

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.10.006
文章编号: 1005-8982 (2018) 10-0032-05

临床研究·论著

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MLST 联合 SCCmec 基因分型与耐药性分析*

纪冰¹, 王凯凯¹, 赵红梅¹, 董艳¹, 孟玮¹, 邢敏², 孙吉花²

(滨州医学院附属医院 1. 检验科, 2. 感染管理办公室, 山东 滨州 256603)

摘要:目的 了解滨州医学院附属医院 MRSA 菌株多位点序列分型 (MLST) 联合 SCCmec 基因型分布和各种基因型的耐药特征。**方法** 采用聚合酶链反应 (PCR) 对 MRSA 菌株进行 MLST 联合 SCCmec 基因分型; 采用 WalkWAY96PLUS PC33 药敏板检测 MRSA 抗菌药物敏感性。**结果** SCCmec 基因分型结果以 III 型为主 (63/67 株, 占 94.03%), MLST 分型共检测出 6 种基因型: ST88、ST121、ST221、ST82、ST239 及 ST399, 其中以 ST239 (61/67, 91.04%) 为主, 耐药性分析显示 SCCmec III 型 MRSA 菌株表现为多重耐药。**结论** ST239-MRSA-SCCmec III 型菌株为鲁北地区 MRSA 主要流行菌株, 该型菌株对多种抗生素呈多重耐药; MLST 联合 SCCmec 基因分型方法是 MRSA 遗传背景研究简便快速的方法。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 多位点序列分型; 葡萄球菌 mec 盒式染色体; 耐药

中图分类号: R 978.1

文献标识码: A

Drug resistance and MLST combined with SCCmec genotyping of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**

Bing Ji¹, Kai-kai Wang¹, Hong-mei Zhao¹, Yan Dong¹, Wei Meng¹, Min Xing², Ji-hua Sun²

(1. Clinical Laboratory, 2. Infection Management Office, Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong 256603, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistance and genetic background of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** Multilocus sequence typing (MLST) technique was introduced to identify sequence types (ST) of MRSA, SCCmec types were determined by multiplex PCR. MLST plus SCCmec typing of these strains were used for their genotyping at the same time. The susceptibility to antimicrobial agents was tested by micro-dilution method. **Results** Among the 67 isolates of MRSA, 63 (94.03%) isolates belonged to SCCmec type III; 6 different genotypes were detected by MLST typing which included ST88, ST121, ST221, ST82, ST239 and ST399, and 61 (91.04%) isolates belonged to ST239. Drug resistance analysis showed the MRSA strains of SCCmec type III were multi-resistant. **Conclusions** ST239-MRSA-SCCmec III genotype is the major epidemic strain in northern Shandong Province, which has multiple resistance to antibiotics. MLST combined with SCCmec genotyping is a rapid and simple method of MRSA genotyping.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; Methicillin; multilocus sequence typing (MLST); *Staphylococcal* cassette chromosome mec (SCCmec); resistance

收稿日期: 2017-07-20

* 基金项目: 滨州市科技发展计划项目 (No: 2013ZC1711); 滨州医学院科技计划 (No: BY2013KJ02); 山东省医药卫生科技发展计划 (No: 2015WS0491, No: 2017WS372)

金黄色葡萄球菌是临床分离常见致病菌, 由于可以释放多种毒素等原因造成致病力很强, 是现代临床感染性疾病中非常重要的病原菌^[1]。金黄色葡萄球菌在获得 *mecA* 基因后成为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Meticillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA), MRSA 对多种抗生素表现多重耐药且耐药性逐年上升, 已经成为现代临床抗感染治疗的难题之一^[2]。本研究通过多位点测序分型联合 *SCCmec* 基因分型对 MRSA 进行基因分型以了解滨州医学院附属医院的主要流行株情况, 并探讨不同基因型与药敏谱的关系, 明确 MRSA 的起源、传播和流行特征, 制定本地区最佳防治措施。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

收集本院 2013 年 3 月-2015 年 11 月临床分离的经德国西门子公司 WalkWAY96 PLUS 全自动微生物分析仪鉴定为金黄色葡萄球菌, 头孢西丁纸片扩散法进行筛选, 用 PCR 方法检测 *mecA* 基因确认为 MRSA 共 67 株。金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC29213 和 ATCC43300 购于中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会临床检验中心。

1.2 仪器和试剂

WalkWAY96 PLUS 全自动微生物分析仪, 溶葡萄球菌酶、细菌 DNA 提取试剂盒、引物、1 000 bp DNA ladder Marker、PCR 试剂均购自上海生物工程有限公司, PC33 鉴定药敏复合板购自德国西门子公司。

