

· 综述 ·

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型的研究进展^{*}

陈 扬¹ 综述, 胡大春² 审校

(1. 昆明医科大学附属甘美医院检验科, 云南昆明 650011; 2. 昆明市第一人民医院检验科, 云南昆明 650011)

关键词: 基因型; 交叉感染; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.029**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2014)10-1299-03

金黄色葡萄球菌是临幊上常见的毒性较强的致病菌,自20世纪40年代青霉素问世后,金黄色葡萄球菌引起的感染性疾病受到较大的控制。但随着人们对青霉素的广泛使用,有些金黄色葡萄球菌产生青霉素酶,能水解β-内酰胺环,表现为对青霉素的耐药。人们又研究出一种新的能耐青霉素酶的半合成青霉素,即甲氧西林^[1]。1959年甲氧西林应用于临幊后,曾有效控制了金黄色葡萄球菌产酶株的感染。但时隔2年,英国首次发现了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)^[2]。MRSA感染几乎遍及全球,现已成为院内感染的重要病原菌之一,其菌株的分型及同源性分析是控制该耐药菌医院感染的重要环节。目前,医院感染中常用的细菌分型法有表型和基因型2大类,血清型、噬菌体分型、抗菌谱型等传统的分型方法均属于表型法。由于表型涉及基因产物(而不是全部基因)的表达,加之细菌易受环境因素影响,很易改变其表达性状,因而表型分型分辨率低,现已少用;另一类是基因分型法,近年来基因分型技术广泛应用于MRSA的分型研究,为MRSA的分型提供了有用的工具。以下介绍几种常用的基因分型方法。

1 质粒指纹图谱技术分型方法

1.1 质粒指纹图谱的原理 质粒图谱分型的原理是基于大多数细菌携带数种大小和数目不等的质粒,提取分离菌株的质粒DNA,在琼脂糖凝胶电泳上分离,并通过测定质粒的数目和大小,从而对带有不同质粒特征的细菌加以区分。对于相对分子质量相同而DNA序列不同的质粒,或相对分子质量不同而有较高同源性的质粒,可以采用限制性内切酶对质粒DNA进行酶切,再用琼脂糖凝胶电泳分析其限制性片段的数目和大小,这样质粒图谱分型的可重复性和分辨力都会得到很大提高,能区分流行株与非流行株,并能准确分析菌株之间的相关性。

1.2 质粒指纹图谱的方法评价 质粒指纹图谱分型是第1个以DNA为基础并用于细菌菌株分型的分子生物学技术,这种方法特异性强、快速简便,不需要特殊设备,故质粒图谱在院内MRSA急性暴发感染的流行病学调查中具有重要作用,可用于追踪传染源。但是需要注意的是,由于细菌质粒属于染色体外DNA,易于获得、缺失或重排,而且细菌在具有抗菌药压力的院内环境中很容易获得耐药性的R质粒,从而影响质粒指纹图谱分型的准确性,加之某些菌株仅含有1个,甚至没有质粒,因此,质粒指纹图谱的分型能力及特异性降低,使用受到限制。

2 脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分型技术

2.1 PFGE分型技术原理 将细菌完整包埋在凝胶块中,经

蛋白酶水解等措施破细胞壁后,用稀有位点限制性内切酶Sma I对MRSA的染色体进行原位酶切,产生DNA大片段,酶切片段在特定的电泳系统中通过改变正极位于每一个交替位置的时间来推动DNA分子在琼脂糖中不断再定位。每一个给定大小范围的DNA分子都有其最小的转变时间,如果少于这个时间,是不足以进行再定位的。这样在电泳期间,将初始PFGE脉冲时间逐渐提升(爬坡)到一个较大终值,从而使不同大小的分子得以分开。这个原理是解决PFGE分辨不同大小分子的基础,因而使用较短的或较长的脉冲时间可以分别影响小分子和大分子的分离效果。基于DNA的迁移率,通过经验调整总的电泳时间,以实现理想的分离效果。从而达到分离大分子线性DNA片段(最大分辨率为5 000 kb)的目的。同源性菌株具有相同的稀有酶切片断,而异源型性菌株的酶切片断各不相同,因此,可以鉴别同源菌。

2.2 PFGE分型结果解释 Tenover等^[3]制定的PFGE图谱分型标准:(1)酶切图谱条带的大小和数目表现一致的菌株被认为是同一型,用英文字母表示(如A型);(2)条带相差3条及以下的可认为是同一型别中的不同亚型,可用A1、A2、A3等表示;(3)条带相差3条以上的可认为是不同型别,用其他的英文字母,如B、C、D型等表示。型别相同的菌株来源于同一亲代,在基因上有相关性;而不同型别的菌株则认为在流行病学上无相关性。

