•实验室研究•

# 马鞍山地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子特征研究

汪永禄 李凤娟 王多春 张萍 陶勇 王利 王艳

【摘要】目的 了解马鞍山地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(金葡菌)(MRSA)肠毒素、溶血素分布情况、菌株克隆群关系及其耐药性。方法 采用全自动酶联荧光免疫系统和PCR技术分别检测肠毒素和溶血素基因分布;选择金葡菌的7个管家基因作为目的基因,对34株MRSA和3株甲氧西林敏感金葡菌(MSSA)进行多位点序列分型(MLST),然后与网上数据库比对,获得序列型(ST),根据eBURST的ST进行亲缘性分析;采用琼脂稀释法检测MRSA对12种抗生素的耐药情况。结果 210株金葡菌肠毒素阳性率为50.9%,溶血素基因携带率为97.1%,其中51株MRSA全部含有溶血素基因。34株MRSA有10个ST,以ST239为主(47.1%,16/34),其次为ST5(17.6%,6/34);3株MSSA的ST为ST188、ST1281和ST7。17株患者来源菌株分为6个ST,以ST239为主(35.3%,6/17),其次为ST5(29.4%,5/17);20株食品来源菌株有9个ST别,以ST239为主(45.0%,9/20),其次为ST7(15.0%,3/20)。ST585、ST630以及ST239的亲缘关系较近,其他ST之间亲缘关系较远。除万古霉素外,所有菌株对10种抗生素有不同程度的耐药。结论 金葡菌溶血素普遍存在;ST239为马鞍山地区MRSA的主要优势菌株,各ST间亲缘关系较远。

【关键词】 金黄色葡萄球菌;溶血素;多位点序列分型;药敏试验

Study of molecular characteristics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Maanshan area Wang Yonglu<sup>1</sup>, Li Fengjuan<sup>2,3</sup>, Wang Duochun<sup>2</sup>, Zhang Ping<sup>2,4</sup>, Tao Yong<sup>1</sup>, Wang Li<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>1</sup>. 1 Maanshan Municipal Center for Disease Control and Prevention (CDC), Maanshan 243000, China; 2 National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention, Chinese CDC; 3 CDC of Henan Province; 4 CDC of Tongzhou District, Beijing Corresponding author; Wang Yonglu, Email; mas wyl@163.com

(Abstract) Objective To identity the distribution of enterotoxin and hemolysin, as well as the clonal complexes and drug resistance of the strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Maanshan region. Methods Automatic enzyme-linked fluorescent assay system and PCR technology were used to identify the distribution of enterotoxin and hemolysin genes. Seven Staphylococcus aureus hourskeeping genes were choosed as the target genes for multilocus sequence typing (MLST) on 34 strains of MRSA and 3 strains of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus (MSSA), comparing the data with the online database and obtaining the sequence typing (ST), conducting affinity analysis on its ST based on eBURST, testing in agar dilution method the drug resistance of MRSA against 12 antibiotics. Results 50.9% of the 210 Staphylococcus aureus strains were enterotoxin positive, and 97.1% of them carried hemolysin genes as all 51 strains of MRSA carried hemolsin genes. The 34 MRSA strains were divided into 10 STs, ranging in sequence ST239 (47.1%, 16/34), ST5 (17.6%, 6/34). Three MSSA strains belonged to ST188, ST1281 and ST7, respectively. Seventeen strains from the patients were divided into 6 STs, ranging in sequence ST239 (35.3%, 6/17) and ST5 (29.4%, 5/17). Twenty strains from food sources were divided into 9 STs, ranging in sequence ST239 (45.0%, 9/20) and ST7 (15.0%, 3/20). STs of ST585, ST630 and ST239 were close in affinity, while the rest were distant in affinity. Except for vancomycin, all the strains were found with drug resistance to varying extent to the 10 antibiotics tested. **Conclusion** Existence of Staphylococcus aureus hemotoxin was universal; ST239 was the main predominant MRSA in Maanshan region, with distant affinity among the STs.

