

• 论 著 •

某院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MLVA 基因分型及流行状况研究*

陈 扬¹, 胡大春², 崔 颖¹, 王 林¹, 刘德华², 邵剑春², 穆士杰^{1△}

(1. 第四军医大学唐都医院输血科, 陕西西安 710038; 2. 昆明市第一人民医院检验科, 云南昆明 650011)

摘 要:目的 通过构建适合临床实验室常规应用的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株同源性多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)分型方法, 建立昆明地区临床分离 MRSA 菌株的 MLVA 基因分型基础数据库, 分析医院 MRSA 感染流行情况。**方法** 收集昆明市第一人民医院临床微生物室 2010 年 10 月至 2013 年 12 月分离的 111 株 MRSA 菌株, 对 7 个可变数目串联重复序列(VNTR)位点进行聚合酶链式反应(PCR)扩增和产物电泳分析, 归类各菌株的基因型别。**结果** VNTR09-01 位点测序结果显示 9 bp 的重复子, 重复规律性不强、易突变; 111 株分离株被分为 25 个基因型别(A~Y), 其中 G、A、B 为主要型别, 分别占 47.7%、13.5%、8.1%; 呼吸内科、神经外科、重症监护室(ICU)和乳腺科存在 MRSA 集中流行趋势。**结论** MLVA 分型方法可推广应用于本研究中 7 个 VNTR 位点多态性检测, 部分科室存在 MRSA 同源菌集中流行情况, 值得高度关注。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 基因分型; 多位点可变数目串联重复序列分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0586-03

MLVA genotyping and the prevalence status analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from a hospital*

Chen Yang¹, Hu Dachun², Cui Ying¹, Wang Lin¹, Liu Dehua², Shao Jianchun², Mu Shijie^{1△}

(1. Department of Blood Transfusion, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Kunming City, Kunming, Yunnan 650011, China)

Abstract: Objective To establish multiple-locus variable-number tandem repeat assay(MLVA) genotyping database for clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA) in Kunming area and analyse the prevalence status of MRSA in hospital, through establishing a classification method for MRSA by homology MLVA which was appropriate to routine application in clinical laboratory. **Methods** A total of 111 strains of MRSA isolated by the Clinical Microbiology Chamber of the First People's Hospital of Kunming City from October 2010 to December 2013 were collected. The polymerase chain reaction(PCR) amplification and electrophoresis for analysis of PCR products were carried out for the seven sites of variable number tandem repeats(VNTR), classification of strain based on genotypes was carried out, as well. **Results** The sequencing results of VNTR09-01 site showed 9 bp repetitive sequence elements whose regularity was not strong, and the repetitive elements was mutable. The 111 isolates were divided into 25 kinds of genotypes(A-Y), among which genotype G, A and B were the main types, accounted for 47.7%, 13.5% and 8.1% respectively. **Conclusion** MLVA could be generally applied in the seven sites of VNTR in this study. Some departments might exit concentrated epidemic of homologous MRSA strains, which is worthy of being paid more attention.

Key words: methicillin-resistant Staphylococcus aureus; genotype; multiple-locus variable-number tandem repeat assay

1961 年, 英国学者 Jevons 首次发现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)^[1]。2011 年美国感染病学会(IDSA)MRSA 感染治疗指南——《IDSA-2011-MRSA 指南》中报道, 美国医院细菌感染中 MRSA 感染率为 31.8%, 远超其他细菌感染率^[2], 其所致感染呈散发、流行, 甚至暴发^[3-4]。我国金黄色葡萄球菌临床分离株中 MRSA 所占百分比增至 50% 以上^[5], 根据 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测数据^[6], MRSA 仅对噁唑烷酮类、利奈唑胺、万古霉素等糖肽类抗菌药物敏感。MRSA 引起医院感染的暴发已成为重点关注的公共卫生问题之一。本研究构建适合临床实验室常规应用的 MRSA 菌株同源性多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)分型方法, 建立本地临床分离 MRSA 菌株的 MLVA 基因分型基础数据库, 分析 MRSA 的医院流行情况, 为制订有效控制措施提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集昆明市第一人民医院检验科微生物室 2010 年 10 月至 2013 年 12 月临床分离鉴定的 MRSA 菌株

