

• 检验技术与方法 •

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及 SCCmec 基因分型研究^{*}

战晓微¹, 郑秋月^{2△}

(1. 沈阳农业大学, 辽宁沈阳 110866; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁大连 116001)

摘要:目的 了解大连地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药性及其葡萄球菌盒染色体 SCCmec 的基因型特点。方法 采用纸片扩散法检测 MRSA 对抗菌药物的耐药性;聚合酶链反应(PCR)对 SCCmec 进行基因分型。结果 分离出的 38 株 MRSA 菌株均具有多重耐药性,但对万古霉素和氯霉素较为敏感。SCCmec 基因型以 II 型最为常见,占 86.84%;其次为 III 型,占 10.53%;未定型的占 2.6%。结论 大连地区分离出的 MRSA 具有多重耐药的特征,SCCmec 基因型以 II 型为主。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 耐药性; SCCmec 基因型; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)18-2512-03

Antimicrobial resistance and SCCmec genotype of methicillin-resistant Staphylococcus aureus^{*}

Zhan Xiaowei¹, Zheng Qiuyue^{2△}

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian, Liaoning 116001, China)

Abstract: Objective To investigate antibiotic resistance and Staphylococcal cassette chromosome mec(SCC-mec) genotype of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Dalian Area. **Methods** Antimicrobial susceptibility of MRSA was detected by Kirby-Bauer method and SCCmec genotype by multiple PCR method. **Results** 38 strains of MRSA were all multidrug-resistant strains, but susceptible to vancomycin and chloramphenicol. The most common SCCmec genotype was type II (86.84%), type III was in the second place (10.53%), and unidentified type accounted for 2.6%. **Conclusion** MRSA strains in Dalian area are characterized by multidrug resistance, type II is the most common SCCmec genotype.

Key words: methicillin-resistant Staphylococcus aureus; antimicrobial resistance; SCCmec genotype; polymerase chain reaction

自第 1 例耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)被报道以来,其检出率逐年上升,已成为导致医院或社区获得性感染的重要病原菌之一,也是临床抗感染治疗的难题之一,分离率约占葡萄球菌 40%~70%,已引起全世界重视^[1]。MRSA 获得了编码青霉素结合蛋白 2a 的外源性甲氧西林决定子基因(mecA),MRSA 的耐药基因位于 SCCmec 基因盒上,同时 SCCmec 还可以整合除 mec 基因以外的许多耐药基因,从而造成对所有 β-内酰胺类药物耐药^[2]。SCCmec 是一种可移动的遗传元件,该元件还携带除 mecA 基因外的其他抗菌药物耐药基因,造成多重耐药。目前常见的类型有 SCCmec I、II、III、IV a、IV b、IV c、IV d 及 V 8 种分型,此外国内外也报道过其他不常见的分型及新的分型。其中 SCCmec I、II、III 型主要存在于医院获得性 MRSA(HA-MRSA)中,此类菌株中 mecA 复合体的下游带有多个质粒及转座子。SCCmec IV 型和 SCCmec V 型通常存在于社区获得性 MRSA(CA-MRSA)和非多重耐药 MRSA 菌株中,其分子较小,除 mecA 外几乎不携带其他多重耐药基因,易移动并通过质粒或噬菌体传播至不同遗传背景的葡萄球菌中,容易在人群中传播和定植^[3-5]。MRSA 流行病学发生了很大变化,出现了另一类导致人类严重感染的牲畜相关性 MRSA(LA-MRSA),国内已有多篇文献报道猪源的 LA-MRSA 菌株有 III 型、IV b 型^[6]。本研究参考了 Zhang 等^[7]方

法,利用多重 PCR 技术对大连地区从食物中毒患者及食品相关工作人员中分离的 MRSA 基因进行分型检测,了解 MRSA 基因型在此类人群中的携带情况。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 金黄色葡萄球菌 ATCC51153、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、38 株金黄色葡萄球菌分离株(分离自大连地区食物中毒患者及食品相关工作人员)。

1.2 仪器与试剂 主要仪器包括 PHOENIX-100 微生物自动鉴定系统、紫外分光光度计、PCR 扩增仪、电泳仪、UVP 凝胶成像系统。使用的培养基包括营养琼脂、Mueller-Hinton(M-H)琼脂、Baird parke(B-P)琼脂、TSA 琼脂、TSB 肉汤。抗菌药物及试剂包括苯唑西林、头孢西丁、氨苄西林、青霉素 G、庆大霉素、卡那霉素、妥布霉素、红霉素、四环素、环丙沙星、左氧沙星、诺氟沙星、氯霉素(购自于杭州天和微生物);prepman ultra 细菌提取试剂(美国 AB 公司);TaqDNA 聚合酶,dNTPmixture, DNA marker,Goldview 等购自于大连宝生物公司,PCR 引物由大连宝生物公司合成。

