

中国 15 个地区分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型研究

申恩华 王立红 王辉 孙宏莉 陈民钧 袁静 王彦宽

【摘要】 目的 研究中国 2006 年耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)流行株的来源和遗传背景。方法 收集 2006 年 1—12 月 15 个地区 17 家医院连续分离的非重复 MRSA 302 株,通过多重 PCR 对 MRSA 进行染色体 *mec* (SCC*mec*)分型,葡萄球菌 A 蛋白(Spa)分型和多位点序列分型(MLST)。结果 SCC*mec* 分型Ⅲ型为 76.8%,不能分型为 7.9%。从广州地区分离株中发现 2 株Ⅳ型,Ⅱ型为 14.6%;而大连地区分离株中Ⅱ型为 75.0%,与其他地区菌株分型的差异存在统计学意义($P < 0.005$)。MLST 共有 4 种分型,其中序列分型(ST)239(46.7%)、ST5(44.4%)、ST59(6.7%)、ST88(2.2%)。Spa 分型共有 14 种,其中 t30(52.6%)、t37(27.2%)、t2(12.9%)、t632(2.3%)、t437(1.3%)和 t570、t601(各 0.7%)及 t377、t459、t796、t899、t1152、t2649(各 0.3%),未分型占 0.3%。未检出 *pvl* 基因。结论 调查的 15 个地区 MRSA 主要克隆株为 ST239-MRSA-SCC*mec* Ⅲ-t30 和 ST5-MRSA-SCC*mec* Ⅱ-t2,具有独特的地理分布。

【关键词】 金黄色葡萄球菌,耐甲氧西林;多位点序列分型;葡萄球菌染色体 *mec* 分型;葡萄球菌 A 蛋白分型

Research on genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China SHEN En-hua¹, WANG Li-hong¹, WANG Hui², SUN Hong-li², CHEN Min-jun², YUAN Jing¹, WANG Yan-kuan¹. 1 Department of Infectious Diseases, the Fourth Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130011, China; 2 Department of Clinical Laboratory, PUMC Hospital, CAMS Beijing
Corresponding author: WANG Hui, Email: wh_bj@tom.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the source and genetic background of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the year of 2006, in China. **Methods** From January to December 2006, a total number of 302 consecutive and non-repetitive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* were collected from 17 Teaching hospitals in 15 areas. Genotypes of SCC*mec* were determined by multiplex PCR and multilocus sequence typing (MLST) was used to type the house-keeping genes. The implementation of the spa typing method was straightforward, and the results obtained were reproducible, unambiguous, and easily interpreted. **Results** All areas but Dalian harbored SCC*mec* Ⅲ while Dalian harbored SCC*mec* Ⅱ most. There were two strains in Guangzhou, harboring SCC*mec* Ⅳ. There were four strains of sequence type (ST), with ST239 accounted for 46.7% and ST5 accounted for 44.4%. ST59 accounted for 6.7% and ST88 accounted for 2.2%. There were fourteen strains of Spa typing, with t30 accounted for 52.6%; t37 accounted for 27.2%; t2 accounted for 12.9%; t632 accounted for 2.3%; t437 accounted for 1.3%; t570, t601 accounted for 0.7%; t377, t459, t796, t899, t1152, t2649 accounted for 0.3%; no-typing accounted for 0.3%, respectively. *pvl* gene was not detected. **Conclusion** The main clone strains were ST239-MRSA-SCC*mec* Ⅲ-t30, ST5-MRSA-SCC*mec* Ⅱ-t2, with unique geographic distributions across the whole nation.

【Key words】 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Multilocus sequence typing; Staphylococcal cassette chromosome *mec*; *Staphylococcus* protein A typing

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)已经成为世界

范围引起医院内感染首要的病原菌^[1-3]。目前 MRSA 耐药严重,通常对多种抗生素同时耐药,社区获得性 MRSA (community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA)不断出现并引起致死性疾病。近年来,在日本和美国等地,甚至出现对万古霉素中介(vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*)或耐药金黄色葡萄球菌

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.03.017

作者单位:130011 长春,吉林大学第四医院感染科(申恩华、王立红、袁静、王彦宽);中国医学科学院北京协和医院检验科(王辉、孙宏莉、陈民钧)

