

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.02.006
文章编号: 1005-8982 (2020) 02-0034-05

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及 *SCCmec* 基因分型研究

胡庆花¹, 朱德全², 刘卫东³, 刘向峰³

[1. 山东第一医科大学 (山东省医学科学院) 研究生处, 山东 泰安 271000; 2. 临沂市人民医院 微生物检验科, 山东 临沂 276000; 3. 临沂市人民医院 药学部, 山东 临沂 276000]

摘要: 目的 分析耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 耐药性及 *SCCmec* 基因分型, 探讨临沂市人民医院 MRSA 菌株的流行趋势, 为临床预防和有效治疗 MRSA 感染提供理论依据。**方法** 选取 2018 年 2 月—10 月临沂市人民医院门诊及住院患者的各类送检标本, 从中分离得到 MRSA 菌株 47 株, 剔除同一患者多次分离得到的菌株, 仅留取第 1 次分离的菌株, 采用 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析仪对收集的菌株进行细菌鉴定和药敏试验。采用聚合酶链反应对 *SCCmec* 基因分型进行研究。**结果** 47 株 MRSA 分离菌株中 *SCCmec* II 型 9 株 (19.15%), *SCCmec* IV a 型 35 株 (74.47%), 另有 3 株未分型 (6.38%)。MRSA 分离菌株对青霉素、苯唑西林及头孢西丁等 β -内酰胺类抗菌药物全部耐药, 对奎奴普汀/达福普汀、利奈唑胺、万古霉素、替加环素、呋喃妥因、利福平及庆大霉素敏感率为 100%; *SCCmec* II 型对环丙沙星、左氧氟沙星及莫西沙星的耐药率高于 *SCCmec* IV a 型 ($P < 0.05$)。 *SCCmec* IV a 型对红霉素、克林霉素耐药率高于 *SCCmec* II 型 ($P > 0.05$)。**结论** 分离的 MRSA 菌株以 *SCCmec* IV a 型为主, 不同 *SCCmec* 基因型的耐药谱有差异, 临床医生应根据药敏结果合理使用抗菌药物。

关键词: 抗甲氧西林金黄色葡萄球菌; 交叉感染; 聚合酶链反应

中图分类号: R378.11

文献标识码: A

Drug resistance and *SCCmec* typing of methicillin-resistant staphylococcus aureus

Qing-hua Hu¹, De-quan Zhu², Wei-dong Liu³, Xiang-feng Liu³

(1. Graduate Office, Shandong First Medical University, Taian, Shandong 271000, China; 2. Department of Microbiology, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China; 3. Department of Pharmacy, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China)

Abstract: Objective To analyze the resistance and *SCCmec* genotyping of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA), to explore the epidemic trend of MRSA strains in this area, and to provide theoretical scientific basis for clinical prevention and effective treatment of MRSA infection. **Methods** A total of 47 strains of MRSA isolated from the outpatients and inpatients of the hospital from February to October 2018 were collected. The strains isolated from the same patient were removed, and only the first isolates were selected. VITEK-2 compact automatic microorganisms were used. The analyzer performs bacterial identification and drug susceptibility testing

收稿日期: 2019-07-15

[通信作者] 刘卫东, E-mail: 1393170563@qq.com; Tel: 13953996807

on the collected strains. *SCCmec* genotyping studies were performed using multiplex polymerase chain (PCR) reactions. **Results** Among the 47 isolates of MRSA, 9 strains (19.15%) were *SCCmec* II, 35 strains (74.47%) were *SCCmec* IVa, and 3 were not classified (6.38%). MRSA isolates are resistant to β -lactam antibiotics such as penicillin, oxacillin, and cefoxitin. For quinopontin/dafloptin, linezolid, vancomycin, tigecycline, nitrofurantoin, rifampicin and gentamicin, the sensitivity rates were 100%; the resistance rate of *SCCmec* II MRSA strain to ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline was higher than that of *SCCmec* IVa MRSA strain ($P < 0.05$); the MRSA strain was severely resistant to erythromycin and clindamycin, and the resistance of *SCCmec* IVa type was higher than the *SCCmec* type II. The difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions** The MRSA strain isolated from Linyi People's Hospital is mainly *SCCmec* IVa. The resistance spectrum of different *SCCmec* types is different, and clinicians should use antibiotics reasonably according to drug sensitivity results.