[Key words] Staphylococcus aureus; Hemolysin; Multilocus sequence typing; Drug sensitivity test

作者单位:243000 安徽省马鞍山市疾病预防控制中心(汪永禄、陶勇、王利、王艳);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(李凤娟、王多春、张萍);河南省疾病预防控制中心(李凤娟);北京市通州区疾病预防控制中心(张萍)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.03.020

金黄色葡萄球菌(金葡菌)能够产生溶血毒素、肠毒素、杀白细胞素等多种毒力因子,引起一系列感染性疾病<sup>[1]</sup>。近年来,由于耐甲氧西林金葡菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)的大量出现,使疾病治疗变得更加困难和棘手<sup>[2]</sup>。MRSA作为医院感染的重要病原菌,得到越来越多的关注。由于抗生素滥用,我国已经成MRSA高度流行的国家。由于MRSA起源、进化和流行具有区域特点,有必要对患者来源和食品来源菌株进行分子生物学研究。本研究对2008—2012年马鞍山地区分离的210株金葡菌的肠毒素和溶血素基因进行检测,并对34株MRSA及3株甲氧西林敏感金葡菌(MSSA)进行多位点序列分型(MLST)分析,探讨菌株间遗传进化关系。

#### 材料与方法

- 1. 实验菌株:共210株,其中食品来源菌株127株,分别为2010年40株、2011年57株、2012年30株;患者来源菌株83株,分别为2008年55株、2011年20株、2012年8株。所有菌株均为革兰阳性菌、过氧化氢酶和血浆凝固酶阳性,经细菌自动仪鉴定为金葡菌;同时对每株菌株耐热核酸酶基因进行PCR检测以进一步确定。
- 2. 肠毒素检测:使用法国梅里埃公司生产的 miniVIDAS全自动荧光免疫分析仪及肠毒素检测试 剂盒检测肠毒素基因。菌株经肉汤培养过夜后,离 心,取上清液上机。操作按仪器手册进行。同时设 置阳性和阴性对照。
- 3. 溶血素基因与MLST基因的检测:根据在NCBI上查的序列,利用Primer 5.0软件,设计溶血素基因nuc、hla、hlb以及MLST的引物序列,PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

溶血素基因 PCR 条件: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 40 s,49 ℃ 40 s(hla 基因)或 54 ℃ 40 s(hlb 基因),72 ℃ 1 min,30个循环;72 ℃ 10 min。MLST分析的 PCR 条件: 94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 个循环,72 ℃ 10 min。PCR 产物进行琼脂凝胶电泳后成像。

4. MLST分析:通过PCR 扩增金葡菌 arcc、aroe、glpf、gmk、pta、tpi、yqil 七个管家基因,将扩增产物直接送公司纯化和双向测序。测序结果用 Vector NTI suite 6软件进行分析和校对后,将7个管家基因序列进行网上数据库比对,得到每个菌株的等位基因号。将已有的7个基因序列作为参照,使用

表1 金葡菌溶血素及MLST基因引物

	1K I	亚用四倍皿尔及MLSI 圣四月初	
引物	名称	序列(5′~3′)	产物长度 (bp)
溶血素			
nuc	FP	GCGATTGATGGTGATACGGTT	
	RP	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279
hla	FP	AGTTTATAGCGAAGAAGG	
	RP	TTGTTAGGGTCAAGGAAG	447
hlb	FP	GCCAAAGCCGAATCTAAG	
	RP	GCGATATACATCCCATGGC	834
MLST			
arcc	FP	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	456
	RP	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
aroe	FP	ATCGGAAATCCTATTTCACATTC	456
	RP	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	
glpf	FP	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	465
	RP	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
gmk	FP	ATCGTTTTATCGGGACCATC	429
	RP	TCATTAACTACAACGTAATCGTA	
pta	FP	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	474
	RP	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	
tpi	FP	TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA	402
	RP	TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC	
yqil	FP	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	516
	RP	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

DNAStar的MegAlign软件对序列进行分析,并将整理好的序列上传至MLST数据库网站(http://saureus.mlst.net),得到每个等位基因相对应的序号并获得序列型(ST),根据eBURST对ST进行亲缘性分析。

5. 甲氧西林抗性检测和药敏试验:甲氧西林抗性检测采用纸片扩散法,依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)的标准<sup>[3]</sup>,利用苯唑青霉素平板筛选试验进行检测,在平板上有单菌落生长,则判定为苯唑青霉素或甲氧西林抗性阳性。每个菌株重复测定3次,以金葡菌ATCC29213作为质控菌株。药敏试验按CLSI标准,采用琼脂稀释法,制备含相应抗生素系列稀释梯度的MH琼脂平板。抗生素包括青霉素、苯唑西林、庆大霉素、红霉素、去甲万古霉素、四环素、氯霉素、利福平、环丙沙星、氯林可霉素、呋喃妥因。结果判断以抑制细菌生长的最低药物浓度为MIC。

