

47株金黄色葡萄球菌临床血流感染分离株的基因分型研究

陈荣 沈定霞 闫中强 王欢

【摘要】 目的 研究金黄色葡萄球菌临床血流感染分离株的分子流行病学特征。方法 收集2006年1月至2008年12月解放军总医院分离的临床血流感染金黄色葡萄球菌菌株(共47株),标本来源均为患者静脉血。采用琼脂稀释法检测所有菌株对多种抗生素的耐药性,PCR方法检测*pvl*毒素基因, DiversiLab™ Rep-PCR分型系统分析菌株的同源性;对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)进行葡萄球菌染色体*mec*(SCC*mec*)分型以及ST239型别的快速筛查;综合分型和药敏试验结果,挑选部分代表菌株进行多位点序列分型(MLST)。结果 47株血流感染金黄色葡萄球菌中,*pvl*基因检出率为4.3%。MRSA占51.1%,MRSA均为SCC*mec* III型菌株;Rep-PCR分为A~L共12个型,其中A型为最主要的型,共22株(46.8%),所有的MRSA均属于A、B两型。结论 47株临床血流感染金黄色葡萄球菌中的MRSA绝大部分为多重耐药克隆ST239-MRSA-SCC*mec* III型。

【关键词】 金黄色葡萄球菌; 血流感染; 抗药性; 基因分型; 分子流行病学

Genotyping on 47 *Staphylococcus aureus* strains associated with bloodstream infection CHEN Rong, SHEN Ding-xia, YAN Zhong-qiang, WANG Huan. Department of Microbiology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: SHEN Ding-xia, Email: shendx301@yahoo.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the molecular epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with bloodstream infection in hospital. **Methods** 47 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bloodstream in PLA General Hospital were collected from January 2006 to December 2008. Susceptibility of the strains to 11 antimicrobial agents was detected and DNA homology of them was analyzed with Rep-based DiversiLab™ Microbial Typing System. Panton-Valentine leukocidin (PVL) gene was determined by PCR. For methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, the genotypes of SCC*mec* were determined and ST239 clone was screened with multiplex PCR. Multilocus sequence typing (MLST) was used to determine the STs of the selected isolates. **Results** In the 47 *Staphylococcus aureus* isolated from blood, methicillin-resistant strains accounted for 51.1%, all belonged to SCC*mec* III type, with only 2 *pvl* gene positive strains identified. 12 different patterns (A-L) were found among 47 strains with Rep-PCR. All MRSA strains clustered in the A and B subtypes. **Conclusion** Most MRSA strains isolated from blood in PLA General Hospital belonged to ST239-MRSA-SCC*mec* III clone. DiversiLab™ Microbial Typing System could provide a rapid and effective method to investigate the molecular epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus* in the hospital settings.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; Bloodstream infection; Drug-resistance; Genotyping; Molecular epidemiology

金黄色葡萄球菌是致医院获得性血流感染中最常见的病原菌之一,特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),已经成为世界范围引起院内感染的重要病原菌。近年来,世界许多地区不断报道MRSA引起医院内感染的暴发,一些耐药克隆(如ST239)广泛流行^[1]。本次研究通过多种分子分型方

法了解解放军总医院临床分离的血流感染金黄色葡萄球菌菌株的流行病学特征,为控制该菌引起的血流感染以及MRSA暴发奠定基础。

材料与方法

1. 菌株:收集2006年1月至2008年12月解放军总医院分离的47株临床血流感染金黄色葡萄球菌,标本来源为患者静脉血,所有菌株均为同一时间内连续分离的非重复菌株,同一患者只取第1次分离株。

2. 主要仪器和试剂: 包括 PCT-200 型 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); BINTA 2020D 型紫外凝胶成像仪; DiversiLab™ 系统: Agilent® 2100 生物分析仪 (包括芯片安装站, 蜗旋混悬仪, 计时器)。M-H 琼脂、药敏纸片购自英国 Oxoid 公司。溶葡萄球菌素 (lysostaphin)、TaqDNA 聚合酶、MgCl₂ 及 dNTP 购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。使用 DiversiLab™ 推荐的微生物 DNA 纯化试剂盒和葡萄球菌 DNA 指纹图谱试剂盒 (法国 bioMérieux 公司) 提取 DNA 并进行 Rep-PCR 分型。

