

# 2009–2015 年深圳市不同来源样本中金黄色葡萄球菌毒力耐药特征及分子分型研究

袁梦, 黄汉伟, 胡鹏威, 袁月明, 罗锦雁, 朱兵清

深圳市南山区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518054

**摘要:** 目的 研究 2009–2015 年深圳市不同来源样本中金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 携带毒力、耐药基因、耐药表型情况和分子型别研究。方法 2009–2015 年期间, 86 株 SA 分离自医院病人、医院环境涂抹样、食物中毒等样品。PCR 方法检测毒力基因、耐药基因以及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的 SCCmec 基因型, 进行蛋白 A 基因多态性 (single locus DNA-sequencing of the repeat region of the *Staphylococcus* protein A gene, *Spa*) 以及多位点序列分型 (multilocus sequencing typing, MLST) 研究。按照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 方法, 对抗菌药物进行药敏试验。结果 检出 21 种毒力基因, 55 株 (64.0%) 携带 *mecA* 基因。SCCmec 分型结果, III 型为优势型别 (60.0%, 33/55)。86 株 SA 分为 24 种 *Spa* 型, MRSA 菌株 *Spa* 优势型别为 t030 与 t437, 甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌菌株 (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) 的优势型别为 t091 与 t127。86 株 SA 分为 23 种 MLST 型, 形成 3 个克隆复合体 CC239 (27.9%)、CCnew3 (27.9%) 与 CC188 (11.6%)。结论 优势型别为 ST239 (*Spa*-t030)、STnew3 (*Spa*-t437) 具有多药耐药的特征, 且携带多种毒力基因。MRSA 流行株、非流行株与 MSSA 在携带毒力与耐药基因之间均存在差异。需要加强监测 SA 中的优势型别及 MRSA 菌株, 关注其耐药的动态变化。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; PCR; 毒力基因; 耐药基因; 分子分型

中图分类号: R378.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2019)04-0420-07 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.04.010

## Virulence and antibiotic resistance characteristics and molecular typing of *Staphylococcus aureus* in samples from various sources in Shenzhen City, 2009–2015

YUAN Meng, HUANG Han-wei, HU Peng-wei, YUAN Yue-ming, LUO Jin-yan, ZHU Bing-qing

Nanshan District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518054, China

**Abstract:** **Objective** To study the virulence genes, drug-resistant genes, antibiotic resistance phenotype and molecular typing of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in samples from various sources in Shenzhen City during 2009–2015. **Methods** Eighty-six strains of *S. aureus* were isolated from specimens collected from hospital patients, nosocomial environment and food poisoning cases in Shenzhen City from 2009 to 2015. Polymerase chain reaction (PCR) assay was used to detect virulence genes, antibiotic resistant genes and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) types in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Staphylococcus* protein A gene (*Spa*) typing and multilocus sequencing typing (MLST) were performed. Antibiotic susceptibilities were determined with Kirby-Bauer disk diffusion method according to the criteria of Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). **Results** Twenty-one virulence genes were detected, and 55 (64.0%) strains carried *mecA* gene. SCCmec typing showed that type III was the preponderant type (60.0%, 33/55). 24 *Spa* types were identified in the 86 strains of *S. aureus*. t030 and t437 were the predominant *Spa* types in MRSA strains, while t091 and t127 the predominant *Spa* types in methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) strains. 23 different MLST sequence types were identified among the 86 strains of *S. aureus*. MLST analysis found 3 clonal complexes (CCs), including CC239 (27.9%), CCnew3 (27.9%) and CC188 (11.6%). **Conclusions** ST239 (*Spa*-t030) and STnew3 (*Spa*-t437) are the most prevalent *Spa* and MLST types among all the strains, which are resistant to many kinds of antibiotics and carry many virulence genes. There exist differences in carrying virulence and antibiotic resistance genes between epidemic/non-epidemic MRSA clones and MSSA isolates. It is necessary to intensify the supervision on the predominant *Spa* types in *S. aureus* strains and MRSA strains and pay attention to their dynamic changes in drug resistance.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; polymerase chain reaction; virulence gene; drug-resistant gene; molecular typing

**基金项目:** 深圳市“医疗卫生三名工程”引进高层次医学团队项目 (SZSM201803081); 广东省医学科研基因项目 (B2015028); 南山区科技创新局项目 (2014004)

**作者简介:** 袁梦 (1979–), 女, 广东东莞人, 硕士, 主任技师, 研究方向: 病原微生物学。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 作为全世界最重要的病原菌之一, 在过去几十年中迅速增多<sup>[1]</sup>。在我国, 1980–2008 年期间, 临床 MRSA 分离率从 20% 递增至 60%<sup>[2]</sup>。本研究对 SA 的 16 种抗菌药物以及 14 种耐

药基因进行检测,掌握 SA 的耐药谱以及耐药基因的携带情况以及两者之间的关联度。按照携带 *mecA* 基因是 MRSA 耐  $\beta$  内酰胺类抗菌药物的主要原因之一<sup>[3]</sup>,是甲氧西林耐药性的遗传决定子<sup>[4]</sup>。*mecA* 基因存在于一个具有移动能力的外来 DNA 片段上,该片段被命名为 SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*),是 MRSA 多重耐药性产生的重要遗传学基础<sup>[5]</sup>,因此对携带 *mecA* 基因的 MRSA 进一步进行 SCC*mec* 分型,掌握优势型别。SA 产生的外毒素与致病性高度相关,检测毒素基因,掌握不同样本的分布情况。

