

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2013.01.002

· 论 著 ·

携带新 SCCmec 型别菌株的耐药特点及 PCR 图谱多位点序列分析

卜平凤¹, 欧阳范献¹, 黄惠琴², 鲍时翔²

(1 海南省农垦总医院, 海南 海口 570311; 2 中国热带生物技术研究所 热带作物技术国家重点实验室, 海南 海口 570311)

[摘 要] **目的** 了解前期研究中发现的 3 株携带有新型 SCCmec 聚合酶链反应(PCR)谱型的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的位点序列特性。**方法** 在前期的分型研究中, 从 58 株 MRSA 中检测到 3 株(5.17%)携带了一种新的 SCCmec 多位点 PCR 谱型, 其含有 5 条扩增带, 依次为 A、F、H、B 和 M。对上述扩增产物测序, 用 BLAST 与国际基因库内已知位点序列进行对比分析。**结果** 测得序列与已有位点相应序列的同源性均在 97% 以上。**结论** 此型为一新的 SCCmec 多位点 PCR 谱型, 是传统 I、II 和 III 型的重组型, 与已有型别比较, 不但有不同的位点图谱, 且有多点突变。

[关 键 词] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 葡萄球菌染色体 *mec* 盒; DNA 测序; 序列分析; 抗药性; 微生物; 聚合酶链反应

[中图分类号] R378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)01-0005-07

Multilocus sequence analysis on polymerase chain reaction map and anti-microbial resistance of isolates with new staphylococcal cassette chromosome *mec*

BU Ping-feng¹, OU YANG Fan-xian¹, HUANG Hui-qin², BAO Shi-xiang² (1 Hainan Provincial Nong Ken Hospital, Haikou 570311, China; 2 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Haikou 570311, China)

[Abstract] **Objective** To study the multilocus sequence characteristics of polymerase chain reaction (PCR) map of 3 isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) which carried a new staphylococcal cassette chromosome *mec*(SCCmec). **Methods** In the previous PCR typing study on 58 MRSA isolates, 3 (5.17%) were found to carry a new SCCmec multilocus sequence containing 5 bands, which were band A, F, H, B and M. The above amplified products were sequenced, and then compared with the sequences of SCCmec type saved in the international GenBank and the Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST). **Results** The homology between the detected sequence and the known sequence was over 97%. **Conclusion** It's a new PCR pattern of multilocus sequence of SCCmec type, and maybe the recombinant of conventional SCCmec type I, II and III, which is not only a different PCR pattern, but also has multilocus mutation.

[Key words] methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; staphylococcal cassette chromosome *mec*; DNA sequencing; sequence analysis; drug resistance, microbial; polymerase chain reaction

[Chin Infect Control, 2013, 12(1): 5-11]

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)是一群致病和耐药谱广、耐药强度大的金黄色葡萄球菌。其拥

有一个能富集各种耐药质粒而称之为耐药基因岛的特殊结构, 即葡萄球菌染色体 *mec* 盒(staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCCmec)^[1]。随着抗

[收稿日期] 2011-11-08

[基金项目] 海南省自然科学基金资助项目(30646)

海南省卫生厅基金项目(2006-60)

[作者简介] 卜平凤(1965-), 女(汉族), 湖南省安乡县人, 主管技师, 主要从事微生物及病理学研究。

[通讯作者] 欧阳范献 E-mail: hnnkoyfx@yahoo.com.cn

菌药物广泛而不规范地应用,MRSA 耐药谱不断扩大,有关其耐药基因岛——SCCmec 的研究成了全球焦点,包括耐药性表型、病原流行病学、耐药机制、基因遗传学等。

在前期的分型研究中,我们从 58 株 MRSA 中检测到 3 株(5.17%)携带了一种新的 SCCmec 多位点聚合酶链反应(PCR)谱型,当时称其为新 2 型;其含有 5 条扩增带,依次为 A、F、H、B 和 M^[2]。为进一步分析此型的位点序列特性,特对其扩增产物进行了测序,序列递交全球生物技术信息中心(The National Center for Biotechnology Information, NCBI),获得了基因库序列号(GenBank Accession),还用 BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool)与中心内的微生物基因核苷酸序列库(All GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences)中已有的序列进行了比较,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 3 株菌中,2 株分别分离自门诊患者的前列腺液和精液标本,另 1 株分离自住院患者的尿液标本。

