

一株游泳池水中沃氏葡萄球菌的分离鉴定与耐药性分析

颜 潘*, 祝司霞#

攀枝花学院基础医学院, 四川 攀枝花

收稿日期: 2022年5月27日; 录用日期: 2022年6月17日; 发布日期: 2022年6月30日

摘 要

目的: 了解游泳池水中可能存在的病原菌, 预防和控制游泳池相关疾病的传播流行。方法: 利用对葡萄球菌有选择性的7.5%氯化钠肉汤和Baird-Parker (BP)琼脂平板培养基分离游泳池水中的细菌, 初步鉴定采用革兰染色和血浆凝固酶实验, 进一步鉴定采用法国梅里埃公司的Vitek2 compact全自动微生物鉴定和药敏分析系统。结果: 该菌为血浆凝固酶阴性的葡萄球菌, 具有沃氏葡萄球菌的生化特征, 诱导性克林霉素耐药阳性, 显示对红霉素和克林霉素耐药, 头孢西丁筛选实验阴性, 对其它抗生素均敏感。结论: 在攀枝花市游泳池水中检测出一株沃氏葡萄球菌, 鉴于游泳池的水质状况关系到人类的身体健康, 应加强对游泳池水中致病菌及其耐药性的监测和研究。

关键词

水, 游泳池, 沃氏葡萄球菌, 耐药性

Isolation, Identification and Drug Resistance Analysis of a Strain of *Staphylococcus warneri* in Swimming Pool Water

Pan Yan*, Sixia Zhu#

School of Basic Medicine, Panzhihua University, Panzhihua Sichuan

Received: May 27th, 2022; accepted: Jun. 17th, 2022; published: Jun. 30th, 2022

Abstract

Objective: To understand the possible pathogenic bacteria in swimming pool water and to prevent

*第一作者。

#通讯作者。

and control the spread of swimming pool related diseases. **Methods:** The bacteria in the swimming pool were isolated by staphylococcal selective 7.5% sodium chloride broth and Baird-Parker (BP) plate culture medium. The bacteria were preliminarily identified by gram staining and plasma coagulase experiment, and further identified by Vitek2 compact automatic microorganism identification and drug sensitivity analysis system of French Merrier Company. **Results:** The bacteria was staphylococcus with negative plasma coagulase, which had the biochemical characteristics of *S. warneri* and positive induced clindamycin resistance, indicating resistance to erythromycin and clindamycin, and cefoxitin screening test was negative and sensitive to other antibiotics. **Conclusion:** A strain of *S. warneri* was detected in the swimming pool water of Panzhuhua city. In view of that the water quality of the swimming pool is related to human health, the monitoring and research on pathogenic bacteria and their resistance in the swimming pool water should be strengthened.

Keywords

Water, Swimming Pools, *Staphylococcus warneri*, Drug Resistance

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

游泳池是人们娱乐和健身的重要公共场所, 如果其水质卫生状况不良, 就可能引发多种传染病的传播流行[1]。韦永孜等[2]曾报道南宁市一起因污染的游泳池水引发儿童腺病毒呼吸道感染暴发流行; 徐亚萍等[3]报道宁波市一家小学游泳池引起多名小学生痢疾和急性结膜炎, 说明我国游泳池水的消毒方法不够成熟, 对某些病原菌杀灭不彻底, 相关部门监测力度不够。美、英等国外游泳池水质标准对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌等的检出都做了严格规定[4], 而我国游泳池卫生标准仅规定了细菌总数和大肠菌群两项微生物学指标。为了解攀枝花市游泳池水中葡萄球菌的污染状况, 本研究对该市几家游泳池水进行了抽样检测分析, 分离出一株沃氏葡萄球菌, 并对其进行了耐药性分析, 以便有效控制介水传染病。

2. 材料与方法

2.1. 调查和采集水样

首先于 2018 年 4 月下旬对攀枝花市几家游泳馆各项指标展开调查, 然后按照我国 GB/T 5750.2-2006 《生活饮用水标准检验方法——水样的采集与保存》[5], 并参照我国 GB/T 18204.6-2013 《公共场所卫生检验方法》[6]进行水样采集。将玻璃容器用自来水和洗涤剂洗涤, 并用自来水彻底冲洗后用质量分数为 10% 的盐酸溶液浸泡过夜, 然后依次用自来水, 蒸馏水洗净。采样瓶在灭菌前加入足量的质量分数 10% (m/m) 的硫代硫酸钠溶液, 125 ml 加入 0.1 ml, 高压蒸汽灭菌 15 min 备用。采用对角线布点法(图 1), 在距离泳池壁 1 m 远处, 水面下约 30 cm 处, 每池取 5 个点, 混合成一瓶, 共 500 ml, 裹好包装纸, 冰袋冷藏, 4 h 内送实验室检测(其中余氯、尿素、水温和 pH 值进行现场检测)。