*Spa* 分型通过对编码 SA 的毒力因子表面蛋白 A 扩增测序,此方法简单、重复性好、易操作,结果利于国际及国内数据比较<sup>[6-7]</sup>。多位点序列分子分型 (multi-locus sequencing typing, MLST) 是一种通过直接测定多个管家基因的核苷酸序列,发现细菌变异的分型方法<sup>[8]</sup>,由于可以准确记录细菌基因水平上的变异,并且序列可通过互联网方便传递,故 MLST 被用于研究细菌的流行病学、致病性和进化学<sup>[9]</sup>。本研究采用两种分子分型方法分析深圳市南山区外环境与病人株的分子型别,掌握 *Spa* 与 MLST 优势型别以及各型别携带耐药基因、毒素基因以及 SCC*mec* 的分型情况,为疾病溯源提供科学依据。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 菌株分离自 2009-2015 年期间医院病人样、医院环境涂抹样、食物中毒等样品 (涂抹样、食品、病人),共 86 株菌。

1.2 主要仪器与试剂 全自动微生物分析鉴定仪 (法国梅里埃公司);PCR 仪 (美国 life Proflex);电泳仪 (Major Science);凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)。GP 生化鉴定卡 (法国梅里埃公司);药敏纸片 (北京三药科技开发公司);PCR 相关试剂 (大连宝生物工程有限公司);PCR 引物合成 (上海生工生物有限公司);PCR 产物测序 (上海英潍捷基贸易有限公司);DNA 提取试剂盒 (美国 Qiagen 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 菌株的分离鉴定 所有菌株按照 GB 15982-2012 分离鉴定。

#### 1.3.2 引物设计与合成

1.3.2.1 耐药基因 喹诺酮类 (*grrA*、*grrB*、*gyrA*、*gyrB*)、氨基糖苷类 (*aacA*-aphD)、红霉素类 (*ermA*、*ermB*、*ermC*)、 $\beta$ -内酰胺类 (*mecA*、*blaZ*)、利福平类 (*rpoB*)、四环素类 (*tetK*、*tetM*)、糖肽类 (*vanA*),见参考

文献<sup>[10-13]</sup>。

1.3.2.2 毒素基因 肠毒素基因 (SEA、SEB、mpSEC、SED、SEE、SEG、SHE、SEI、mpSEJ、mpSEN、mpSEO、mpSEM),中毒性休克综合征毒素基因 (TST),表皮剥脱素基因 (mpETA、mpETB),白细胞毒素基因 (PVL、LUKDE、LUKM),溶血素基因 (HLA、HLB、HLD、mpHLG1、mpHLG2),分化抑制因子 (EDIN),见参考文献<sup>[14]</sup>。

1.3.2.3 分子分型基因 SCC*mec* 分型基因 (Type I、Type II、Type III、Type IV、Type V),见参考文献<sup>[15]</sup>; *Spa* 分型引物序列见网址 <http://www.spaserver.ridom.de/><sup>[16]</sup>; MLST 分型 7 种管家基因 (*arc*、*aroE*、*glpF*、*gmK*、*pta*、*tpi*、*yqjI*) 见网址 (<http://saureus.mlst.net/>)。以上基因引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.3.3 模板 DNA 制备 吸取 1 ml 经 18~24 h 培养的液体培养基,离心 7 500 rpm,10 min,去上清,加入 180  $\mu$ l 溶菌酶 (200  $\mu$ g/ml) 重悬沉淀,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min;加入 20  $\mu$ l 蛋白酶 K 与 200  $\mu$ l ATL,剧烈震荡,56  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,95  $^{\circ}$ C 孵育 15 min,离心几秒,加入 200  $\mu$ l 无水乙醇,脉冲震荡 15 s,短暂离心,加入柱子,离心 8 000 rpm,1 min,分别加入缓冲液 AW1 和 AW2 冲洗柱子,最后离心 14 000 rpm,3 min,加入 200  $\mu$ l AE,离心 8 000 rpm,1 min 洗脱柱子,最后为 DNA 模板。

1.3.4 药敏试验 采用 16 种抗菌药物按照 CLSI 方法进行。16 种抗菌药物分别为四环素 (tetracycline, TE)、利福平 (rifampicin, RA)、替考拉宁 (teicoplanin, TCL)、万古霉素 (vancomycin, VA)、左氧氟沙星 (levofloxacin, LVF)、氧氟沙星 (ofloxacin, OFL)、环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP)、妥布霉素 (tobramycin, TM)、庆大霉素 (gentamicin, GM)、头孢噻肟 (cefotaxime, CTX)、苯唑西林 (oxacillin, OX)、青霉素 (penicillin, P)、红霉素 (erythromycin, E)、米诺环素 (minocycline, MNO)、氯霉素 (chloramphenicol, C)、克林霉素 (clindamycin, CM)。

