凝固酶试验(试管法)及生化反应(葡萄糖发酵、甘露醇发酵等)鉴定,确定金黄色葡萄球菌。检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),采用苯唑西林、头孢西丁K-B纸片扩散法,根据NCCLS(2004年)标准进行试验。质控菌株为ATCC25923,结果判定标准:苯唑西林纸片扩散法抑菌圈直径 ≤ 10 mm为耐药,11~12 mm为中介, ≥ 13 mm为敏感;头孢西丁纸片扩散法抑菌圈直径 ≤ 19 mm为耐药, ≥ 20 mm为敏感。MRSA确认:金葡菌对苯唑西林、头孢西丁均耐药。

1.3 金葡菌药物敏感试验

K-B纸片扩散法,选用的抗菌药物为:苯唑西林、头孢西丁、新生霉素、多粘菌素B、氨苄西林、头孢唑林、头孢呋新、头孢噻肟、庆大霉素、阿米卡星、氯霉素、红霉素、克林霉素、万古霉素、复方新诺明,药敏纸片为英国Oxoid公司产品。

1.4 金葡菌的基因组提取和RAPD检测

1.4.1 基因组DNA提取 分别将分上述离出的鼻前庭携带的15株MRSA与其中患者痰标本中分离出的3株MRSA,分别挑单菌落于5 ml - LB中培养过夜,取1 ml过夜菌液,离心去上清。加10%SDS 62.5 μ l, 2 μ l 20 mg/ml蛋白酶k, 37 $^{\circ}$ C, 1 h。加酚、氯仿、异戊醇抽提,转移上清至干净EP管中。加1倍体积的冰异丙醇充分沉淀DNA。50 μ l 灭菌ddH₂O溶解DNA, 5 μ l 0.7%琼脂糖凝胶电泳。

1.4.2 PCR引物扩增 随机引物序列为:5-AGCGG GCCAA-3,由上海英骏生物技术有限公司合成。扩增体积为50 μ l,预变性94 $^{\circ}$ C 3 min,变性94 $^{\circ}$ C 1 min,退火38 $^{\circ}$ C 1 min,延伸72 $^{\circ}$ C 2 min,共45个循环。

1.4.3 RAPD聚类分析 将RAPD-DNA指纹图输入凝胶成像分析系统,经计算机处理,运用RAPD软件(Quantity one 4.4.0 Bio-Rad)进行分析。

2 结果

2.1 医患鼻前庭金葡菌的检出率

本次调查，分别于2005年5、6、7月，共采集某科医护人员鼻拭子标本62份，分离出MRSA 3株(同为一人携带)，检出率4.8%，住院患者鼻拭子标本88份，分离出MRSA 12株(分别由10人携带)，检出率13.6%。10名患者中的基础病为：重型颅脑损伤7人、脑肿瘤2人、脑出血1人，在鼻前庭携带MRSA的患者中有3人曾先后从痰标本(痰标本均用无菌管从人工气道吸取下呼吸道分泌物置灭菌容器内立即送检)中分离出MRSA，临床诊断为肺炎。

2.2 药敏试验结果

本组MRSA除了对万古霉素100%敏感，对氯霉素耐药率16.7%，复方新诺明耐药率83.3%以外。对上述其它抗生素耐药率均为100%。

2.3 RAPD-DNA电泳结果

18株MRSA(15株鼻前庭携带，3株痰标本中分离) RAPD-DNA电泳结果见图1。从电泳结果可见，18株金黄色葡萄球菌可扩增出3~10条带。

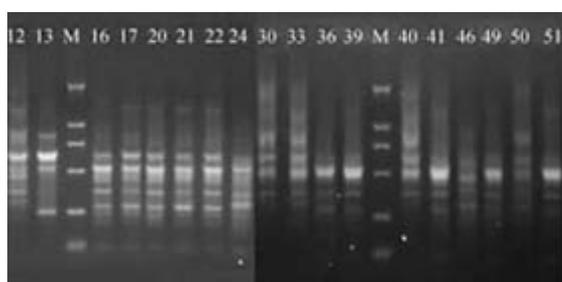


图1 18株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌RAPD-DNA图谱

Fig.1 Eighteen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains
The number on the top of each lane indicates the sample number. M: DNA marker

2.4 RAPD聚类分析

18株MRSA基因水平数值分类树状图谱见图2。同源性较高的分为5型 I、II、III、IV、V型。I型(菌株编号为：39、41、51、36)，II型(菌株编号为：40、33、30)，III型菌株编号为：22、20)，IV型(菌株编号为：13、12、46、21)，V型(菌株编号为：16、17、24)，其余两株(菌株编号为：49、50)同源性较低未分型。

