

论著·临床研究

成都地区健康儿童鼻腔社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的携带研究

范娟 周伟 舒敏 邓建军 朱渝 邓思燕 郭琴 万朝敏

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 调查成都地区健康儿童鼻腔中社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)的携带率。**方法** 采用横断面调查研究的方法,收集成都市5所幼儿园健康儿童的相关资料及鼻拭子样本,进行细菌培养,使用琼脂纸片扩散法及琼脂稀释法对培养出的金黄色葡萄球菌进行抗生素敏感试验;用PCR方法检测CA-MRSA菌株*mecA*耐药基因及*PVL*毒力基因。**结果** 共有801例健康儿童纳入研究,其中金黄色葡萄球菌的携带率为18.4%(147/801);CA-MRSA的携带率为1.1%(9/801),并且这9例CA-MRSA全都携带*mecA*耐药基因,其中有5例CA-MRSA携带*PVL*基因。9例CA-MRSA中6例为多重耐药。**结论** 在中国成都市,社区健康儿童已出现CA-MRSA携带者,而且多为多重耐药、部分携带*PVL*毒力基因。社区健康儿童CA-MRSA的携带已成为值得关注的重要问题。

[中国当代儿科杂志,2011,13(1):16-19]

[关键词] 社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;携带;儿童

[中图分类号] R72 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)01-0016-04

Nasal carriage of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in healthy children from Chengdu

FAN Juan, ZHOU Wei, SHU Min, DENG Jian-Jun, ZHU Yu, DENG Si-Yan, GUO Qin, WAN Chao-Min. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu, China 610041 (Wan C-M, Email: wcm0220@sina.com)

Abstract: Objective To evaluate the prevalence of nasal carriage of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in healthy children from Chengdu. **Methods** Strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from nasal swabs of healthy children from five kindergartens in Chengdu from September, 2005 to December, 2005 and questionnaires were obtained. Antibiotic susceptibility test was performed with agar disk diffusion and Bauer-Kirby on Mueller-Hinton medium method to determine CA-MRSA. *mecA* and *PVL* genes were detected with PCR in all of the CA-MRSA isolates. **Results** A total of 801 children were enrolled. Overall 147 children (18.4%) were carried with *Staphylococcus aureus* and 9 (1.1%) were carried with CA-MRSA. All CA-MRSA isolates were positive for *mecA* gene, and 5 CA-MRSA isolates were positive for *PVL* gene. Of the 9 CA-MRSA isolates, 6 were multiresistant. **Conclusions** CA-MRSA nasal colonization is present among Chengdu healthy children. The CA-MRSA isolates are multiresistant and parts of CA-MRSA isolates carry *PVL* gene. The nasal carriage of CA-MRSA in healthy children should be a concerned issue.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(1):16-19]

Key words: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Carriage; Child

金黄色葡萄球菌(金葡菌)是常见的医院及社区感染病原之一。1998年Herold等^[1]报道了首例无危险因素儿童社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA)感染。这种新的社区病原已成为威胁儿童健康的重要问题。目前许多CA-

MRSA研究的样本多来自于医院,而关于在社区生活的健康儿童携带CA-MRSA情况的研究很少,在中国大陆地区尚未见来源于健康儿童CA-MRSA的报道。本研究目的在于了解成都地区健康儿童鼻部CA-MRSA的携带情况及其耐药特性、分子生物学特点。

[收稿日期]2010-03-02;[修回日期]2010-07-11

[作者简介]范娟,女,博士,医师。

[通信作者]万朝敏,教授。

1 资料与方法

1.1 研究对象

采用横断面调查、整群抽样的方法于2005年9~11月抽取成都市5所幼儿园中健康儿童作为研究对象,其中包括日托幼儿园4所,全托幼儿园1所。

纳入标准为:①经体检证实健康的儿童;②愿意参加调查,并且家长同意的儿童。

对所有纳入日托幼儿园儿童的父母及全托幼儿园儿童的教师发出调查表,收集儿童的一般资料,包括:性别、年龄、样本来源、个人危险因素(近1年内住院史、抗生素使用情况、疾病情况)、家庭危险因素(家庭成员住院史、家庭成员从事医护工作情况)。取所有纳入研究儿童的鼻拭子标本培养分离金葡菌。