1.3 药物敏感试验

采用 WalkWAY96 PLUS 自动微生物分析仪 PC33 鉴定药敏复合板和 Kirby-Bauer 法检测抗菌药物的敏感性, 共测试 17 种抗菌药物, 分别为: 青霉素、氨苄西林、苯唑西林、利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素、环丙沙星、莫西沙星、左氧氟沙星、氯霉素、克林霉素、红霉素、庆大霉素、利福平、四环素、复方新诺明及米诺环素。

1.4 *SCCmec* 基因分型检测

对金葡菌 DNA 提取后进行多重 PCR 扩增, 分型引物 / 扩增及反应条件均依据 ZHANG 等^[3] 的报道, 根据扩增条带分为 5 型。标准阳性对照菌株: NCTC10042 (*SCCmec* I 型)、N315 (*SCCmec* II 型)、85/2080 (*SCCmec* III 型)、JCSC4744 (*SCCmec* IV 型)、HS663 (*SCCmec* V 型) 由滨州医学院微生物教研室

张玉梅惠赠。标准阳性对照菌株保证在规定实验条件下, 保证每次结果的质量控制, 与标准菌株出现相同产物长度条带为该 *SCCmec* 型别, *SCCmec* I、II、III、IV 及 V 型分别出现 613、398、280、776 及 325 bp 条带。

1.5 MLST 分型

提取金黄色葡萄球菌 DNA 后进行 PCR 扩增金黄色葡萄球菌染色体 DNA 上的 7 个管家基因 *arcC*、*aroE*、*glpF*、*gmk*、*pta*、*tpi* 及 *yqiL* 的可变区片段。引物序列依据 MLST 网站, PCR 扩增后 PCR 产物送上海生物工程有限公司进行双向测序, 将所测序列与 WWW.mlst.net 上公布的管家基因的等位基因进行比较, 从而获得所测金黄色葡萄球菌的 7 个管家基因的等位基因谱, 然后提交 MLST 网站根据等位基因谱确定其序列分型 (sequence type, ST)。利用 eBURST 软件分析 ST 分型结果, 最后得出细胞克隆株 (clonal complex, CC) 来源。

1.6 方法

采用 eBURST 软件分析 ST 分型结果, 采用 Whonet 5.6 软件进行细菌耐药性分析。

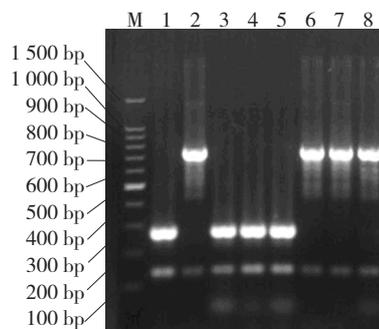
2 结果

2.1 *SCCmec* 基因分型结果

在检测的 67 株 MRSA 中, *SCCmec* III 型菌株 63 株, 占 94.03%, *SCCmec* IV 菌株 4 株, 占 5.97%。*SCCmec* III 型和 *SCCmec* VI 型阳性对照菌株与检测阳性菌株产物分别于 280 和 776 bp 出现条带。PCR 扩增结果见附图。

2.2 MLST 分型结果

经 PCR 分别扩增 67 株 MRSA 的 7 个管家基因, 扩增后的 PCR 产物经纯化后测序, 最后提交 MLST 网



M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: *SCCmec* III 型阳性对照菌株; 2: *SCCmec* VI 型阳性对照菌株; 3, 4, 5: *SCCmec* III 型检测阳性菌株; 6, 7, 8: *SCCmec* IV 型检测阳性菌株

附图 MRSA 的 *SCCmec* 多重 PCR 扩增产物电泳图谱

站分析,本研究共检出 6 个 ST 型。见表 1。

2.3 不同基因型的药物敏感试验结果

6 种型别 MRSA 菌株对青霉素、氨苄西林等 β -内酰胺类抗生素完全耐药,对万古霉素、利奈唑烷和替考拉宁完全敏感,ST239-MRSA-SCCmec III、ST399-MRSA-SCCmec III 及 ST121-MRSA-SCCmec IV 均为多重耐药株(对 3 种类型以上的抗菌药物耐药),ST88-MRSA-SCCmec IV、ST221-MRSA-SCCmec IV 及 ST82-MRSA-SCCmec IV 对非 β -内酰胺类的抗菌药物多表现敏感,为非多重耐药。见表 2。

表 1 67 株 MRSA 的 MLST 结果

ST 型别	Arc-aroE-glpf-gmk-pta-tpi-yqil	CC 组	SCCmec 型别	菌株数 / 株
239	2-3-1-1-4-4-3	8	III	61
399	6-5-55-2-7-14-10	121	III	2
121	6-5-6-23-7-14-5	7	IV	1
88	22-1-14-23-12-4-31	10	IV	1
221	1-4-1-1-12-1-10	2	IV	1
82	22-1-14-23-12-14-31	10	IV	1