Keywords: methicillin-resistant staphylococcus aureus; cross infection; polymerase chain reaction

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是一类常见的多重耐药菌, 由于葡萄球菌染色体 *mec* 基因盒 (staphylococcal cassette chromosome *mec*, *SCCmec*) 携带的 *mecA* 耐药基因及其同系物编码产生的青霉素结合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 导致其呈多重耐药性。目前, 国际上已经明确了 8 个与 MRSA 流行病学相关的 *SCCmec* 基因分型及 26 个亚型, 医院获得性 MRSA 常携带 I、II 及 III 型 *SCCmec* 基因, 社区获得性 MRSA 多携带 *SCCmec* IV、V 型 *SCCmec* 基因^[1]。由于不同地区 MRSA 的 *SCCmec* 分型差异较大, 因此该实验对 MRSA 进行耐药性及 *SCCmec* 基因分型研究, 以了解该地区 MRSA 的流行病学特点, 对指导临床合理治疗 MRSA 感染具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 菌株

选取 2018 年 2 月—2018 年 10 月临沂市人民医院门诊及住院患者的各类送检标本, 从中分离得到 MRSA 菌株 47 株, 剔除同一患者相同部位重复分离的菌株。MRSA 标准菌株采用 ATCC29213 和 ATCC43300。

1.2 仪器及材料

VITEK-2 Compact 全自动微生物分析仪及配套鉴定卡和药敏卡 (法国生物梅里埃公司), 药敏纸片 (英国 Oxoid 公司), 聚合酶链反应扩增仪、全自动凝胶成像仪 (美国 Bio Rad 公司), DYY-6C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司), 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取试剂盒、2 × Power Taq PCR Master Mix、

DL2000 DNA Marker 及核酸凝胶染色剂 -GelRed (北京百泰克生物技术有限公司), Multiplex PCR Kit (德国 QIAGEN 公司), 溶葡萄球菌酶等其他生物试剂 (上海生工生物工程股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 MRSA 细菌表型鉴定及药敏试验 采用 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析仪对分离菌株进行细菌鉴定及药敏试验。根据 2017 年美国临床和实验室标准协会相关标准推荐的头孢西丁纸片扩散法, 抑菌圈直径 ≤ 21 mm 判断为 MRSA^[2]。

1.3.2 DNA 提取 将收集的待测菌株接种于哥伦比亚血平板上, 置于 37℃ 生化培养箱中培养 18 ~ 24 h。用取菌环挑取适量单个菌落接种于 5 ml LB 培养液中, 置于 37℃ 恒温摇床过夜进行增菌培养。取 1.5 ml 细菌培养液于 2 ml 离心管中, 10 000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 收集菌体, 尽可能吸净上清。严格按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。提取后的 DNA 使用微量核酸蛋白测定仪检测浓度和纯度, 后将提取的 DNA 置于 -20℃ 冰箱中保存。

1.3.3 引物设计 各型别基因引物根据 GenBank 中已发布的各型基因序列及参考文献 [3] 自行设计 *mecA*、*SCCmec* 基因, 均委托上海铂尚生物技术公司合成^[3]。见表 1。

1.3.4 MRSA *mecA* 基因检测 采用 PCR 进行 *mecA* 基因检测, 反应体系为 25 μ l, 其中 DNA 模板 2 μ l, 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μ l, *mecA* 正反向引物各 1 μ l, 其余用 ddH₂O 补足 25 μ l。反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 继续延伸 10 min。将 PCR 产物放置于 4℃ 保存。取 5 μ l PCR 产物在 1% 琼脂糖