样本通过使用无菌干燥棉签伸入儿童左侧鼻腔中约1 cm接触鼻黏膜,旋转停留3 s后取出,放入无菌培养管中取得。培养管在取样后4 h内进行培养接种。

本研究经四川大学华西第二医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 分离金葡菌 将鼻拭子标本棉签接种于甘露醇食盐琼脂培养基上孵育,挑出培养基上长出的金黄色单个菌落,进行凝固酶试验及触酶试验。以上两个试验均为阳性则所分离的菌落为金葡菌。再将菌落接种于血培养基上观察β溶血现象。将分离出的已鉴定为金葡菌的单个菌落,保存于无菌的脱脂牛奶中,置于-70℃保存待用。质控菌株为金葡菌 ATCC29213株。

1.2.2 抗生素敏感试验 按照CLSI的标准^[2]先使用琼脂纸片扩散法进行初筛,再使用琼脂稀释法确定精确的MIC值。共使用以下6种抗生素:苯唑西林、万古霉素、克林霉素、红霉素、青霉素、利福平。

使用金葡菌 ATCC 29213 株为敏感菌(MSSA)质控菌株,ATCC 43300 株为耐药菌(MRSA)质控菌株。

1.2.3 PCR方法检测 mecA 耐药基因及 PVL 毒力基因 使用细菌基因组DNA提取试剂盒(北京天为时代科技有限公司)提取CA-MRSA DNA。使用2xTaq PCR MasterMix 试剂盒(北京天为时代科技有限公司)进行PCR扩增 mecA 耐药基因及 PVL 毒力基因。mecA 基因引物^[3]: 5'-TCCAGATTA-CAACTTCACCAGG-3'; 5'-CCACTTCATATCTTGTA-ACG-3'。PVL 基因引物^[4]: 5'-ATCATTAGGTA-AAATGTCTGGACATGATCCA3'; 5'-GCATCAASTG-TATTGGATAGCAAAAGC-3'。两条基因扩增条件分别为:mecA 基因 95℃ 5 min 预变性;95℃ 1 min, 50℃ 1 min,72℃ 1 min,扩增30个循环;最后72℃延伸5 min;PVL 基因 95℃ 5 min 预变性;95℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2min,扩增30个循环;最后72℃延伸5 min。

1.3 统计学分析

采用SPSS 11.0 统计软件对数据进行统计分析,率的比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

共纳入了801例2~7岁的健康儿童。其中日托幼儿园555例,全托幼儿园246例。金葡菌携带率为18.4%(147/801)。各年龄组间金葡菌携带率差异有统计学意义($\chi^2=8.124,P=0.017$),其中5~7岁组携带率最高。男女间金葡菌携带率差异无统计学意义($\chi^2=0.035,P=0.852$)。见表1。CA-MRSA携带率为1.1%(9/801),平均年龄为4岁,男性5例,女性4例,日托幼儿园6例,全托幼儿园3例。

表1 社区中健康儿童携带金葡菌的一般情况 [例(%)]

例数	年龄			性别		地点	
	2岁~	3岁~	5~7岁	男	女	日托幼儿园	全托幼儿园
无携带者	654	155 (86.6)	286 (83.1)	213 (76.6)	337 (81.4)	317 (81.9)	442 (79.6)
金葡菌携带者	147	24 (13.4)	58 (16.9)	65 (23.4)	77 (18.6)	70 (18.1)	113 (20.4)
总计	801	179 (22.3)	344 (43.0)	278 (34.7)	414 (51.7)	387 (48.3)	555 (69.3)

2.2 金葡菌携带者及 CA-MRSA 携带者的危险因素

801例儿童中,6月内使用抗生素的儿童(581例)金葡菌携带率高于未使用抗生素的儿童(220例)($\chi^2=5.411,P<0.05$)。9例携带CA-MRSA的健康儿童中各有1例分别在1周及1月内使用过抗生素,而在1月至半年内有3例使用过抗生素。

801例儿童中,既往1年内有住院史的儿童(83例)与1年内无住院史儿童(718例)相比,金葡菌携带率差异无统计学意($\chi^2=1.607,P=0.205$)。家庭成员在近1年内有住院史的儿童(34例)与家庭成员近1年内无住院史的儿童(767例)相比,金葡菌携带率差异无统计学意义($\chi^2=2.898,P=0.089$)。家庭

成员中有从事医护工作的儿童(69例),与家庭成员中无从事医护工作的儿童(732例)相比,金葡菌携带率差异无统计学意义($\chi^2=0.047,P=0.829$)。9例携带 CA-MRSA 的健康儿童在近1年内均无住院史,只有1例儿童家庭成员在近1年内有住院史。日托幼儿园儿童金葡菌携带率高于全托幼儿园儿童, ($\chi^2=4.864,P=0.027$)。