111 株。

1.2 仪器与试剂 MicroScan WalkAway 40 SI 全自动细菌鉴定及药敏分析系统(德国西门子公司); 聚合酶链式反应(PCR)试剂、50 bp DNA 标记物(美国 Fermentas 公司); 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司)。

1.3 MRSA 临床菌株的分离培养与鉴定 参照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)的临床病原微生物分离培养方法进行菌株的分离培养, 根据血浆凝固酶试验, 金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)单克隆抗体检测和 MicroScan WalkAway 40 SI 全自动细菌鉴定及药敏分析系统进行菌种鉴定和抗菌药物敏感性试验。

1.4 MRSA 菌株 DNA 提取 采用离心柱法提取高浓度的模板 DNA。

1.5 可变数目串联重复序列(VNTR)位点多态性检测方法的建立

1.5.1 引物设计与合成 本研究参考 Schouls 等^[7]在 S. au-

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2010C097)。 作者简介: 陈扬, 女, 住院医师, 主要从事临床微生物学与检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: musj1963@fmmu.edu.cn。

reus strain N315 基因组序列中寻找的 VNTR 序列位点,采用 BLASTN 进行引物序列比对和特异性验证后,从中选取 7 个分辨力和分型能力较好的位点,由上海生工公司合成其侧翼特异性引物,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

1.5.2 反应体系和条件 上、下游引物各 1.5 μ L, Taq 缓冲液 5 μ L, 三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTP)4 μ L, 氯化镁(MgCl₂)4 μ L, DNA 模板 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 1.4 μ L, 双蒸水补至 50 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s (各自引物的 T_m 值-5 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

1.5.3 结果检测与分析 配制 2% 的琼脂糖凝胶,用 50 bp DNA 标记物确定其相对分子质量。用 50 bp DNA 标记物作为相对分子质量对照,按照产物片段大小确定其多态性情况,即人工估算出各菌株各 VNTR 序列位点的基序重复次数。

1.6 所构建的 PCR 方法对菌株 VNTR 多态性检测的验证

1.6.1 重复性验证 从研究菌株中抽取 24 株,每株 MRSA 用 7 对引物进行不同位点 VNTR 多态性扩增检测 3 次,分析 3 次产物的一致性。

1.6.2 正确性测序验证 选取 14 株研究菌株(编号为 1~14 号),分别对所构建的 7 个 VNTR 位点多态性 PCR 检测方法进行测序验证。

1.7 临床分离 MRSA 菌株的 MLVA 分型数据库建立 对 7 个 VNTR 位点及其核心基序重复次数进行编号,然后分别对 111 株临床分离 MRSA 菌株中每一株细菌进行 7 个 VNTR 位点多态性组合编码,并根据其编码进行 MLVA 型别归类,得出 MLVA 分型数据库数据。

1.8 临床分离主要 MLVA 型别菌株的流行趋势分析 根据 MLVA 分型结果及菌株分离的时间,分析主要 MLVA 型别菌株的流行时间分布及病房分布情况。

2 结 果

2.1 PCR 方法对菌株 VNTR 多态性检测的重复性验证 从研究的 MRSA 菌株中抽取 24 株,每株 MRSA 在不同 VNTR 位点重复检测 3 次,每次 DNA 扩增片段大小完全相符。

2.2 PCR 方法对菌株 VNTR 多态性检测的正确性测序验证 选取 14 株研究菌株(编号为 1~14 号),分别对所构建的 7 个 VNTR 位点多态性 PCR 检测方法进行测序验证, VN-TR09-01 位点的 9 bp 重复子规律性不强,碱基突变率较高。VNTR 位点序号 2 上游引物扩增产物测序结果见图 1、2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),其中重复子基序为 60 bp, 3、4 号研究菌株分别重复 0 次(见图 1)和 7 次(见图 2)。其余各 VNTR 位点引物扩增产物测序序列图略。

2.3 111 株临床分离 MRSA 菌株 6 个 VNTR 位点的多态性检测 部分菌株(24 株)中 6 个 VNTR 基因位点的多态性检测结果,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。各位点的 VNTR 多态性变化,见表 2。