1.3.5 PCR 检测五大类 24 种毒力基因 扩增体系:10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ l;10 mM dNTPs 2.0  $\mu$ l;10  $\mu$ M 毒力基因上下游引物各 1.0  $\mu$ l;Taq 酶 (5 u/ $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l;50 ng DNA 模板 5  $\mu$ l,总体积 25  $\mu$ l。扩增条件:预变性 94  $^{\circ}$ C 5 min;变性 94  $^{\circ}$ C 1 min,退火 55  $^{\circ}$ C 1 min,延伸 72  $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;最后延伸为 72  $^{\circ}$ C 10 min<sup>[14]</sup>。

1.3.6 PCR 检测七大类 14 种耐药基因 方法见参考文献<sup>[11-14]</sup>。

1.3.7 SCC*mec* 基因型分型 方法见参考文献<sup>[15]</sup>。

1.3.8 *Spa* 分型 方法见参考文献网址 (<http://www.spaserver.ridom.de/>)<sup>[16]</sup>。

1.3.9 MLST 分型 方法见网址 (<http://saureus.mlst.net/>)。

1.3.10 蛋白 A 基因 PCR 产物测序,测序结果上传 *Spa* 数据库。MLST 七种管家基因产物测序,测序结果上传 MLST 数据库。克隆群分析,运用 Bionumerics 软件确定不同的克隆群 (clonal complexes, CCs),7 个位点中有 5 个相同的,认为是同一克隆群<sup>[17]</sup>。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 对数据进行统计分析。率的比较采用  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$  (双侧)。

2 结果

2.1 *mecA* 基因检出情况 86 株菌,55 株携带 *mecA* 基因,检出率为 64.0%。

2.2 24 种毒力基因检出情况 86 株 SA 检测 24 种毒力基因,共检出 21 种毒力基因,3 种毒力基因 (SEE、LUKM、EDIN) 未检出。21 种毒力基因检出率见图 1。检出率大于 60.0% 以上的毒力基因有 LUKDE、SHE、mpHLG2、HLD、HLA。18 株 (20.9%) 携带 PVL 基因,均为 MRSA 株,其中 11 株为 STnew3 型别,4 株 ST239、ST88、ST938、ST59 各 1 株,分别分离自痰 (5 株)、脓液、伤口分泌物 (各 3 株)、穿刺液、血液 (各 2 株)、活检组织块、胸水、咽拭子 (各 1 株)。

2.3 MRSA 流行株、非流行株与 MSSA 株携带毒力基因之间的关系 在本研究中将 MRSA 株的 MLST 优势型别 ST239 与 STnew3 定义为流行株,其余为散在型别定义为 MRSA 非流行株。以下毒力基因 SEB、SEG、SEH、mpSEJ、mpSEN、mpSEO、mpSEM、mpETB、HLB 在 MRSA 流行株、非流行株与 MSSA 株携带之间差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。SEG、mpSEJ、mpSEN、mpSEM 毒力基因在 MRSA 流行株中均未检出,在非流行株与 MSSA 株中检出较高;SEB 在 MRSA 流行株的检出率

高于其余两种;SEH 在 MRSA 非流行株里的检出率高于其余两种;mpSEO 在 MRSA 流行株的检出率低于其余两种;mpETB 仅在 MSSA 株中检出;HLB 在 MRSA 流行株的检出率高于其余两种。见图 2。

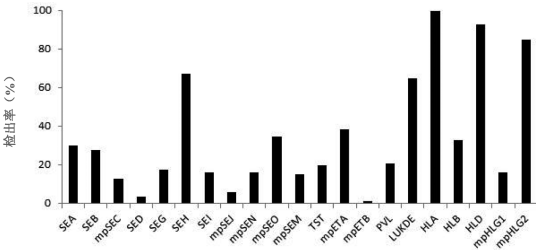


图 1 21 种毒力基因检出率

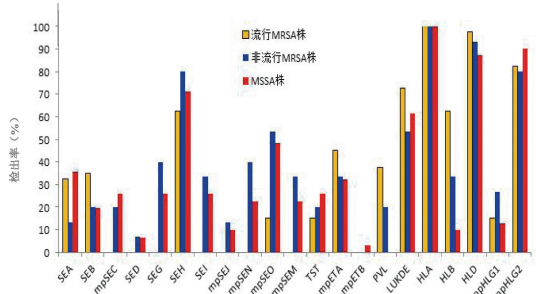


图 2 MRSA 流行株、非流行株与 MSSA 株携带毒力基因之间的关系

2.4 *Spa* 分型结果 86 株 SA 分为 24 种 *Spa* 型,55 株 MRSA 包含 16 种 *Spa* 型,31 株 MSSA 包含 14 种 *Spa* 型,在 MRSA 与 MSSA 种均存在 6 种 *Spa* 型 (t091、t528、t116、t030、t1081、t437)。t030 与 t437 为优势型别,检出率分别为 20.9% (18/86) 与 25.6% (22/86)。MRSA 株中,*Spa* 的优势型别为 t030 与 t437,菌株均分离自病人,检出率分别为 30.9% (17/55) 与 36.4% (20/55)。MSSA 株中,*Spa* 的优势型别为 t091 与 t127,菌株分离自医护人员双手涂抹样、食品 and 食物中毒患者,仅一株来源于病人 (t091) 检出率分别为 25.8% (8/31) 与 22.6% (7/31)。MRSA 株与 MSSA 株 *Spa* 优势型别的抗菌药物耐药谱与毒力基因谱以及样本来源,见表 1。

