·实验室研究·

社区分离金黄色葡萄球菌在健康人群中的分布及其分子生物学特点

马笑雪 罗恩杰

【摘要】 目的 调查医科大学学生鼻腔中金黄色葡萄球菌(金葡菌)的定植状况,解析鼻腔定植社区型甲氧西林耐药性金葡菌(MRSA)克隆的分子生物学特点。方法 以无菌棉签从调查对象鼻腔中收集定植菌,鉴定出甲氧西林敏感性金葡菌(MSSA)和MRSA;多重PCR法分型MRSA携带的SCC*mec*基因岛;PCR测定*pvl*、*seh*、*tsst*1等毒素基因在菌株中的分布;脉冲场凝胶电泳(PFGE)检测MRSA菌株的脉冲场型。结果 2009年977名学生488份样本中鉴定出葡萄球菌,其中凝固酶阴性葡萄球菌(CoNS)和金葡菌分别为364份和124份,MRSA在金葡菌中所占比例为3.4%。2010年调查显示,657名学生中有310份样本鉴定为葡萄球菌属,其中CoNS为195份,金葡菌115份,MRSA在金葡菌中所占比例为7.7%。金葡菌在所有葡萄球菌属中所占比例为29.9%,而MRSA在金葡菌中所占比例为5.1%。MRSA菌株中共鉴定出5种SCC*mec*基因岛型,其中Ⅳa型最多(10株),为优势SCC*mec*基因岛类型。PFGE共有11种图谱型,7种(A～G)脉冲场型。10株MRSA均为*pvl*阳性。结论 1株起源于社区,基因型为Ⅳa SCC*mec*-pulsotype A且携带*pvl*毒素基因的特定MRSA克隆在健康大学生中传播。

【关键词】 金黄色葡萄球菌;甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌,社区分离型;SCC*mec*基因岛分型

Distribution of *Staphylococcus aureus* strains colonized in healthy community population and molecular epidemiological characteristics for MRSA strains

MA Xiao-xue, LUO En-jie. Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China
Corresponding author: LUO En-jie, Email: rochover@126.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation (No. 30972520) *and the Ministry of Education in China* (No. [2009] 1001).

【Abstract】 **Objective** To investigate the nasal colonization of *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* strains among medical university students in Shenyang and to study the molecular epidemiological characteristics of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains. **Methods** Sterilized nasal swabs were used to collect nasal bacteria from both nares of the students. Nasal specimens were further identified as *S. aureus* strains, sensitive or resistant to methicillin through a series of tests. Molecular related methods including staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing, pulsed- field gel electrophoresis (PFGE), coagulase isotyping and minimum inhibitory concentration (MIC) determination *etc.* were used to characterize the isolates. Prevalence of the panton-valentine leukocidin (*pvl*) genes (*lukS* and *F-PV*) among the isolates was also assessed. **Results** Staphylococci were found in 488 specimens from 977 participants through the surveillance program, conducted in 2009. Of the 488 specimens being tested, 364 were identified as coagulase-negative staphylococci (CoNS) and 124 as *S. aureus*. MRSA strain among the *S. aureus* isolates was accounted for 3.4%. In the surveillance program conducted in 2010, staphylococci grew in 310 specimens from 657 participants. Of the 310 specimens tested, 195 were identified as CoNS and 115 as *S. aureus*. The percentage of MRSA strains among the *S. aureus* isolates was 7.7%. In total, 239 students carried *S. aureus*, and the percentage of MRSA carriers among the total specimens tested in this study was 5.1%. Most of the MRSA strains could be classified into one of the five types of SCC*mec* elements. Type Ⅳa SCC*mec* strains were most frequent seen overall (10 isolates). A total of 11 pulsotypes were identified

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.08.016
基金项目:国家自然科学基金(30972520);教育部归国留学人员科研启动基金([2009] 1001)
作者单位:110001 沈阳,中国医科大学基础医学院病原生物学教研室
通信作者:罗恩杰, Email: rochover@126.com

among the MRSA strains and were classified into 7 major groups (A to G) by the mutual correlations of their banding patterns. Ten MRSA strains were identified as *pvl* positive strains. **Conclusion** An MRSA clone (Ⅳa SCC*mec* pulsotype A) carrying *pvl* toxin gene was found to be prevalent in the nares of the healthy university students.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; Staphylococcal cassette chromosome *mec* typing

甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是引起院内感染的重要病原体之一[1-3]。20世纪90年代后,出现许多关于MRSA在与医疗机构无接触史的正常健康人群中定植并引起感染的报道[4],这些社区分离型MRSA(community acquired MRSA, CA-MRSA)有许多自身特性都不同于医院分离型MRSA,体现在对多种抗生素的药物敏感性上、SCC*mec*基因岛分型或者毒素基因携带谱等方面[5]。新的CA-MRSA菌株更倾向于感染青年人,特别是在儿童群体、运动员、囚犯、静脉药品注射者中引起危及生命的社区型感染[6]。金黄色葡萄球菌(金葡菌)的传播主要依靠人间的密切接触。人鼻前庭是金葡菌最主要的定植部位[7],而鼻腔携带金葡菌是确定罹患社区MRSA感染的高风险指标之一[8]。目前对金葡菌分离株的研究大多限于住院病例,本研究旨在确定医科学生鼻腔定植MRSA和甲氧西林敏感性金葡菌(MSSA)的流行情况及采用分子生物学方法鉴定菌株的生物学特性。

材料与方法

1. 实验材料:

(1)菌株及鉴定:样本来自中国医科大学在校3年级学生。以无菌棉拭子蘸取0.9%生理盐水,伸入鼻腔深处旋转刮擦,将标本接种到含5%绵羊红血球的哥伦比亚血液培养平板上,置5%二氧化碳培养箱35 ℃培养48 h。挑选细菌形态上符合葡萄球菌属特性的菌落进一步进行革兰染色和玻片凝固酶试验。凡鉴定为葡萄球菌属的菌落分别接种到含头孢唑肟(10 mg/L)或不含头孢唑肟的甘露醇高盐琼脂培养基上,于37 ℃培养48 h。在含10 mg/L头孢唑肟的甘露醇高盐培养基上生长的黄色单个细菌克隆确定为MRSA,并于存储原液(20%甘油,80%脑心浸液)中-80 ℃低温保存。

(2)试剂:药敏实验培养基采用英国Oxoid公司生产MH琼脂(Mueller-Hinton Agar);细菌培养采用LB培养基(每升):胰蛋白胨(Difco, Detroit, MI) 10 g,酵母粉(Oxoid, Basington, UK)5 g, NaCl 5 g; PCR仪器为PerkinElmer公司产品;脉冲场电泳仪采用美国伯乐公司的CHEF MAPPER XA系统。

2. 实验方法:

(1)鉴定*mecA*基因:为确定上述含抗生素的甘露醇高盐琼脂培养基上生长的黄色菌落为MRSA,进一步以细菌染色体为模板,用PCR扩增菌株中的*mecA*基因。所用引物为mA1(5′-TGC TAT CCA CCC TCA AAC AGG-3′)和mA2(5′-AAC GTT GTA ACC ACC CCA AGA-3′),PCR反应体系为10×扩增缓冲液5 μl,4种dNT P混合物各200 μmol/L,引物各20 pmol,模板DNA 100 ng, Taq DNA聚合酶1 μl, Mg^{2+} 1.5 mmol/L,加双蒸水至50 μl。

(2)药敏实验:根据2009年国家临床实验室标准委员会(CLSI)的规定严格操作实施。苯唑西林、头孢唑肟、左氧氟沙星、庆大霉素、利福平、红霉素、四环素、克林霉素、替考拉宁和万古霉素均为原药粉(由本课题组统一提供)。最低抑菌浓度(MIC)测定是应用Mueller-Hinton液体培养基以常量肉汤稀释法进行。ATCC 29213为质控菌株。

(3)染色体分型和毒素基因检测:应用小型苯酚氯仿法提取细菌染色体DNA作为PCR反应模板。根据Kondo等[9]设计的多重PCR扩增反应体系和条件检测金葡菌盒式染色体*mec*(staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*)分型和设计阳性对照株。PCR产物在1%琼脂糖中电泳30 min,然后用EB染色20 min,扫胶仪观察结果并拍照。*pvl*、*seh*和*tsst*1毒素基因检测应用引物参照文献[10]。

(4)血浆凝固酶分型:使用市售的分别针对Ⅰ~Ⅷ型血浆凝固酶的兔中和血清(Denka Seiken, Co. Ltd., Tokyo, Japan)进行凝固酶抑制试验以确定血浆凝固酶型。离心收集BHI过夜培养菌液,取适度稀释的菌液上清0.1 ml与等量抗血清混合,37% 孵育1 h;加入稀释血浆0.2 ml,孵育,直到肉眼观察到凝固为止。菌株的凝固酶型即为抑制凝固的抗血清型,具体操作按试剂盒说明书进行。