2.4 111 株临床分离 MRSA 的 MLVA 基因分型 依据 6 个 VNTR 序列位点多态性在 111 株临床分离 MRSA 菌株中的变化信息,对各株细菌进行基因 VNTR 多态性编码,具有相同编码的菌株归类为同一分型类别中,得到 111 株临床分离 MRSA 菌株的 MLVA 基因型别归类数据库。111 株分离株可分为 25 个基因型别(A~Y),其中 G、A、B 为主要型别,分别占 47.7%(53/111)、13.5%(15/111)、8.1%(9/111)。

2.5 主要 MLVA 型别菌株的流行趋势分析 根据 MLVA 分

型结果及菌株分离的时间进行分析,主要 MLVA 型别菌株的流行时间分布情况见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”);病房分布情况见图 5(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),呼吸内科、神经外科、重症监护室(ICU)和乳腺科存在 MRSA 集中流行趋势。

表 2 6 个 VNTR 序列位点在 111 株 MRSA 中的多态性变化

VNTR 名称	DNA 序列位置或 编码蛋白质名称	重复序列 大小(bp)	重复次数 (次)	产物大小 (bp)
VNTR61-01	非编码区	60	0~8	210~695
VNTR61-02	非编码区	61	0~2	233~366
VNTR67-01	非编码区	67	0~6	181~605
VNTR24-01	蛋白 A(spa)	24	4~10	265~410
VNTR63-01	非编码区	63	0~5	232~554
VNTR81-01	葡萄球菌凝固酶(coa)	81	1~5	222~568

3 讨 论

目前,脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)作为细菌分子分型的“金标准”而被首推^[8],但其操作繁琐、费时。2009 年, Schouls 等^[7]对 529 株金黄色葡萄球菌分别采用 MLVA、Spa 和 PFGE 3 种分型方法进行比较,结果显示 MLVA 与 PFGE 有相似多样性指数。2010 年陶晓霞等^[9]参考 Sabat 选取的 5 个 VNTR 位点对 49 株 MRSA 进行了 MLVA 分型,结果显示该方法与 PFGE 具有较好的符合率。此外,在 Pourcel 等^[10]收集的 300 株 MRSA 研究中,显示 MLVA 与多位点序列分型(MLST)和 Spa 分型方法相比有较强的分辨力,且另有研究证明 VNTR 的重复性和稳定性更好^[11]。在本研究选取的 7 个 VNTR 位点中,6 个位点的分辨力和分型能力较好,操作较 PFGE 更为简单易行、快速,在临床实验室具有较好的可操作性,值得推广应用。

本研究在对 2010 年 10 月至 2013 年 12 月收集到的 111 株分离自住院患者临床标本的 MRSA 进行 MLVA 型别归类后,发现呼吸科、神经外科、ICU 和乳腺科在以上时间段内存在 MRSA 集中流行趋势。医务人员的手是引起医院 MRSA 感染的重要传播途径之一,由医务人员的手传播细菌而造成的医院感染占 30%左右^[9]。因此,应进一步提高医务人员手卫生依从性,努力阻断 MRSA 的传播途径。

综上所述,MLVA 可推广应用于本研究中 7 个 VNTR 位点多态性检测,该院部分科室存在 MRSA 同源菌集中流行情况,值得高度关注。

参考文献

[1] Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospital, 1992-2003[J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(3):389-391.

[2] Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(3):18-55.

[3] Hussain FM, Boyle-Vavra S, Bethel CD, et al. Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000, 19(12):1163-1166.

(下转第 590 页)

药物治疗效果等^[7]。

目前,临床实验室应用于检测抗 dsDNA 抗体的方法多样,主要包括 IIF、ELISA、IBT 和 Farr 法,且各有利弊。其中 Farr 法出现最早,具有只结合高亲和力抗体的独特优势,其特异性好,曾被列为检测抗 dsDNA 抗体的金标准。但是,该方法具有放射性、检测周期长,易受到血清中高亲和力免疫球蛋白 M(IgM)的干扰且不能自动化,现在已经很少采用^[8-10]。本研究选择了 IIF、ELISA 和 IBT 法对 250 份血清标本进行了抗 dsDNA 抗体检测,并对其检测效能进行了分析。其中,IIF 法特异度(99.5%)最高,灵敏度(48.0%)最低;ELISA 法灵敏度高,可达 74.0%;IBT 法的特异度和灵敏度均不高。