表 1 *Spa* 优势型别的抗菌药物耐药谱与毒力基因谱在 MRSA 株与 MSSA 株的分布情况

MRSA 或 MSSA <i>Spa</i> 型别			株数	耐药基因谱(株数)	毒力基因谱(株数)	样本来源(株数)
MRSA	t030	17	TE(6)、RA(17)、LVF(17)、OFL(17)、CIP(17)、TM(17)、GM(15)、CTX(17)、OX(17)、P(17)、E(7)、MNO(4)	SEA(11)、SEH(11)、mpSEO(1)、TST(3)、mpETA(7)、PVL(3)、LUKDE(17)、HLA(17)、HLD(16)、mpHLG1(3)、mpHLG(14)	咽拭子(3)、痰(12)、尿液(2)	
	t437	20	TE(8)、RA(1)、TCL(1)、LVF(1)、OFL(1)、CIP(4)、GM(1)、CTX(20)、OX(20)、P(20);E(17);C(6)、CM(17)	SEA(1)、SEB(15)、SEH(14)、mpSEO(3)、TST(1)、mpETA(8)、PVL(10)、LUKDE(8)、HLA(20)、HLB(19)、HLD(20)、mpHLG1(1)、mpHLG(18)	穿刺液(1)、粪便(1)、活检组织(1)、脓液(2)、伤口分泌物(5)、痰(6)、血液(3)、咽拭子(1)	
	t037	5	TE(5)、LVF(5)、OFL(5)、CIP(5)、TM(5)、GM(5)、CTX(5)、OX(5)、P(5)、E(5)、MNO(5)、C(1)、CM(5)	SEA(1)、SEH(1)、mpSEO(2)、TST(2)、mp-ETA(2)、PVL(1)、LUKDE(5)、HLA(5)、HLD(4)、mpHLG1((2)、mpHLG2(3)	痰(5)	

续表 1

MRSA 或 MSSA	Spa 型别	株数	耐药基因谱(株数)	毒力基因谱(株数)	样本来源(株数)
MSSA	t091	7	TE(5)、TCL(2)、LVF(1)、CIP(2)、TM(5)、OX(6)、P(7)、E(3)、CM(3)	SEA(2)、SEG(1)、SEH(5)、SEI(1)、mpSEN(1)、mpSEO(2)、mpSEM(1)、TST(1)、mpETA(1)、LUKDE(6)、HLA(7)、HLD(6)、mpHLG2(7)	食品(2)、肛肠拭子(2)、双手涂抹样(3)
	t127	7	TE(1)、LVF(3)、OFL(3)、CIP(4)、OX(2)、P(7)、E(6)、CM(6)	SEA(7)、mpSEC(4)、SEH(7)、mpSEO(2)、TST(3)、mpETA(3)、LUKDE(4)、HLA(7)、HLD(7)、mpHLG(7)	食品(3)、肛肠拭子(4)
	t189	3	OFL(1)、CIP(1)、CTX(3)、OX(3)、P(3)、E(2)、CM(1)	SEA(1)、SEB(2)、SEH(2)、mpSEJ(1)、mpSEO(2)、TST(1)、mpETA(1)、PVL(10)、LUKDE(1)、HLA(3)、HLB(1)、HLD(2)、mpHLG1(1)、mpHLG(2)	食品(1)、肛肠拭子(1)、台面涂抹样(1)

2.5 MLST 分型结果 86 株 SA 分为 23 种 MLST 型, 其中 ST239 与 STnew3 为优势型别, 检出率分别为 25.6%(22/86) 与 24.2%(21/86)。经克隆复合体分析, 采用 Bionumerics 软件分析得到 3 个不同的 CCs, 见图 3。CC239(包括 ST239、STnew2、ST630)、CCnew3(包括 STnew3、ST59、STnew4)、CC188(ST1047、ST1), 所占比例分别为 27.9%、27.9%、11.6%。不能形成 CCs 的 STs 称为独特型。

2.6 三大克隆群 MLST 型别中不同 Spa、SCCmec 型别以及毒力基因谱 对 MRSA 菌株, 根据 MLST 分型克隆分类, 三大克隆群的具体 MLST 型别, 以及相对应的 Spa 型别、SCCmec 型别、毒力基因谱, 见表 2。CC239 与 CCnew2 两大克隆系中, 除了 STnew2、ST630 携带较少的毒力基因外, 其余型别均携带 5 种以上毒力基因。SCCmec 分型结果, III 型检出 33 株, 占 60.0%(33/55), 为优势型别; IV 型检出 18 株, 占 33.0%(18/55), V 型检出 2 株, 占 4.0%(2/55), 2 株未分型, 占 4.0%(2/55)。III 型包括 22 株 ST239、9 株 STnew3、1 株 STnew2、1 株 1936, IV 型包括 11 株 STnew3、3 株 ST45、2 株 ST59、1 株 STnew4、1 株 ST938。