3. 方法: ①药敏试验: 琼脂稀释法检测所有菌株对青霉素 G、万古霉素、红霉素、头孢西丁、头孢唑啉、环丙沙星、左旋氧氟沙星、替考拉宁、米诺环素、庆大霉素、头孢噻肟的耐药性。②总 DNA 提取: 取血平板上新鲜过夜 6~8 个单个菌落, 混悬于 0.3 ml 含有 50 U/ml 溶葡萄球菌素的 TE 液 (pH=8.0) 中, 35 °C 水浴 30 min, 100 °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, 用于 PCR 扩增。③葡萄球菌染色体 *mec* (SCC*mec*) 分型: 按参考文献 [2] 介绍的多重 PCR 进行 SCC*mec* 快速分型。反应体系为 25 μl, 共 9 对引物。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 90 s, 10 个循环, 再次 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环 25 次, 最后 72 °C 延伸 10 min。电泳结果用凝胶成像系统观察。④ Rep-PCR 分型: 使用 DiversiLab™ 推荐的微生物 DNA 纯化试剂盒提取 DNA 模板, DNA 定量并稀释至工作浓度 25~50 ng/μl, 使用 DiversiLab™ 葡萄球菌 DNA 指纹图谱试剂盒按操作说明配制 PCR 反应体系后, 上机 (Agilent® 2100 Bioanalyzer) 进行 Rep-PCR 反应并分离 DNA 片段。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火

30 s, 70 °C 延伸 90 s, 循环 35 次, 最后 70 °C 延伸 3 min。利用 DiversiLab™ 软件的统计分析功能比较指纹图谱。⑤ ST239 型别的快速筛查: 参照参考文献 [3], 采用多重 PCR 方法筛查 MRSA 菌株中的 ST239 克隆, 同时扩增出大小分别为 220 bp 和 484 bp 的产物者为初筛阳性, 电泳结果用凝胶成像系统观察。⑥ *pvl* 基因检测: 参考文献 [4]: 反应体系为 25 μl; PCR 扩增条件: 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, 片段长度 433 bp, 电泳结果用凝胶成像系统观察。⑦ 多位点序列分型 (MLST): 反应体系为 50 μl。7 个管家基因 (*arcC*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqil*) 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, 最后 72 °C 延伸 5 min。片段大小为 402~516 bp。产物纯化后测序, 结果通过 MLST 分型数据库 (<http://www.mlst.net>) 进行分型。

结 果

1. 药敏试验: 47 株血流感染的金黄色葡萄球菌均对万古霉素、替考拉宁和米诺环素敏感。MRSA 24 株 (51.1%) 均为多耐药菌株 (表 1)。

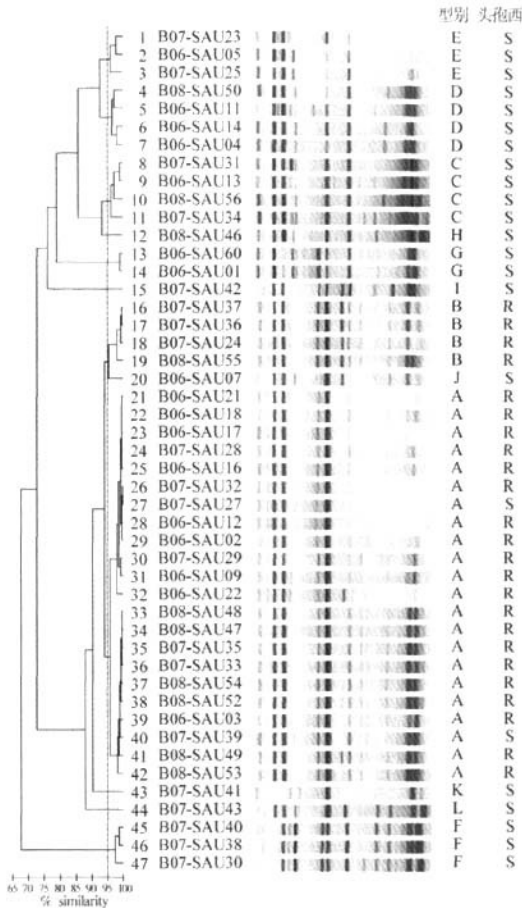
2. Rep-PCR 分型: 见图 1。47 株金黄色葡萄球菌以 95% 的相似度为界, 分为 A~L 共 12 个型, 其中 A 型为主, 有 22 株 (46.8%), B、C、D 型各 4 株, E、F 型各 3 株, G 型 2 株, H、I、J、K、L 型各 1 株。24 株 MRSA 全部集中于 A、B 两个型别中。

