

· 老年人感染防控专栏 ·

致皮肤软组织感染社区获得性金黄色葡萄球菌的分子生物特征分析

蒋伟*, 张康, 李少增

(解放军总医院第一附属医院感染控制科, 北京 100048)

【摘要】目的 了解解放军总医院第一附属医院致皮肤软组织感染社区获得性金黄色葡萄球菌(CA-SA)的流行情况、耐药特点、毒力和致病因素信息。**方法** 收集2009年1月至2010年8月皮肤科、门诊、急诊55例患者化脓性皮肤软组织感染检测标本, 进行细菌鉴定和药敏试验, 采用多位点序列分型(MLST)、金黄色葡萄球菌A蛋白(SPA)分型和毒素基因检测筛查。结果 55例中分离到社区获得性甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(CA-MSSA)12株;药敏结果显示CA-MSSA除对红霉素、克林霉素、四环素、庆大霉素和左氧氟沙星耐药性较高(8.3%~50.0%), 对其他抗菌药物均敏感。毒素基因检测显示杀白细胞素(pvl)、肠毒素C(sec)和毒性休克综合征毒素-1(tsst-1)在CA-MSSA中的阳性率分别为33.3%, 25.0%和8.3%, 未检测到葡萄球菌肠毒素H(seh)和葡萄球菌表皮剥脱毒素(et);结合MLST和SPA分型, 发现CA-MSSA中的克隆有ST5-t002(2株)、ST22-t309(2株)及ST398-t034、ST15-t5864、ST7-t091、ST25-t078、ST30-t318、ST121-t1425、ST800-t1425、ST630-t377各1株。**结论** 我院致皮肤软组织感染CA-MSSA菌株对抗菌药物的敏感性较高, 分子分型具有多样性, 携带多种毒素。

【关键词】 社区获得性感染; 甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌; 皮肤软组织感染; 多位点序列分型; 杀白细胞素; 金黄色葡萄球菌A蛋白分型

【中图分类号】 R181.32

【文献标识码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.09.159

Biological characteristics of community-acquired *staphylococcus aureus* in patients with skin soft-tissue infections

JIANG Wei*, ZHANG Kang, LI Shao-Zeng

(Department of Infection Control, the First Affiliated Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the prevalence, antibiotic resistance, virulence and pathogenicity of community-acquired *Staphylococcus aureus* (CA-SA) in the patients with skin soft-tissue infections. **Methods** Clinical specimen of the 55 patients with skin soft-tissue infections admitted in Department of Dermatology, Outpatient Department and Emergency Department in our hospital between January 2009 and August 2010 were collected. The isolates of SA strains were collected from the patients for bacterial identification and antibiotic susceptibility. Multilocus-sequence typing (MLST), staphylococcal protein A (SPA) typing and toxin gene screening were also performed. **Results** Of the 55 isolates, 12 strains of community-acquired methicillin-sensitive SA (CA-MSSA) were isolated. The CA-MSSA strains had comparatively high resistance rates (8.3%~50.0%) to erythromycin, tetracycline, clindamycin, gentamicin and levofloxacin, but were sensitive to other antibiotics. Their toxin positive rates were 33.3%, 25.0% and 8.3%, respectively to Panton-Valentine leukocidin (pvl), staphylococcal entotoxin C (sec) and toxic shock syndrome toxin-1 (tsst-1), but were none to staphylococcal entotoxin H (seh) and staphylococcal exfoliative toxin (et). The MLST and SPA typing results showed that there were 2 isolates of ST5-t002, 2 isolates of ST22-t309, and 1 isolate respectively of ST398-t034, ST15-t5864, ST7-t091, ST25-t078, ST30-t318, ST121-t1425, ST800-t1425 and ST630-t377. **Conclusion** The CA-MSSA isolates derived from the patients with skin soft-tissue infections of our hospital have high antibiotic sensitive rates, diversity of molecular types and multiple toxins.