1.2 药敏测定 采用琼脂扩散法(定性)和 E-test 法(minimum inhibition concentration, MIC 测定)进行药敏测定。测定药物包括:红霉素(ERY)、多西环素(DOX)、阿米卡星(AMK)、万古霉素(VAN)、氯霉素(CHL)、环丙沙星(CIP)。

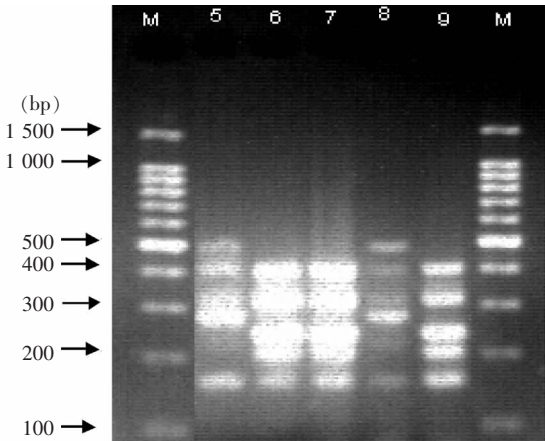
1.3 MRSA 的确证方法 用青霉素结合蛋白 2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a)测定阳性确证 MRSA。

1.4 SCCmec 分型测定 SCCmec 分型,采用多位点 PCR 法测定:A—H 8 个位点为型别判定位点,M 为阳性对照位点。依据位点有无及与已有型别位点的图谱比较来判定型别和确定新的型或亚型^[3-5]。

1.5 DNA 测序及与已知序列比对方法 从 3 株菌中取 1 株菌(编号 3964)的各位点扩增产物纯化后,委托北京三博志远生物技术有限公司进行测序,测序后各位点序列递交 NCBI,通过网络用 BLAST 分析软件与中心内微生物基因核苷酸序列库中的已有序列进行对比分析,以确证位点的正确性及序列同源性。

2 结果

2.1 新 2 型的多位点 PCR 图谱 见图 1。



M: molecular marker; lane 5(isolate 3964) and lane 8(isolate 3584): new type 2 multilocus sequence, from top to the bottom: band A(495 bp), F(414 bp), H(303 bp), B(284 bp) and M(162 bp) (Details can be seen in reference^[2])

图 1 Ⅲ型(6、7、9)和新 2 型(5、8)SCCmec 多位点 PCR 图谱
Figure 1 Electrophoresis map of PCR products of multilocus SCCmec type III (6, 7, 9) and new type 2 (5, 8)