#### 结 果

1. 甲氧西林抗性检测:采用纸片扩散法对210 株菌株进行检测,51株为MRSA(24.3%),包含食品 来源25株(19.7%,25/127)及患者来源26株(31.3%, 26/83)。 2. 肠毒素检测:210株金葡菌中107株为肠毒素阳性(50.9%)。不同年份菌株的肠毒素阳性率分别为2008年54.6%(30/55),2009年42.5%(17/40),2011年57.1%(44/77)和2012年42.1%(16/38),不同年份之间肠毒素阳性率差异无统计学意义(P=0.284)。51株 MRSA中有46株肠毒素阳性(90.2%),其中25株食品来源MRSA有22株阳性(88.0%);26株患者来源MRSA中24株阳性(92.3%),差异无统计学意义(P=0.963)。

#### 3. 溶血素基因分布:

(1) nuc: 210 株菌株经 PCR 扩增均检测到 nuc 基因, 阳性率为 100%。

(2) hla、hlb:根据PCR检测结果,210株菌中198株含有 hla、hlb 中的1~2种基因(94.3%),其中 hla、hlb 同时检出率为31.4%,hla 基因检出率为32.4%,hlb 基因检出率为30.5%(表2)。统计学分析显示,食品来源和患者来源菌株各基因阳性率差异无统计学意义(χ²=2.807,P=0.422)。食品来源的127株菌株中检出溶血素基因120株,检出率为94.5%;83株患者来源菌株中78株检出溶血素基因,检出率为94.0%,见表3。51株 MRSA 检出 hla、hlb 中的1~2种基因,检出率为100%。

表2 马鞍山地区210株MRSA溶血素基因检测

样品 来源		hla+hlb+ (%)				χ²值	P值
食品	127	35(27.6)	42(33.1)	43(33.9)	7(5.5)	2.807	0.422
患者	83	31(37.3)	26(31.3)	21(25.3)	5(6.0)		
合计	210	66(31.4)	68(32.4)	64(30.5)	12(5.7)		

表3 马鞍山地区51株MRSA药敏结果

	食品来源(n=25)		患者来源(n=26)		_
药 物	耐药菌	耐药率	耐药菌	耐药率	P值
	株数	(%)	株数	(%)	
青霉素	24	96.0	26	100.0	0.490
苯唑西林	24	96.0	26	100.0	0.490
庆大霉素	23	92.0	25	96.2	0.610
红霉素	24	96.0	24	92.3	1.000
去甲万古霉素	0	0.0	1	3.8	1.000
四环素	22	88.0	25	96.2	0.350
氯霉素	6	24.0	7	26.9	1.000
利福平	14	56.0	16	61.5	0.779
环丙沙星	21	84.0	23	88.5	0.703
氯林可霉素	20	80.0	22	84.6	0.726
呋喃妥因	1	3.8	1	3.8	1.000

4. MLST: 选取34 株 MRSA 和3 株 MSSA 进行 MLST分析,得到14个等位基因,11个ST,以ST239 为主(43.2%),ST5次之(16.2%),其他型别为散发状

态,分别是ST7(5-4-1-4-4-6-3)为10.8%,ST188(3-1-1-8-1-1-1)为8.1%,ST88(22-1-14-23-12-4-31)为8.1%,其余型别(ST1、97、243、585、630和1281)均为2.7%,见图1。

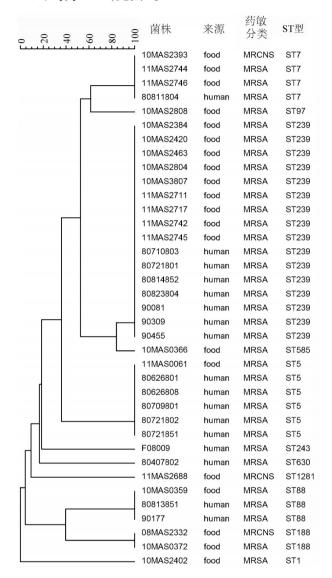
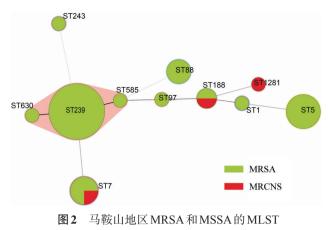


图1 马鞍山地区37株MRSAMLST聚类

菌株的 ST 比较分散,主要以 ST239 为主,占 47.1%(16/34),其次为 ST5,占 17.6%(6/34),这两个主要型别的菌株均为 MRSA。在 ST188、ST1281 和 ST7 三种 ST 的菌株中各有 1 株是耐甲氧西林凝固酶阴性的菌株(MRCNS),其余 34 株菌为 MRSA,见图 2。

17株患者来源菌株有6个ST,以ST239为主要型别(35.3%,6/17),其次为ST5(29.4%,5/17);20株食品来源菌株有9个型别,以ST239为主(45.0%,9/20),其次为ST7(15.0%,3/20)。在几个主要的ST中菌株来源既包括患者来源也包括食品来源,见图3。