[Key words] community-acquired infections; methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; skin soft-tissue infections; multilocus sequence typing; Panton-Valentine leukocidin; staphylococcal protein A

Corresponding author: JIANG Wei, E-mail: jiangwei680808@163.com

金黄色葡萄球菌是一种常见的重要致病菌,可导致多种院内和社区获得性感染^[1-10],如皮肤软组织感染、肺炎等局部感染和严重的致死性全身性感染(菌血症、毒素休克综合征、脓毒血症)等,其感染的发病率和致死率均较高^[1-3]。随着院内获得性金黄色葡萄球菌(hospital-acquired *staphylococcus aureus*, HA-SA)从医院走向社区,社区获得性金黄色葡萄球菌(community-acquired *staphylococcus aureus*, CA-SA)呈上升趋势^[6-8],为社区疾病的预防和治疗带来新挑战,引起世界各国的关注。国内外学者对HA-SA已进行了广泛深入的研究^[1-5],对CA-SA的研究近年来亦呈增多趋势^[6-8]。本研究收集解放军总医院第一附属医院2009年1月至2010年8月分离的致皮肤软组织感染的CA-SA进行耐药和携带毒素分析,采用金黄色葡萄球菌A蛋白分型(staphylococcal protein A typing, SPA分型)和多位点序列分型(multilocus-sequence typing, MLST)进行分子流行病学特征研究,为医院防控和治疗CA-SA感染提供实验室帮助。

1 对象与方法

1.1 研究对象

菌株主要来自2009年1月至2010年8月皮肤科、门诊、急诊55例化脓性皮肤软组织感染患者检测标本。质控菌株为金黄色葡萄球菌ATCC29213和粪肠球菌ATCC29212。药敏培养基(Mueller-Hinton琼脂)和纸片(英国Oxoid公司),聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增试剂和溶葡萄球菌酶(上海生工生物公司),金黄色葡萄球菌Slidex Staph Plus乳胶凝集试剂盒和VITEK全自动细菌鉴定仪(为法国生物梅里埃公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定 根据细菌形态、革兰染色、溶血情况、触酶实验初步鉴定,Slidex Staph Plus乳胶凝集法快速检测金黄色葡萄球菌,在30 s内产生肉眼可见的凝集者为金黄色葡萄球菌。疑难菌采用API系统和VITEK系统进一步鉴定。

1.2.2 药敏试验和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA)的检测 采用琼脂稀释法测定18种抗菌药物对12株金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。参照临床实验室标准委员会(Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI)M100-S20(2010)文件^[11],判定敏感、中介和耐药。替加环素的折点采用美国食品药品监督管理局(Food and

Drug Administration,FDA)推荐的折点($S \leq 0.5 \text{ mg/L}$)。MRSA的检测采用苯唑西林MIC法及mecA基因和femB基因双重PCR法同时检测分离的金黄色葡萄球菌菌株。双重PCR反应条件:94℃预变性4 min,94℃45 s + 50℃45 s + 72℃60 s,循环30次,72℃延伸2 min,mecA和femB基因的电泳条带分别在310 bp和651 bp位置,若两条带同时阳性为MRSA,仅mecA基因阳性为耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus coagulase negative*, MRSCN),仅femB基因阳性判断为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-sensitive *staphylococcus aureus*, MSSA)。

1.2.3 CA-SA的分子特征研究 根据文献^[3,6,12]采用PCR方法进行SPA和MLST分型检测。扩增MLST的7个管家基因arcc(673 bp)、aroe(568 bp)、glpf(635 bp)、gmk(548 bp)、pta(584 bp)、tpi(512 bp)和yqil(654 bp),根据菌株的等位基因分别确定其ST并分析不同主要克隆之间的亲缘关系。SPA分型的引物序列为:spa113f:5'-TAAAGACGATCCT-TCGGYGAGC-3'和spa1514f:5'-CAGcAGTAGTGc-cGTTTGCTT-3'。PCR反应条件:95℃预变性5 min,95℃45 s + 60℃45 s + 72℃90 s,循环30次,72℃延伸10 min,300~400 bp出现单一条带为阳性,以spa113f引物为主进行正向测序,SPA测序结果与分型数据库(<http://spa.ridom.de/repeats.shtml>)进行比对。