同时,笔者对 IIF 与 ELISA 法、IIF 与 IBT 法、ELISA 与 IBT 法检测 SLE 患者抗 dsDNA 抗体的检出率进行了比较分析,结果显示差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 11.435、13.994、4.539, $P<0.05$)。对 3 种方法进行一致性分析,结果显示 IIF 与 ELISA 法、IIF 法与 IBT 法呈现中度一致,而 ELISA 与 IBT 法一致性较差。这可能与抗 dsDNA 抗体存在高亲和力和低亲和力两种特异性抗体有关。低亲和力抗 dsDNA 抗体除存在于 SLE 患者体内外,也存在于其他 AID 患者体内,对 SLE 的诊断价值低;而高亲和力抗 dsDNA 抗体对 SLE 有较好的特异性。各种检测方法对上述两种抗 dsDNA 抗体的检测适应性不同。ELISA 法适宜检测低亲和力抗 dsDNA 抗体,IIF 法适宜检测高亲和力抗 dsDNA 抗体^[11-12]。本研究还显示,3 种方法串联检测抗 dsDNA 抗体的特异度提高,但灵敏度下降;而 3 种方法并联检测的灵敏度提高,特异度下降。

综上所述,3 种方法单独检测抗 dsDNA 抗体均存在不足之处,且 3 种方法的相关性与一致性不是很理想,而 3 种方法联合检测对 SLE 诊断具有重要的临床意义,可以提高检测特异度与灵敏度,从而很大程度上避免误诊与漏诊的发生。

参考文献

[1] 刘艳慧,王爱雪,孟新艳,等.抗核小体抗体、抗双链 DNA 抗体和抗超敏双链 DNA 抗体与系统性红斑狼疮的相关性研究[J]. 临床内科杂志,2013,30(7):453-455.

[4] 沈萍,魏泽庆,陈云波,等. Mohnarin 2010 年度报告:ICU 细菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(3):5477-5481.

[5] Shorr AF. Epidemiology of Staphylococcal resistance[J]. Clin Infect Dis,2007,45(Suppl 3):S171-S176.

[6] 李光辉,朱德妹,汪复,等. 2011 年中国 CHINET 血培养临床分离菌的分布及耐药性[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(4):241-247.

[7] Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of Staphylococcus aureus: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing[J]. PLoS One,2009,4(4):e5082.

[8] 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.

[9] 陶晓霞,崔志刚,刘国栋,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MLVA

[2] Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosis[J]. N Engl J Med,2008,358(9):929-939.

[3] 杨艳丽,任健康,李亚娥,等. 蛋白芯片技术联合检测抗 dsDNA 抗体、抗 Smith 抗体和抗 Rib-P 抗体对 SLE 诊断价值分析[J]. 现代检验医学杂志,2012,27(2):55-56.

[4] 彭赛蛟,陶锡东,王敏. 不同自身抗体联合检测在系统性红斑狼疮中的诊断价值[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(6):831-833.

[5] 李珍,刘洋,王俊芳. 间接荧光法(IIF)和酶联免疫吸附法(ELISA)对抗双链 DNA 的检测结果比较[J]. 医药前沿,2014,4(8):262.

[6] Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusos[J]. Proc Soc Exp Biol Med,1957,96(3):572-574.

[7] 王兰兰,吴健民. 临床免疫学与检验[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2007:331-332.

[8] Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, et al. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test [J]. Lupus,2010,19(8):906-912.

[9] Hillebrand JJ, Bernelet Moens HJ, Mulder AH. Changes in Farr radioimmunoassay and EliA fluorescence immunoassay anti-dsDNA in relation to exacerbation of SLE[J]. Lupus,2013,22(11):1169-1173.

[10] 谭太昌,王婷,张航烽,等. 抗双链 DNA 抗体检测策略研究[J]. 成都医学院学报,2014,9(2):128-133.

[11] 蒋明,张奉春. 风湿病诊断与诊断评析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:30-33.

[12] Peter JB, Shoenfeld Y. Autoantibodies[M]. Amsterdam: Elsevier, 1996:227-236.

(收稿日期:2015-11-26)



(上接第 587 页)

分型研究[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(2):81-83.

[10] 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.

[11] 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(1):1-8.

(收稿日期:2015-12-16)