通信作者:王辉,Email: wh_bj@tom.com

(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), 同时 CA-MRSA 出现上升趋势, 严重威胁着人类的健康。鉴于上述情况, 为了解我国一些地区 MRSA 的分子特征及医院内感染的暴发, 我们对 15 个地区收集的 302 株 MRSA 进行多中心分子流行病学调查, 并进行葡萄球菌染色体 *mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*) 分型^[4]、葡萄球菌 A 蛋白 (Spa) 分型和多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 分型^[5]。

材料与方法

1. 材料:

(1) 菌株: 收集自 2006 年 1—12 月北京等 15 个地区 17 家医院临床分离的 MRSA 共 302 株, 所有菌株均为同一时间内连续分离的非重复株, 同一患者只取第一次分离菌株。标本类型包括无菌部位 (血、脑脊液、关节液、腹水、封闭的脓汁)、呼吸道分泌物 (深部痰、支气管灌洗液) 及尿液、伤口分泌物等。SCC*mec* 分型的阳性对照株均来自澳大利亚。

(2) 主要仪器和试剂: 包括 PTC-200 型 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)、BINTA 2020D 型紫外凝胶成像仪; Lysostaphin (SD9001) (TaKaRa, 日本)、rTaqDNA 聚合酶、MgCl₂ 及 dNTP (Promega, 美国、TaKaRa, 日本)。PCR 引物由上海生物工程有限公司和大连宝生物工程有限公司合成; Spa 及 MLST 产物测序由北京利嘉泰成公司完成。

2. 方法:

(1) 总 DNA 提取: 取血平板上分纯后新鲜过夜 6~8 个单个菌落, 混悬于 0.3 ml 含有 50 U/ml Lysostaphin 的 TE 中 (pH 值 8.0), 35 °C 水浴 30 min, 95 °C 煮沸 10 min, 15 000 r/min 离心 20 s 后取上清即为细菌总 DNA 溶液, 测 A 值检测 DNA 含量。

(2) SCC*mec* 分型: 反应体系为 25 μl, 根据参考文献^[5]加入不同量的引物。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 45 s, 65 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 10 次, 再次 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 25 次, 后 72 °C 延伸 10 min。

(3) Spa 分型: 反应体系为 50 μl。葡萄球菌 A 蛋白基因 X 区扩增引物 Spa-1113f: 5' -TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C-3', Spa-1514r: 5' -CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT-3' 参照参考文献^[6]。PCR 反应条件: 80 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 进行 35 次循环,

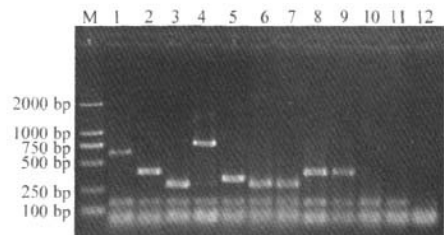
最后 72 °C 延伸 10 min。Spa 分型网 (<http://spa.ridom.de/spaserver>) 上目前已公布 329 种重复序列和 5710 个 Spa 型别。PCR 产物进行单向测序, 在测序结果中查找已公布的重复序列, 根据串联重复序列出现的次数和排列方式确定型别。

(4) MLST 分型: 反应体系为 50 μl。7 个管家基因 (*arcC*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *ycjI*) PCR 所用的引物参照参考文献^[5]。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次, 后 72 °C 延伸 5 min。片段大小 402~516 bp。PCR 产物纯化后进行双向测序, 结果通过 MLST 分型数据库 (<http://www.mlst.net>) 进行分型。

(5) PVL 基因检测: PVL-PCR 反应体系及扩增条件: 反应体系为 25 μl, 引物序列: pvl-U: 5' -ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A-3'; pvl-D: 5' -GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC-3', 片段长度 433 bp。PCR 扩增反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 °C 延伸 5 min。

结果

1. SCC*mec* 分型: SCC*mec* PCR 产物电泳结果见图 1, 15 个地区 17 家医院分离的 302 株 MRSA 的 SCC*mec* 分型见表 1。其中北京地区以 III 型为主 (94.9%), 其他地区与北京地区类似, 但大连地区则以 II 型为主。应用 SPSS 软件分析, 经 χ^2 检验, 大连与其他 14 个地区 SCC*mec* 分型的差异有统计学意义 ($P < 0.005$)。广州地区发现 2 株 IV 型, 但未发现 I 和 V 型。