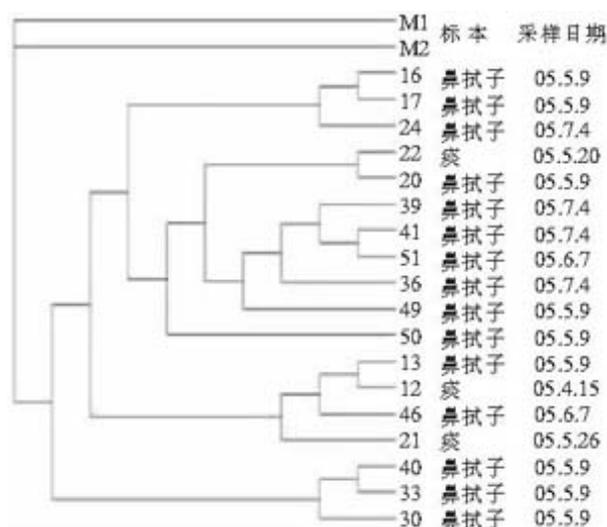


图2 18株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌同源性树状图

Fig.2 Demography showing the genetic relation of the 18 MRSA strains

3 讨论

从本研究RAPD分型结果显示,从树状图谱中可看出, 同源性较高的分为5型。I、II、III、IV、V型。

(1) I型4株, 其中两位患者分别携带2株, 这两位患者住在不同的病室, 医务人员携带的2株菌是由同一人不同时间(6、7月)两次采样分离检出的, 说明可能存在同一科室不同病房患者之间或是医患之间直接或间接的传播, 而引起定植。(2) II型3株, 是一名医务人员和两位患者鼻前庭所携带, 该型中医务人员携带的1株MRSA与I型中的2株同为一人所携带, 但同源性很低, 分析其原因不能排除MRSA发生了变异或有新基因型菌株的携带[1]。(3) III型2株菌的同源性很高, 是由一个患者的鼻前庭(5月9日鉴定)和痰标本(5月20日鉴定)分离出的, 此病人临床诊断有MRSA院内肺炎, 仅从时间上推断有可能或不能排除存在鼻前庭的细菌下行至肺部引起的感染。(4) IV型4株是由两位患者的鼻前庭和痰标本中分离出的, 一位患者分别于4月15日痰标本和5月9日鼻前庭分离出MRSA, 另一位患者分别于5月26日的痰标本中和6月7日的鼻前庭分离出MRSA, 存在着MRSA的肺部感染形成其鼻前庭携带的可能, 同时也存在两位患者之间的交叉感染。(5) I型3株菌中, 是两位患者的鼻前庭携带3株, 其中2株分别于5月和7月由一位患者的鼻前庭采样检出, 这两位患者住在同一个病室, 说明可能存在同一病室内的MRSA传播。总之, MRSA在医患鼻前庭能够较长时间的定植或携带, 存在病室内、病室间、医患之间的传播。

金黄色葡萄球菌是引起医院感染的重要病原菌, 特别是MRSA的感染是临床治疗的难题, 金葡菌医院感染源主要为感染的患者或携带者、污染的环境、污染的医疗器械和带菌的工作人员, 据报道, 金葡菌感染者或携带者, 易引起医院感染的爆发流行[2][3][4][5][6]。鼻前庭为葡萄球菌的主要储存所, 通过手将葡萄球菌带到人体其他部位引起感染已有报道[7], 医护人员鼻前庭金葡菌经手传给病人, 或再将病人身上的金葡菌经手寄居鼻腔, 形成细菌定植或交叉感染, 医务人员和病人鼻前庭金葡菌的定植, 有造成医院感染的潜在威胁。因此预防工作非常重要, (1) 定期检测医患鼻前庭金葡菌特别是MRSA的携带情况, 并对带菌医务人员和病人的鼻前庭进行清洁或局部使用百多邦软膏等方法减少带菌率。(2) 强调医护人员的洗手观念减少接触传播。(3) 对MRSA感染者进行床边隔离, 有条件的医院对感染的病人单独病房。(4) 合理应用广谱抗生素, 减少耐药菌株的产生。从而有效控制其医院感染的流行。

(责任编辑: 吴锦雅)

参考文献:

- [1] 苏关关, 俞云松, 林洁, 等. 19株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的同源性分析[J]. 中华流行病学杂志(Chin J Epidemiol), 2004, 25(12): 1084-5.
- [2] 舒雪琴, 方哗, 石娜, 等. 医院环境中葡萄球菌监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(7): 771-2.
- [3] 孙宏莉, 王辉, 陈民钧. 甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行病学调查[J]. 中华微生物学和免疫学杂志(Chin J Microbiol Immunol), 2005, 25(2): 137-141.
- [4] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 1549-1555.
- [5] Fey PD, Said-Salim B, Rupp ME, et al. Comparative molecular analysis of community or hospital-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus[J]. Antimicrobial Agents Chemother, 2003, 47(1): 196-203.

[6]侯晓娜, 丁雪松, 付炜昕, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的基因多态性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(10): 919-21.

[7]Hud IRB. The Efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of staphylococcal infections;a review of recent experience[J]. J Hosp Infect, 1994, (27): 81-98.

[回结果列表](#)