1.2.4 毒力相关基因的检测 参照文献^[5,13,14],应用PCR扩增毒力相关基因,包括杀白细胞毒素(Panton-Valentine leukocidin, pvl, 433 bp)、毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin-1, tsst-1, 350 bp)、葡萄球菌肠毒素C(*Staphylococcus enterotoxin C*, sec, 257 bp)、葡萄球菌肠毒素H(*Staphylococcus enterotoxin H*, seh, 375 bp)和葡萄球菌表皮剥脱毒素(exfoliatin, et, 119 bp)。

1.3 数据分析及处理

药敏数据用WHONET-5.6软件分析耐药模式,折点的判读参照CLSI指南。用Microsoft office办公软件和Filemaker数据库软件进行数据的批量处理和整合。

2 结果

2.1 感染来源和菌种分布

共55例皮肤软组织感染患者,年龄19~62(32.2 ± 11.6)岁;皮肤感染10例,毛囊炎8例,皮肤癣感染8例,脓肿6例,蜂窝组织炎6例,脓疮5例,

疖肿5例，其他皮肤软组织感染7例；分离到的CA-SA 12株主要来源于脓肿、疖肿和毛囊炎，凝固酶阴性葡萄球菌27株，其他病原菌15株。

2.2 菲敏试验和 *mecA-femB* 双基因扩增结果

12株CA-SA中未发现MRSA(FOX>8 mg/L)者，对红霉素(erythromycin, ERY)、克林霉素(clindamycin, CLI)、替卡西林(ticarcillin, TCY)、庆大霉素(gentamicin, GEN)和左氧氟沙星(levofloxacin, LVX)的耐药率分别为50.0%、25.0%、25.0%、8.3%和8.3%，对其余13种抗菌药物均表现敏感(100%)。*mecA-femB*双基因检测仅*femB*基因阳性，确定为CA-MSSA。12株CA-SA对18种抗菌药物的耐药情况见表1。

2.3 CA-MSSA的MLST和SPA分型结果

CA-MSSA中的克隆有ST5-t002(2株)，ST22-t309(2株)及ST398-t034, ST15-t5864, ST7-

t091, ST25-t078, ST30-t318, ST121-t1425, ST800-t1425, ST630-t377各1株。各型ST和SPA分型的CA-MSSA分布情况见图1和表2。

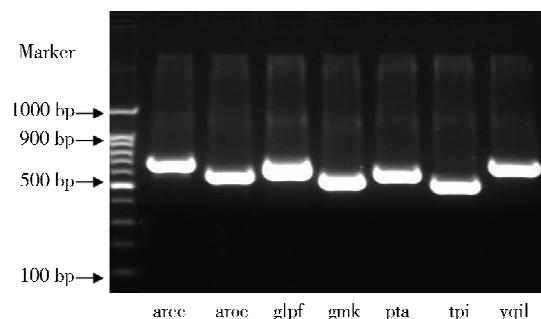


图1 各型MLST的基因扩增结果

Figure 1 Electrophoresis of PCR products of MLST

From left to right: Marker, arec(673 bp), aroe (568 bp), glpf(635 bp), gmk(548 bp), pta(584 bp), tpi(512 bp), yql(654 bp)

表1 不同抗菌药物对12株CA-SA的MIC

Table 1 MIC of 12 strains of CA-SA resistant to different antibacterials (μg/ml)