表 1 *mecA* 基因及 *SCCmec* 基因各分型 PCR 扩增引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
<i>mecA</i>	正向引物: 5' -GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3' 反向引物: 5' -CCAATTCATGTTTCGGTCTAA-3'	310
<i>SCCmec I</i>	正向引物: 5' -GCTTTAAAGACTGTCCGTACAGG-3' 反向引物: 5' -GTTCTCTCATAAGTATGACGTCC-3'	613
<i>SCCmec II</i>	正向引物: 5' -CGTTGAAGATGATGAAGCG-3' 反向引物: 5' -CGAAATCAATGGTTAATGGACC-3'	398
<i>SCCmec III</i>	正向引物: 5' -CCATATTGTGTACGATGCG-3' 反向引物: 5' -CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG-3'	280
<i>SCCmec IV a</i>	正向引物: 5' -GCCTTATTCGAAGAAACCG-3' 反向引物: 5' -CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG-3'	776
<i>SCCmec IV b</i>	正向引物: 5' -TCTGGAATTACTTCAGCTGC-3' 反向引物: 5' -AAACAATATTGCTCTCCCTC-3'	493
<i>SCCmec IV c</i>	正向引物: 5' -ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC-3' 反向引物: 5' -TTGCTATGAGGTATTGCTGG-3'	200
<i>SCCmec IV d</i>	正向引物: 5' -CTCAAATACGGACCCCAATACA-3' 反向引物: 5' -TGCTCCAGTAATTGCTAAAG-3'	881
<i>SCCmec V</i>	正向引物: 5' -GAACATTTGTTACTTAAATGAGCG-3' 反向引物: 5' -TGAAAGTTGTACCCTTGACACC-3'	325

凝胶电泳 30 min, 后将凝胶置于紫外凝胶成像仪下拍照并记录结果。

1.3.5 MRSA *SCCmec* 基因检测 采用多重 PCR 进行 *SCCmec* 基因分型检测, 反应体系为 25 μ l, 其中 DNA 模板 2 μ l, 2 \times QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 12.5 μ l, 引物混合物 5 μ l, 其余用 ddH₂O 补足 25 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。循环结束后将 PCR 产物于 4 $^{\circ}$ C 环境下保存。取 5 μ l PCR 产物在 1.3% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 后将凝胶置于紫外凝胶成像仪下拍照并记录结果。

1.4 统计学方法

数据分析采用 Whonet 5.6 软件和 SPSS 20.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示, 比较用校正 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *mecA* 基因检测结果

凝胶电泳成像显示, MRSA 分离菌株可见 310 bp

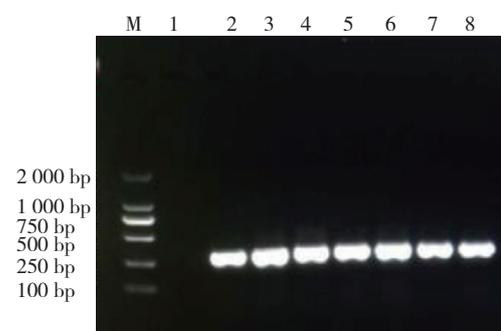
条带, 均为 *mecA* 基因阳性菌株, MRSA 分离菌株 *mecA* 基因携带率为 100%。见图 1。

2.2 *SCCmec* 基因检测结果

凝胶电泳成像显示: *SCCmec* II 型 9 株, 检出率为 19.15%; *SCCmec* IV a 型 35 株, 检出率为 74.47%; 未分型菌株 3 株, 占 6.38%。见图 2。

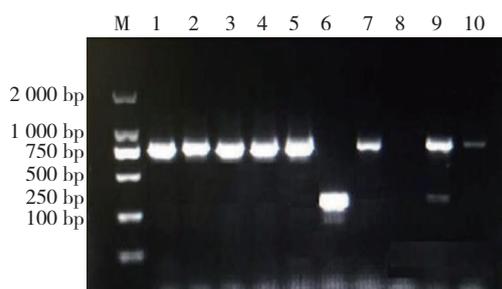
2.3 不同 *SCCmec* 分型 MRSA 对抗菌药的耐药率比较

MRSA 分离菌株对青霉素、苯唑西林及头孢西丁



M: DNA Ladder Marker 2000; 1: ATCC29213 阴性质控菌; 2: ATCC43300 阳性质控菌; 3 ~ 8: 随机抽取的待测 MRSA 菌株。

图 1 *mecA* 基因 PCR 扩增产物电泳图



M: DNA Ladder Marker 2000; 1 ~ 5、7、9 和 10: *SCCmec* IV a 型阳性 MRSA 菌株; 6: *SCCmec* II 型阳性 MRSA 菌株; 8: 未分型 MRSA 菌株。

