

• 基础实验研究论著 •

62 株临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 SCCmec 基因分型及耐药性分析*

王 蕾, 李武平, 刘 冰, 孙惠英, 宋向阳

(第四军医大学西京医院感染管理科, 西安 710032)

摘要:目的 了解医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的 SCCmec 基因型别及耐药特征。方法 应用聚合酶链反应(PCR)技术检测 MRSA 菌株的 mecA 基因并对其进行分型,应用 E-test 法测试 MRSA 对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、左氧氟沙星和利福平 5 种药物的 MIC 值。结果 62 株 MRSA 的 mecA 基因全部阳性,SCCmecⅢ型 60 株,SCCmecⅣa 型 1 株,还有 1 株用本实验方法未能分型。药敏试验显示所检菌株对万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺均敏感,对左氧氟沙星和利福平的耐药率分别为 96.8% 和 82.3%。结论 该院以 SCCmecⅢ型为主要流行类型,治疗 MRSA 仍首选万古霉素等糖肽类抗菌药物。

关键词:葡萄球菌,金黄色; SCCmec 分型; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)07-0769-02

SCCmec genotype and drug resistance analysis of 62 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**

Wang Lei, Li Wuping, Liu Bing, Sun Huiying, Song Xiangyang

(Department of Infection Management, Xijing Hospital of the Fourth

Military Medical University, Xi'an Shaanxi 710032, China)

Abstract: Objective To investigate antimicrobial resistance and Staphylococcal cassette chromosome mec(SCCmec) genotype characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) in this hospital. **Methods** Antimicrobial susceptibility of MRSA was detected by E-test method, and polymerase chain reaction(PCR) were used to determine the genotype of SCCmec. **Results** All of 62 strains of MRSA isolate were mecA positive, with 1 isolate of SCCmecⅣa, 60 isolates of SCCmecⅢ and 1 isolate with unidentified genotype. All isolates were susceptible to Vancomycin, Teicoplanin and Linezolid, and the resistance rate of the 62 isolates to Levofloxacin and Rifampicin were 96.8% and 82.3% respectively. **Conclusion** SCCmecⅢ genotype might be the major epidemic isolate in this hospital and Vancomycin could be the first choice to treat MRSA infection.

Key words: *Staphylococcus aureus*; SCCmec genotype; drug resistance

金黄色葡萄球菌(SAU)是临床常见的病原菌之一,自 1961 年在英国首次分离出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)以来,由其引发的院内感染率呈持续上升趋势^[1]。该菌致病力强,可引起脓毒症及休克等严重并发症,死亡率高达 63.6%^[2]。目前对于 MRSA 的临床治疗仍首选糖肽类抗菌药物,但由于该类药物的频繁使用,已有许多对糖肽类药物敏感性降低的研究报道^[3]。现运用 PCR 技术对其 SCCmec 基因进行分型,并通过药敏试验了解 MRSA 药特征及耐药基因型别。

1 资料与方法

1.1 一般资料 西京医院 2011 年 1~6 月临床送检的住院患者各种标本的非重复菌株,共 62 株,全部为 MRSA,其中痰液 53 株,伤口或创面分泌物 8 株,血液 1 株。质控菌株 ATCC 25923 为该院检验科保存。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪、普通琼脂糖凝胶电泳仪和凝胶成像仪均为 Bio-rad 公司产品。药敏纸片购自英国 Oxoid 公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq MasterMix 和 100 bp DNA Ladder(最亮条带为 500 bp)均为天根生化科技(北京)有限公司产品,溶血葡萄球菌酶购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.3 PCR 引物 SCCmec 分型引物均参照文献[2]由西安沃

尔森生物技术有限公司合成。见表 1。

1.4 方法

1.4.1 DNA 模板的制备 将试验菌株接种于羊血平板上,置于 37℃ 恒温孵箱中过夜孵育,挑取单克隆菌落于 5 mL LB 培养液中,于 37℃ 恒温摇床过夜摇菌,吸取 0.5 mL 菌液于离心管中,12 000 r/min 离心 1 min,离心半径 8 cm,弃上清液,加入 180 μL 溶血葡萄球菌酶缓冲液,置于 37℃ 水浴箱中水浴 10 min,然后按细菌 DNA 提取试剂盒说明书的第 3 步开始提取 DNA,将 DNA 液保存于 -20℃ 冰箱备用。