2.2. 葡萄球菌分离培养

吸取 25 ml 水样至盛有 225 ml 7.5% 氯化钠肉汤(广东环凯微生物科技有限公司, H0056Y)的无菌锥形瓶中, 振荡混匀。将上述样品均液于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。将上述培养物, 采用平板划线法分别接种

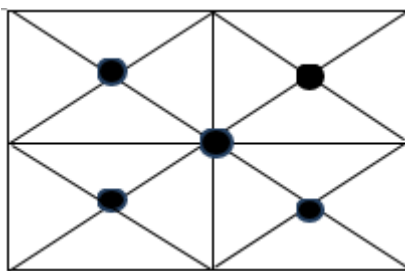


Figure 1. Diagonal distribution method
图 1. 对角线布点法

到 Baird-Parker (BP) 平板(广东环凯微生物科技有限公司, H0150Y)和血平板(广东环凯微生物科技有限公司, H0144Y), 血平板 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h, BP 平板 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h 或 45~48 h。观察菌落形态, 挑取疑似菌落革兰染色镜检, 并进一步用血平板分离纯化培养。

2.3. 血浆凝固酶试验

挑取 BP 平板或血平板上的纯培养菌落 1 个或 1 个以上, 分别接种到 5 ml BHI (脑心浸出液肉汤) (广东环凯微生物科技有限公司, 1068851), $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。取冻干兔血浆(广东环凯微生物科技有限公司, 6104262) 0.5 ml, 放入小试管中, 再加入 BHI 培养物 0.2~0.3 ml, 振荡摇匀, 置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 温箱内, 每半小时观察一次, 观察 6 h。如呈现凝固(即将试管倾斜或倒置时, 呈现凝块)或凝固体积大于原体积的一半, 被判定为阳性结果, 否则为阴性。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株(来自攀枝花学院附属医院)的肉汤培养物作为对照。

2.4. Vitek2 菌株生化鉴定与药敏试验

将上述初步鉴定的葡萄球菌的血平板纯培养物送攀枝花市中心医院, 采用 Vitek2 compact 全自动微生物鉴定和药敏分析系统(法国梅里埃公司, VK2C6661)进行菌株鉴定和药敏分析; 判定标准参照临床实验室标准化协会(CLSI) 2014 版标准。

2.5. 数据分析

用 WHONET 5.6 软件对 MIC 值药敏结果进行数据处理和分析。

3. 结果

3.1. 调查情况

对几家游泳馆分别进行管理状况调查、水质情况监测和采集水样, 其中一家游泳馆后来分离出沃氏葡萄球菌, 该游泳馆当时的调查结果(表 1)显示浸脚池余氯、尿素、水温不在正常范围, 强制淋浴执行力一般, 过滤系统清洁周期较长, 细菌总数和大肠菌群数均超标。

Table 1. Comprehensive survey of a swimming pool

表 1. 某游泳馆综合情况调查

一般情况		净化清洁情况		消毒情况		水质检测情况	
项目	结果	项目	结果	项目	结果	项目	结果
容量	800 m ³	净化系统	循环净化	加药	自动	泳池水余氯	0.5 mg/L
池水来源	自来水	池壁清洁周期	2 天	消毒剂	二氯异氰尿酸钠	浸脚池余氯	3.5 mg/L

Continued

补水周期	2~4 天	过滤清洁周期	半年	每天使用	2~3 kg	尿素	3.8 mg/L
		强制淋浴	一般			水温	27°C
						pH	7.2
						细菌总数	2000 个/ml
						大肠菌群数	23 个/L

注: 根据《游泳场所卫生标准》(GB9667-1996)的人工游泳池水质卫生标准值, 游泳池水余氯: 0.3~0.5 mg/L; 浸脚池水余氯: 5~10 mg/L, 4 h 换一次; 尿素: ≤ 3.5 mg/L; 池水温度: 22°C~26°C; pH 值: 6.8~8.5; 细菌总数: ≤ 1000 个/ml; 大肠菌群数 ≤ 18 个/L。