2.2 编号 3964 菌株 5 个位点扩增产物的测序及与已有序列的比较

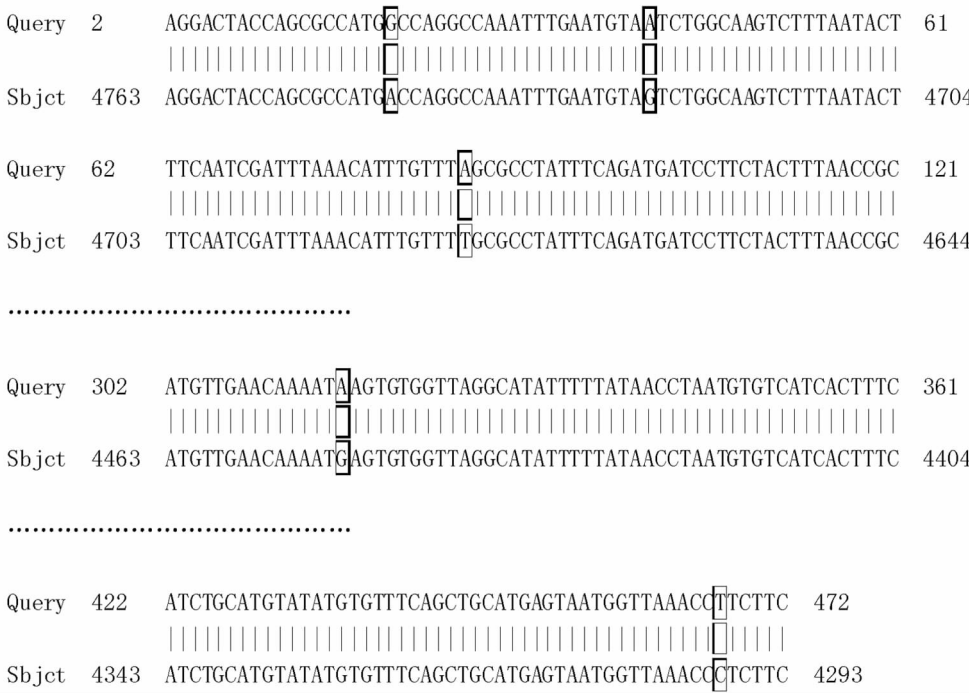
2.2.1 A 位点序列测序结果及其比较 编号 3964 菌株 A 位点扩增产物测序得一 472 个碱基(bp)的核苷酸片段,通过网络递交该序列, GenBank Accession 为GU213104: CAGGACTACCAGCGCCATG-GCCAGGCCAAATTTGAATGTAATCTGGCAA-GTCTTTTAATACTTTCAATCGATTTAAACAT-TTGTTTAGCGCCTATTTTCAGATGATCCTTC-TACTTTAACCGCTTTTTCTAGTAAATCAGG-TCTACCGATATCTCCTACAAAAATAAAATC-ACCACTGAATAGTCCCATTGGAACCTTGTGC-TCCAGCACCTTCGTCAGTAAGTAAAAAACT-TATACTTTCTGGCGTGTGACCCGGTGTATG-AAGCACTTTTAATTTTATATTTCCTACATA-AATATCGTCATTATGTTGAACAAAATAAG-TGTGGTTAGGCATATTTTTATAACCTAATG-TGTCATCACTTTCACCCGATACATAAATAT-TAGCATTTAACTTTATAGCAACATCTCTAA-TTCCTGAAGCAAAATCTGCATGTATATGTG-TTTCAGCTGCATGAGTAATGGTTAAACCTT-CTTC;与中心内核苷酸序列库中几个高同源性序列的比对结果见表 1。

表 1 含同源性序列的菌株及其相应序列的相似度

Description of characteristics of sequence	Maximal identity(%)	Accession
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ST398, metallo-beta- lactamase family gene	100.00(471/471)	AM990992.1
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> COL, metallo-beta- lactamase family gene	99.79(470/471)	NC_002951.2
<i>S. aureus</i> DNA, type-I SCCmec; strain NCTC 10442	99.79(470/471)	AB033763.2
<i>S. hominis</i> DNA, SCCmec; strain GIFU12263	98.94(466/471)	AB063171.1

序列特性描述包括序列来源的菌株名称、基因或位点名称等,最大相似度即相同 bp 百分率或同源率。基因库序列号即中心库中序列的检索号,如:编号 3964 菌株的 A 位点序列(序列比较图中的待测序列,Query)与检索号为 AM990992.1 的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)ST398 菌株的金属 β-内酰胺酶家族基因的第 68 386~ 68 856 位 bp 区段(比较图中的目标序列,Sbjct)完全相同(相似度 100%);而与 *S. aureus* COL 菌株相同基因的第 54 157~