注: M: DL2000 Marker; 1~5: 澳大利亚阳性对照株分别为 FH53 (I 型)、E822485 (II 型)、k711532 (III 型)、B8-10 (IV 型)、IMV5 67 (V 型); 6、7: 北京地区菌株中检测到的 II 型; 8、9: 北京地区菌株中检测到的 III 型; 10、11: 北京地区菌株中检测到未分型; 12: 空白对照株

图 1 SCC*mec* PCR 产物电泳图谱

2. Spa 分型: Spa PCR 产物电泳结果见表 2。302 株 MRSA 中 t30 为 159 株 (52.6%), t37 为 82 株

(27.2%), t2 为 39 株 (12.9%), t632 为 7 株 (2.3%), t437 为 4 株 (1.3%), t570、t601 均为 2 株 (各 0.7%), t377、t459、t796、t899、t1152、t2649 各 1 株 (2.0%); 未分型 1 株 (0.3%); 除上海、深圳、广西、新疆地区以 t37 为主外, 其他地区多以 t30 为主。

表 1 我国 15 个地区 17 家医院分离 MRSA 的 SCCmec 分型

地区/医院	MRSA 菌株数	SCCmec 分型			
		II 型(%)	III 型(%)	IV 型(%)	未分型(%)
北京医院(BJ)	9	0(0.0)	9(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
北京协和医院(BJ)	30	1(3.3)	28(93.3)	0(0.0)	1(3.3)
上海中山医院(SH)	23	8(34.8)	13(56.5)	0(0.0)	2(8.7)
上海瑞金医院(SH)	23	3(13.0)	16(56.5)	0(0.0)	4(17.7)
沈阳(SY)	26	9(34.6)	15(57.7)	0(0.0)	2(7.7)
大连(DL)	16	12(75.0)	4(25.0)	0(0.0)	0(0.0)
武汉(WH)	21	1(4.8)	19(90.5)	0(0.0)	1(4.8)
浙江(ZJ)	18	4(22.2)	12(66.6)	0(0.0)	2(11.1)
吉林(JL)	12	0(0.0)	11(91.7)	0(0.0)	1(8.3)
青岛(QD)	23	0(0.0)	23(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
南京(NJ)	12	1(8.3)	11(91.6)	0(0.0)	0(0.0)
广州(GZ)	36	3(8.3)	28(77.8)	2(5.6)	3(8.3)
陕西(SX)	12	0(0.0)	12(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
广西(GX)	4	0(0.0)	4(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
深圳(SZ)	10	0(0.0)	4(40.0)	0(0.0)	6(60.0)
新疆(XJ)	7	0(0.0)	6(85.7)	0(0.0)	1(14.3)
西安(XA)	20	2(10.0)	17(85.0)	0(0.0)	1(5.0)
合计	302	44(14.6)	232(76.8)	2(0.7)	24(7.9)

注: 括号外数据为菌株数, 括号内数据为构成比(%)

3. MLST: 根据药敏、SCCmec 和 Spa 分型结果, 选取 45 株 MRSA 进行 MLST 检测, 共有 4 种分型, ST239 为 21 株 (46.7%), ST5 为 20 株 (44.4%), ST59 为 3 株 (6.7%), ST88 为 1 株 (2.2%)。45 株 MRSA 的 SCCmec、Spa 和 MLST 分型结果见表 2。