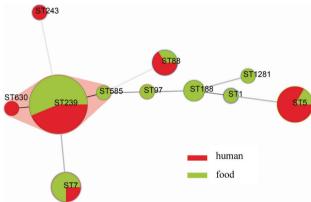


图3 马鞍山地区不同来源金葡菌的MLST

eBURST软件分析显示(图4),ST585、ST239 以及ST630亲缘关系较近,其余ST之间亲缘关系 较远。

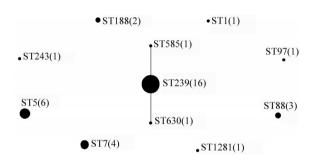


图4 马鞍山地区37株MRSA的eBURST分析

5. 药敏试验:食品和患者来源的菌株对青霉素、苯唑西林、氨苄西林、庆大霉素和红霉素的耐药率最高,均高于90.0%,耐药率较高的为四环素、环丙沙星、氯林可霉素和利福平,均高于50.0%,所有菌株对氯霉素、呋喃妥因和去甲万古霉素有较低的耐药率。食品和患者来源菌株耐药率差异无统计学意义,见表3。

#### 讨 论

金葡菌为人类重要的致病菌之一,能够产生溶

血毒素、肠毒素、杀白细胞素等多种毒力因子,可引起人皮肤软组织感染、肺炎和中毒性休克综合征等一系列感染性疾病,严重危害着人类的健康<sup>[4]</sup>。本研究对210株金葡菌溶血素基因检测,阳性率达94.3%,说明溶血素在该菌中普遍存在。对51株MRSA进行溶血素检测,发现均携带 hla 或 hlb 基因。因本研究菌株数较少,MRSA耐药是否与携带溶血素基因有关,有待进一步研究证实。

近年来,随着抗生素滥用,动物源性MRSA菌株 在全世界范围内已有报道[5]。本研究中20株食品来 源菌株分离自马鞍山地区的禽畜类和水产品,17株 则分离自住院患者。根据37株菌株的MLST结果 可以看出,在这些菌株中,共有11个ST,以ST239为 主要型别,ST5次之。根据20株食品来源菌株的 MLST 进行分析,有9个型别,以ST239为主要型, ST7次之;金葡菌是社区获得性感染和医院内感染 的主要致病菌之一,因此国内外的报道多以分离自 患者的菌株为多见,而对于分离自食品的菌株较 少。本次食品来源菌株以ST239为主要型别。由于 金葡菌也是食源性致病菌,有必要对我国食品中 MRSA的流行情况进行MLST分析,以建立统一的 分子数据库。此外,17株患者来源菌株则分布为6 个型别,也以ST239为主要型,ST5次之。根据我国 相关医院内 MRSA 的流行病学调查发现, ST5 和 ST239型是我国医院感染中最为常见[6]。其中 ST239-MRSA 在阿根廷[7]、印度[8]和中国香港[9]等地 也报道ST239为主要克隆群。而ST5这一克隆在日 本[10]和韩国[11]也是其优势菌群,这些报道都与本研 究结果一致。

从结果中可以看出,11种ST亲缘关系较远,提示不同来源的37株菌存在克隆多样性,34株MRSA 共分为10个ST,以ST239和ST5为优势型别;而3株MSSA分别为ST188、ST1281和ST7,提示ST239和ST5可以作为MRSA鉴定的候选型别。

药敏试验结果显示,51株 MRSA 对青霉素、苯唑西林、氨苄西林的耐药率均高于95%,对庆大霉素、红霉素、四环素的耐药率高于90%,仅对去甲万古霉素、呋喃妥因有较好的敏感性,提示 MRSA 呈多重耐药的情况较为严重。目前,由于抗生素在临床治疗中长期大量使用,致使 MRSA 已经成为医院内及社区获得性感染的主要致病菌,其来源普遍,检出频繁,致病力和耐药性也越来越强。同时,食源性动物中 MRSA 的产生也与抗菌药物在养殖场的广泛应用密切相关,长期低剂量的抗菌药物添加到饮水或

饲料中,可能是导致细菌产生耐药性的主要原因之一<sup>[12]</sup>。因此,临床上应进一步控制和对症使用抗生素治疗MRSA引起的疾病,在养殖业中,应合理规范动物饲料抗生素添加剂的使用,加强抗生素的管理及耐药性的监测,以防止多耐药菌株的产生。