1.3 方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌鉴定及药敏试验 根据金黄色葡萄球菌检验 GB/T4789.10-2010 方法分离鉴定金黄色葡萄球菌,利用 PHOENIX-100 微生物自动鉴定系统鉴定并检测金黄色葡萄

^{*} 基金项目:质检公益性行业科研专项资助项目(201210043)。 作者简介:战晓微,女,博士研究生在读,主要从事有害生物与环境安全的研究。 △ 通讯作者,E-mail:zhengqciq@163.co。

萄球菌耐药性,《动物及其制品中细菌耐药性的测定纸片扩散法》SN/T1944-2007 对菌株的苯唑西林、头孢西丁、氨苄西林、青霉素 G、庆大霉素、卡那霉素、妥布霉素、红霉素、克林霉素、四环素、环丙沙星、左氧沙星、诺氟沙星、氯霉素耐药性进行测定,参照美国临床和实验室标准研究所(CLSI)判定结果,质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.3.2 多重 PCR 方法 按 GB4789.10-2010 方法对金黄色葡萄球菌进行增菌培养,并培养后的增菌液以 prepman ultra 细菌提取方法提取细菌 DNA,使用紫外分光光度计测定其浓度和纯度,-20 ℃ 保存。参考文献[7],设计合成引物见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。反应条件:94 ℃,45 s,65 ℃,45 s,72 ℃,90 s,10 个循环;94 ℃,45 s,55 ℃,45 s,72 ℃,90 s,25 个循环;72 ℃,10 min;4 ℃ 保存,反应体系见附表 1。电泳:取 PCR 产物 10 μL 上样,3%琼脂糖电泳,电压为 200 V,电流 190 mA,电泳时间为 20 min,电泳结束后,将胶置于凝胶成像系统下鉴定。

2 结 果

2.1 38 株 MRSA 耐药性检测 对利用微生物自动鉴定系统鉴定为 MRSA 的 38 株菌进行纸片扩散法试验,对照 CLSI 判定结果。苯唑西林、头孢西丁、氨苄西林、青霉素 G、红霉素、克林霉素、四环素耐药率为 100%(38/38),对庆大霉素耐药率为 71.05%(27/38),对卡那霉素耐药率为 81.58%(31/38),妥布霉素 78.95%(30/38),对环丙沙星的耐药率为 97.37%(37/38),对氯霉素的耐药率为 60.53%(23/38),对万古霉素均敏感。且全部 38 株 MRSA 均为多重耐药菌株。

2.2 SCCmec 基因分型 通过对 38 株 MRSA 进行 PCR 扩增后,并进行琼脂糖凝胶电泳检测,部分结果见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),38 株菌均出现 147 bp 条带,均检出 mecA 基因;其中 33 株菌出现 398 bp 条带,为Ⅱ型菌株,占全部菌株的 86.84%;4 株出现 280 bp 条带,为Ⅲ型菌株,占全部菌株的 10.53%;另有一株 MRSA 只检出 mecA 基因,未检出 SCCmec 分型基因,其可能是其他不常见分型或新分型,待进一步研究。

2.3 SCCmec 基因型及其耐药率 SCCmecⅡ型 MRSA 对苯唑西林、头孢西丁、氨苄西林、青霉素 G、红霉素、克林霉素、四环素、左氧沙星、诺氟沙星的耐药率为 100%,对环丙沙星的耐药率较高,氨基糖苷类抗菌药物庆大霉素、卡那霉素、妥布霉素的耐药率次之,对氯霉素的耐药率为 61.76%,而对万古霉素均敏感。Ⅲ型 MRSA 苯唑西林、头孢西丁、氨苄西林、青霉素 G、红霉素、克林霉素、四环素、左氧沙星、诺氟沙星、卡那霉素、妥布霉素耐药率为 100%,对庆大霉素、氯霉素有敏感菌株,对万古霉素均敏感。而未分型菌株仅对氯霉素、万古霉素敏感,见表 1。

表 1 MRSA 的 SCCmec 基因型及其耐药率

抗菌药物	Ⅱ 型(n=33)		Ⅲ 型(n=4)		未分型(n=1)	
	耐药菌株	耐药率	耐药菌株	耐药率	耐药菌株	耐药率
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
苯唑西林	33	100.00	4	100.00	1	100.00
头孢西丁	33	100.00	4	100.00	1	100.00
氨苄西林	33	100.00	4	100.00	1	100.00
青霉素 G	33	100.00	4	100.00	1	100.00