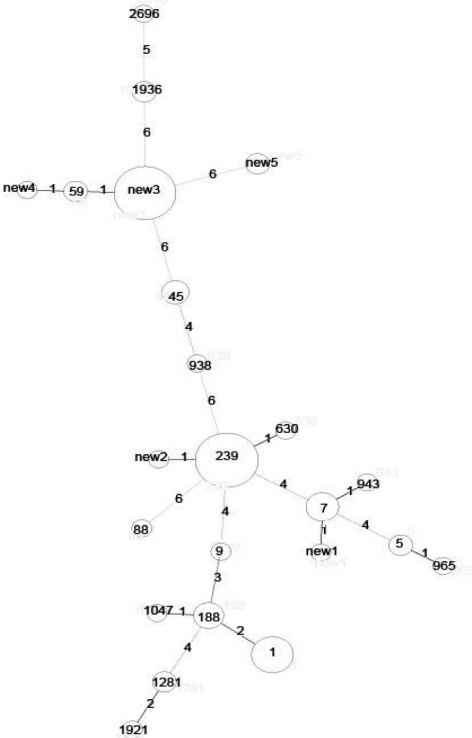


图3 86 株 SA 菌最小生成树进化溯源图

表 2 MRSA 株在不同克隆群 Spa 型别、SCCmec 型别、毒力基因谱的分布情况

MLST 克隆群	MLST 型别	株数	MLST 等位基因谱	Spa 型别	SCCmec 型别(株数)	毒力基因谱
CC239	ST239	18	2-3-1-1-4-4-3	t030	III	SEA(11)、SEH(11)、mpSEO(1)、TST(3)、mpETA(7)、PVL(3)、LUKDE(18)、HLA(18)、HLB(5)、HLD(18)、mpHLG1(3)、mpHLG2(15)
		4	2-3-1-1-4-4-3	t037	III	SEA(1)、SEH(1)、mpSEO(2)、TST(2)、mpETA(2)、PVL(1)、LUKDE(4)、HLA(4)、HLB(2)、HLD(4)、mpHLG1(2)、mpHLG2(2)
	STnew2	1	2-3-1-185-4-4-3	t037	III	LUKDE、HLA、mpHLG2
	ST630	1	12-3-1-1-4-4-3	t4549	V	HLA、HLB、HLD、mpHLG2
CCnew3	STnew3	18	19-23-15-6-19-20-15	t437	IV(11)、III(7)	SEA(1)、SEB(13)、SEH(13)、mpSEO(3)、TST(1)、mpETA(8)、PVL(9)、LUKDE(7)、HLA(18)、HLB(17)、HLD(18)、mpHLG1(1)、mpHLG2(16)



续表 2

MLST 克隆群	MLST 型别	株数	MLST 等位基因谱	Spa 型别	SCCmec 型别(株数)	毒力基因谱
CC188		1	19-23-15-6-19-20-15	t1380	Ⅲ	SEB, SEH, mpETA, PVL, HLA, HLB, HLD, mpHLG2
		1	19-23-15-6-19-20-15	t3485	Ⅲ	SEB, PVL, LUKDE, HLA, HLB, HLD, mpHLG2
	ST59	2	19-23-15-2-19-20-15	t437	Ⅳ	SEB(2), SEH(2), PVL(1), LUKDE(1), HLA(2), HLB(2), HLD(2), mpHLG2(2)
	STnew4	1	19-23-15-19-19-20-15	t437	Ⅳ	SEB, HLA, HLB, HLD, mpHLG2
	ST1047	1	10-1-1-8-1-1-1	t1081	V	SEH, mpETA, LUKDE, HLA, HLD, mpHLG2
	ST1	2	1-1-1-1-1-1-1	t114	NT	mpSEO(2), SHE(2), mpSEJ(1), mpSEO(2), TST(1), mpETA(1), LUKDE(1), HLA(2), HLD(2), mpHLG2(16)

2.7 MRSA 流行株、非流行株与 MSSA 株耐药之间的关系 以下抗菌药物:RA、LVF、OFL、TM、GM、CTX、OX、MNO 在三者耐药之间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。MRSA 流行株 LVF、OFL、TM、GM 四种抗菌药物的耐药率高于 MRSA 非流行株与 MSSA 株;MRSA 非流行株 RA 的耐药率高于 MRSA 流行株与 MSSA 株;MRSA 流行株与非流行株 CTX 与 OX 的耐药率均高于 MSSA 株;MRSA 流行株对于 MNO 完全敏感,MRSA 非流行株 MNO 耐药高于 MSSA 株。见图 4。