(5)脉冲场凝胶电泳(PFGE)测定:依据Tenover等[11]提供的方法将细菌包裹于琼脂中,加十二烷基肌氨酸钠和蛋白酶K消化蛋白,经SmaⅠ酶切后,于脉冲场电泳槽中电泳分离DNA片段,读胶仪读取电泳图谱,分析同源性。PFGE图谱具有4条以下不同条带时可定义为既存PFGE型别的亚型。

结　果

1. 葡萄球菌鼻腔定植的分布特点：2009和2010年共检查健康医学生1634人，其中男性801人(49.1%)，女性833人(50.9%)，平均年龄20.5(19～22)岁。2009年检查的977人中有488份鼻腔样本鉴定出葡萄球菌，其中凝固酶阴性葡萄球菌(CoNS)和金葡菌分别为364例和124例，MRSA在金葡菌中所占比例为3.4%；2010年调查的657人中有310份鼻腔样本鉴定出葡萄球菌属，其中CoNS 195例，金葡菌115例，MRSA在金葡菌中所占比例为7.7%。总体而言，金葡菌在所有葡萄球菌属中所占比例为29.9%，而MRSA在金葡菌中所占比例为5.1%；甲氧西林耐药性凝固酶阴性葡萄球菌(MR-CoNS)的鼻腔携带率从2009年的36.3%下降到2010年的29.2%(表1)。

表1　沈阳地区1634名健康医学生鼻腔中MSSA和MRSA的分布特征

特征	2009年	2010年	合计
性别			
女	501(51.3)	332(50.5)	833(50.9)
男	476(48.7)	325(49.5)	801(49.1)
平均年龄(岁)	20.2	21.1	20.5
检出葡萄球菌属	488(49.9)	310(47.1)	798(48.9)
鉴定CoNS	364(74.6)	195(62.9)	559(70.1)
MS-CoNS[a]	232(63.7)	138(70.8)	370(66.2)
MR-CoNS	132(36.3)	57(29.2)	189(33.8)
检出金葡菌	124(25.4)	115(37.1)	239(29.9)
MSSA	107(86.3)	91(79.1)	198(82.8)
MRSA	17(13.7)	24(20.9)	41(17.2)
MRSA定植率(%)	3.4	7.7	5.1

注：[a]甲氧西林敏感性-CoNS；括号外数据为人(份)数，括号内数据为构成比(%)

2. MRSA菌株的分子生物学特点：鼻腔分离的MRSA菌株共鉴定出Ⅰ～Ⅴ型SCC*mec*基因岛。其中Ⅳa型是最多见的类型(10株)，其次为Ⅴ型SCC*mec*(3株)，尚有2株MRSA中携带的Ⅳ型SCC*mec*不能确定其亚型。尽管本研究鉴定出的各型SCC*mec*所占比率不同，但Ⅰ～Ⅴ型SCC*mec*分散存在于社区MRSA中，且半数以上(54.5%)菌株携带Ⅳa、Ⅳc或Ⅳn型SCC*mec*基因岛，揭示了Ⅳ型SCC*mec*为本研究MRSA携带的优势SCC*mec*类型。

PFGE显示MRSA有11种图谱，归纳为7种脉冲场型(A～G)，其中A型包括A1～A3亚型，B和D型分别包含B1、B2和D1、D2亚型。22株MRSA中10株菌属于A型，80%A型MRSA菌株携带Ⅳa型SCC*mec*基因岛，标志A型为优势PFGE型别，而D、B和F为次优势PFGE型别，分别包含4、3和2株MRSA菌株，C、E和G型仅有1株MRSA代表菌。凝固酶型分析结果显示产生3型凝固酶的10株MRSA尽管其脉冲场图谱显示有1～2条条带的差异，除1株MRSA携带Ⅳc和另1株MRSA携带未能分型(NT)的SCC*mec*以外，其余均携带Ⅳa型SCC*mec*基因岛，且其中5株MRSA被鉴定为携带*pvl*毒素基因。另外携带*pvl*基因的菌株还包括1株Ⅳa型SCC*mec*菌株并产生7型凝固酶的MRSA，2株携带Ⅳc型SCC*mec*并产生4型凝固酶的MRSA和2株携带Ⅴ型SCC*mec*产生7型凝固酶的MRSA菌株。*tsst*1毒素基因存在于2株MRSA中，其中1株为携带Ⅱ型SCC*mec*的脉冲场F型菌株，另1株为携带Ⅲ型SCC*mec*的脉冲场G型菌株。只有1株脉冲场E型-Ⅳa SCC*mec*的MRSA携带*seh*基因，显示*seh*基因很少从鼻腔定植细菌中检出。