54 617 位 bp 区段以及与拥有经典 I 型 SCCmec 的 *S. aureus* NCTC10442 菌株的第 18 882~ 18 412 位 bp 区段,胞浆素敏感表面蛋白基因(A 位点测定基因,详见参考文献[3])的差异均为 1 bp[即 Query 的第 316 位腺嘌呤核苷(A)与 Sbjct 的鸟嘌呤核苷(G)的差异,详细情况可用 BLAST 比对];与人葡萄球菌 GIFU12263 菌株的 SCCmec A 位点序列的差异则是 5 bp。序列比对结果如下。



2.2.2 B 位点序列测序结果及其比较 编号 3964 菌株的 B 位点扩增产物序列测序结果得— 283 bp 的核苷酸片段(GenBank Accession: GU213105): CGATGAAGTGAAAGAAAGTGGCGGACCTGC-TTCAGGTGGCTCAAACCTACGGCAATTCAAA-TCCTGAATTGAAAAAAGAGTTCAAGAGA-CTATTAAACAAGAAGGACAAAAAAGTTTCA-

AGTGATGCGGTGACCACTTCTGGCTCTGGT-TTAGACCCAGATATTACGGTTGACAATGCG-AAACAACAAGTAAAACGCATTGCGAAAGA-AAGAAACATAGATGCTTCAAAAATTAATC-ACCTTATTGATGAAAACAAACAAGCATCAC-CAATGGCAGATAATTA;与中心内核苷酸序列库中几个高同源性序列的比对结果见表 2。

表 2 含同源性序列的菌株及其相应序列的相似度

Table 2 Strains contained the same sequence and the maximal identity of sequence

Description of characteristics of sequence	Maximal identity(%)	Accession
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 genomic DNA, type-II SCCmec, kdpC	97.88(277/283)	BA000018.3
<i>S. haemolyticus</i> JCSC1435 DNA, part of subject sequence: kdpC	99.29(281/283)	AP006716.1
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu3 DNA, kdpC	98.23(278/283)	AP009324.1
<i>S. epidermidis</i> RP62A, kdpC	98.23(278/283)	CP000029.1
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> JH1 DNA, kdpC	98.23(278/283)	CP000736.1

编号 3964 菌株的 B 位点序列与含经典 II 型 SCCmec 的 *S. aureus* N315 第 81 079~81 363 位 bp 区段,钾依赖性 ATP 转运酶 C 链上的基因片段,即

经典的 B 位点测定区域的同源性高达 97%,差异 6 bp。两者的对比分析结果如下。

Query	1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGGCGGACCTGCTTCAGG	GGCTCAAAC	TACGGCAATTCAA	60
Sbjct	81079	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGGCGGACCTGCTTCAGG	GGCTCAAAC	TACGGCAATTCAA	81138
Query	61	ATCCTGAATTGaaaaaaGAGTTCAAGAGACTATTAAACAAGAAGGAC	CAAAAAA	TTTCAA	120
Sbjct	81139	ATCCTGAATTGAAAAAAGAGTTCAAGAGACTATTAAACAAGAAGGAA	AAAAAAA	TTTCAA	81198
Query	121	GTGATGCGGTGACCACTTCTGGCTCTGGTTTAGACCCAGATATTACGGTT	GACAA	TGC	178
Sbjct	81199	GTGATGCGGTGACCGCTTCTGGCTCTGGTTTAGACCCAGATATTACGGTT	TGACAAA	TGC	81258
.....					

