

• 论 著 •

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 SCCmec 分型及耐药性分析

吴 宇, 王贵宇, 余 瑶, 徐 莉, 黄君富[△]

(第三军医大学第一附属医院检验科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨临床分离的 346 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株的临床分布、SCCmec 分型及其对常用抗菌药物的耐药情况。方法 选择 2014 年 1 月至 2015 年 1 月该院分离的 784 例金黄色葡萄球菌(SA), 采用 PCR 方法对其进行 MRSA 及 MRSA SCCmec 基因分型鉴定, 并对其检出分布及耐药性进行分析。结果 784 株 SA 中 MRSA 346 株(占 44.13%), MRSA 中来自痰液占 43.06%, 伤口分泌物占 48.55%; MRSA 对青霉素、左氧氟沙星、红霉素耐药性较高, 对万古霉素、利奈唑胺、替考拉宁均敏感。MRSA 经 SCCmec 分型, 共发现 SCCmec II 型 130 株, SCCmec III 型 196 株, SCCmec IV 型 11 株, SCCmec V 型 9 株。结论 该院分离的 MRSA 以 SCCmec III 型为主, MRSA 对多种抗菌药物具有耐药作用, 但对万古霉素、替考拉宁等敏感。

关键词:金黄色葡萄球菌; 耐甲氧西林; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)04-0455-03

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus SCCmec parting and resistance analysis

Wu Yu, Wang Guiyu, Yu Yao, Xu Li, Huang Junfu[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First Hospital Affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the clinical distribution, antimicrobial resistance and Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) genotype characteristics of 346 methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) clinical isolates in the hospital.

Methods A total of 784 strains of Staphylococcus aureus isolated from January 2014 to January 2015 in the hospital, MRSA identification and the SCCmec genotype was conducted by PCR assay. **Results** 346 strains of MRSA (44.13%) were isolated from 784 strains of Staphylococcus aureus, the detection rate of MRSA from sputum accounted for 43.06%, the secretion accounted for 48.55%. MRSA was resistant to penicillin, levofloxacin and erythromycin, sensitive to vancomycin, linezolid and teicoplanin. SCCmec genotyping result showed that SCCmec II was identified in 130, SCCmec III in 196, SCCmec IV in 11, SCCmec V in 9. **Conclusion**

SCCmec III is the main genotypes of MRSA from our Hospital, all of the MRSA strains are multi-resistant to tested antibiotics, but sensitive to vancomycin and teicoplanin.

Key words: Staphylococcus aureus; anti-methicillin-resistant; drug resistance

金黄色葡萄球菌(SA)是引起临床化脓性感染的常见致病菌之一,自 1961 年英国首次发现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)以来,MRSA 的耐药性及检出率逐年升高,目前已成为引发院内感染重要的致病菌之一^[1-2],因此,监测 MRSA 的感染情况及对抗菌药物的耐药情况,为临床用药提供合理依据显得极为重要。本文将本院 2014 年 1 月至 2015 年 1 月临床分离出的 346 株 MRSA 的 SCCmec 基因进行分型,并对其临床分布情况、耐药性进行分析,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 SA 菌株为 2014 年 1 月至 2015 年 1 月西南医院门诊及住院患者各类标本中分离而来,共 784 株,其中 MRSA 346 株。质控菌株金黄色葡萄球菌(ATCC2923)、质控菌株 MRSA(ATCC43300)为本院检验科保存。

1.2 仪器与试剂 药敏纸片(Oxoid 公司,英国); TaKaRa 细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]、100 bp DNA 标记物[宝生物工程(大连)有限公司]、琼脂糖(BIOWEST, 西班牙); TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version [宝生物工程(大连)有限公司];其他试剂均购自国药集团。PCR 仪(ABI 公司;美国);水平电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)、凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)。MRSA PCR 鉴定引物及 SCCmec 基因分型引物均由生工生物工程(上海)股

份有限公司合成。

1.3 方 法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 按常规方法接种培养、分离纯化收集到的标本,使用 TaKaRa 细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒提取细菌基因组 DNA,具体方法按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 MRSA 的鉴定 Nuc 为耐热核酸酶基因,用于 SA 的鉴定;MecA 基因为甲氧西林耐药决定子 A,用于 MRSA 的鉴定。根据文献[3] MRSA 鉴定引物,具体序列见表 1。MRSA 双重 PCR 反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 50 s,59 °C 45 s,72 °C 90 s,共 35 个循环;72 °C 5 min。PCR 反应结束后,取 10 μL PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