所有检测菌株对苯唑西林和头孢唑肟耐药，但均对万古霉素和替考拉宁敏感。多数携带Ⅳ或Ⅴ型SCC*mec*基因岛的MRSA菌株，除对β-内酰胺酶类抗生素以外的红霉素表现为低度敏感，对大部分抗菌药物有特异敏感性。然而，从鼻腔分离携带Ⅰ、Ⅱ或Ⅲ型SCC*mec*的MRSA菌株表现为对所测药物有高度耐药(表2)。

讨　论

高致病性金葡菌在世界范围内的广泛出现，及其耐药水平的日趋提高，严重威胁人类健康。近年来的研究指出[12]，在缺少罹患MRSA感染共同危险因素的正常人群中，CA-MRSA感染率也呈逐年上升趋势，而鼻腔携带MRSA在葡萄球菌引起的感染在流行病学和发病机制中起着重要作用。医学院校学生是特定人群，其中MRSA的定植会可能加快MRSA在社区和医院中的传播蔓延。基于社区的调查显示，各国社区人群金葡菌的鼻腔定植均很普遍，但在不同人群中的分布和比例有差异。北京地区的一项研究报告显示[13]，在士兵中存在MSSA的鼻腔定植和细菌克隆传播。美国的一项研究表明[14]，在2002年以前MRSA的定植率低，但近年来却有逐年增加的态势。本研究显示虽然MSSA的分离数量相对稳定，但MRSA的分离率却从2009年的13.7%上升到2010年的20.9%。

MRSA分子流行病学研究的重要内容之一就是区分社区和医院环境中占主导地位的MRSA克隆。本研究结果显示，在所有5个型别的SCC*mec*中以Ⅳ型最为多见。与多数医院分型MRSA所携带的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型SCC*mec*相比，Ⅳ型SCC*mec*在基因组长度上较小，通过噬菌体转导作用具有更容易在不同菌

表2　22株MRSA克隆的分子生物学特性

菌株号	脉冲场型	凝固酶型	SCC*mec*基因岛型	携带毒素基因			抗菌药物耐药谱(MIC)										
				pvl	*tsst*1	*seh*	甲氧西林	头孢唑肟	克林霉素	利福平	庆大霉素	四环素	红霉素	左氧氟沙星	复方磺胺甲唑	替考拉宁	万古霉素
25	A1	3	Ⅳa	+	-	-	4	128	1	1	2	0.5	256	1	0.5/8	0.5	0.5
104	A1	3	Ⅳa	+	-	-	8	256	0.5	1	1	0.5	128	0.5	0.5/8	1	1
127	A1	3	Ⅳa	-	-	-	16	256	0.5	0.5	1	1	128	0.5	0.5/8	0.5	0.5
436	A1	3	Ⅳa	-	-	-	16	256	0.5	0.5	1	1	128	0.5	0.5/8	0.5	0.5
367	A1	3	Ⅰ	-	-	-	64	128	16	4	128	8	128	4	0.5/8	0.5	0.5
551	A2	3	Ⅳa	-	-	-	16	256	0.5	0.5	1	1	128	0.5	0.5/8	0.5	0.5
274	A2	3	Ⅳa	+	-	-	32	256	0.5	1	0.5	0.5	256	0.5	0.5/8	1	0.5
333	A2	3	Ⅳa	+	-	-	16	256	8	0.5	128	0.5	256	0.5	0.5/8	1	0.5
21	A3	3	Ⅳa	+	-	-	8	128	0.5	1	0.5	1	256	0.5	0.5/8	0.5	0.5
376	A3	3	NT	-	-	-	32	64	128	1	256	0.5	128	1	8/256	1	0.5
563	D1	7	Ⅴ	+	-	-	16	128	0.5	1	0.5	1	256	0.5	0.5/8	0.5	0.5
10	D1	7	Ⅴ	+	-	-	32	64	0.5	0.5	1	1	128	0.5	0.5/8	0.5	0.5
321	D1	7	Ⅳn	-	-	-	16	128	0.5	1	0.5	1	256	0.5	0.5/8	0.5	0.5
543	D2	7	Ⅳn	-	-	-	32	64	0.5	0.5	1	1	128	0.5	0.5/8	0.5	0.5
317	B1	4	Ⅳc	+	-	-	8	128	0.5	1	1	0.5	256	1	0.5/8	0.5	0.5
99	B1	4	Ⅳa	-	-	-	4	256	1	1	0.5	1	256	0.5	0.5/8	0.5	0.5
686	B2	4	Ⅳc	+	-	-	8	128	0.5	0.5	1	1	128	1	0.5/8	0.5	0.5
318	F	2	Ⅱ	-	+	-	64	128	16	4	128	8	128	4	0.5/8	0.5	0.5
360	F	2	Ⅱ	-	-	-	64	128	8	8	256	16	128	8	0.5/8	0.5	0.5
542	C	2	Ⅴ	-	-	-	16	128	0.5	1	1	1	256	1	0.5/8	0.5	0.5
411	E	7	Ⅳa	+	-	+	4	128	0.5	1	2	0.5	256	1	0.5/8	1	0.5
176	G	5	Ⅲ	-	+	-	128	256	16	4	64	32	256	8	8/256	0.5	0.5