Sample	OXA	FOX	TEC	VAN	ERY	CLI	TCY	CHL	GEN
1	0.125	2(S)	0.5	0.5	256(R)	0.032	0.25	4	0.125
2	0.25	4(S)	0.5	0.5	>256(R)	4(R)	16(R)	4	8
3	0.25	2(S)	0.25	0.5	0.25	0.064	0.5	8	0.5
4	0.25	2(S)	0.5	0.5	>256(R)	0.064	0.5	8	0.5
5	0.25	2(S)	0.5	0.5	0.25	0.064	0.5	8	0.5
6	0.25	2(S)	0.5	0.5	>256(R)	0.064	32	8	1
7	0.25	2(S)	0.5	1	0.5	0.064	0.5	8	0.5
8	0.25	2(S)	1	0.5	>256(R)	>256(R)	64(R)	8	64(R)
9	0.5	2(S)	1	1	0.5	0.064	0.5	8	1
10	0.25	2(S)	1	1	0.25	0.064	0.5	8	0.5
11	0.25	2(S)	1	0.5	>256(R)	>256(R)	0.5	8	0.5
12	0.25	2(S)	1	1	0.25	0.064	64(R)	8	0.5
Sample	SXT	RIF	LVX	TGC	LNZ	CZO	CXM	CRO	MUP
1	0.5	0.008	0.125	0.125	1	0.25	0.5	2	≤0.064
2	0.25	0.016	4(R)	0.125	1	0.5	0.5	4	≤0.064
3	0.064	≤0.016	0.125	0.25	2	0.5	1	2	0.032
4	0.064	≤0.016	0.125	0.25	2	0.25	1	2	0.032
5	0.064	≤0.016	0.125	0.25	2	0.25	1	2	0.032
6	0.064	≤0.016	0.125	0.25	2	0.25	1	2	0.032
7	0.064	≤0.016	0.125	0.25	2	0.25	1	2	0.032
8	2	≤0.016	0.125	0.5	2	0.25	1	2	0.032
9	2	≤0.016	0.125	0.25	2	0.5	1	2	0.032
10	0.064	≤0.016	0.25	0.25	2	0.25	1	2	0.032
11	0.5	≤0.016	0.125	0.25	2	0.25	1	2	0.032
12	0.5	≤0.016	0.125	0.5	2	0.5	1	2	0.032

CA-SA: community-acquired *Staphylococcus aureus*; MIC: minimum inhibitory concentration; OXA: oxaliplatin; FOX: cefoxitin; TEC: tetracycline; VAN: vancomycin; ERY: erythromycin; CLI: clindamycin; TCY: ticarcillin; CHL: chloramphenicol; GEN: gentamicin; SXT: sulfamethoxazole trimethoprim; RIF: rifampicin; LVX: levofloxacin; TGC: tigecycline; LNZ: linezolid; CZO: cefazolin; CXM: cefuroxime; CRO: ceftriaxone; MUP: mupirocin; S: sensitive; R: resistance

表2 12株CA-MSSA的SPA分型、MLST与毒力基因检测情况

Table 2 Results of SPA typing, MLST and toxin genes screening of 12 strains of CA-MSSA isolates

Sample	Assay	SPA	MLST	Cloning complex	pvl	sec	seh	tsst-1	et
1	SA	t318	30	CC30	P	P	N	P	N
2	SA	t034	398	CC398	N	N	N	N	N
3	SA	t377	630	CC8	N	N	N	N	N
4	SA	t309	22	CC22	P	N	N	N	N
5	SA	t309	22	CC22	P	N	N	N	N
6	SA	t091	7	CC7	N	N	N	N	N
7	SA	t002	5	CC5	N	N	N	N	N
8	SA	t002	5	CC5	N	P	N	N	N
9	SA	t1425	121	CC121	N	N	N	N	N
10	SA	t5864	15	CC15	N	N	N	N	N
11	SA	t1425	800	CC121	N	N	N	N	N
12	SA	t078	25	CC25	P	P	N	N	N

CA-MSSA: community-acquired methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; SPA: staphylococcal protein A; MLST: multilocus-sequence typing; pvl: Panton-Valentine leukocidin; sec: *Staphylococcus* enterotoxin C; seh: *Staphylococcus* enterotoxin H; tsst-1: toxic shock syndrome toxin-1; et: exfoliatin; SA: *Staphylococcus aureus*; P: positive; N: negative