3.2. 菌株形态特征

在 BP 平板上, 菌落直径为 2~3 mm, 颜色呈灰色到黑色, 边缘为淡色, 周围为一混浊带, 在其外层有一透明圈。用接种针接触菌落有似奶油至树胶样的硬度(图 2)。BP 平板为葡萄球菌的选择培养基, 从上述生长现象, 初步判断细菌为葡萄球菌。后又经血平板培养和革兰氏染色后进一步鉴定为葡萄球菌。

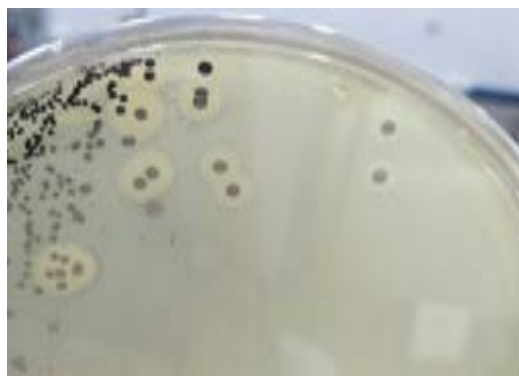


Figure 2. Growth of bacteria on BP plate
图 2. 细菌在 BP 平板上的生长现象

3.3. 血浆凝固酶试验结果

经过 6 h 的观察, 盛有血浆和葡萄球菌 BHI 培养物的试管未呈现凝固, 判定为凝固酶阴性葡萄球菌。

3.4. 生化鉴定

上述分离细菌生化编码为 010006002261231, 判定为沃氏葡萄球菌(可能性为 98%), 具体生化鉴定结果见表 2。

Table 2. Biochemical identification results of isolated strains

表 2. 分离菌株的生化鉴定结果

生化鉴定项目	结果	生化鉴定项目	结果
AMY 苦杏仁苷	-	POLYB 多粘菌素 B 耐受	-
PIPLC 磷脂酰磷脂酶 C	-	dGAL D-半乳糖	-
dXYL D-木糖	-	dRIB D-核糖	-
ADH1 精氨酸双水解酶 1	+	ILATk L-乳酸盐产碱	+

Continued

BGAL β -D-半乳糖苷酶	-	LAC 乳糖	-
AGLU α -葡萄糖苷酶	-	NAG N-乙酰-D-葡萄糖胺	-
APPA 丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶	-	dMAL D-麦芽糖	+
CDEX 环式糊精	-	BACI 杆菌肽耐受	-
AspA L-天冬氨酸芳胺酶	-	NOVO 新生霉素耐受	-
BGAR β -半乳糖吡喃糖苷酶	-	NC6.5 6.5%NaCl 生长	+
AMAN α -甘露糖苷酶	-	dMAN D-甘露醇	+
PHOS 磷酸酶	-	dMNE D-甘露糖	+
LeuA 亮氨酸芳胺酶	-	MBdG 甲基-B-D-葡萄糖吡喃苷	-
ProA L-脯氨酸芳胺酶	-	PUL 支链淀粉	-
BGURr β -葡萄糖苷酸酶	-	dRAF D-棉子糖	-
AGAL α -半乳糖苷酶	-	O129R O/129 耐受	+
PyrA 焦谷氨酸芳胺酶	+	SAL 水杨素	-
BGUR β -D-葡萄糖苷酸酶	+	SAC 蔗糖	+
ALaA 丙氨酸芳胺酶	-	dTRE D-海藻糖	+
TyrA 酪氨酸芳胺酶	-	ADH2s 精氨酸双水解酶 2	-
dSOR D-山梨醇	-	OPTO 奥普托欣耐受	+
URE 尿素酶	-		

3.5. 药敏试验结果

试验选取的 17 种抗菌药物分属 13 类：喹诺酮类 3 种，青霉素类 2 种，四环素类 2 种，磺胺类、链阳性菌素类、噁唑烷酮类、头孢菌素类、林可酰胺类、利福霉素类、呋喃类、多肽类、氨基糖苷类、大环内酯类各 1 种。沃氏葡萄球菌的药敏结果表明，沃氏葡萄球菌诱导性克林霉素耐药为阳性，对克林霉素、红霉素均耐药，但对其它类型的抗生素均敏感。头孢菌素类抗生素头孢西丁筛选结果为阴性，对甲氧西林敏感。具体药敏试验结果见表 3。