表 2 不同 ST-MRSA-SCCmec 基因型别耐药率 %

抗生素	耐药率					
	ST239-MRSA-SCCmec III (61 株)	ST399-MRSA-SCCmec III (2 株)	ST121-MRSA-SCCmec IV (1 株)	ST88-MRSA-SCCmec IV (1 株)	ST221-MRSA-SCCmec IV (1 株)	ST82-MRSA-SCCmec IV (1 株)
青霉素	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
氨苄西林	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
苯唑西林	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
氯霉素	17.50	50.00	0.00	100.00	0.00	100.00
利奈唑胺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
万古霉素	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
替考拉宁	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
环丙沙星	84.13	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
莫西沙星	25.41	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00
左氧氟沙星	80.91	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
米诺环素	9.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
克林霉素	98.33	100.00	100.00	0.00	100.00	0.00
红霉素	98.33	100.00	100.00	0.00	100.00	0.00
庆大霉素	83.61	50.00	100.00	0.00	0.00	0.00
利福平	23.81	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00
四环素	77.05	100.00	100.00	0.00	0.00	0.00
复方新诺明	17.46	50.00	0.00	0.00	100.00	0.00

3 讨论

金黄色葡萄球菌可以引起医院和社区诸如心内膜炎、菌血症、肺炎等可危及生命的严重感染性疾病,由于金黄色葡萄球菌在获得 *mecA* 基因成为 MRSA 后的多药耐药性和交叉耐药性特点使临床治疗非常棘手,致临床治疗难以控制,目前已成为临床抗感染治疗的一大难题,现在不同地区 MRSA 的起

源、控制医院内传播和耐药特征已成为国内外耐药监测和流行病学监测的热点和重点。在众多基因型方法中,由 ENRIGHT 等^[4]建立的 MLST 联合 SCCmec 基因型方法将 MRSA 的群体生物学、致病性和进化等遗传特征和 SCCmec 染色体盒耐药基因特征相结合对 MRSA 进行分析,该技术操作简单易行,可重复性强,由于有固定 MLST 互连网站数据库故可

以实现不同实验室之间进行信息互相传递和比较分析, 现在已被国际临床微生物界认定是定义 MRSA 克隆株的参考方法, 适用于公共卫生、分子流行病学和群体进化学研究。通过对国际上的 MRSA 进行 MLST 联合 *SCCmec* 基因分型技术分型发现目前主要有 5 个 MRSA 流行克隆: ST250-MRSA-*SCCmec* I (First 株)、ST247-MRSA-*SCCmec* I (Iberian 株)、ST5-MRSA-*SCCmec* II (NewYork/Japan 株)、ST239-MRSA-*SCCmec* III (Brazilian/Hungarian 株) 及 ST5-MRSA-*SCCmec* IV (Pediatric)。本研究 67 株 MRSA 流行的主要是 ST239-MRSA-III, 与大部分亚洲国家^[5]和国内杨延成^[6]研究 ST239-MRSA-III 主要流行株相同, ST239-MRSA-III 属于国际流行克隆株中的 Brazilian/Hungarian 株, 也是我国医院获得性感染 MRSA 主要流行株, 而研究中 ST399-MRSA-*SCCmec* III、ST121-MRSA-*SCCmec* IV、ST88-MRSA-*SCCmec* IV、ST221-MRSA-*SCCmec* IV 及 ST82-MRSA-*SCCmec* IV 都不是国际流行克隆株, 在国内外也能散发检测到, 要求进一步研究其基因特征来确定菌株起源。63 株 *SCCmec* III 型 MRSA 有 2 型 ST 型别, 相对于 *SCCmec* III 型 MRSA, *SCCmec* IV 型 MRSA 显示了更为多样化的 ST 分型特点, 4 株就检测出 4 型不同的 ST 型别。所以 *SCCmec* IV 型 MRSA 菌株与 *SCCmec* III 型相比具有完全不同菌株起源背景和进化路线, 提示在滨州医学院附属医院 *SCCmec* IV 型 MRSA 可能存在独特的遗传背景和进化传播方式。MLST 联合 *SCCmec* 基因分型技术的最主要优势是已经建立了存有大型基因型数据库的国际网站, 不同国家, 不同地区的实验室可以将自己的检测结果提交基因型数据库与公认的已有的流行株进行比较和分析, 可以对不同实验室分离的 MRSA 的遗传背景和进化传播路线进行相关性分析, 实现世界范围内的流行病学调查, 监测是否出现国际流行 MRSA 克隆株, 这样可以防止和控制国际流行 MRSA 株感染的爆发和流行。