与溶血性葡萄球菌 JCSC1435 菌株的 B 位点片段同源性高达 99%,差异 2 bp[即 Query 的第 195 位胞嘧啶核苷(C)与 Sbjct 胸腺嘧啶核苷(T)以及第 279 位的 A 与 G 的差异];与其他多个菌株的 B 位点片段相关区域的差异为 4 bp(详细情况可用 BLAST 比对)。

2.2.3 F 位点序列测序结果及其比较 编号 3964 菌株的 F 位点扩增产物测序得一 416 bp 的核苷酸片段(GenBank Accession: GU213106):TGTCAC-AGTTATTCCATCAATGCTGAAGTCGTCGAG-CGTGTAATTAATGTTTCAATTTGAATCGTATT-CTGTCTCAACCAGATATTATCAAGCAGATT-GCGTCAAATGTGATAGAAGAAGTGAACA-

AAAGCATAGTAACCAAACAGAAATTAAAT-ATGACATTGATAGTTTAGAAAAACAAAAA-GCTAAGCTTAAAACACAACAAGAACGATT-GTTAGAATTGTTCTTAGATGATCAGATGG-ATAGCGAAATGTTAAAAGCTAAACAAAGT-CAAATGAATCAACAGTTAGAAGTATTAGA-TCAACAAATTAAAGAAGCGCAACAAGCAA-ATCAATCACAGGATGAAATACCTAATTTT-GATAAATTAAAAGGACGACTCATTTTGAT-GATAACACGATTGAGCGTGACCTTAAAAAA;与中心内核苷酸序列库中几个高同源性序列的比对结果见表 3。

表 3 含同源性序列的菌株及其相应序列的相似度

Table 3 Strains contained the same sequence and the maximal identity of sequence

Description of characteristics of sequence	Maximal identity(%)	Accession
<i>S. aureus</i> strain ST389 ccr7	99.04(412/416)	AM990992.1
<i>S. aureus</i> strain AGA-16484 ccr8	99.04(412/416)	FJ931051.1
<i>S. aureus</i> strain HU25 SCCmec type III sequence between Tn554 and orfX	96.88(403/416)	AF422696.1
<i>S. aureus</i> strain;85/2082 SCCmec-III region	96.88(403/416)	AB037671.1

以上表示:F 位点序列与 *S. aureus* ST389 菌株的 *ccrC7* 基因第 43 074~42 498 位 bp 区域及 *S. aureus* AGA-16484 菌株的 *ccrC8* 基因第 1 039~

1 454 位 bp 区域的同源性均为 99%, 两者的差异为 4 bp, 且在待测序列上的位置及 bp 性质也相同, 还有一个 bp 缺失。与 *ccrC7* 序列比对结果如下。

Query	1	TGTCACAGT		ATTCCATCAATGCTGAAGTCGTCGAGCGTGAATTAATGTTCAATTGAAT	60
Sbjct	42074	TGTCACAGT		ATTCCATCAATGCTGAAGTCGTCGAGCGTGAATTAATGTTCAATTGAAT	42133
.....					
Query	361	AAATTAAGGACGACTCATTTTGATGATAACACGATTCAGCGTG		ACCTTAA	416
Sbjct	42434	AAATTAAGGACGACTCATTTTGATGATAACACGATTCAGCGTG		TTAA	42489