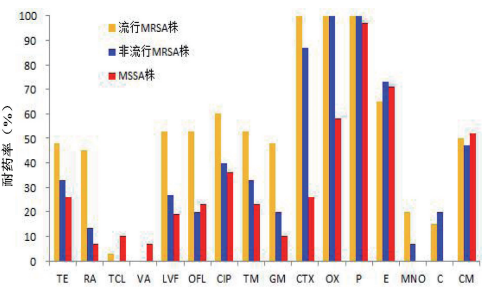


图 4 MRSA 流行株、非流行株与 MSSA 株耐药之间的关系

3 讨论

本研究对 SA 的 24 个毒力基因进行检测,检出 21 种毒力基因。结果表明,5 种毒力基因的检出率大于 60.0%。PVL 基因与 SA 所致的多种疾病有关,因此对 SA 菌株检测 PVL 基因意义重大<sup>[18]</sup>。18 株菌(20.9%)携带 PVL 基因,均为 MRSA 株仅存在病人株中,抗菌药物耐药谱广(大于 13 种抗菌药物耐药),携带毒力基因谱广(大于 11 种毒力基因的携带)。本研究 MRSA 菌株 PVL 基因的检出率明显高于 MSSA 株与文献报道类似<sup>[19]</sup>。携带 PVL 毒素基因的型别主要为 STnew3(11, 14.0%),亦为本研究的 MLST 分型的优势型别,且样本分布范围广和复杂。因其易感性增加,易传播,医院尤其需加强感染防控措施。其它 9 种毒力基因的携带情况在 MRSA 流行株、非流行株与 MSSA 菌株间存在差异,MRSA 流行株里除了 SEB 这类肠毒素基因检出率较高外,其余存在差异的肠毒素基因未检出,也说明不同来源菌株因携带毒力基因的

差异而所致疾病也存在差异。食物中毒株 mpSEC、mpSEJ 与 mpSEO 三种肠毒素携带率较高,说明肠毒素与致食物中毒关系密切,与报道相符<sup>[20]</sup>。MRSA 携带肠毒素基因普遍低于 MSSA,与报道相符<sup>[21]</sup>。溶血素基因 HLA 与 HLD 携带率分别为 100.0%与 93.0%为本研究中毒力基因携带率较高的基因,普遍分布于 SA 中与多处文献报道一致<sup>[22-23]</sup>。

本研究采用 Spa 分型方法将 86 株菌分为 24 种 Spa 型,Spa-t030 与 Spa-t437 型为本研究的优势型别,Spa-t030 与文献报道的该型别为我国的主要的流行克隆型别之一的结果一致<sup>[6, 24]</sup>。有研究表明 Spa-t437 为社区获得性感染和住院患者最主要的克隆株<sup>[25-26]</sup>,与本研究结果一致。

MRSA 菌株里,前三的 Spa 型别分别为 Spa-t030、Spa-t437 与 Spa-t037,检出率分别为 19.8%、23.3%、5.8%。Spa-t030 型别的菌株对 8 种抗菌药物(RA、LVF、OFL、CIP、TM、CTX、OX、P)完全耐药,6 种毒力基因 SEA、SEH、LUKDE、HLA、HLD、mpHLG 检出率较高,本研究证实 Spa-t030 型检出率高于 Spa-t037 型别,与文献报道的 Spa-t030 型慢慢取代 Spa-t037 型,成为优势型别一致<sup>[27]</sup>。Spa-t437 型别的菌株对 3 种抗菌药物(CTX、OX、P)完全耐药,对 2 种抗菌药物(E、CM)耐药率较高(85%),9 种毒力基因 SEB、SEH、mpETA、PVL、LUKDE、HLA、HLB、HLD、mpHLG 检出率较高。文献报道,SA 中的 Spa-t437 型别为社区里皮肤或者软组织感染的主要相关型别,无论是在 MRSA 株还是 MSSA 株里都有较高的流行<sup>[28]</sup>。本研究与文献报道相符,Spa-t437 也为 MASR 株的优势型别,在 MSSA 株里也检出 2 株。样本来源均为病人分离株,类型较为复杂,抗菌药物耐药率高,几大类毒素基因:肠毒素类、表皮剥脱素类、白细胞毒素类、溶血素类毒力基因检出率高。Spa-t037 仅在 MRSA 株里检出,检出率(5.8%)虽然不及 Spa-t030 与 Spa-t437 型,但对 11 种抗菌药物完全耐药,也需引起重视。MSSA 前三的型别分别为 Spa-t091、Spa-t127 与 Spa-t189,检出

率分别为 8.1%、8.1%、3.5%。菌株主要分离自食物中毒样中的食品与肛拭子、医院的台面与双手涂抹样。有文献报道, *Spa*-t091 型为中国 MSSA 株中流行的主要型别<sup>[29]</sup>。*Spa*-t189 型在马来西亚和中国的 MSSA 株中也占优势<sup>[30-31]</sup>, 与本研究的内容一致。从表 1 可以看出无论是 MRSA 还是 MSSA 株耐药基因谱与携带毒力基因谱均较广。