续表 1 MRSA 的 SCCmec 基因型及其耐药率

抗菌药物	Ⅱ 型(n=33)		Ⅲ 型(n=4)		未分型(n=1)	
	耐药菌株	耐药率	耐药菌株	耐药率	耐药菌株	耐药率
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
庆大霉素	23	67.65	3	75.00	1	100.00
卡那霉素	26	76.47	4	100.00	1	100.00
妥布霉素	30	88.23	4	100.00	1	100.00
红霉素	33	100.00	4	100.00	1	100.00
克林霉素	33	100.00	4	100.00	1	100.00
四环素	33	100.00	4	100.00	1	100.00
环丙沙星	32	94.11	4	100.00	1	100.00
左氧氟沙星	33	100.00	4	100.00	1	100.00
诺氟沙星	33	100.00	4	100.00	1	100.00
氯霉素	21	61.76	2	50.00	0	0.00
万古霉素	0	0.00	0	0.00	0	0.00

3 讨 论

目前,MRSA 常用的基因分型方法有 SCCmec、MLST、Spa、agr 分型和 PFGE 等,其中 SCCmec 分型的优点为快速、精确、灵敏度高,SCCmec 是 MRSA 菌株中携带的 mec 基因的一段超过 30 000 bp 的染色体 DNA 片段,其类似于毒力岛,但更易携带抗菌药物耐药基因,除携带 mec 基因复合物外,还携带转座子和整合的质粒(含各种对非 β-内酰胺类抗菌药物耐药的基因),因此,SCCmec 可被认为是一种类似于毒力岛结构的抗菌药物耐药岛[8]。

SCC mec 基因分型方法是根据 SCC mec 内部基因结构组成的不同分型,SCC mec 主要由 mec 基因复合体和 ccr 基因复合体组成。mec 基因复合体是由编码对 β-内酰胺类抗菌药物的 mecA 基因及诱导调节的 mec I-mecR1 基因组成,分为 A、B、C、D 四种类型。ccr 基因复合体是由 ccrA、ccrB 基因及邻近的开放读码框架组成,其功能与 SCCmec 的移动、SCCmec 准确的整合到染色体上并从染色体上分离有关,据 mec 基因复合体和 ccr 基因复合体组成的不同[9]。

SCCmec 根据发现时间的先后,分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ 5 种类型和多种亚型,1961 年第一株临床分离获得的Ⅰ型 SCCmec MRSA 菌株,SCCmecⅠ型基因主要由 B 型 mec 基因复合体和 ccr1 基因复合体组成[10];1982 年在日本分离出Ⅱ型 SCCmecMRSA 菌株,SCCmecⅡ型基因主要由 A 型 mec 基因复合体和 ccr2 基因复合体组成[11];SCCmecⅢ型基因主要是由 A 型 mec 基因复合体和 ccr3 基因复合体组成,Ⅲ型 SCCmec 主要编码四环素、红霉素和镉耐药,携带多个耐药基因,在各种 SCCmec 中是最大的;SCCⅣ型主要是由 B 型 mec 复合体和 ccr2 基因复合体组成,Ⅳ型菌株于 2000 年在社区感染的 MRAS 菌株首次发现,Ⅳ型 SCCmec 是各种 SCCmec 中最小的,因此移动性强,更易转移至不同遗传背景的葡萄球菌中;Ⅴ型 SCCmecⅤ型主要是由 C 型 mec 复合体和 ccr5 基因复合体组成,除了携带 mecA 以外不携带其他任何抗菌药物耐药基因,最早是在澳大利亚的一株社区获得的 MRSA 中发现,与Ⅳ型不同的是它携带一套编码限制修饰系统的外源基因[12]。