3. SCC*mec* 分型: 24 株 MRSA 均为 SCC*mec* III 型。

4. *pvl* 基因检测: 2 株菌检出 *pvl* 基因, 分别为 Rep-PCR 的 D 型和 E 型, 均为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA)。

表 1 47 株金黄色葡萄球菌临床血流感染分离株药敏试验结果

抗生素	耐药率 (%)		耐药率 95%CI		MIC50 (mg/L)		MIC90 (mg/L)		MIC 范围 (mg/L)	
	MRSA (24 株)	MSSA (23 株)	MRSA (24 株)	MSSA (23 株)	MRSA (24 株)	MSSA (23 株)	MRSA (24 株)	MSSA (23 株)	MRSA (24 株)	MSSA (23 株)
红霉素	91.7	56.5	71.6~98.6	34.9~76.1	128	16	128	128	0.25~128	0.25~128
环丙沙星	95.8	30.4	76.8~99.8	14.0~53.0	64	0.5	64	16	0.25~64	0.25~64
替考拉宁	0	0	0.0~17.2	0.0~17.8	2	1	4	2	1~4	1~8
头孢噻肟	95.8	0	76.8~99.8	0.0~17.8	>256	2	>256	4	8~512	1~4
头孢唑啉	91.7	0	71.6~98.6	0.0~17.8	64	1	128	2	1~128	1~16
头孢西丁	100	0	82.8~100	0.0~17.8	256	2	256	2	32~256	1~2
万古霉素	0	0	0.0~17.2	0.0~17.8	0.5	0.5	1	1	0.25~1	0.25~2
左旋氧氟沙星	95.8	30.4	76.8~99.8	14.0~53.0	16	0.25	32	8	0.25~32	0.12~32
米诺环素	0	0	0.0~17.2	0.0~17.8	4	0.5	8	1	0.5~8	0.5~2
青霉素 G	100	65.2	82.8~100	42.8~82.8	16	0.5	16	1	4~16	0.12~2
庆大霉素	95.8	30.4	76.8~99.8	14.0~53.0	128	1	256	128	0.5~256	0.5~256