图2 *SCCmec* 基因 PCR 扩增产物电泳图

等 β -内酰胺类抗菌药物耐药,对奎奴普汀/达福普汀、利奈唑胺、万古霉素、替加环素、呋喃妥因、利福平及庆大霉素均表现为敏感,敏感率均为 100%;不同 *SCCmec* 分型 MRSA 对环丙沙星、左氧氟沙星及莫西沙星的耐药率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),*SCCmec* II 型高于 *SCCmec* IV a 型。不同 *SCCmec* 分型 MRSA 对红霉素、克林霉素耐药率比较,经校正 χ^2 检验,差异无统计学意义($P > 0.05$),*SCCmec* IV a 型高于 *SCCmec* II 型,红霉素、克林霉素耐药严重。见表 2。

表2 不同 *SCCmec* 分型 MRSA 对抗菌药的耐药率比较 株 (%)

分型	n	青霉素 G	苯唑西林	头孢西丁	环丙沙星	左氧氟沙星	莫西沙星	红霉素
SCCmec II 型	9	9 (100.0)	9 (100.0)	9 (100.0)	6 (66.7)	3 (33.3)	3 (33.3)	5 (55.6)
SCCmec IV a 型	35	35 (100.0)	35 (100.0)	35 (100.0)	3 (8.6)	1 (2.8)	1 (2.8)	30 (85.7)
χ^2 值		-	-	-	11.494	4.781	4.781	2.363
P 值		-	-	-	0.001	0.029	0.029	0.124

分型	n	克林霉素	庆大霉素	奎奴普汀/达福普汀	利奈唑胺	四环素	甲氧苄啶/磺胺甲恶唑
SCCmec II 型	9	4 (44.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (33.3)	1 (11.1)
SCCmec IV a 型	35	28 (80.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (28.6)	1 (2.8)
χ^2 值		2.946	-	-	-	0.000	0.027
P 值		0.086	-	-	-	1.000	0.870

分型	n	万古霉素	替考拉宁	替加环素	达托霉素	呋喃妥因	利福平
SCCmec II 型	9	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
SCCmec IV a 型	35	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
χ^2 值		-	-	-	-	-	-
P 值		-	-	-	-	-	-

3 讨论

MRSA 指携带 *mecA* 或 *mecC* 基因或对苯唑西林 (最低抑菌浓度 $\geq 4 \mu\text{g/ml}$)、头孢西丁耐药的金黄色葡萄球菌,可引起人类多种组织和脏器的感染,病死率高^[4]。自 1961 年 JEVONS 发现第一株 MRSA 后,MRSA 已成为医院和社区感染的常见致病菌^[5]。

有研究表明,SCCmec 是区分医院获得性 MRSA 和社区获得性 MRSA 的重要指标之一^[6]。医院获得性 MRSA 常携带 I、II 和 III 型 *SCCmec* 基因, I 型 *SCCmec* 携带耐药基因较少,仅对 β -内酰胺类抗生素耐药; II、III 型携带多种耐药基因,表现多重耐药。

SCCmec IV、V 型多见于社区获得性 MRSA 中,由于其基因盒较短,除 *mecA* 基因外几乎不携带其他耐药基因,因此仅对 β -内酰胺类抗生素耐药^[7]。该研究还发现,MRSA 分离菌株以 *SCCmec* IV a 型为主,未发现 *SCCmec* I、III 及 V 型菌株,这与杨琴等^[8] 2018 年报道的深圳住院患儿 MRSA 的感染以 *SCCmec* IV 型社区获得性 MRSA 感染为主一致。但区别于 CHENG^[9] 和吴宇等^[10] 对 9 所医院 309 株 MRSA 分离菌株进行基因分型的检测结果:中国院内流行的 MRSA 菌株以 *SCCmec* III 型为主,其次为 II 型, *SCCmec* I ~ V 型占绝对优势。本研究结果显示,MRSA 分离菌株对青

