

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.12.001

· 论 著 ·

社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型及药敏结果

牛瑞兵, 郭利平, 王新刚, 段宝生, 巴特尔

(鄂尔多斯市中心医院, 内蒙古 鄂尔多斯 017000)

[摘要] **目的** 了解某院门诊和住院患者标本分离的社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)盒式染色体基因(SCCmec)型别以及 CA-MRSA 耐药性。**方法** 收集该院 2011 年 5 月—2015 年 8 月分离的 MRSA 及其相关病史资料, 利用聚合酶链反应(PCR)方法进行 MRSA 的 *mecA* 基因和 CA-MRSA 的 SCCmec 基因分型检测, 对 CA-MRSA 进行药物敏感性试验并进行统计分析。**结果** 共收集 MRSA 305 株, 其中 *mecA* 阳性 296 株。CA-MRSA 88 株, 占 29.73%(88/296), 其中 48 株为 SCCmec IV 型, 36 株为 SCCmec V 型, 4 株未定型。药敏试验显示, CA-MRSA 对万古霉素、利奈唑胺、替加环素均 100% 敏感, 对青霉素和苯唑西林 100% 耐药; SCCmec IV 和 V 型 CA-MRSA 对左氧氟沙星、利福平、环丙沙星的耐药率比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。SCCmec IV、V 型 CA-MRSA 对氨苄西林/舒巴坦、呋喃妥因、红霉素的耐药率均 $> 58\%$ 。**结论** 该院 CA-MRSA 的 SCCmec 分型以 IV 和 V 型为主, 且耐药率较高, 临床医生应对此高度重视, 根据药敏结果合理应用抗菌药物。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; CA-MRSA; SCCmec 基因分型; 抗菌药性; 微生物; 耐药性; 合理用药

[中图分类号] R378.1[†] R969.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)12-0897-05

SCCmec genotyping and antimicrobial susceptibility of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

NIU Rui-bing, GUO Li-ping, WANG Xin-gang, DUAN Bao-sheng, BA Te-er (Ordos Central Hospital, Ordos 017000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the types of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) gene and antimicrobial resistance of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) isolated from outpatients and inpatients in a hospital. **Methods** MRSA strains isolated between May 2011 and August 2015 in a hospital and the relevant case data were collected, polymerase chain reaction(PCR) method was used to identify *mecA* gene of MRSA and SCCmec gene of CA-MRSA, antimicrobial susceptibility testing of CA-MRSA were performed and analyzed. **Results** A total of 305 MRSA isolates were collected, 296 of which were *mecA* positive, 29.73%(88/296) were CA-MRSA. The genotyping of CA-MRSA showed that 48 strains were SCCmec type IV, 36 were SCCmec type V, the other 4 strains were undefined. Antimicrobial susceptibility testing results showed that susceptibility rates of CA-MRSA to vancomycin, linezolid, and tigecycline were all 100%, resistance rates to penicillin and oxacillin were both 100%; resistance rates of SCCmec type IV and SCCmec type V CA-MRSA strains to levofloxacin, rifampicin, and ciprofloxacin were all significantly different (all $P < 0.05$), to ampicillin/sulbactam, furantoin, and erythromycin were all $> 58\%$. **Conclusion** The main SCCmec type of CA-MRSA are type IV and type V in this hospital, antimicrobial resistance rate is high, clinicians should pay high attention, and use antimicrobial agents according to antimicrobial susceptibility testing results.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CA-MRSA; SCCmec genotyping; drug resistance, microbial; rational antimicrobial use

[Chin J Infect Control, 2016, 15(12): 897-901]

[收稿日期] 2016-06-25

[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2013MS1116); 内蒙古自治区卫生和计划生育委员会医疗卫生科研计划项目(201302161)