#### 参考文献

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections[J]. N Engl J Med, 1998, 339(8):520–532.
- [2] Su GG, Yu YS, Lin J, et al. Homology analysis of 19 strains of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Epidemiol, 2004,25(12):1084–1085. (in Chinese) 苏关关,俞云松,林洁,等. 19 株甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌的同源性分析[J]. 中华流行病学杂志,2004,25(12):1084–1085
- [3] Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive methicillinresistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States [J]. JAMA, 2007, 298(15):1763-1771.
- [4] Han XL, Liu LS, Li Y, et al. Detection and analysis of food poisoning with *Staphylococcus aureus* enterotoxin A, C[J]. Chin J Epidemiol, 2004, 25(6): 547. (in Chinese) 韩秀兰,柳连顺,李云,等. 一起金黄色葡萄球菌A、C肠毒素引起食品中毒的检测分析[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(6): 547.
- [5] Wang XM, Yao JN, Li BB, et al. Antimicrobial susceptibility and SCCmec typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from swine [J]. Chin J Zoonoses, 2013, 29(9):841–845. (in Chinese)
  - 王雪敏,姚建楠,李蓓蓓,等. 猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药表型及其 SCCmec 基因分型研究[J]. 中国人兽共患病学报,2013,29(9):841-845.

- [6] Zhang W, Shen X, Zhang H, et al. Molecular epidemiological analysis of methicillin-resiseant *Staphylococcus aureus* isolates from Chinese pediatric patients [J]. Clin Microbiol Infect Dis, 2009,12(10):57-69.
- [7] 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]. J Clin Microbiol, 2006, 44(1):192–200.
- [8] Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asia countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(3):1001–1012.
- [9] Ip M, Yung RW, Ng TK, et al. Contenporary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hong Kong[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10):5069–5073.
- [10] Zaraket H, Otsuka T, Saito K, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals in Niigata, Japan: divergence and transmission [J]. Microbiol Immunol, 2007,51(2):171-176.
- [11] Ko KS, Kim YS, Song JH, et al. Genotypic diversity of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* isolates in Korean Hospitals [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8): 3583–3585.
- [12] Dai FW, Ke XF, Zhou SS, et al. The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals [J]. Chin J Compar Med, 2010, 20(7):81–85. (in Chinese) 戴方伟, 柯贤福, 周莎桑, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌在动物流行病学中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20 (7):81–85.

(收稿日期:2014-09-10) (本文编辑:万玉立)

### 读者 · 作者 · 编者

## 中华流行病学杂志 2014年度审稿专家名单

(按姓氏汉语拼音排序,2013-11-01-2014-11-30)

彬 曹卫华 曹晓斌 柴君杰 陈 坤 陈 文 曦 陈东科 陈素良 陈维清 陈裕明 陈园生 崔步云 党少农 董碧蓉 段招军 方美玉 方向华 傅继华 高婷 龚向东 龚震宇 郭建花 郭志荣 海 荣 纳 贺建华 胡 源 胡永华 华琦 还锡萍 黄久仪 贾曼红 姜 垣 蒋秀高 荆春霞 李 李 梁争论 静 进 阚海东 伟 卫 李劲松 李敬云 李立明 李硕颀 李太生 李献云 李秀央 廖苏苏 林 刘 莉 刘 刘 洋 刘爱忠 刘殿武 刘广文 刘列钧 刘忠泉 卢金星 卢亦愚 陆家海 林 玫 鹏 民 吕 繁 吕 吕嘉春 马 军 马 马冠生 马会来 马家奇 马文军 马依彤 门 筠 越 可 米 杰 倪明健 潘凯枫 潘晓红 庞 琳 裴丽君 彭志行 邱洪斌 曲成毅 任爱国 任泽舫 阮玉华 赛晓勇 邵祝军 施榕 施国庆 施小明 时景璞 苏 虹 孙强正 孙照刚 谭红专 汤 哲 汤奋扬 唐 青 唐耀武 田庆宝 汪 宁 汪天平 王蓓 王 岚 王 璐 王 鸣 王 王滨有 王多春 王环宇 王建华 王金桃 王全意 王声湧 薇 王忆军 武 鸣 王素萍 王增珍 王志萍 魏建春 温博海 乌正赉 武阳丰 夏连续 项永兵 肖水源 谢娟 徐勇勇 严 严卫丽 杨泽 徐爱强 许汴利 闫永平 杰 姚应水 殷文武 于普林 余宏杰 余金明 余运贤 曾年华 张国刚 曾哲淳 詹思延 张丽杰 张顺祥 张卫东 张迎修 张之伦 赵方辉 赵根明 赵景波 赵亚双 赵一鸣 郑素华 周晓农 朱 谦 朱益民 庄 辉 庄 勋 祖荣强