与含 III 型 *SCCmec* 的 *S. aureus* HU25 菌株 Tn554 与 *orfX* 间片段序列的第 1 308~893 位 bp 的

同源性均为 97.06%, 差异为 13 bp, 且在待测序列上的位置及差异性质也相同。与 HU25 菌株片段的比对结果如下。

Query	1	TGTCACAGT		ATTCCATCAATGCTGAAGTCGTCGAGCGTGAATTAATGTTCAATTGAAT	60
Sbjct	1308	TGTCACAGT		ATTCCATCAATGCTGAAGTCGTCGAGCGTGAATTAATGTTCAATTGAAT	1249
Query	61	CGTATTCTGTCTCAACCAGATATTATCAAGCAGATTGCGTCAAAATGTGAT		AGAAGAACTG	120
Sbjct	1248	CGTATTCTGTCTCAACCAGATATTATCAAGCAGATTGCGTCAAAATGTGAT		GAAGAACTG	1189
Query	121	AAACAAAAGCATAGTAACCAACAGAAATTAATATGACATTGATAGTTTAGAAAAACAA			180
Sbjct	1188	AAACAAAAGCATAGTAACCAACAGAAATTAATATGACATTGATAGTTTAGAAAAACAA			1129
Query	181	AAAGCTAAGCTTAAAC		ACAACAAGAACGATTGTTAGAATTGTTCTTAGATGATCAGATG	240
Sbjct	1128	AAAGCTAAGCTTAAAC		ACAACAAGAACGATTGTTAGAATTGTTCTTAGATGATCAATG	1069
Query	241	GATAGCG		AATGTTAAAGCTAAACAAAGT	300
Sbjct	1068	GATAGCG		AATGTTAAAGCTAAACAAAGT	1009
Query	301	CAACAAATTAAGAAGCGCAACAAGCAAAATCAATCAGGATGAAATACCTAATTTTGAT			360
Sbjct	1008	CAACAAATTAAGAAGCGCAACAAGCAAAATCAATCAGGATGAAATACCTAATTTTGAT			949
Query	361	AAATTAAGGACGACTCATTTTGATGATAACACGATTCAGCGTG		ACCTTAA	416
Sbjct	948	AAATTAAGGACGACTCATTTTGATGATAACACGATTCAGCGTG		TTAA	893

2.2.4 新 *SCCmec* 型别菌株的 H 位点扩增产物序列分析 编号 3964 菌株的 H 位点扩增产物测序得一 272 bp 的核苷酸片段 (GenBank Accession: GU213107): GCTAGCAAGTTAAGCGAACAACACTGACATGATAAATTAGTGTTA GCTATATT-TTTTACTTTGCAACAGAACCATTTTTTGTTCT-

AGTAATATTAATATGTACACTATTTCCAA-AATTTAAATTCATGTTGCCAAAAATCGAT-TTGTTTTTTGCAATTGTTTTTTCGTTTCGCTTT-TAAAGTCGATTTTCATTAAGTCCGTTAAATCGACTGGCGAAATTTCTTTTATCAAATTCT-TATATTTTGTCTAGAAATTTCTGTGAAGCT-

TTCCCCATTCTTCA。H 位点是质粒 pT181 上游的测定位点,是其存在的标志,中心内核苷酸序列库中的同源序列很多,以下列出几个有代表性的同源

性序列的特性描述、序列相似度及菌株在基因库中的检索号,见表 4。

表 4 含同源序列的菌株及其相应序列的相似度

Description of characteristics of sequence	Maximal identity(%)	Accession
<i>S. aureus</i> DNA, type-III staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> and SCCmercury; strain 85/2082	99.63(271/272)	AB037671.1
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> COL plasmid pT181, complete genome	100.00(201/201)	CP000045.2
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 plasmid pSE-12228-01, complete sequence	100.00(201/201)	AE015930.1
<i>S. aureus</i> tetracycline resistance plasmid pKH6, complete sequence	100.00(189/189)	U38428.1
Plasmid pNS1 (from <i>S. aureus</i>) encoding tetracycline-resistance (tet), complete genome	100.00(173/173)	M16217.1

表 4 显示,编号 3964 菌株的 H 位点序列与金黄色葡萄球菌 85/2082 菌株中的经典Ⅲ型 SCC*mec* 的第 29 705~29 976 位碱基间片段的同源性为 99.63%,即与第 29 760 位对应的胸腺嘧啶核苷(T)

缺失。此片段为质粒 pT181 的上游区域,即 H 位点测定区,说明 H 位点测定准确。两者的比对结果如下。

Query	1	GCTAGCAAGTTAAGCGAACACTGACATGATAAATTAGTGGTTAGCTATATTTTTT	ACTT	59
Sbjct	29705	GCTAGCAAGTTAAGCGAACACTGACATGATAAATTAGTGGTTAGCTATATTTTTT	ACTT	29764
			