由于不同地区 MRSA 菌株的来源背景不同,其流行的

SCCmec 基因型也不同,亚洲地区大部分国家以 SCCmec III 型为主,日本和韩国以 SCCmec II 型 MRSA 为主^[13],而欧美地区的流行株与亚洲不同,以 I、III 型两种基因型为主^[14-15],挪威 MRSA 的主要流行株为 SCCmec III 型^[16],荷兰 MRSA 的流行株主要为 SCCmec IV 和 SCCmec V 型^[17],阿根廷和加拿大地区的流行株均为 SCCmec II 型^[18,7],我国大部分地区均以 SCCmec III 型为主^[2,8,19-20],SCCmec 基因分型与细菌耐药性关系密切,I 型 SCCmec 携带耐药基因较少,一般仅对 β -内酰胺类的抗菌药物耐药,II、III 两型基因盒较大,携带多种耐药基因,II 型 MRSA 菌株 SCCmec 基因盒存在携带氨基糖苷类耐药基因的 PUB110 质粒和携带红霉素耐药基因的 Tn554 转座子,III 型菌株具 MRSA 有携带四环素耐药基因的 PT181 质粒和 Tn554 转座子,因此,除对 β -内酰胺类抗菌药物耐药外,II 型、III 型还对氨基糖苷类、四环素类和大环内酯类抗菌药物耐药性较高,仅对糖肽类抗菌药物敏感^[9,21-22]。而多来自社区感染的 MRSA 菌株多为 IV、V 型,除携带 mecA 基因外,整合的其他耐药基因较少,多重耐药菌株的发生率较低,但因片段小而轻便,与 SCCmec I、II、III 型相比更易在葡萄球菌之间传播。

本研究针对大连地区的 MRSA 分离进行 SCCmec 分型研究,全部 38 株 MRSA 以 SCCmec II 型为主,III 型较少,另有一株未分型菌株,与国内其他地区的流行类型不同,这可能由于大连地区在地里位置上离日韩地区比较近,因此流行的主要类型比较相似。将 SCCmec 分型与 MRSA 菌株耐药表型比较发现,此 38 株 MRSA 均为多重耐药菌株,其中 SCCmec II 型 MRSA 菌株均对红霉素耐药,与其整合的耐药基因相符,而对氨基糖苷类庆大霉素、卡那霉素、妥布霉素三种抗菌药物耐药率为 67.65%、76.47%、88.23%,可能由于部分菌株携带氨基糖苷类耐药基因,但并未表达出耐药表型,尚需检测相应氨基糖苷类耐药基因做进一步研究。而 SCCmec III 型 MRSA 菌株均对四环素耐药,这与其携带的耐药基因相符。

参考文献

- [1] 郭云龙,赵先进,韩宏艳,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药表型分型与耐药基因检测分析研究[J].中国药物与临床,2012,12(1):32-35.
- [2] 纪冰,王爱玲,宿振国,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型与耐药性研究[J].中国实验诊断学,2012,16(7):1195-1198.
- [3] 王雪敏,姚建楠,李蓓蓓,等.猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药表型及其 SCCmec 基因分型研究[J].中国人兽共患病学报,2013,29(9):841-845.
- [4] 王新,黄山,周婷,等.猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及其 SCCmec 基因分型研究[J].中国预防兽医学报,2010,32(12):975-977.
- [5] 欧阳范献,卜平凤,黄惠琴,等.MRSA 的 7 种新 SCCmec 型别及其抗药特性[J].微生物学报,2007,47(2):201-207.
- [6] Cui S, Li J, Hu C, et al. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(4): 680-683.
- [7] 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.
- [8] 余方友,林晓梅,李美兰,等.应用多重聚合酶链反应对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌进行 SCCmec 基因分型[J].中华检验医学杂志,2006,29(10):931-934.
- [9] 孙光明,马筱玲,戴媛媛.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型的研究[J].中国抗生素杂志,2006,31(5):287-290.
- [10] 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.
- [11] Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(6): 1449-1458.
- [12] Ito T, Ma XX, Takeuchi F, et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2637-2651.
- [13] 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(1): 421-426.
- [14] Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Antimicrob Agents Chemother[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(7): 2155-2161.
- [15] Bukharie HA, Abdelhadi MS, Saeed IA, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community pathogen[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001, 40(1/2): 1-4.
- [16] Fossum AE, Bukholm G. Increased incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST80, novel ST125 and SCCmecIV in the south-eastern part of Norway during a 12-year period[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(7): 627-633.
- [17] Huijsdens XW, van Santen-Verheul MG, Spalburg E, et al. Multiple cases of familial transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2994-2996.
- [18] Sola C, Cortes P, Saka HA, et al. Evolution and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic and sporadic clones in Cordoba, Argentina[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(1): 192-200.
- [19] 肖松生,吴伟元,文丽霞,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及其 SCCmec 基因型的研究[J].中国感染控制杂志,2007,6(3): 153-156.
- [20] 李囡,范红,陆小军,等.新型多重聚合酶链反应对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因的分型研究[J].现代检验医学杂志,2008,23(1): 32-35.
- [21] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Genet Evol, 2008, 8(6): 747-763.
- [22] 纪冰,马筱玲,蔡朝阳,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型与耐药性分析[J].临床检验杂志,2007,25(3): 204-206.