2.3 抗生素敏感试验

抗生素敏感试验发现,147株金葡菌均对万古霉素敏感;9株 CA-MRSA 对苯唑西林耐药,其余138株为社区获得性甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(community-acquired methicillin-susceptible *staphylococcus aureus*, CA-MSSA)。这9株 CA-MRSA 均对青霉素耐药,7株对红霉素耐药,1株对利福平耐药,2株对克林霉素耐药,均对万古霉素敏感。9株 CA-MRSA 中3株对2种抗生素耐药,4株对3种抗生素耐药,2株对4种抗生素耐药。138株 CA-MSSA 中32.6%(45/138)对3种以上的抗生素耐药,其中有2株对4种抗生素耐药。

2.4 *mecA* 耐药基因及 *PVL* 毒力基因

本研究对147株金葡菌进行了 *mecA* 基因检测,阳性者47株,其中9株 CA-MRSA 全都携带 *mecA* 耐药基因。*PVL* 毒力基因检测中阳性者33株,9株 CA-MRSA 中有5株携带 *PVL* 毒力基因。见图1,2。

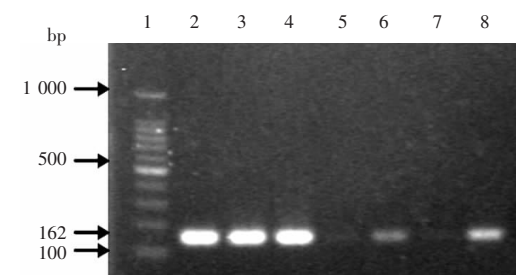


图1 *mecA* 基因电泳图 1:marker; 2,3,4,6,8:*mecA* 基因阳性标本,条带为162 bp; 5,7:*mecA* 基因阴性标本。

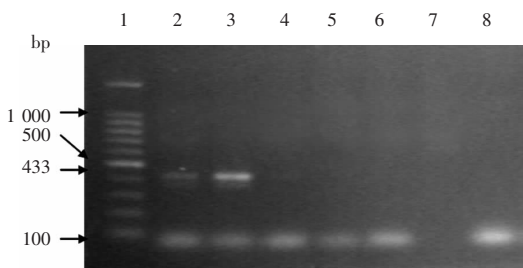


图2 *PVL* 基因电泳图 1:marker; 2~3:*PVL* 基因阳性标本,条带为433 bp; 4~8:*PVL* 基因阴性标本。

3 讨论

本研究的健康儿童鼻腔 CA-MRSA 的携带率为1.1%,与国外报道的健康儿童 CA-MRSA 携带率0.8%~3%相似^[5-6]。Nakamura 等^[7]的研究发现,社区健康儿童中 MRSA 携带率为0.8%,然而这样低的携带率也引起很高的 CA-MRSA 感染。CA-MRSA 主要引起皮肤软组织感染,但也可以引起严重的侵袭性疾病包括坏死性肺炎及坏死性筋膜炎^[8-9]。有研究报道,70%的 CA-MRSA 感染发生在皮肤、伤口及脓肿,仅有16%导致严重侵袭性感染如坏死性肺炎等^[10]。由 CA-MRSA 引起的肺炎并不常见,但能引起严重的后果如坏死性肺炎、休克、呼吸衰竭、脓肿形成及脓胸。而鼻腔的定植是金葡菌感染的潜在危险因素,约有超过80%的感染源于鼻腔金葡菌的定植^[11]。因此了解社区中健康儿童 CA-MRSA 的携带情况能使人们对 CA-MRSA 感染的发病情况有更多的认识。

本研究发现,6个月内使用过抗生素的儿童金葡菌携带率高于未使用过抗生素的儿童。由此可见,社区中抗生素的广泛应用与金葡菌的鼻腔携带有一定相关,会增加金葡菌携带的危险性。集中在幼儿园的儿童,机体各个器官的功能尚在发育中,免疫系统功能没有完善,是病原菌袭击的一个弱势群体。当机体免疫力低下或局部皮肤、黏膜破损时,定植在人体的病原菌就可能引起严重的感染。而社区中抗生素的广泛应用加深了这种潜在病原菌携带及感染的危险性。无论是 CA-MRSA 还是 CA-MSSA 都对红霉素、青霉素表现出较高的耐药率,多重耐药现象(包括对青霉素耐药)发生率也较高。CA-MRSA 在中国成都地区不仅是一种社区病原,而且也具有医院相关性多重耐药的特性。问卷调查显示72.5%的儿童在调查前半年内使用过抗生素,提示社区病原中耐药现象的普遍及多重耐药现象的发生可能与社区中抗生素的广泛应用有一定相关性。9株 CA-MRSA 中有7株对红霉素耐药,2株对克林霉素耐药。如存在红霉素耐药诱导克林霉素耐药,经验性地对 CA-MRSA 感染使用克林霉素治疗会导致治疗失败。一项研究报道,在 MSSA 和 MRSA 菌株中诱导克林霉素耐药的发生率分别为20%和10%^[12]。因此经验性地对 CA-MRSA 感染使用克林霉素治疗应该谨慎。