3 讨论

近年来,金黄色葡萄球菌已走向社区,毒力强、致死性高的CA-SA已引起世界各国的关注^[2,5,8,9]。本研究主要了解解放军总医院第一附属医院CA-SA的发病情况、耐药表型、毒素基因携带率和分子特征,为临床经验治疗CA-SA感染提供了参考依据。CA-SA感染研究菌株主要来源于脓肿、疖肿和毛囊炎,与国内研究相似^[7,10,15];药敏结果显示CA-MSSA菌株对常用抗菌药物的敏感性普遍较高,与HA-SA和CA-MRSA菌株药敏结果存在差异^[8],但对红霉素有较高耐药率(50%),与国内相关文献一致^[6-8],提示临床经验治疗时应谨慎选择大环内酯类药物治疗金黄色葡萄球菌感染。

明确不同医院及病区金黄色葡萄球菌分子型别,可为临床医师有效、及时地治疗感染提供可靠的流行病学依据,本研究中12株CA-MSSA中共发现10个确定的MLST和8种SPA分型,分属于9种克隆复合体,三者结合显示CA-MSSA中的克隆有ST5-t002-CC5(2株),ST22-t309-CC22(2株),ST398-t034-CC398,ST15-t5864-CC15、ST7-t091-CC7、ST25-t078-CC25、ST30-t318-CC30、ST121-t1425-CC121、ST800-t1425-CC121和ST630-t377-CC8各1株,可见CA-MSSA在遗传背景上具有多样性,与文献报道一致^[13,14]。MSSA菌株在各科室内部分布也存在差异,可能与科室性质不同有一定关系,应加强医院感染控制工作,采取有效措施,降低金黄色葡萄球菌医院内和科室内的播散。

CA-SA的致病与其所产生的毒素有着密切的关系,不同毒素在金黄色葡萄球菌中的分布有明显的

区别,毒素的分布在地域上也同样存在差别。基因pvl阳性金黄色葡萄球菌常与皮肤软组织感染相关^[5,13,14],特别是蜂窝组织炎、脓肿和疖肿等疾病,本研究发现有33.3%CA-MSSA菌株存在pvl基因,远高于院内获得性菌株pvl的阳性率,与文献^[13]报道接近(41.5%),其原因可能是产生pvl毒素对社区获得性菌株增加了其生存优势,CA-SA逐渐演化为毒素较强而耐药性相对较低的表型。通过对肠毒素的检测,发现CA-MSSA中sec的携带率为25%,较以往报道高(3.5%~10.4%)^[5,14],可能与菌株来源不同相关。有1株(8.3%)菌携带了tsst-1基因,未检测到携带seh和et基因的菌株,主要原因是本研究菌株均来自皮肤软组织感染的患者,考虑毒素阳性率的高低与感染类型相关。

总之,通过临床资料和实验室检测数据分析,可更全面地了解CA-SA感染的疾病特点和流行特征^[15]。由于CA-MSSA的耐药性相对较低、引起的感染较轻,常被临床医师忽略,尤其产pvl毒素菌株可能会构成潜在威胁,临床医师和感染控制工作者应注意检测和预防。

【参考文献】

- [1] Xiong ZJ, Xiao M, Wang H, et al. Research of molecular epidemiology and antibiotic resistance about methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from seven hospitals in China [J]. Chin J Infect Chemother, 2012, 12(1): 22~24. [熊祝嘉, 肖盟, 王贺, 等. 中国7所医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学及耐药性研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(1): 22~24.]
- [2] Liu C, Chen ZJ, Sun Z, et al. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and

- heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from Central Southern China [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2015, 48(5): 490–496.
- [3] Xu XL, Zhou S, Bai L, et al. Characteristics of antimicrobial resistance and molecular epidemiology about *Staphylococcus aureus* isolated from patients in intensive care units [J]. *Chin J Infect Control*, 2016, 15(5): 294–298. [徐修礼, 周珊, 白露, 等. ICU患者分离金黄色葡萄球菌的耐药性及分子流行病学特征[J]. 中国感染控制杂志, 2016, 15(5): 294–298.]
- [4] Wu Y, Wang GY, Yu Y, et al. SCCmec typing and antibiotic resistance analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Lab Med*, 2016, 37(4): 455–457. [吴宇, 王贵宇, 余瑶, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的SCCmec分型及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(4): 455–457.]
- [5] Hao CH, Wan YH, Pei SJ, et al. Analysis of resistance genes and virulence genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Chin Rem Clin*, 2015, 15(12): 1712–1713. [郝崇华, 万艳红, 裴世静, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药基因与毒力基因分析[J]. 中国药物与临床, 2015, 15(12): 1712–1713.]
- [6] Zhao CJ, Wang H, Sun QN, et al. Epidemiological investigation of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection from 4 hospitals in Beijing [J]. *Chin J Lab Med*, 2012, 35(3): 237–242. [赵春江, 王辉, 孙秋宁, 等. 北京四家医院社区获得性甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染的流行病学调查[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(3): 237–242]
- [7] Liu XL, Wang B, Jiang YS, et al. Research on SCCmec typing and antibiotic resistance of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Chin J Antibiotics*, 2015, 40(3): 197–202. [刘小丽, 王斌, 江元山, 等. 社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌SCCmec分型及耐药性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(3): 197–202.]
- [8] Niu RB, Guo LP, Wang XG, et al. Difference in antibiotic resistance between hospital-and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Chin Infect Control*, 2015, 14(7): 476–478. [牛瑞兵, 郭利平, 王新刚, 等. 医院获得性与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性差异[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(7): 476–478.]
- [9] Becker RE, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* and the skin: a longstanding and complex interaction [J]. *Skinmed*, 2015, 13(2): 111–119.
- [10] Wang YJ, Wang J, He G. Progress in clinical diagnosis and treatment of skin and soft tissue infection [J]. *Clin Misdiagn Misther*, 2016, 29(2): 113–116. [王永进, 王娟, 何钢. 皮肤及软组织感染临床诊治进展[J]. 临床误诊误治, 2016, 29(2): 113–116.]
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [S]. Eighteenth Informational Supplement, Wayne: CLSI, 2010.
- [12] Zou ZY, Han L, Xiong J, et al. Research on spa typing and resistance characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens [J]. *Chin J Infect Chemother*, 2014, 14(2): 142–145. [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.]
- [13] Liu XL, Wang B, Jiang YS, et al. Detection of Panton-Valentine leukocidin genes and antibiotic resistance in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates from outpatients with skin and soft-tissue infections in Wuhan [J]. *Chin J Dermatol*, 2016, 12(3): 172–175. [刘小丽, 王斌, 江元山, 等. 武汉地区门诊皮肤软组织感染患者中甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌PVL基因携带及耐药性检测[J]. 中华皮肤科杂志, 2016, 12(3): 172–175.]
- [14] Shen L, Jiang N, Yang ZY, et al. Molecular typing and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* infected with acne [J]. *Guangdong Med*, 2016, 37(6): 856–858. [申丽, 姜南, 杨智勇, 等. 痤疮感染金黄色葡萄球菌分子分型及毒力特征[J]. 广东医学, 2016, 37(6): 856–858.]
- [15] Wu YR, Huang H, Peng CJ. Clinical analysis of 214 *Staphylococcus aureus* strains from skin and soft tissue infections [J]. *Int J Lab Med*, 2015, 35(12): 1688–1690. [吴愿如, 黄华, 彭常军. 214例皮肤软组织感染金黄色葡萄球菌的临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 35(12): 1688–1690.]

(编辑: 王彩霞)