此外,H 位点序列的第 71~271 位碱基间序列与金黄色葡萄球菌 COL 菌株 pT181 质粒的第 1 006~806 位碱基间以及表皮葡萄球菌 ATCC 12228 菌株 pSE-12228-01 质粒的第 4 343~4 143位碱基间的序列完全相同;其第 71~259 位碱基间序列与金黄色葡萄球菌的四环素耐药性质粒 pKH6 的第 1 006~806 位碱基间序列完全相同;第 71~243 位碱基间序列与金黄色葡萄球菌的四环素耐药性质粒 pNS1 第 173~1 位碱基间的序列完全相同。

2.2.5 新 SCC*mec* 型别菌株的 M 位点扩增产物序列分析 编号 3964 菌株的 M 位点扩增产物测序得一 141 bp 片段(GenBank Accession:

GU213108):AATGATTGCCTTAAATAACAAA-ACATTAGACGATAAAACAAGTTATAAAAT-CGATGGTAAAGGTTGGCAAAAAGATAAAT-CTTGGGGTGGTTACAACGTTACAAGATATG-AAGTGGACCCTGGAAAATTTGTTCTCTAAAA。M 位点是 MRSA 的鉴别位点,即阳性对照位点,各型 SCC*mec* 均含有,因而中心内核苷酸序列库中同源序列的数量较多,表 5 示几个主要的、代表性同源序列的特性描述、序列相似度及在基因库中的检索号。

比对结果显示,均是 M 位点的第 9、10 bp 的胞嘧啶核苷 C 与相应序列的鸟嘌呤核苷 G 的差异(详细情况可用 BLAST 比对)。

表 5 含同源性序列的菌株及其相应序列的相似度

Description of characteristics of sequence	Maximal identity(%)	Accession
<i>S. aureus</i> <i>mecA</i> gene for penicillin-binding protein 2, complete cds	98.28(114/116)	AB236888.1
<i>S. aureus</i> DNA, type-I staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> ; strain NCTC10442	98.28(114/116)	AB033763.2
<i>S. aureus</i> DNA, type-II staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> ; strain N315	98.28(114/116)	D86934.2
<i>S. aureus</i> DNA, type-III staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> and SCCmercury; strain 85/2082	98.28(114/116)	AB037671.1
<i>S. aureus</i> strain: JCSC6670,SCC <i>mec</i> type IV element, complete sequence	98.28(114/116)	AB425824.1
<i>S. aureus</i> DNA, type-V staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i> ; strain JCSC3624(WIS)	98.28(114/116)	AB121219.1

3 讨论

在前期研究中,我们已对海口地区 MRSA 的耐药性表型、强度,多重耐药谱和可能的发展趋势进行了探讨,同时对本地菌株 SCCmec 的基因结构、多位点 PCR 谱型进行了探索,发现 2000—2003 年间 MRSA 的总检出率已达 80.66%,检出率在携带者性别、门诊与住院及不同年龄组患者间的差异无统计学意义;MRSA 的耐药强度、多重耐药率均高,多重耐药模式多达 19 种。其中对临床常用的 6 类抗生素:氨基糖苷类(代表药物:AMK)、氯霉素类(CHL)、喹诺酮类(CIP)、红霉素类(ERY)、四环素类(DOX)和 β -内酰胺类(苯唑西林)都耐药的百分比为 20.41%,对其中 5 类抗生素耐药的百分比为 30.55%,耐 4 类抗生素的百分比为 22.50%,耐 3 类抗生素的百分比为 26.23%;耐 3 类以上抗生素的百分比高达 98.06%^[2]。