表 2 我国 15 个地区 17 家医院 MRSA 的 Spa 及 MLST 分型结果

Spa 分型	城市分布	SCCmec 分型				MLST 管家基因序列 (arc-aro-glp-gmk-pta-tpi-yqi)	MLST-CC
		II	III	IV	未分型		
t002(39)	BJ(1), DL(12), GZ(3), ZJ(2), SH(11), SY(7), WH(1), XA(2)	39				1-4-1-4-12-1-10	ST5-CC5
t030(159)	BJ(31), JL(11), DL(3), GZ(17), ZJ(9), NJ(6), GX(1), QD(19), SH(6), SY(14), SZ(1), WH(19), XA(22)		155		4	2-3-1-1-4-4-3	ST239-CC8
t037(82)	BJ(2), GZ(11), ZJ(5), NJ(5), GX(3), QD(3), SH(29), SZ(9), XJ(6), WH(1), XA(8)			67	15	2-3-1-1-4-4-3	ST239-CC8
t377(1)	NJ(1)	1				2-3-1-1-4-4-3	ST239-CC8
t437(4)	GZ(3), XJ(1)		2	1	1	19-23-15-2-19-20-15	ST59-CC59
t459(1)	QD(1)		1			2-3-1-1-4-4-3	ST239-CC8
t570(2)	SY(2)	2				1-4-1-4-12-1-10	ST5-CC5
t601(2)	ZJ(2)	2				1-4-1-4-12-1-10	ST5-CC5
t632(7)	BJ(4), SY(3)		7			2-3-1-1-4-4-3	ST239-CC8
t796(1)	JL(1)				1	5-4-1-4-4-6-3	ST7-CC7
t899(1)	GZ(1)				1	3-3-1-1-1-1-10	ST9-CC9
t1152(1)	DL(1)		1			2-3-1-1-4-4-3	ST239-CC8
t2649(1)	GZ(1)			1		22-1-14-23-12-4-3	ST88-CC88

4. *pvl* 基因检测: 302 株 MRSA 菌株均未检测出 *pvl* 基因。

讨 论

MRSA 常用的基因分型方法有 SCCmec、MLST、Spa、*agr* 分型和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 等。本研究采用 SCCmec、MLST、Spa 分型及 *pvl* 毒素基因的检测。SCCmec 分型的优点为快速、精确、灵敏度高。在 302 株 MRSA 中, 发现大部分医院以 III 型菌为主, 而大连地区为 II 型菌为主, 广州地区发现 2 株 IV 型菌。杜娜等^[7]对我国 5 家医院分离的 MRSA 进行 SCCmec 和毒素基因的检测, 结果 4 家医院 SCCmec 以 III 型为主, 而另家医院以 II 型为主。有文献报道^[8], 韩国、日本主要以 SCCmec II 型多见, 而我辽宁地区也以 II 型为主, 具有独特的地理分布。

20 世纪 90 年代后期, 美国和澳大利亚先后报道 CA-MRSA 感染, 多数患者临床表现为皮肤软组织感染, 也有少数严重侵袭性感染的报道。1999 年美国疾病预防控制中心报道 4 例儿童患者死于 CA-MRSA 引起的脓毒症, 其中 3 例合并坏死性肺炎和(或)脓胸^[9]。CA-MRSA 有三个显著特征^[10]: ①与院内获得的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (HA-MRSA) 多重耐药相比大部分 CA-MRSA 是非多重耐药; ②CA-MRSA 经 SCCmec 分型, 大部分属于 IV 型; ③CA-MRSA 大部分携带有毒素 PVL。本研究中广州地区发现 2 株 SCCmec IV 型, PVL(-), 其中 1 例是出生后 12 d 的女婴, 送检标本为脓液; 另 1 例为 27 岁男性, 送检标本为伤口分泌物; 菌株分型分别为 ST59-MRSA-SCCmec IV-t437 及 ST88-

MRSA-SCCmecIV-t2469。

有报道温州地区以ST239-MRSA-SCCmec III和ST88-MRSA-SCCmec III为主^[11],而目前的文献报道认为ST88这一克隆具有SCCmec IV型,PVL(+),归为CA-MRSA^[12]。本研究中,SCCmec、Spa和MLST分型的结果以ST239-MRSA-SCCmec III-t030和ST5-MRSA-SCCmec II-t002为主。提示,我国可能以Brazilian/Hungarian流行株为主,其次为New York/Japan流行株,与刘昱东等^[13]研究结果一致。Sola等^[14]报道了阿根廷最流行的克隆株为ST239-MRSA-III,但是已经逐渐被ST5-MRSA-SCCmec II取代,这一克隆是New York/Japan国际流行克隆株中的一员。在荷兰CA-MRSA主要为ST59-MRSA-SCCmec V和ST8-MRSA-SCCmec IV^[15],而我国香港主要为ST30-MRSA-SCCmec IV和ST59-MRSA-SCCmec V^[16]。Fenner等^[17]报道2000—2005年间瑞士MRSA主要Spa分型为t041及t044;Ho等^[18]报道香港地区MRSA主要的基因分型为ST45-MRSA-SCCmec IV/V-t1081和ST5-MRSA-SCCmec II-t002。