SCCmec 分型与药物敏感试验结果结合分析显示 *SCCmec* III 型的 MRSA 株均表现为多重耐药 (对 3 类药物及以上耐药定义为多重耐药), 而 *SCCmec* IV 型 MRSA 均未表现为多重耐药, 药物敏感试验结果显示对红霉素、左氧氟沙星等非 β -内酰胺类的抗菌药物多为表现为敏感, 现有研究已经明确 III 型与 IV 型 MRSA 耐药性差异与不同型别 *SCCmec* 基因盒基因结构差异有关^[7]。在目前明确的 *SCCmec* 分型中, I、II、

III 型 *SCCmec* 基因盒基因元件结构比较复杂, 特别是存在于该 3 种 *SCCmec* 基因盒上的 IS431 等插入序列有吸引非 β -内酰胺类药物耐药基因的作用, 能将多种非 β -内酰胺类药物耐药基因整合到 *SCCmec* 基因盒中, 使之携带多种耐药基因并表现为对多种非 β -内酰胺类药物耐药。多项研究显示 *SCCmec* I、II 及 III 型常存在于医院获得性 MRSA (hospital acquired MRSA, HA-MRSA) 中引起医院获得性感染; *SCCmec* IV 型和 V 型基因盒基因元件比较简单, 不存在吸引其他耐药基因的元件结构, 所以一般不携带其他非 β -内酰胺类药物耐药基因, 本研究显示 *SCCmec* IV 型菌株为非多重耐药菌。*SCCmec* IV 和 V 型菌株多存在于社区获得 MRSA 中, 由于其可引起暴发流行和菌株不表现为多重耐药现在已成为研究的热点^[8]。对于 MRSA 临床医师经验性治疗第一选择仍为万古霉素, 药敏结果显示 MRSA 未发现耐万古霉素菌株, 但由于万古霉素的广泛应用已出现万古霉素 MIC 上升趋势, 使万古霉素使用受到一定限制, 国际上更出现万古霉素耐药菌株, 为了减缓万古霉素抗生素压力防止我国出现万古霉素耐药金葡菌, 本研究根据药物敏感结果提示携带 *SCCmec* III 型的医院获得性 MRSA 株对莫西沙星、氯霉素及米诺环素耐药率较低, 经验治疗时可考虑优先选择使用这些抗生素, 而对 *SCCmec* IV 型菌株对非 β -内酰胺类的抗菌药物敏感性较好, 经验治疗社区获得 MRSA 可以选择左氧氟沙星、红霉素及克林霉素等多种抗生素。

由于 MRSA 的致病性强、传播速度快和多重耐药性, 其引起的社区和医院感染如果监测和控制不当, 容易引起院内或社区感染的暴发, 严重威胁人类健康。故在医院和社区进行 MRSA 起源、传播和进化、抗菌药物敏感性试验的研究监测, 明确本地区 MRSA 流行株和尽早发现新的 MRSA 克隆株的播散, 可以根据 MRSA 菌株起源及传播特点并获取耐药机制, 为制定有针对性的预防和控制措施提供有力证据和方法, 能有效减少 MRSA 菌株的传播和流行。

参 考 文 献:

- [1] 仇广翠, 孙明忠, 金浩. 220 株金黄色葡萄球菌的临床分布特点及耐药性分析 [J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(2): 269-271.
- [2] KUMARI J, SHENOY S M, BALIGA S, et al. Healthcare-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus: Clinical characteristics and antibiotic resistance profile with emphasis

- on macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance[J]. Sultan Qaboos Un IV Med J, 2016, 16(2): 175-181.
- [3] ZHANG K, MCCLURE J A, ELSAYED S. 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.
- [4] ENRIGHT M C, ROBINSON A, RANDLE G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11): 7687-7692.
- [5] FEIL E J, NICKERSON E K, CHANTRATITA N, et al. Rapid detection of the pandemic methicillin-resistant staphylococcus aureus clone st 239, A dominant strain in asian hospitals[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1520-1522.
- [6] 杨延成, 程航, 胡珍, 等. 乌鲁木齐地区金黄色葡萄球菌分离株的分子分型与耐药性分析 [J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(9): 1035-1042.
- [7] 孙丽媛, 武昕媛, 李钰, 等. ICU 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型及耐药性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2015, 13(10): 468-471.
- [8] 金春梅, 陈宏斌, 朴美花, 等. 我国延边地区金黄色葡萄球菌分子特征研究 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 13(5): 468-471.

(张西倩 编辑)