在 SCCmec 多位点分型研究中发现,本地区 MRSA 携带的主要型别为传统 III 型(占 34.48%,20/58)和已有报道的 IV-dcs(占 20.69%,12/58);另外,发现有当时未见报道的 9 种 SCCmec 多位点 PCR 谱型,且发现携带新谱型的 MRSA 菌株,其流行病学分布特点、抗药性以及多位点扩增图谱均与国外已报道的菌株不同,其中新 2 型从 3 株(5.17%)MRSA 中检出,其含有 5 条扩增带,依次为 A(495 bp)、F(414 bp)、H(303 bp)、B(284 bp)和 M(162 bp);特点为:含有 I、II 型的上游特异性位点 A、B,但缺乏下游位点 D,却多了两个 III 型的下游位点 F、H。其耐药特点是 3 株菌均对 VAN、DOX 敏感,后者与含 pT181 质粒(携带有四环素耐药性质粒)的预期表型不一致,是否是编号 3964 菌株的 H 位点只与四环素耐药质粒的部分序列相同而造成其耐药表型改变,有待研究;对其他几种代表药物的敏感性因菌株不同而有差异^[2]。

依据 Oliveira 设计的 SCCmec 多位点分型原理^[4],位点 A 位于 mecA 的上游,为胞浆素敏感表面蛋白基因 *pls* 的下端序列,是 *pls* 的指示位点,为 I 型 SCCmec 所特有;B 位于 mecA 的上游,为 *kdp* 基因的前端序列,为 II 型 SCCmec 所特有;F 在转座子 Tn554 与 SCCmec 右结合点之间的假盒染色体重组酶基因(Ψ ccr)内;H 位于插入了 IS431 与质粒 pT181 的结合处,是 pT181 的指示位点,两者均位于 mecA 下游,均是 III 型 SCCmec 的特异性位点,且 H 位点还

是鉴别 III 与 IIIA 型 SCCmec 的鉴别位点;M 位点是 MRSA 的阳性对照位点,各型 SCCmec 均应含有。

测定株 3964 的 A 位点序列与经典 I 型 SCCmec 的 A 位点序列(GenBank Accession AB033763.2)同源率为 99.79%,差异为 1 bp;B 位点序列与经典 II 型 SCCmec 的 B 位点序列(GenBank Accession BA000018.3)同源率为 97.88%,差异为 6 bp;F 位点序列与经典 III 型 SCCmec 的 F 位点序列(GenBank Accession AF422696.1)同源率为 96.88%,差异为 13 bp;H 位点序列部分与金黄色葡萄球菌 85/2082 菌株中经典 III 型 SCCmec 的第 29 705~29 976 位碱基间片段(GenBank Accession AB037671.1)的同源率为 99.63%,此片段为质粒 pT181 的上游区域,即 H 位点测定区。依此均确证各位点测定准确,但位点序列与已知位点序列存在一定差异。

多位点复合 PCR 分型原理及扩增谱显示,3964 号 MRSA 携带的 SCCmec 含有 I、II 型上游特异性位点(A、B)和 III 型下游特有位点(F、H)以及阳性对照位点 M,与已报道型别的结构完全不同,可以认为是一种新的 SCCmec 型别,推测可能是 I、II、III 型 SCCmec 的重组型。

测定位点序列的碱基数量与已报道位点的碱基数量不完全一致,依测序公司的反馈,PCR 条带会存在一定的碱基差异。

[参考文献]

- [1] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1549 - 1555.
- [2] 欧阳范献,胡永华,黄惠琴,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的两种新 SCCmec 型别及抗药性研究[J].微生物学报, 2006, 46(6): 890 - 894.
- [3] 欧阳范献,胡永华,黄惠琴,等.葡萄球菌染色体 *mec* 盒多位点复合 PCR 分型测定[J].中华医院感染学杂志, 2007, 17(11): 1353 - 1356.
- [4] Oliveira D C, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* elements in methicillin-resistant *S. aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(7): 2155 - 2161.
- [5] Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(5): 1323 - 1336.
- [6] 欧阳范献,卜平凤,黄惠琴,等. MRSA 的 7 种新 SCCmec 型别及其抗药性[J].微生物学报, 2007, 47(2): 201 - 207.