[作者简介] 牛瑞兵(1986-), 男(汉族), 山西省兴县人, 主管检验师, 主要从事微生物与免疫学疾病的研究。

[通信作者] 段宝生 E-mail: erdsdbs@163.com

1961 年发现的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 现在是社区获得性感染的重要病原菌, 并且感染率有逐年上升的趋势^[1]。与医院获得性 MRSA (hospital-acquired MRSA, HA-MRSA) 感染不同, 社区获得性 MRSA (community-acquired MRSA, CA-MRSA) 感染通常发生在社区环境中, 是导致皮肤及软组织获得感染的主要因素^[2]。MRSA 的耐药机制主要是获得了外源性葡萄球菌盒式染色体基因 (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*), 其携带 *mecA* 基因在内的多种耐药基因, SCC*mec* 的结构具有高度多态性, 可分为不同的型^[3]。本研究利用多重聚合酶链反应 (PCR) 技术检测 MRSA 的 *mecA* 基因和 CA-MRSA 的 SCC*mec* 基因型, 研究鄂尔多斯地区 CA-MRSA 的基因型及药物敏感情况, 为预测发展趋势, 控制暴发流行, 治疗 CA-MRSA 感染提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集鄂尔多斯市中心医院 2011 年 5 月—2015 年 8 月门诊和住院患者微生物标本分离鉴定的 MRSA 305 株, 所有菌株均为非重复菌株, 同一患者同一部位只取 1 次分离株。MRSA 的筛查用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪, 所用质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 购于卫生部临床检验中心。用 PCR 方法检测 *mecA* 基因确定 MRSA 296 株。

1.1.2 CA-MRSA 的诊断 符合以下条件的为 CA-MRSA 感染^[3]: 患者在门诊就诊时 MRSA 培养阳性或在入院 48 h 内 MRSA 培养阳性; 患者无 MRSA 感染或定植的病史; 患者在过去一年中无住院史, 无外科手术史, 无护理中心入住史, 无透析史, 患者无永久留置的管腔或经皮肤进入体内的医疗装置。

1.1.3 主要试剂及仪器 细菌基因组提取试剂盒、溶葡萄球菌酶、2 × Taq PCR Master Mix、ddH₂O、100 bp DNA Ladder、琼脂糖、核酸染料均购于南京博尔迪生物科技有限公司。实验所有引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。BioRad 公司 PCR 扩增仪 (PTC-200), 北京六一仪器厂 DYY-6C 型电泳仪, 英国 Syngene 公司电泳成像分析系统。法国 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪及药

敏系统, 药敏卡及培养基全部购于北京威泰科生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MRSA 基因组 DNA 模板提取 将已冻存的菌株重新接种于哥伦比亚血平板上, 置 37℃ 温箱中孵育 18~24 h。用灭菌环从血平板上挑取 8~10 个复活菌落置于 300 μL 含溶葡萄球菌酶液中, 置 37℃ 温箱中水浴 30 min, 取出放入 100℃ 沸水中小火煮 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 其余方法按照细菌 DNA 提取试剂盒的操作进行, 提取 DNA 置于 -20℃ 冰箱中保存。

1.2.2 *mecA* 基因检测 参照文献^[4]合成 *mecA* 基因扩增引物: MECAP₄: 5'-TCCAGATTACAAC TTCACCAGG-3', MECAP₇: 5'-CCACTTCATAT CTTGTAAGG-3', 扩增片段大小约为 162 bp。采用 PCR 方法对初筛的 MRSA 进行分子学检测, 携带 *mecA* 基因的确定为 MRSA 菌株。PCR 扩增体系为 25 μL, 其中 DNA 模板 2 μL, 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL, MECAP₄ 0.25 μL, MECAP₇ 0.25 μL, 余 ddH₂O 补足。PCR 扩增条件为 94℃ 初变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 4 min, 1.5% 琼脂糖电泳, EB 染色, 紫外凝胶成像仪观察目的条带, 并拍照成像。

1.2.3 CA-MRSA 菌株 SCC*mec* 基因分型 参照 2007 年 Milheirico 等^[5]方法设计 10 对引物, 采用多重 PCR 的方法对 CA-MRSA 菌株进行 SCC*mec* 基因分型, 所用引物见表 1。反应体系为 25 μL, 其中 DNA 模板 2 μL, 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 各种引物的最终浓度和用量参考文献, 余 ddH₂O 补足。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。取 10 μL PCR 产物点样, 在 1.8% 琼脂糖凝胶中电泳 1 h, 结果拍照保存。

1.2.4 药物敏感试验 采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定及药敏系统对分离的 CA-MRSA 进行 16 种抗菌药物的敏感性试验。结果判定采用美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 2005 年版标准进行。

1.3 统计学分析 所收集数据应用 WHONET 5.2 软件和 SPSS 15.0 统计软件进行分析, CA-MRSA SCC*mec* IV 型和 SCC*mec* V 型耐药率比较采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 CA-MRSA 菌株 SCCmec 基因分型所用引物