霉素、苯唑西林和头孢西丁等 β -内酰胺类抗菌药物全部耐药,对奎奴普汀/达福普汀、利奈唑胺、万古霉素、替加环素、呋喃妥因、利福平和庆大霉素等均表现为敏感, *SCCmec* II 型 MRSA 分离株对左氧氟沙星、环丙沙星及莫西沙星的耐药率高于 *SCCmec* IV a 型,而 *SCCmec* IV a 型对红霉素、克林霉素耐药率高于 *SCCmec* II 型。近年来,越来越多的研究发现 IV 和 V 型 MRSA 菌株正在取代传统的医院获得性 MRSA 菌株,成为医院内感染的重要来源^[11-12]。对于 *SCCmec* IV 和 V 型 MRSA 菌株院内传播的原因尚不清楚,部分研究猜测,其传播可能与社区获得性 MRSA 菌株的高感染率和遗传适应性有关^[13-15]。但还需要进一步研究,以便更好地了解该类型菌株在院内传播的机制。

综上所述,本研究仅对临沂市人民医院某一时间段内 47 株 MRSA 分离菌株进行研究,具有一定的局限性,可能只反映当前医院 MRSA 的流行趋势,无法推广到不同地区、不同医疗机构,后续研究可扩大样本量,更进一步对本地区 MRSA 的流行进行分析。本研究结果可初步表明,本地区可能存在 *SCCmec* IV 和 V 型 MRSA 菌株医院传播的高风险,因此医院应提高病原学的相关诊断水平,及时监测到院内感染的新型 MRSA *SCCmec* 基因分型,对临床预防和治疗 MRSA 感染提供参考依据,同时对有效控制 MRSA 菌株的流行具有重要的意义。

参 考 文 献:

- [1] AEDO S, TOMASZ A. Role of the stringent stress response in the antibiotic resistance phenotype of methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 60(4): 2311-2317.
- [2] Clinical And Laboratory Standards Institute. M100-S27. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-seventh informational supplement[S]. Wayne, PA:CLSI, 2017: 1.
- [3] ZHANG K, MCCLURE J A, ELSAYED S, et al. Novel multiplex per characterization and concomitant sub typing of staphylococcal assay for cassette chromosome mec type I to V in methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. J Clinmicrobiology, 2005, 43(10): 5026-5033.
- [4] 胡庆花,朱德全,刘卫东,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药机制[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2018, 45(5): 349-352.
- [5] 赵吴静,徐进强,武中庸,等. 苯唑西林敏感耐甲氧西林金黄色葡萄球菌研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(8): 2458-2464.
- [6] ISOBE H H. Evolution and virulence of panton-valentine leukocidin-positive ST30 methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the past 30 years in Japan.[J]. Biomed Res, 2012, 33(2): 97-109
- [7] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家委员会. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识 2011 年更新版[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2011(3): 372-384.
- [8] 杨琴,郑跃杰,文飞球,等. 深圳住院患儿 MRSA 的分子分型和耐药性[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(7): 802-806.
- [9] CHENG H, YUAN W, ZENG F, et al. Molecular and phenotypic evidence for the spread of three major methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones associated with two characteristic antimicrobial resistance profiles in China[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(11): 2453-2457.
- [10] 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(04): 455-456.
- [11] ZHONG Y M, YUAN R, DING J S, et al. Emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus *SCCmec* type IV/V epidemic clones in a large teaching hospital in China[J]. Journal of Southern Medical University, 2017, 37(7): 861-865.
- [12] INOMATA S, SHINYA H, YANO K, et al. Microbiological and molecular epidemiological analyses of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus at a tertiary care hospital in Japan[J]. Journal of Infection & Chemotherapy Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy, 2015, 21(10): 729-736.
- [13] DHAWAN B, RAO C, UDO E E, ET AL. Dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus *SCCmec* type IV and *SCCmec* type V epidemic clones in a tertiary hospital: challenge to infection control[J]. Epidemiology and Infection, 2015, 143(02): 343-353.
- [14] CHUANG Y Y, HUANG Y C. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Asia[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2013, 13(8): 698-708.
- [15] POPOVICH K J, WEINSTEIN R A, HOTA B. Are community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) strains replacing traditional nosocomial mrsa strains[J]. Clinical Infectious Diseases An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 2008, 46(6): 787-794.

(李科 编辑)