注:图中菌株ID号由分离年份及其年份编号组成,如B07-SAU23代表2007年分离的第23株血流感染金黄色葡萄球菌

图1 Rep-PCR分型的同源性树状图分析

5. ST239初筛及MLST检测:采用多重PCR方法对24株MRSA进行ST239型别的筛查,其中22株为ST239。综合药敏结果和分型结果,挑选10株菌株(包括2株MSSA和8株MRSA)进行MLST检测,结果见表2。

表2 10株金黄色葡萄球菌MLST分型结果

菌株号	Rep-PCR 类型	头孢西丁 耐药	ST239 初筛	7个等位基因							型别
				<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gfpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	
B06-SAU12	A	R	阳性	2	3	1	1	4	4	3	ST239
B06-SAU22	A	R	阳性	2	3	1	1	4	4	3	ST239
B07-SAU27	A	S	阳性	2	3	1	1	4	4	3	ST239
B07-SAU32	A	R	阴性	5	4	1	4	4	6	39	ST1485
B07-SAU24	B	R	阳性	2	3	1	1	4	4	3	ST239
B07-SAU37	B	R	阴性	5	4	1	4	4	6	3	ST7
B07-SAU39	A	S	阴性	12	3	1	1	4	4	3	ST630
B08-SAU48	A	R	阳性	2	3	1	1	4	4	3	ST239
B08-SAU53	A	R	阳性	2	3	1	1	4	4	3	ST239
B08-SAU54	A	R	阳性	2	3	1	1	4	4	3	ST239

讨论

47株金黄色葡萄球菌中MRSA为24株(51.1%)。所有分离菌株虽对万古霉素、替考拉宁、米诺环素敏感,但对其他抗生素的耐药性较高,特别是MRSA菌株,均为多耐药株。有文献报道临床血流感染MRSA的死亡率高于MSSA^[6],而多耐药MRSA还常引起院内感染暴发和流行,并延长住院时间、增加治疗费用^[7]。

本研究还对分离菌株进行基因分型研究。47株金黄色葡萄球菌的Rep-PCR分型^[8]结果显示:与本院血流感染MSSA菌株分子型别的多样性不同,MRSA菌株的分子型别只有A、B两型,为本院临床分离血流感染MRSA的主要克隆,相似度较高(94%);而MSSA菌株除2株菌为A型,其余菌株分布在C~L 10个型中,相似度较低。3年内各病房均分离出血流感染的MRSA和MSSA,但从来源分析并未发现明显的病区内暴发,从菌株分离年度看也并未发现明显的聚集现象和变迁规律。

MLST是研究金黄色葡萄球菌分子流行病学的主要方法之一。ST239 MRSA克隆株耐药性高,且是目前亚洲及我国国内医院分离的主要MRSA克隆^[1,9]。虽然MLST分辨率较高,但技术要求严格且费用较高;故我们先利用文献已报道的多重PCR方法对MRSA菌株进行初步ST239筛查。结果22株菌初筛阳性,挑选其中10株菌(2株为B型,8株为A型)进行MLST检测,包括A型中的2株MSSA。2株ST239初筛为阴性的MRSA中1株为ST7,另一株菌的等位基因序列号为5-4-1-4-4-6-39,这种排列模式与ST7极为相似,仅在*yqiL*基因上有4个碱基的差异,在网上并没有查到一致的型别,已命名为新的ST,编号为ST1485,网站数据库ID为3057。其余MRSA菌株均为ST239型,等位基因序列号为2-3-1-1-4-4-3。而2株被归入A型的MSSA分别为ST630和ST239,其中ST630和ST239从等位基因排列上看,相似度高,仅在*arcC*基因上有差别。MLST确认结果与PCR初筛结果相吻合。从分型结果看,2006—2008年本院血流感染MRSA绝大多数(91.67%)为ST239-MRSA-SCC*mec* III型,该克隆耐药性高,应积极预防其在医院内的爆发性流行。

本次研究未检测到携带*pvl*基因的MRSA,仅2株MSSA的*pvl*基因为阳性,分别属于Rep-PCR的D型和E型。据文献报道,近年来携带Panton-Valentine杀白细胞素(*pvl*)基因的MRSA主要引起

化脓性感染和严重的肺部感染,已有在美国、欧洲、亚洲和非洲等国家引起严重感染的报道,甚至在有些国家造成克隆株的播散^[10,11]。这种携带 *pvl* 基因的 MRSA 多为 SCCmecIV 型,且多为社区获得性^[12]。虽然我们没有分离到 *pvl* 基因阳性的血流感染 MRSA 菌株,但对 *pvl* 基因阳性的血流感染 MSSA 菌株引起医院感染仍应引起足够的重视,这种携带 *pvl* 基因的 MSSA 会不会经过院内环境的影响转变为携带 *pvl* 基因的 MRSA,或者将这种毒力基因传递给其他 MRSA 菌株,还有待继续监测。