Table 1 Primers of CA-MRSA SCCmec genotyping

引物名称	引物序列(5'-3')	特异性	片段大小(bp)
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	I, J1 region	495
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
ccrC F2	GTACTIONGTTACAATGTTTGG	V, ccr complex	449
ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC		
RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	III, J3 region	414
RIF5 R13	ATGGAGATGAATTACAAGGG		
SCCmec V J1 F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	V, J1 region	377
SCCmec V J1 R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG		
des F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	I, II, IV and VI J3 region	342
des R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
ccrB2 F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	II and IV, ccr complex	311
ccrB2 R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC		
kdp F1	AATCATATGCCATTGGTTATGC	II, J1 region	284
kdp R1	CGAATGAAGTAAAAGAAAGTGG		
SCCmec III J1 F	CATTTGTGAAAACACAGTACG	III, J1 region	243
SCCmec III J1 R	GTTATTGAGACTCCTAAAACG		
mecI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	II and III, mec complex	209
mecI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTCT		
mecA P4	TCCAGAATTACAACCTCACCAGG	Internal positive control	162
mecA P7	CCACTTCATATCTTGTAAACG		

2 结果

2.1 CA-MRSA 标本来源 根据临床诊断共获得 88 株 CA-MRSA,来自于皮肤科、骨科、普通外科、儿科、肿瘤科、重症监护病房(ICU)、神经外科等 12 个科室,其中以儿科、皮肤科和骨科所占比率最高。见图 1。

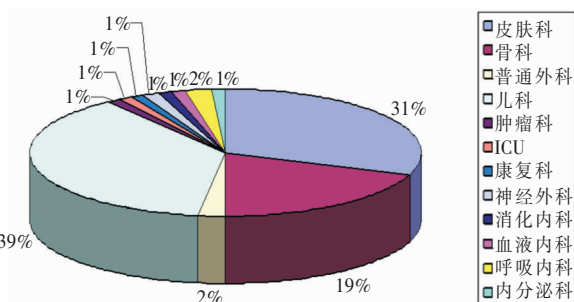


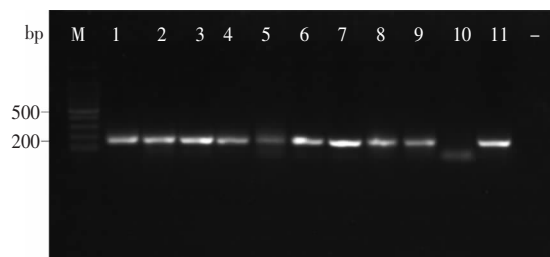
图 1 88 株 CA-MRSA 来源科室分布

Figure 1 Department distribution of 88 CA-MRSA strains

2.2 MRSA 菌株多重 PCR 鉴定结果 经多重 PCR 扩增,扩增产物凝胶电泳图成像显示,305 株 MRSA 中 mecA 基因阳性 296 株。见图 2。

2.3 CA-MRSA 菌株 SCCmec 基因分型结果 利用多重 PCR 方法对 88 株 CA-MRSA 进行 SCCmec 基因分型,48 株为 SCCmec IV 型,36 株为 SCCmec V

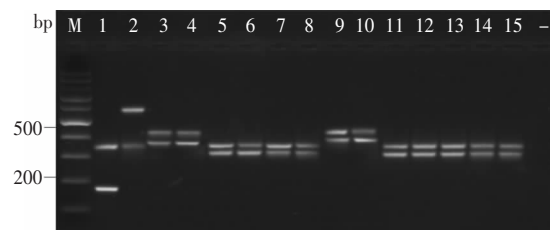
型,4 株未定型。见图 3。



M: DNA ladder maker(100~1 500 bp);1—11 泳道:临床 MRSA 菌株;-:阴性对照

图 2 mecA 基因 PCR 扩增产物电泳图

Figure 2 Electrophoresis map of PCR amplification products of mecA gene



M: DNA ladder maker(100~1 500 bp);1—15:CA-MRSA 菌株;-:阴性对照;其中 1、2 泳道菌株 SCCmec 分型未定型,3、4、9、10 号菌株为 SCCmec V 型,5—8、11—15 号菌株为 SCCmec IV 型