Table 3. Drug sensitivity test results

表 3. 药敏试验结果

药物	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	敏感度	药物	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	敏感度
青霉素 G	≤ 0.03	S	替加环素	≤ 0.12	S
复方新诺明	≤ 10	S	克林霉素	≤ 0.25	R
诱导性克林霉素耐药	Pos		利福平	≤ 0.5	S
喹努普汀/达福普汀	0.5	S	左氧氟沙星	≤ 0.12	S
四环素	≤ 1	S	呋喃妥因	≤ 16	S
利奈唑胺	2	S	苯唑西林	≤ 0.25	S
环丙沙星	≤ 0.5	S	万古霉素	1	S
莫西沙星	≤ 0.25	S	庆大霉素	≤ 0.5	S
头孢西丁筛选	Neg		红霉素	≥ 8	R

注：S，敏感；R，耐药。

4. 讨论

沃氏葡萄球菌是葡萄球菌属中的一员, 主要分布在环境及人与动物的皮肤粘膜上, 目前多认为其致病性较弱或仅为条件致病菌, 所以相关研究相对较少, 但近年来偶尔也会在患者、动物或环境标本中检测出来。如叶金奶等[7]在平阳县人工游泳池水中也曾检测出过沃氏葡萄球菌; 匡雪等[8]从外观健康猪的新鲜粪便中分离出一株沃氏葡萄球菌并对其耐药性进行了分析, 作者建议由于人与猪密切相关, 应加强猪源细菌的耐药性监测; 魏超[9]、马晓燕[10]、宛传丹[11]等分别从牦牛乳中、肿瘤患者中心静脉导管及前列腺炎患者中分离出沃氏葡萄球菌, 还有其它学者从骨髓、儿童菌血症的血液、女性乳腺炎患者的脓液、牙膏、患病的罗非鱼苗中分离出此菌[12] [13] [14]。以上资料均表明沃氏葡萄球菌仍与某些疾病相关, 虽然其健康风险相对较低, 但也不应该被完全忽视。

本试验采用葡萄球菌的 BP 选择性培养基从攀枝花市某游泳池水中分离到一株沃氏葡萄球菌, 而且细菌总数和大肠菌群数均超标, 现结合前面的调查结果分析其原因及引起感染的可能性。首先, 池水余氯合格, 但细菌总数和大肠菌群数不合格, 可能由于投加的消毒剂时间太短, 消毒时间不够; 也可能是氯胺类消毒剂二氯异氰尿酸钠, 在产生次氯酸发挥消毒作用的同时又产生了氰尿酸, 形成了氯锁现象[15], 此时即使有很高浓度的氯, 也不能发挥其消毒作用, 导致细菌数量在水中超标。其次, 浸脚池余氯含量低于标准范围, 可能是游泳池管理员未按规定及时给浸脚池补药或换水, 余氯低起不到应有的杀菌效果, 或者游泳馆淋浴管理不严格, 游泳者进入泳池前没有进行淋浴, 都有机会将细菌带入泳池。再次, 游泳池水温偏高, 可能是游泳馆为了招揽生意, 迎合客人的舒适感受有关, 但过高的池水温度会造成水中游离性余氯挥发加快, 难以有效杀死各种微生物。最后, 尿素超标, 游泳池水中尿素主要来自人体的汗液、尿液等分泌物和排泄物, 超标原因可能是游泳者没有进行淋浴直接进入游泳池; 儿童自控能力较差, 不自觉在水中排尿; 也可能因为我们调查的时间是 4 月下旬, 气温不高, 游泳的人不是很多, 商家为了节约成本, 过滤系统清洁周期过长, 使水中尿素蓄积, 池水受到污染。过高的尿素中的氨会与含氯消毒剂形成氯胺类物质, 刺激皮肤、眼角膜、腐蚀头皮等, 或者游泳者本身就存在轻微伤口, 如果此时水体中有细菌, 人体就会增加感染的可能性。