本研究应用 MLST 分型方法结合 Bionumerics 软件进行克隆溯源分析。克隆分析结果, 主要有两大克隆群: CC239 与 CCnew3。CC239 里包含 3 种 MLST 型别共 24 株菌, ST239 为 MLST 分型里优势型别, 占 25.6% (22/86), 毒力基因携带较多, SCCmec 型别以 III 型为主。CCnew3 里包含 3 种 MLST 型别, 共 23 株菌, STnew3 为 MLST 分型里的优势型别, 占 23.3% (20/86), 毒力基因携带较多, SCCmec 型别为 III 型和 IV 型。SCCmec 分型结果显示, *Spa* 分型的优势型别 *Spa*-t030、*Spa*-t437 与 III 型相关, 有报道表明<sup>[32]</sup>, 此型别主要为医院多重耐药的 MRSA 菌株。20 株 *Spa*-t437 型 MRSA 菌株, 其中 13 株为 IV 型, 该型别在亚洲很多国家中为社区流行的 MRSA 菌株并且对红霉素与克林霉素高度耐药<sup>[33]</sup>。本研究中, *Spa*-t437 型别对红霉素与克林霉素的耐药率高达 85% (17/20)。有报道指出<sup>[34]</sup>, ST59-MRSA-IV 为上海地区的主要流行型别, 本研究中, ST59 属于 CCnew3 克隆群中, 亦为优势型别。

本研究中共有 55 株 MRSA, 31 株 MSSA。MRSA 株中, 通过 MLST 分型, ST239 与 STnew3 为优势型别, 分别占 25.6% 与 23.3% 为本研究的流行株, 其余散在型别为非流行株。将三种类型的菌株耐药进行比较, 三种类型的菌株对 8 种抗菌药物耐药的耐药率之间比较有差异, MRSA 流行株比 MRSA 非流行株以及 MSSA 株耐药率高, MRSA 流行株与非流行型株对 VA 完全敏感; MRSA 流行株对 TCL 较为敏感; MRSA 非流行株对 VA 完全敏感; MSSA 对 C 完全敏感。因此需要加强 MRSA 株的耐药动态监测。

本研究中, *Spa* 分型与 MLST 分型优势型别大部分存在交叉, 两种型别分型各有优势。优势型别存在高耐药, 携带毒力基因多的特点, 如何有效的加强防控, 定期对不同来源样本分离菌株做耐药、毒力基因检测及分子分型, 及时了解菌株耐药特征谱以及遗传特征是否改变, 建立数据库, 为疾病溯源、避免院内感染有着重要意义。

#### 参考文献

[1] Grundmann H, Aires-De-Sousa M, Boyce J, et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-

- health threat[J]. Lancet, 2006, 368(9538): 874-885.
- [2] Xiao YH, Giske CG, Wei ZQ, et al. Epidemiology and characteristics of antimicrobial resistance in China[J]. Drug Resist Updat, 2011, 14(4-5): 236-250.
- [3] 姜爱英, 应俊, 管瑜, 等. 临床分离的金黄色葡萄球菌 *mecA* 和 *qacA/B* 基因检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(9): 1212-1215.
- [4] 邵冬华, 孙立颖, 严岩, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性, SCCmec 分型及毒素基因的检测[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(4): 468-471.
- [5] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Trends Microbiol, 2001, 9(10): 486-493.
- [6] 邹自英, 韩黎, 熊杰, 等. 金黄色葡萄球菌临床分离株 *Spa* 分型和耐药特征研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(2): 142-145.
- [7] Strommenger B, Braulke C, Heuck D, et al. *Spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 574-581.
- [8] 张少敏, 徐建国. 多位点序列分型及其应用[J]. 疾病监测, 2008, 23(10): 648-650.
- [9] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [10] Aubry-Damon H, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(10): 2590-2594.
- [11] Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4089-4094.
- [12] Choi SM, Kim SH, Kim HJ, et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species [J]. J Korean Med Sci, 2003, 18(5): 631-636.
- [13] O'Neill AJ, Larsen AR, Henriksen AS, et al. A fusidic acid-resistant epidemic strain of *Staphylococcus aureus* carries the fusB determinant, whereas fusA mutations are prevalent in other resistant isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3594-3597.
- [14] Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease [J]. Infect Immun, 2002, 70(2): 631-641.
- [15] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 5026-5033.
- [16] Votintseva AA, Fung R, Miller RR, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (*Spa*) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire [J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 63.
- [17] Cholley P, Ka R, Guyeux C, et al. Population structure of clinical *Pseudomonas aeruginosa* from West and Central African countries [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107008.
- [18] 祝进, 陆军, 余旭良, 等. 不同来源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌毒力基因的研究 [J]. 检验医学, 2012, 27(6): 475-478.
- [19] Martinez-Aguilar G, Avalos-Mishaan A, Hultén K, et al. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children [J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(8): 701-706.
- [20] 张健, 陈惠玲, 邓志爱, 等. 广州市食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及耐药分析 [J]. 实用预防医学, 2018, 25(4): 398-400.
- [21] 王俊瑞, 杜小莉, 塔拉, 等. 甲氧西林耐药/敏感金黄色葡萄球菌基因分型和毒力基因检测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(1): 70-75.
- [22] Shukla SK, Karow ME, Brady JM, et al. Virulence genes and genotypic associations in nasal carriage, community-associated methicillin-susceptible and methicillin-resistant USA400 *Staphylococcus aureus* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3582-3592.
- [23] Kateete DP, Namazzi S, Okee M, et al. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the surgical units of Mulago hospital in Kampala, Uganda [J]. BMC Res Notes, 2011, 4: 326-330.
- [24] Chen Y, Liu Z, Duo L, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* from distinct geographic locations in China: an increasing prevalence of *Spa*-t030 and SCCmec type III [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e96255.