图 3 CA-MRSA 菌株 SCCmec 基因分型电泳图

Figure 3 Electrophoresis map of CA-MRSA SCCmec genotyping

2.4 CA-MRSA 药敏结果 84 株 SCCmec 分型的 CA-MRSA 对万古霉素、利奈唑胺、替加环素均 100% 敏感,对青霉素和苯唑西林 100% 耐药; SCCmec IV 型和 SCCmec V 型 CA-MRSA 对左氧氟沙星、环丙沙星、利福平的耐药率比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),对其余 9 种抗菌药物的耐

药率均相对较高。SCCmec IV 型和 SCCmec V 型 CA-MRSA 对氨苄西林/舒巴坦的耐药率分别为 66.67%、69.44%,对呋喃妥因的耐药率分别为 62.50%、58.33%,对红霉素的耐药率分别为 66.67%、69.44%。见表 2。

表 2 不同 SCCmec 基因型 CA-MRSA 对抗菌药物的耐药情况[株(%)]

Table 2 Antimicrobial resistance of different SCCmec CA-MRSA strains (No. of isolates[%])

抗菌药物	SCCmec IV 型 CA-MRSA (n = 48)			SCCmec V 型 CA-MRSA (n = 36)			χ^2	P
	敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药		
青霉素 G	0(0.00)	0(0.00)	48(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	36(100.00)	-	-
苯唑西林	0(0.00)	0(0.00)	48(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	36(100.00)	-	-
氨苄西林/舒巴坦	16(33.33)	0(0.00)	32(66.67)	11(30.56)	0(0.00)	25(69.44)	0.52	0.873
庆大霉素	27(56.25)	2(4.17)	19(39.58)	20(55.56)	3(8.33)	13(36.11)	0.23	0.690
万古霉素	48(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	36(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	-	-
利奈唑胺	48(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	36(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	-	-
四环素	28(58.34)	1(2.08)	19(39.58)	23(63.89)	0(0.00)	13(36.11)	0.25	0.653
红霉素	14(29.16)	2(4.17)	32(66.67)	11(30.56)	0(0.00)	25(69.44)	0.41	0.819
克林霉素	24(50.00)	3(6.25)	21(43.75)	17(47.22)	1(2.78)	18(50.00)	0.33	0.694
替加环素	48(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	36(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	-	-
左氧氟沙星	29(60.42)	2(4.17)	17(35.41)	28(77.78)	0(0.00)	8(22.22)	20.96	0.023
环丙沙星	34(70.83)	0(0.00)	14(29.17)	28(77.78)	2(5.56)	6(16.66)	32.15	0.004
莫西沙星	32(66.67)	0(0.00)	16(33.33)	22(61.11)	1(2.78)	13(36.11)	0.38	0.712
呋喃妥因	15(31.25)	3(6.25)	30(62.50)	13(36.11)	2(5.56)	21(58.33)	0.19	0.521
复方磺胺甲噁唑	30(62.50)	0(0.00)	18(37.50)	21(58.33)	3(8.33)	12(33.33)	0.39	0.579
利福平	34(70.83)	2(4.17)	12(25.00)	29(80.56)	1(2.78)	6(16.66)	17.91	0.037

3 讨论

MRSA 既是医院获得性感染,也是社区获得性感染的主要病原菌之一。虽然医疗技术在高速发展,但 MRSA 感染率及病死率一直居高不下。根据文献^[6]报道,从 20 世纪 90 年代开始 CA-MRSA 感染在国内外不同地区均十分严峻,甚至发生暴发流行。SCCmec 基因分型是研究 CA-MRSA 菌株基因型变化或流行病学的最常用方法,也是区分 HA-MRSA 和 CA-MRSA 感染的一种重要检测方法^[7]。

本研究显示,鄂尔多斯市中心医院门诊与病房标本分离的 296 株 MRSA 中,根据病史资料 CA-MRSA 为 88 株,占 29.73%。感染标本主要来源于儿科和皮肤科、骨科,说明 CA-MRSA 主要感染儿童、健康人群,且以感染皮肤软组织为主。根据 SCCmec 分型主要分为两个型别,分别是 SCCmec IV 型和 SCCmec V 型,其中 SCCmec IV 型 48 株,SCCmec V 型 36 株,与国内其他地区的文献^[8]报道结果基本一致。而李敏豪等^[9]的研究表明,CA-