试验分离的沃氏葡萄球菌为凝固酶阴性(Coagulase-negative Staphylococcus, CNS)的葡萄球菌, 有报道目前临床分离的凝固酶阴性的葡萄球菌耐药性日益严重[16] [17] [18], 本实验药敏结果显示, 沃氏葡萄球菌对甲氧西林敏感, 对克林霉素和红霉素耐药, 但对其它类型的抗生素均敏感。由于耐药基因可以在细菌之间传递, 沃氏葡萄球菌作为耐药基因库, 也有可能将耐药基因传递给其它细菌, 加重临床治疗的难度, 因此, 有必要对外环境中分离的菌株进行耐药性监测, 以判断耐药菌的分布情况, 遏制和降低细菌耐药现象的产生和扩散。

与国外游泳池水质卫生标准对比[4], 我国的游泳池水质标准微生物学指标较单一, 仅规定了细菌总数和大肠菌群两项, 这不能很好地反映池水受污染的情况, 建议我国游泳池卫生标准再次修订时, 应进一步加强微生物检测指标及标准限值的制定。如将对消毒剂有较强耐受性的葡萄球菌作为池水污染状况监测的基本指标; 相关部门应该加大监测力度, 督促游泳馆合理有效使用消毒剂, 定期进行池壁的清洗和换水, 加强对浸脚池余氯检测和泡脚的监督, 强制淋浴的执行; 设置水温自动控制系统; 在游泳池水质检测时, 监测氰尿酸等的量, 发现超标及时采取相应措施; 对那些不合格的游泳馆应加大惩罚力度, 监督其改善池水的质量, 保障游泳者的身体健康。

基金项目

攀枝花学院大学生创新创业训练计划项目, 编号: 2016cxcy182。

参考文献

- [1] 张蕊, 甄国新, 刘晓涛, 等. 去极化氧化还原电位与游泳池水卫生指标关系研究[J]. 首都公共卫生, 2019, 13(5): 270-272.
- [2] 韦永孜, 陈茂伟, 徐贤丽, 等. 一起游泳相关人腺病毒呼吸道感染的流行病学及临床特征分析[J]. 中国医学创新, 2020, 17(24): 153-157.
- [3] 徐亚萍, 冯丹青, 韩永华. 宁波市区 26 家游泳池水质卫生检测分析[J]. 现代预防医学, 2005, 32(1): 46.
- [4] 徐瑛, 侯常春. 国外游泳池水质卫生标准简介[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(3): 185-186.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T5750.2-2006 生活饮用水标准检验方法——水样的采集与保存[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T18204.6-2013 公共场所卫生检验方法第 6 部分: 卫生监测技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [7] 叶金奶, 杨学斌, 何剑锋, 等. 平阳县人工游泳池水中致病菌污染调查[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(6): 535-537.
- [8] 匡雪, 杨国淋, 陈培富, 等. 一株猪源沃氏葡萄球菌的分离鉴定及耐药特性分析[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(2): 201-204.
- [9] 魏超, 毛建霏, 代晓航, 等. 牦牛乳中沃氏葡萄球菌的分离鉴定与耐药性分析[J]. 乳业科学与技术, 2017, 40(4): 11-14.
- [10] 马晓燕, 高玉芳, 魏丽丽, 等. 肿瘤患者 PICC 导管相关性感染影响因素调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(11): 2290-2092.
- [11] 宛传丹, 周金保, 宋逸萍, 等. 前列腺炎病原体流行病学与耐药趋势分析[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(10): 912-917.
- [12] 袁汶. 骨髓中分离出沃氏葡萄球菌 1 列[J]. 中国保健营养, 2012, 22(16): 3542.
- [13] 许建成, 周琪, 黄晶, 等. 凝固酶阴性葡萄球菌致儿童菌血症的菌种分布及耐药性监测[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(6): 534-537.
- [14] 仲康, 王亚男, 乔悦, 等. 女性乳腺炎患者脓液细菌培养及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(21): 2713-2714.
- [15] 梁晓军, 张建新. 我国游泳池水质卫生标准现状及存在问题探讨[J]. 江苏预防医学, 2014, 25(3): 81-82.
- [16] 周小梅, 游明园, 廖小平, 等. 292 株凝固酶阴性葡萄球菌的临床分布及耐药性[J]. 中国消毒学杂志, 2016, 33(3): 255-257.
- [17] 方小敏, 李小冰, 郭兆旺. 2014-2015 年我院凝固酶阴性葡萄球菌的分布及耐药性分析[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(10): 7-8.
- [18] 李磊, 王延梅. 血流感染凝固酶阴性葡萄球菌的耐药性及耐药基因检测[J/OL]. 检验医学与临床: 1-7. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20220602.0906.002.html>, 2022-06-06.