1.4.2 PCR 扩增体系及条件 PCR 反应体系为 25 μL,其中 2×Taq MasterMix 12.5 μL,DNA 模板 1 μL,引物各 1 μL,最后用灭菌双蒸水补足 25 μL。PCR 循环基本条件为 94℃ 预变性 5 min;然后 94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后,将 PCR 产物保存于 4℃ 冰箱中,配制 1% 琼脂糖凝胶,取 6 μL 产物加入其中,120 V 电泳 30 min,使用凝胶成像仪观察结果并拍照保存。其中 ATCC25923 作为阴性对照。

1.4.3 PCR 产物纯化及测序 测序要求 PCR 体系为 50 μL,由天根生化科技(北京)有限公司完成。

1.4.4 药敏试验 采用 E-test 法对万古霉素、替考拉宁、利奈

* 基金项目:陕西省科学技术研究发展计划项目(项目编号 2010K16-01-07)。

唑胺、左氧氟沙星和利福平进行药敏试验。

表 1 mecA 和 SCCmec 基因扩增引物序列

基因型号	引物序列	产物大小 (bp)	浓度 (μmol/L)
SCCmecI-F	GCTTTAAAGAGTGTGCTTACAGG	613	0.048
SCCmecI-R	GTTCTCTCATAGTATGACGTCC		
SCCmecII-F	CGTTGAAGATGATGAAGCG	398	0.032
SCCmecII-R	CGAAATCAATGGTTAATGACCC		
SCCmecIII-F	CCATATTGTGTACGATGCG	280	0.040
SCCmecIII-R	CCTTAGTTGTGCTAACAGATCG		
SCCmecIVa-F	GCCTTATTGAAAGAAACCG	776	0.104
SCCmecIVa-R	CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG		
SCCmecIVb-F	TCTGGAATTACTTCAGCTGC	493	0.092
SCCmecIVb-R	AAACAATATTGCTCTCCCTC		
SCCmecIVc-F	ACAATATTGTATTATCGGAGAGC	200	0.070
SCCmecIVc-R	TTGGTATGAGGTATTGCTGG		
SCCmecIVd-F	CTCAAAATACGGACCCCAATACA	881	0.280
SCCmecIVd-R	TGCTCCAGTAATTGCTAAAG		
SCCmecV-F	GAACATGTACTTAAATGAGCG	147	0.046
SCCmecV-R	TGAAAAGTTGTACCTTGACACC		
MecA-F	GTGAAGATATACCAAGTGATT	147	0.046
MecA-R	ATGCGCTATAGATTGAAAAGGAT		

2 结 果

2.1 菌株分布特征 所有检出 MRSA 的患者中,男性为 49 例(79.0%),女性为 13 例(21.0%)。60 岁及以上者有 30 例(48.4%)。分布前 3 位的科室分别为神经外科 ICU 10 例(16.1%),神经内科 ICU 9 例(14.5%),骨科 6 例(9.7%)。

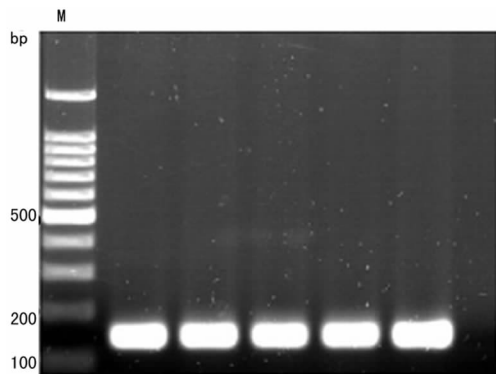


图 1 mecA 基因扩增电泳结果

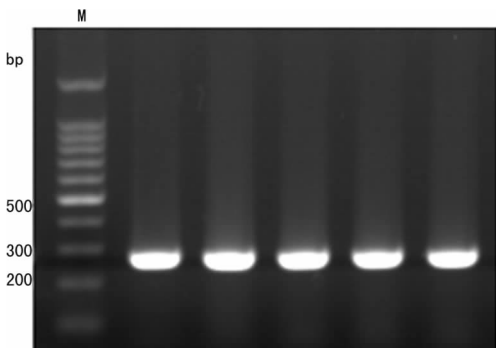


图 2 SCCmecIII 基因扩增电泳结果

2.2 基因类型检测 62 株 MRSA 的 mecA 基因均为阳性,其中 1 株出现 776 bp 条带,1 株未分出型别,其余 60 株全部出现 280 bp 条带,各型别经测序后与 GeneBank 上进行比对,证实 1 株为 SCCmecIVa 型,其余为 SCCmecIII 型。见图 1~3。