2.3 PFGE分型的方法评价 PFGE分型通过分析菌株完整的基因组DNA,可从整体上反映不同菌株全部基因信息的相关性,是追查病原菌传染源和传播途径的有效方法,它是针对MRSA群体内全基因序列中高度变异的位点或区域进行的分型,具有DNA电泳清晰、重复性好、分辨率强等优点,曾被誉为细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[4]。宗春辉等^[5]的研究显示PFGE可有效鉴定菌株间的亲缘关系,并将40株医院感染的MRSA分为A、B、C、D、E5个型别。但是,PFGE研究细菌的DNA大片段,只可以分析感染菌株是否来自同一克隆株,并不能分析菌株是医院感染株,还是社区感染株;另外,PFGE操作需要专用脉冲场凝胶电泳仪才能完成,有一定技术难度,操作繁琐,且电泳时间长,加之电压较高,产生热量,为了保证温度为14℃,需要一些冷却设备(如缓冲液冷却循环器),对设备的严格要求,使PFGE难以得到广泛开展。

虽然PFGE不能观察到所有基因组变化和所有限制性片段,但只要染色体的各种基因突变影响到稀有酶切位点,就可利用PFGE进行检测。PFGE分型技术仍然在不断完善中,当PFGE作为整个流行病学策略的一部分而被合理地应用时,它将在未来几年为许多重要事件的病原菌分子分型提供重要的

^{*} 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2010C097)。

作者简介: 陈扬,女,硕士,主要从事微生物与分子生物学的研究工作。

流行病学数据。

3 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术

3.1 MLST 分型的原理 MLST 是 Maiden 等^[6]于 1998 年在多位点酶切电泳技术的基础上为研究菌群基因结构而设计的一种高分辨率分型技术。它是选择微生物染色体上 7 个管家基因 DNA 进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,产物测序后将每个基因的测序结果在 MLST 的数据网站上进行比对,获得特定菌株号,然后进行同源性比较。这 7 个基因最大的特点是既相对保守,又会发生局部点突变,具有相对变化缓慢的突变累积效应^[7],可用于长期追踪菌株间遗传关系和宏观进化过程。

3.2 MLST 分型的应用与特点 2000 年 Enright 等^[8]首先将 MLST 分型方法应用于金黄色葡萄球菌。该方法是以 *arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi* 和 *yqIL* 这 7 个管家基因内部 450 bp 左右的不同碱基序列以及各等位基因的不同组合而分型的。以 7 个管家基因作为目的基因,每个扩增产物进行 DNA 测序,与 MLST 网站(www.mlst.net)上公布的相应基因的等位基因相比较,获得该菌株针对 7 个管家基因的等位基因谱;再提交 MLST 网站,确定其序列分型,结果用等位基因谱或序列型表示,如 Iberian 克隆 MLST 等位基因谱为 3-3-1-12-4-4-16,序列型为 ST247^[9]。另外,还可以应用 BURST(based upon related sequence types)软件分析菌株之间的进化关系。金黄色葡萄球菌 7 个管家基因中 5 个序列相同属于同一克隆群^[10]。

3.3 MLST 分型的方法评价及意义 MLST 主要优势是建立了国际数据库网站,实验结果可直接与数据库中已知流行株进行比较和分析,以达到了解不同国家和地区间菌株的遗传相关性^[11]。与 PFGE 比较,MLST 更适于长期对 MRSA 进行流行病学的监测^[12],并且在数据库中可长期、系统、客观地调查 MRSA 的克隆进化。但 MLST 作为一种基因分型方法也存在一定的限制,其技术要求严格,需特殊仪器,费用较高,难以应用于常规临床实验室,而且因管家基因非常保守,呈慢时钟速度变化,这限制了 MLST 在 MRSA 暴发时对亚群的鉴别能力。

4 多位点可变数量串联重复序列分析(multiple-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA)分型技术

4.1 MLVA 分型的原理及应用 在生物基因组中,广泛存在着一些以寡核苷酸为基序首尾串联重复排列形成的微卫星和小卫星序列,其中基序的重复次数是可变的,被称为可变数目串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)。在同种细菌不同菌株基因组中,相同位点 VNTR 序列基序的重复次数可变异,即存在种内 VNTR 序列多态性,因此,可利用这一特征区别同一种属中的不同个体。目前串联重复序列分析已经广泛地应用于细菌的分子流行病学调查、菌株鉴别、基因分型等方面。