两种主要的MRSA菌株为ST239-MRSA-SCCmec III型和ST5-MRSA-SCCmec II型,且具有独特的地理分布。因为本文是一项回顾性研究,很难得到急(门)诊及住院患者的病历,一些得到的数据不能提供充分信息来鉴定是否为CA-MRSA感染。但本研究表明两种广泛流行的MRSA克隆株(ST239和ST5),具有独特的地理分布。

目前MRSA已经成为医院内及社区获得性感染的主要病原菌,不论是CA-MRSA还是HA-MRSA,其检出越来越频繁,致病力和耐药性也越来越强,不断出现感染暴发或流行,这也是国外医疗机构对MRSA高度重视的原因。有必要研究我国菌株的自身特点,特别是进行一些基础方面的研究。

[本研究提供菌株的其他医院分别为:北京医院(胡云建),上海瑞金医院(倪语星),上海中山医院(胡必杰),武汉同济医院(孙自庸),中国医科大学附属一院(褚卓),陕西省人民医院(任健康),大连医科大学附属一院(王晶),吉林省人民医院(段琼),青岛医学院附属医院(刘蓬蓬),浙江大学附属一院(俞云松),新疆医科大学附属医院(季萍),深圳市人民医院(何林),广州市第一人民医院(叶惠芬),广西医科大学附属一院(朱莲娜),江苏省人民医院(赵旺胜),西安交通大学附属一院(雷金娥)]

参 考 文 献

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med, 1998, 339:520-532.
- [2] Nada T, Ichihama S, Osada Y, et al. Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates. J Hosp Infect, 1996, 32:305-317.
- [3] Husking WC, Goldmann DA. Controlling methicillin-resistant

Staphylococcus aureus, aka "Superbug". Lancet, 2005, 365: 273-275.

- [4] Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemo, 2007, 51(9): 3374-3377.
- [5] Enright M, Day N, Davies C, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2000, 38:1008-1014.
- [6] Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, et al. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by *spa* typing, *Sma*I macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol, 2006, 44:2533-2540.
- [7] Du N, Wang H, Niu JQ, et al. Detection of SCCmec typing and toxic genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at five teaching hospitals in China. Chin J Lab Med, 2007, 30:499-504. (in Chinese)
- [8] Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian Countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(3): 1001-1012.
- [9] Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Minnesota and North Dakota, 1997-1997. MMWR, 1999, 48:707-710.
- [10] Binh A, George F, Naraporn S. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain harboring the genes for Pantone-Valentine leukocidin. J Clin Microbiol, 2004, 42:2080-2084.
- [11] Yu FY, Li ML, Zhang XQ, et al. Research of infection type of *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine. Chin J Lab Med, 2007, 30:568-571. (in Chinese)
- [12] Denis O, Deplano A, De Beenhouwer H. Polyclonal emergence and importation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring Pantone-Valentine leukocidin genes in Belgium. J Antimicrob Chemother, 2005, 56: 1103-1106.
- [13] Liu YD, Wang H, Chen MJ, et al. Research of the source and molecular evolution of MRSA. Chin J Microbiol Immunol, 2007, 27:962-966. (in Chinese)
- [14] 刘昱东,王辉,陈民钧,等.耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)起源和分子进化的研究进展.中华微生物和免疫学杂志,2007,27:962-966.
- [15] Sola C, Cortes P, Saka HA, et al. Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Coedoba, Argentina. J Clin Microbiol, 2006, 44(1):192-200.
- [16] Huijsdens XW, van Santen-Verheuevel MG, Spalburg E, et al. Multiple cases of familial transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2006, 44(8):3198-3202.
- [17] Ho PL, Cheung C, Mak GC, et al. Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. Diag Microbiol Infect Dis, 2007, 57:145-151.
- [18] Fenner L, Widmer AF, Dangel M, et al. Distribution of *spa* types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence university hospital. J Med Microbiol, 2008, 57(5):612-616.
- [19] Ho PL, Lai EL, Chow KH, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in residential care homes for the elderly in Hong Kong. Microbiol Infect Dis, 2008, 61(2):135-142.

(收稿日期:2009-08-22)

(本文编辑:张林东)