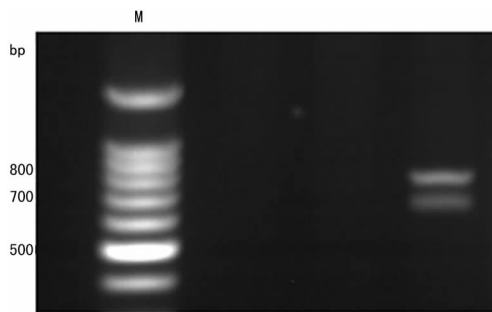


图 3 SCCmecIVa 基因扩增电泳结果

2.3 药敏试验结果 62 株 MRSA 对 5 种抗菌药物的 MIC 值见表 2。

表 2 62 株 MRSA 对 5 种抗菌药物的 MCI 值(μg/mL)

抗菌药物	MIC ₅₀	MIC ₉₀	耐药株数(n)	耐药率(%)
万古霉素	1.0	2.0	0	0
替考拉宁	4.0	4.0	0	0
利奈唑胺	1.0	2.0	0	0
左氧氟沙星	16.0	64.0	60.0	96.8
利福平	256.0	256.0	51.0	82.3

3 讨 论

MRSA 引起感染的难治性表现为其多重耐药性,而产生多重耐药的原因主要是由染色体介导的青霉素结合蛋白 PBP2a 所致,mecA 基因是 PBP2a 的编码基因,其能携带有多种抗菌药物的耐药基因,是 MRSA 的主要耐药因子^[4]。同时 MRSA 还可以从肠球菌属中获得耐药质粒,进一步扩大和增强了其耐药性^[5]。mecA 基因存在于 SAU 染色体盒(SCCmec)上,SCCmec 为一移动的基因序列,其可以作为 mec 基因在葡萄球菌菌株间水平传播的载体,使 MRSA 得以传播,同时 SCCmec 还可以整合除 mec 基因以外的许多耐药基因。此外,MRSA 的耐药机制包括两种基本形式,一是由质粒介导产生大量 β-内酰胺酶的获得性耐药;另一种是由耐药基因介导的固有耐药性,这两种机制导致 MRSA 广泛耐药^[6]。

目前报道 SCCmec 主要有 5 种类型,分别为 SCCmec I ~ SCCmec V 型^[7]。日本和韩国的 MRSA 流行株主要携带 SCCmec II,除此以外,亚洲地区其他国家主要以携带 SCCmec III 的流行株^[8]。本试验为该院首次对 MRSA 的 SCCmec 基因进行分型,在所检测的 62 株 MRSA 中,SCCmec III 型占 60 株(96.7%),是主要流行类型。本研究药敏试验结果显示,所有菌株对万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺均敏感,对左氧氟沙星和利福平的耐药率分别为 96.8% 和 82.3%,在临床治疗 MRSA 引起的感染时仍首选万古霉素,但由于临床抗菌药物的不合理使用,近年来已出现对万古霉素耐药的菌株^[9]。因此,需防止盲目地经验性用药而出现耐万古霉素的菌株。

社区获得性 MRSA(CA-MRSA)由于具有高毒力、高致病性的特点,且多感染健康人群,可能出现致死性后果,已成为目前临床研究的重点^[10]。而在中国关于 CA-MRSA 的报道相对较少,杭州地区两家大型综合医院 2 年中共分(下转第 773 页)

液被 UU 感染后,绝大部分精子的头部、体部和尾部有颗粒物吸附物,严重卷曲畸形,影响精子的活动能力;颗粒物吸附物还遮盖精子头部识别卵细胞的部位,影响受精能力^[9]。UU 感染睾丸组织后,睾丸的生精功能降低,并且可使精母细胞空泡化,干扰曲精管内精子的发生及成熟,从而引起精子密度明显减少,畸形率明显增加,这可能是导致男性不育的主要原因之一^[10]。

表 3 表明男性不育症患者 CT 感染阳性组精子密度、活力、活率及运动参数低于阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但畸形率与阴性组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。CT 侵袭睾丸和附睾,能使精子形态异常,破坏精子膜和顶体^[11]。Eley 等^[12]的研究表明男性生殖道 CT 感染会导致精子密度减低、活力减小,并干扰精子成熟。但 CT 感染后,一般症状较轻,若治疗不及时、彻底,可呈慢性感染而导致不育。

表 4 表明 NG 感染阳性组患者与阴性组液化时间、精子密度、存活率、精子活力比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),精子形态学两组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。NG 感染可能是男性不育的原因之一:(1)NG 感染男性尿道、输精管后,借助其表面的菌毛黏附在上皮细胞,并进行繁殖,进而进入上皮细胞内增殖破坏上皮细胞,使基底膜增厚而导致输精管上皮的生精细胞减少,精子成熟受到抑制。(2)NG 感染和死亡后排出内毒素导致输精管炎,坏死黏膜及其周围组织形成瘢痕引起输精管道堵塞。