# 济南市手足口病重症病例危险因素病例对照研究

常彩云, 许华茹, 徐淑慧, 关恒云, 王春荣, 成洪旗

济南市疾病预防控制中心, 山东 济南 250021

**摘要:** **目的** 探讨济南市手足口病重症病例发病的危险因素, 为早期识别重症病例, 降低手足口病重症病例的发生提供科学依据。 **方法** 采用病例对照研究方法, 病例组为 86 例手足口病重症病例, 对照组为 86 例手足口病轻症病例, 用问卷调查收集病例组和对照组的社会人口学特征、接触史、就诊史、临床症状、实验室诊断等信息, 对重症病例危险因素分析采用单因素和多因素非条件 logistic 回归分析。 **结果** 单因素结果显示发病到就诊日期、初诊单位类型为村级、患儿出现发热、足部皮疹、口腔疱疹、臀部皮疹、咳嗽、呕吐、有病例接触史、EV71 阳性在两组间差异有统计学意义。多因素非条件 Logistic 回归分析结果显示, 患儿出现发热 ( $OR=89.38$ )、口腔疱疹 ( $OR=22.28$ )、臀部皮疹 ( $OR=234.81$ )、呕吐 ( $OR=23.90$ )、有病例接触史 ( $OR=31.48$ ) 和 EV71 阳性 ( $OR=71.65$ ) 是手足口病重症病例发病的危险因素。 **结论** 早期识别发热、口腔疱疹、臀部皮疹、呕吐等症状的患儿, 对降低手足口病重症病例的发生具有一定的参考意义。提高 EV71 手足口病疫苗的接种率, 可降低由 EV71 导致的重症手足口病病例的发生率。

**关键词:** 手足口病; 重症病例; 危险因素; EV71 阳性; 病例对照研究

中图分类号: R512.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2019)04-0426-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.04.011

## Risk factors of severe cases of hand, foot and mouth disease in Jinan City: a case-control study

CHANG Cai-yun, XU Hua-ru, XU Shu-hui, GUAN Heng-yun, WANG Chun-rong, CHENG Hong-qi

Jinan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jinan, Shandong 250021, China

Corresponding author: CHENG Hong-qi, E-mail: hqcheng1966@163.com

**Abstract:** **Objective** To explore the risk factors of severe cases of hand, foot and mouth disease (HFMD) in Jinan city so as to provide a scientific basis for early identifying the severe cases and reducing the incidence of severe HFMD. **Methods** A case-control study was conducted in 86 severe HFMD cases (the severe HFMD group) and 86 mild HFMD cases (the control group). A questionnaire survey was performed to collect their socio-demographic characteristics, contact history, history of treatment, clinical symptoms, laboratory diagnosis and other information. Single factor and multi-factor unconditional logistic regression analyses were performed to identify the risk factors of the severe HFMD cases. **Results** Single-factor logistic regression analysis

**基金项目:** 济南市卫生局科技计划项目 (2013-34)

**作者简介:** 常彩云 (1981-), 女, 山东人, 硕士, 主要从事传染病预防与控制研究工作。

**通信作者:** 成洪旗, E-mail: hqcheng1966@163.com。

- [25] Geng W, Yang Y, Wu D, et al. Molecular characteristics of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 58(3): 356-362.
- [26] 李克诚, 李琼, 夏菲, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *Spa* 基因分型[J]. 疾病监测, 2012, 27(11): 877-880.
- [27] Li H, Zhao C, Chen H, et al. Identification of gene clusters associated with host adaptation and antibiotic resistance in Chinese *Staphylococcus aureus* isolates by microarray-based comparative genomics[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53341.
- [28] Geng W, Yang Y, Wang C, et al. Skin and soft tissue infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among children in China[J]. Acta Paediatr, 2010, 99(4): 575-580.
- [29] He WQ, Chen HB, Zhao CJ, et al. Population structure and characterization of *Staphylococcus aureus* from bacteraemia at multiple hospitals in China; association between antimicrobial resistance, toxin genes and genotypes[J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(3): 211-219.
- [30] Yu F, Li T, Huang X, et al. Virulence gene profiling and molecular characterization of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 74(4): 363-368.
- [31] Ghazemzadeh-Moghaddam H, Ghaznavi-Rad E, Sekawi Z, et al. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from clinical and community sources are genetically diverse[J]. Int J Med Microbiol, 2011, 301(4): 347-353.
- [32] Xu BL, Zhang G, Ye HF, et al. Predominance of the Hungarian clone (ST 239-III) among hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered throughout mainland China[J]. J Hosp Infect, 2009, 71(3): 245-255.
- [33] Song JH, Hsueh PR, Chung DR, et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries; an ANSORP study[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(5): 1061-1069.
- [34] Wang X, Li X, Liu W, et al. Molecular characteristic and virulence gene profiles of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from pediatric patients in Shanghai, China[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1818.

收稿日期: 2018-06-07