MRSA 的 SCCmec 分型为 II、IV、V 型,可能是由于地理区域不同,导致的 CA-MRSA 的基因分型有所不同,也可能是由于病史资料的统计方法不同,致使一部分 HA-MRSA 判断为 CA-MRSA。本实验中的 4 株未定型 CA-MRSA 可能为 SCCmec 亚型,需要进一步鉴定。

MRSA 耐药机制主要是由于编码青霉素结合蛋白(PBPs)的基因发生变化所致。MRSA 的多重耐药特点与拥有的 SCCmec 结构存在联系。SCCmec 主要有 5 个型别,HA-MRSA 基因型别为 SCCmec I、II、III 型,CA-MRSA 基因型别多为 IV 型和 V 型。SCCmec 基因型与 MRSA 的流行背景有关,不同地区的 SCCmec 可能不同,不同遗传背景的克隆株携带的 SCCmec 也可能不同,同时耐药也存在显著差异^[10]。HA-MRSA 通常多重耐药严重,对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类、四环素类、大环内酯类、林可霉素等多种抗菌药物耐药,通常仅对糖肽类敏感,目前万古霉素是其最后一道防线^[11]。CA-MRSA 除 mecA 基因外很少携带其他耐药基因,但随着抗菌药物的频繁使用,CA-MRSA

对各类抗菌药物的耐药性也在不断增强。

本研究显示,84 株 CA-MRSA 对青霉素和苯唑西林 100% 耐药,但未发现对万古霉素、利奈唑胺、替加环素的耐药菌株。SCCmec IV 型和 SCCmec V 型 CA-MRSA 对左氧氟沙星、环丙沙星、利福平的耐药率比较,差异有统计学意义,且耐药率比较低,对其余 9 种抗菌药物的耐药率均无差别,且耐药率相对偏高。说明不同的 SCCmec 基因型别的菌株对抗菌药物的耐药性有一定的差别,可能是由于不同的 SCCmec 基因携带了不同的耐药基因所致^[12]。在美国,克林霉素是皮肤软组织感染门诊治疗的推荐用药^[13],而本地区克林霉素耐药率高达 50%,说明在门诊治疗中要根据具体情况选择合适的抗菌药物。本实验中 IV 型和 V 型 CA-MRSA 对大多数抗菌药物的耐药率均较刘小丽等^[8]的研究要高,对氨苄西林/舒巴坦的耐药率分别为 66.67%、69.44%,对呋喃妥因的耐药率分别为 62.50%、58.33%,对红霉素的耐药率分别为 66.67%、69.44%,说明本地区 CA-MRSA 的耐药性比较严重。在临床治疗 CA-MRSA 感染过程中可联合使用耐药率较低的左氧氟沙星、环丙沙星、利福平,防止耐药率的升高,同时不宜根据经验用药,要根据实验室的药物敏感性合理应用抗菌药物。

综上所述,本院 CA-MRSA 感染流行较严重,耐药率较高,临床医生应引起高度重视。

[参 考 文 献]

- [1] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus* [J]. Infect Genet Evol, 2008, 8(6):747-763.
- [2] Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Lancet, 2010, 375(9725):1557-1568.
- [3] Fridkin SK, Hageman JC, Morrisson M, et al. Methicillin-re-

sistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities [J]. N Engl J Med, 2005, 352(14):1436-1444.

- [4] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, et al. 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.
- [5] Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(9):3374-3377.
- [6] 赵春江,王辉,刘颖梅,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] 欧阳范献,鲍时翔. MRSA 全基因结构及 SCCmec 分型的意义 [J]. 中华微生物和免疫学杂志,2006,26(12):1118-1121.
- [8] 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.
- [9] 李敏豪,董超,王成兴,等.广州地区儿童社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子特征研究 [J]. 广州医药,2015,46(3): 25-28.
- [10] 郭利平,王晓彦.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究进展 [J]. 中国感染控制杂志,2012, 11(1):533-536.
- [11] Vandenesch F, Etienne J. How to prevent transmission of MRSA in the open community? [J]. Euro surveill, 2004, 9 (11):5.
- [12] Chen L, Mediavilla JR, Oliveira DC, et al. Multiplex real-time PCR for rapid staphylococcal cassette chromosome *mec* typing [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(11):3692-3706.
- [13] Lin C, Bayer A, Casgrove SE, et al. Clinical practice guidelines by the infections diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children [J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(3):e18-e55.

(本文编辑:左双燕)