参考文献

[1] 田根富,俞夏美.不育患者精液支原体感染及药敏分析[J].中国优生与遗传杂志,2007,15(6):114-115.
 [2] 谷翊群,陈振文,于和鸣.人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实

验室检验手册[M].4版.北京:人民卫生出版社,2001:15-64.
 [3] 贺昌海.不孕不育现代诊治技术[M].上海:复旦大学出版社,2003:42-43.
 [4] Kim SW, Kim KD, Paick JS. Microdeletion with in the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia[J]. Fertil Steril, 1999, 72(2): 349-353.
 [5] Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa[J]. Fertil Steril, 2002, 78(6): 1215-1224.
 [6] Fraczek M, Kurpisz M. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa[J]. J Androl, 2007, 28(2): 325-329.
 [7] 王忠山.精液黏度与精液分析参数、解脲支原体感染和抗精子抗体关系分析[J].中国男科学杂志,2004,18(1):9-10.
 [8] 李强.解脲支原体感染对男性不育的影响[J].中国男科学杂志,2004,18(6):41-43.
 [9] Shang XJ, Huang YF, Xiong CL, et al. Ureaplasma urealyticum infection and apoptosis of spermatogenic cell[J]. Asian J Androl, 1999, 21(3): 127-129.
 [10] Xu C, Lu MG, Feng JS, et al. Germ cell apoptosis induced by ureaplasma urealyticum infection[J]. Asian J Androl, 2001, 3(3): 199-204.
 [11] 倪语星,尚红.临床微生物学与检验[M].4版.北京:人民卫生出版社,2007:317-320.
 [12] Eley A, Pacey M, Galdiero M, et al. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm[J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(1): 53-71.

(收稿日期:2011-12-13)

(上接第 770 页)

离到 248 株 MRSA,其中 38 株为 CA-MRSA,约占 15%^[11]。但该数据仅从临床病历资料获得,缺乏 SCCmec 分型依据,尽管如此,仍低于欧美国家的报道^[12]。本组试验发现 1 株 SCCmecIV a 型菌株,为 1 例 33 岁女性患者,标本类型为血液,在入院时即抽取样本进行检测,排除医院感染,所以应警惕社区感染的可能性。

此外,本组试验表明,MRSA 检出率最高的科室依次为神经外科 ICU、神经内科 ICU 和骨科,提示医院感染管理时应重点监测以上高发科室,对其医务人员及环境微生物进行监测,对已感染 MRSA 的患者进行隔离,做到早发现、早治疗。

参考文献

[1] Huang YC, Su LH, Wu TL, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Taiwan. [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(16): 307-309.
 [2] Klinika C, Zakaznych AM, Lodzi W. Etiology and course of sepsis in adult patients treated in the Department of Infectious Diseases, Medical University of Lodz. Two-year observation[J]. Przegl Epidemiol, 2001, 5(3): 34-39.
 [3] Robert J, Bismuth R, Jarlier V. Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983-2002[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(3): 506-509.

[4] Brown DF. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 48(1): 65-66.
 [5] 钱小毛,金海勇.312 株金黄色葡萄球菌耐药特性的研究[J].中华医院感染学杂志,2009,19(5):578-580.
 [6] 徐小平.凝固酶阴性葡萄球菌的青霉素结合蛋白产生和苯唑西林 MIC 相关性研究[J].中华医院感染学杂志,2005,15(1):9-11.
 [7] Melles DC, Hendriks WD, Ott A, et al. Outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the Rijnmond region: the largest outbreak in the Netherlands[J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2004, 148(21): 1038-1041.
 [8] Ko KS, Lee JY, Suh JY, et al. Distribution of major genotypes among methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Asian countries[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 421-424.
 [9] Cheng S, Suvert DM, Hageman JC, et al. Infection with vancomycin-resistant Staphylococcus containing the vanA resistance gene [J]. N Engl J Med, 2003, 348(14): 1342-1346.
 [10] 李园,范红,陈慧莉,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型研究[J].中国现代医学杂志,2008,18(15):2122-2123.
 [11] 章锐锋,徐志江.社区获得性 MRSA 感染的临床特征和耐药性分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(7):573-575.
 [12] Gregory M, Anusha K, Rachel G, et al. Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department[J]. The New England Journal of Medicine, 2006, 355(1): 666-669.

(收稿日期:2012-02-08)