9株 CA-MRSA 全都携带 *mecA* 耐药基因。*Mec* 基因是 MRSA 耐药的主要基因,由活动的遗传元件

SCCmec 编码^[9]。研究发现,由于 CA-MRSA 的 SCC 片断过小,只能携带 *mecA* 耐药基因,不具有其他耐药基因,因而与医院相关性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌不同,CA-MRSA 多为非多重耐药^[13]。而在本研究中 CA-MRSA 多为多重耐药。在台湾地区也有类似的发现^[14]。这显示尽管 CA-MRSA 的多重耐药现象不多见,但 CA-MRSA 也可以含有许多转座子和插入序列,从而获得非 β -内酰胺类耐药基因。*PVL* 是一种与皮肤软组织感染及坏死性肺炎相关的杀白细胞毒力因子^[15]。目前的研究多认为携带 *PVL* 基因是 CA-MRSA 所独有的特点,与其所致皮肤软组织感染,严重的侵袭性疾病包括坏死性肺炎及坏死性筋膜炎等疾病相关。然而与国外研究不同,本研究中并非所有的 CA-MRSA 都携带 *PVL* 基因。研究发现,35 例 CA-MRSA 感染的患者中 *PVL* 的携带率为 17.1%^[16]。而一项对成都市感染患儿的研究发现,11 例医院获得性耐甲氧西林金葡菌有 9 例也携带 *PVL* 基因^[17]。因此 *PVL* 基因可能并不是 CA-MRSA 特有的,*PVL* 基因虽然具有引起严重社区感染性疾病的潜在风险,但其对疾病的影响还取决于克隆背景。

综上,在中国成都市,社区健康儿童已出现 CA-MRSA 携带者。这一地区发现的 CA-MRSA 有不同于国外研究的一些特点。社区健康儿童 CA-MRSA 的携带值得关注。

[参 考 文 献]

[1] Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gas-kin RE, Boyle-Vavra S, et al. Community-acquired methicillin-re-sistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predis-posing risk[J]. JAMA, 1998, 279(8): 593-598.

[2] Clinical and Laboratory Standards. Performance Standards for An-timicrobial Susceptibility Testing-Approved Standard. M2-A9. Clinical and Laboratory Standard Institute; Wayne PA 2005.

[3] Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(7): 2155-2161.

[4] Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gaudu-chon V, et al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-produ-cing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumo-nia[J]. Clin Infect Dis, 1999, 29(5): 1128-1132.

[5] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin re-

sistance in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Che-mother, 2000, 44(6): 1549-1555.

[6] Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, et al. Novel type of staphylococcal cassette chro-mosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(4): 1147-1152.

[7] Nakamura MM, Rohling KL, Shashaty M, Lu H, Tang YW, Ed-wards KM. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus au-reus* nasal carriage in the community pediatric population[J]. Pe-diatr Infect Dis, 2002, 21(10): 917-922.

[8] Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities[J]. N Engl J Med, 2005, 352(14): 1436-1444.

[9] Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, et al. Necrotizing fasciitis caused by community-associ-ated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles [J]. N Engl J Med, 2005, 352(14): 1445-1453.

[10] Frank AL, Marcinak JF, Mangat PD, Schreckenberger PC. Com-munity-acquired and clindamycin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in childre[J]. Pediatr Infect Dis, 1999, 18(11): 993-1000.

[11] Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluyt-mans JA, et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers[J]. Lan-cet, 2004, 364(9435): 703-705.

[12] Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multi-locus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1008-1015.

[13] Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *cCrC* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2637-2651.

[14] Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, Daum RS. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylo-coccus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel *Staphylococcal* chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) type VT or SCC*mec* type IV[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4719-4730.

[15] Iyer S, Jones DH. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infection; a retrospective analysis of clinical presentation and treatment of a local outbreak [J]. J Am Acad Dermatol, 2004, 50(6): 854-858.

[16] Yu F, Chen Z, Liu C, Zhang X, Lin X, Chi S, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes among isolates from hospitalised patients in China[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(4): 381-384.

[17] Fan J, Shu M, Zhang G, Zhou W, Jiang Y, Zhu Y, et al. Bioge-ography and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6216.

(本文编辑:俞 燕)