MLVA 原理是根据所选取的 VNTR 序列位点两端的保守序列设计引物,通过多重 PCR 扩增这些重复序列,用琼脂糖凝胶电泳进行产物分析,并依据各 VNTR 位点的基序和扩增产物片段的大小,计算每株细菌每个位点重复次数,以达到菌株分型的目的。还可以通过 MLVA 结果构建基因进化树,以了解各种生物型之间的相互关系。

目前,MLVA 作为一种有效基因分型方法已被国外许多学者所采用,人们分别于 2003、2005 年利用 5 个和 8 个 VNTR 位点序列构建了 MRSA 的 MLVA 基因分型技术,分别对 17

株和 20 株临床分离的 MRSA 进行了成功分型^[13],其结果与 PFGE 结果相符。

4.2 MLVA 分型的方法评价及意义 MLVA 技术简便、快速,采用多重 PCR 扩增技术对多个 VNTR 位点同时进行分析,该速度远超过经典 PFGE 分型方法^[14]。与 PFGE 相比,MLVA 分型结果采用较简便的数字形式,更有助于全球范围内 MRSA 分子流行病学的调查和研究。

MLVA 具有很强的分辨能力,在 Pourcel 等^[15]收集的 300 株 MRSA 研究中,结果显示 MLVA 比 MLST 和葡萄球菌蛋白 A(staphylococcal protein A, SPA)分型方法有较强的分辨力。经研究证明,VNTR 的重复性和稳定性好。由于 VNTR 位点常选自单一标准菌株基因组序列,可能对各种来源菌株的分型能力有一定限制,相信随着对微生物基因组序列研究的深入及各种相关技术的提高,该分型方法将会在 MRSA 基因分型和流行病学研究中具有广阔的应用前景。

5 SPA 基因多态性分型法

5.1 SPA 分型原理 金黄色葡萄球菌免疫球蛋白结合蛋白编码基因(SPA 基因)内含有基序为 24 bp 的核苷酸重复序列,在不同的菌株间,其重复的次数在 3~15 之间变异。利用这种基因的多态性,即单位点 VNTR 这一特征建立的分型方法称为 SPA 分型。其原理是根据 SPA 基因序列设计引物进行扩增,PCR 产物经测序后,在测序结果中与已公布的重复序列相比较,并根据其出现的次数和排列方式确定型别,从而达到分型的目的。

5.2 SPA 分型的方法评价及意义 由于 SPA 基因分型只对一个位点的重复序列进行测定,因此,它具有快速,准确等优点,但其利用单个 VNTR 序列位点多态性进行基因分型的分辨能力有限,多用于粗筛。SPA 基因分型还可用于医院内 MRSA 暴发流行研究^[16],根据重复序列数的不同,可初步区分金黄色葡萄球菌流行与非流行菌株。总之,它对于 MRSA 仍不失为一种快速、简便、易于获得可靠流行病学数据的高效分型方法。

6 其他分型方法

除了以上介绍的几种分型方法外,目前用于 MRSA 基因分型技术的还有葡萄球菌染色体 *mec* 盒(staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCCmec)分型,它是根据金黄色葡萄球菌 *mec* 基因复合物和染色体重组酶 *ccr* 基因复合物各组分的不同将 SCCmec 分成 5 型(I~V 型)^[17]。SCCmec IV 型根据 J 区域的不同分为 a、b、c、d 4 个亚型。其中,医院感染 MRSA(HA-MRSA)多为 SCCmec I、II、III 型,而社区获得或社区相关 MRSA(CA-MRSA)多为 IV、V 型。欧、美等国家以 II 型为主,而亚洲国家则以 III 型在发生频率上占优势,但有关报道显示,日本、韩国、越南等周边国家及中国部分地区以 II 型为主^[18]。

杀白细胞素(panton-valentine leucocidin, PVL)由 2 个共转录基因(*lukS-PV*、*lukF-PV*)编码整合在染色体原噬菌体片段上,主要存在于 SCCmec IV 型 社区获得性 MRSA(CA-MRSA),医院获得性 MRSA(HA-MRSA)菌株则一般不携带 PVL 基因。根据 HA-MRSA 与 CA-MRSA 的 PVL 毒素编码基因携带率不同,可作为一种有效的分型方法。