株之间转移传播的特点[15]。

本研究中所有菌株均对苯唑西林(4～128 mg/L)和头孢唑肟(128～256 mg/L)耐药,但对替考拉宁和万古霉素敏感。大多数携带Ⅳ或Ⅴ型SCC*mec*的MRSA菌株对多数抗菌药物表现为敏感,但对红霉素耐药,显示这些从医学院校大学生鼻腔中分离的MRSA,其药物敏感性与分散在医院中的高度多重耐药MRSA显著不同。

本研究22株MRSA中检测出10株*pvl*阳性菌株。Panton-Valentine leukocidine(PVL)中的LukF-PV和lukS-PV蛋白能够协同作用导致多核白细胞膜穿孔,进而起到杀伤白细胞的作用[16]。目前在许多国家都广泛地分离出*pvl*阳性的MSSA和MRSA[17]。

在医学院校学生中蔓延的特定克隆型MRSA,可能是由该人群密切接触引起传播,而携带*pvl*阳性MRSA者有可能成为将病菌由社区带入医院的媒介。因此,制定相应的措施以控制CA-MRSA在敏感宿主间的传播将是当前面对的重要课题。

参 考 文 献

[1] Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis, 2001, 7(2): 178-182.
[2] Wang H, Liu Y, Sun H, et al. In vitro activity of ceftobiprole, linezolid, tigecycline, and 23 other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates in China. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 62(2): 226-229.
[3] Xiao YH, Wang J, Li Y. Bacterial resistance surveillance in China: a report from Mohnarin 2004-2005. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008, 27(8): 697-708.
[4] Groom AV, Wolsey DH, Naimi TS, et al. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a rural American Indian community. JAMA, 2001, 286(10): 1201-1205.
[5] Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, et al. Comparison of community and healthcare associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA, 2003, 290(22): 2976-2984.
[6] Kluytmans-Vandenbergh MF, Kluytmans JA. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clin Microbiol Infect, 2006, 12 Suppl 1: S9-15.
[7] Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev, 1997, 10: 505-520.
[8] Ellis MW, Hospenthal DR, Dooley DP, et al. Natural history of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. Clin Infect Dis, 2004, 39(7): 971-979.
[9] Kondo Y, Ito T, Ma XX, et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr* and major differences in Junkyard Regions. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(1): 264-274.
[10] Ma XX, Galiana A, Pedreira W, et al. Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. Emerg Infect Dis, 2005, 11(6): 973-976.
[11] Tenover FC, Arbeit DR, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction pattens produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
[12] Fontanilla JM, Kirkland KB, Talbot EA, et al. Outbreak of skin infections in college football team members due to an unusual strain of community acquired methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 609-611.
[13] Qu F, Cui E, Guo T, et al. Nasal colonization of and clonal transmission of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* among Chinese military volunteers. J Clin Microbiol, 2010, 48(1): 64-69.
[14] Tenover FC, McAllister S, Fosheim G, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. J Clin Microbiol, 2008, 46(9): 2837-2841.
[15] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 2001, 9(10): 486-493.
[16] Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(5): 981-1003.
[17] Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis, 2003, 9(8): 978-984.

(收稿日期:2011-03-30)
(本文编辑:张林东)