参 考 文 献

- [1] Cha HY, Moon DC, Choi CH, et al. Prevalence of the ST239 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and differences in antimicrobial susceptibilities of ST239 and ST5 clones identified in a Korean hospital. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8):3610-3614.
- [2] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcus cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10):5026-5033.
- [3] Feil EJ, Nickerson EK, Chantratita N, et al. Rapid detection of the pandemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST239, a dominant strain in Asian hospitals. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4):1520-1522.
- [4] Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al. Involvement of panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis*, 1999, 29(5):1128-1132.
- [5] Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3):1008-1015.
- [6] Laupland KB, Ross T, Gregson DB. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000-2006. *J Infect Dis*, 2008, 198(3):336-343.
- [7] Kilgore M, Brossette S. Cost of bloodstream infections. *Am J Infect Control*, 2008, 36(10):S172.e1-3.
- [8] Versalovic J, de Bruijn F, Lupski J. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. New York: Chapman & Hall, 1998.
- [9] Wang H, Liu YD, Du N, et al. The molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in China in 2005. *Chin J Lab Med*, 2007, 30(12):1354-1359. (in Chinese)
王辉,刘昱东,杜娜,等. 2005年我国多中心苯唑西林耐药的金黄色葡萄球菌分子流行病学研究. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(12):1354-1359.
- [10] Naas T, Fortineau N, Spicq C, et al. Three-year survey of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a French University Hospital. *J Hosp Infect*, 2005, 61(4):321-329.
- [11] McClure JA, Conly JM, Lau V, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant staphylococci. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(3):1141-1144.
- [12] Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(1):100-107.
(收稿日期:2009-09-19)
(本文编辑:张林东)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会通讯编委名单

- | | | |
|---------------------|-------------------|-----------------------|
| 陈 曦(湖南省疾病预防控制中心) | 奚丰满(成都市疾病预防控制中心) | 高 婷(北京市疾病预防控制中心) |
| 姜宝法(山东大学公共卫生学院) | 李 杰(北京大学医学部) | 李十月(武汉大学公共卫生学院) |
| 李秀央(浙江大学医学院公共卫生学院) | 廖苏苏(中国医学科学院基础医学院) | 林 玫(广西壮族自治区疾病预防控制中心) |
| 林 鹏(广东省疾病预防控制中心) | 刘爱忠(中南大学公共卫生学院) | 刘 刚(四川省疾病预防控制中心) |
| 刘 静(北京安贞医院) | 刘 莉(四川省疾病预防控制中心) | 刘 玮(军事医学科学院微生物流行病研究所) |
| 鲁凤民(北京大学医学部) | 欧剑鸣(福建省疾病预防控制中心) | 彭晓旻(北京市疾病预防控制中心) |
| 邱洪斌(佳木斯大学) | 赛晓勇(解放军总医院) | 苏 虹(安徽医科大学公共卫生学院) |
| 汤 哲(首都医科大学附属宣武医院) | 田庆宝(河北医科大学公共卫生学院) | 王 榕(东南大学公共卫生学院) |
| 王素萍(山西医科大学公共卫生学院) | 王志萍(山东大学公共卫生学院) | 谢 娟(天津医科大学公共卫生学院) |
| 徐爱强(山东省疾病预防控制中心) | 徐慧芳(广州市疾病预防控制中心) | 严卫丽(新疆医科大学公共卫生学院) |
| 阎丽静(中国乔治中心) | 杨春霞(四川大学华西公共卫生学院) | 余运贤(浙江大学医学院公共卫生学院) |
| 曾哲洋(北京安贞医院) | 张 波(宁夏回族自治区卫生厅) | 张宏伟(第二军医大学) |
| 张茂俊(中国疾病预防控制中心传染病所) | 张卫东(郑州大学公共卫生学院) | 赵亚双(哈尔滨医科大学公共卫生学院) |
| 朱 谦(河南省疾病预防控制中心) | 祖荣强(江苏省疾病预防控制中心) | |