以上 2 种分型方法最大的局限性就是不能追寻相同 MRSA 感染是否为同一克隆株,但它们为流行株是否来源于其他地方或其他国家可提供一定的依据。

MRSA 耐药决定基因 *mec* 区域高变区(hypervariable re-

gion, HVR) 分型是对 HVR 的 *dru* 序列扩增后进行多态性研究, 其原理是根据不同 MRSA 菌株中 *dru* 序列重复次数不同而分型的。因 *mecA* 基因是 MRSA 所特有, 且该法操作简单、快速, 不需要特殊电泳设备, 因此具有很好的实用性和广阔的应用前景, 但其分辨率不如 PFGE 法。

7 展望

理想的细菌基因分型方法需要满足以下条件: 操作简单、省时, 重复性好, 利于实验室间相互比较, 适用范围广, 易于标准化。由于目前各种细菌基因分型方法不能完全符合理想 MRSA 基因分型要求, 并且在区分菌株差异的分辨率上各有限制, 还不能完全取代经典 PFGE 分型法。PFGE 技术越来越多地用于细菌种群的研究, 而 SPA 分型和 MLST 分型针对细菌的特异性靶序列进行测序, 用于暴发研究和流行监测。因此, 结合 2 种分型法用于 MRSA 的分型研究有助于了解暴发菌株是如何扩散的。

对 MRSA 进行理想的基因分型还需在现有分型技术的基础上进一步改进或开发新的、更好的分型方法。随着 MRSA 基因组测序及其功能基因组的研究进展, 为进一步寻找在 MRSA 基因组中保守, 而在其菌株间高度变异的序列奠定了基础。扩增高度保守区域可用于推断亲缘关系, 分析高度可变区域可用于区分非常相近的 2 个菌株间的差异。这些保守的或高度可变的序列信息提供了更简便省时, 鉴别力强, 应用更广泛且易于标准化的 MRSA 分型方法。

参考文献

- [1] Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Kotilainen P, et al. Molecular epidemiology of Methicillin-Resistant *staphylococcus aureus* in Finland[J]. *Emerg Infect Dis*, 2000, 19(2): 101-107.
- [2] Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(11): 7687-7692.
- [3] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [4] Strandén A, Frei R, Widmer AF. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7): 3181-3186.
- [5] 宗春辉, 孙兰菊, 李东华, 等. MRSA 分子流行病学研究[J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9(2): 85-88.
- [6] 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 U S A*, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [7] Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacteria in an era of rapid DNA sequencing and the internet [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(3): 312-316.
- [8] Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1008-1015.
- [9] Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(2): 92-97.
- [10] Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(11): 7687-7692.
- [11] Strommenger B, Bräulke 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.
- [12] Francois P, Huyghe A, Charbonnier Y, et al. Use of an automated multiple-locus, variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3346-3355.
- [13] Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1801-1804.
- [14] Ross TL, Merz WG, Farkosh M, et al. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5642-5647.
- [15] Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, et al. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(10): 3121-3128.
- [16] Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5442-5448.
- [17] Delaney JA, Schneider-Lindner V, Brassard P, et al. Mortality after infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) diagnosed in the community[J]. *BMC Med*, 2008, 6: 2.
- [18] 杜娜, 王辉, 牛俊奇, 等. 我国五家教学医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 分型及毒素基因的检测[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(5): 499-504.

(收稿日期: 2013-12-13)

(上接第 1294 页)

- dependent aberrant regulation of cytokine-STAT signaling in murine systemic lupus erythematosus[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6756.
- [9] Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, et al. Effect of pregnancy on serum cytokines in SLE patients[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(2): R66.
- [10] Frutos MÁ, Praga M, Quereda C, et al. Lupus nephritis: in search of a better future[J]. *Nefrologia*, 2012, 32(2): 136-138.
- [11] Yu F, Tan Y, Liu G, et al. Clinicopathological characteristics and

- outcomes of patients with crescentic lupus nephritis[J]. *Kidney Int*, 2009, 76(3): 307-317.
- [12] Nasr SH, Said SM, Valeri AM, et al. Membranous glomerulonephritis with ANCA-associated necrotizing and crescentic glomerulonephritis[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4(2): 299-308.
- [13] Morimoto S, Watanabe T, Lee S, et al. Improvement of rapidly progressive lupus nephritis associated MPO-ANCA with tacrolimus[J]. *Mod Rheumatol*, 2010, 20(3): 291-294.

(收稿日期: 2014-01-13)