表 1 MRSA 鉴定引物序列

基因类型	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
Nuc-F	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'	279
Nuc-R	5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	
MecA-F	5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3'	533
MecA-R	5'-AGT TCT CTG CAG TAC CGG ATT TGC-3'	

1.3.3 SCCmec 基因分型 根据文献[4-5]合成 SCCmec 基因特异引物,具体序列见表 2(见《国际检验医学杂志》网站首页

“论文附件”)。SCCmec 多重 PCR 反应条件为 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 65 °C 45 s, 72 °C 90 s, 10 个循环; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应结束后, 取 10 μL PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。PCR 鉴定正确后, PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进一步测序验证。

1.3.4 药敏试验 采用 E-Test 法对分离到的 MRSA 进行药敏试验。

2 结 果

2.1 MRSA 的鉴定及检出情况 2014 年 1 月至 2015 年 1 月本院门诊及住院患者标本中共分离出 SA 784 株, 其中 MRSA 346 株, 占 44.13%, MRSA 的 PCR 鉴定见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。检出 MRSA 的患者中, 男性患者 178, 占 51.45%, 女性患者 168, 占 48.55%。MRSA 检出率较高的科室为烧伤科、儿科、ICU, 具体见表 3。在各类送检标本中, MRSA 检出率在痰液和伤口分泌物标本中相对较高, 分别占 45.57%、44.80%, 见表 4。

2.2 MRSA 的基因分型 本研究通过 PCR 方法共分离鉴定到 SCCmec III 型 196 株, 占 56.65%; SCCmec II 型 130 株, 占 37.57%; SCCmec IV 型 11 株, 占 3.18%; SCCmec V 型 9 株, 占 2.60%。未发现其他型别 MRSA。鉴定电泳图见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 药敏试验 本研究分离到的 SCCmec II 型、SCCmec III、SCCmec IV 及 SCCmec V 型 MRSA 的具体耐药情况见表 5。

表 3 SA 科室分布及 MRSA 检出情况

科室	SA		MRSA		MRSA 检出率(%)
	株数(n)	构成比(%)	株数(n)	构成比(%)	
ICU	211	26.91	89	25.72	42.18
外科	189	24.11	72	20.81	38.10
烧伤科	107	13.65	62	17.92	57.94
儿科	92	11.73	49	14.16	53.26
神经外科	77	9.82	31	8.96	40.26
皮肤科	69	8.80	22	6.36	31.88
泌尿外科	11	1.40	4	1.16	36.36
其他	28	3.57	17	4.91	60.71

表 4 SA、MRSA 的来源及检出情况

来源	SA		MRSA		MRSA 检出率(%)
	株数(n)	构成比(%)	株数(n)	构成比(%)	
伤口分泌物	375	47.83	168	48.55	44.80
痰液	327	41.71	149	43.06	45.57
血液	52	6.63	21	6.07	40.38
尿液	16	2.04	4	1.16	25.00
其他	14	1.79	4	1.16	28.57

表 5 不同 SCCmec 分型 MRSA 的耐药情况分析

抗菌药物	SCCmec II (n=130)		SCCmec III (n=196)		SCCmec IV (n=11)		SCCmec V (n=9)		合计(n)
	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	
青霉素	130	100.00	196	100.00	11	100.00	9	100.00	346
苯唑西林	130	100.00	196	100.00	11	100.00	9	100.00	346
红霉素	128	98.46	196	100.00	11	100.00	9	100.00	344
头孢西丁	130	100.00	196	100.00	10	90.91	9	100.00	345
克林霉素	116	89.23	196	100.00	9	81.82	9	100.00	330
庆大霉素	112	86.15	178	90.82	9	81.82	8	88.89	307
左氧氟沙星	125	96.15	191	97.45	10	90.91	8	88.89	334
利福平	8	6.15	9	4.59	1	9.09	0	0.00	18
万古霉素	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0
替考拉宁	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0

3 讨 论

近年来, MRSA 的检出率逐年升高, 已成为临床感染的常见致病菌之一。本研究共分离到 MRSA 346 株, 占 SA 的 44.13%。从临床分布来看, MRSA 检出率最高的科室依次为烧伤科、儿科与 ICU, 原因可能与这些科室的患者病情严重, 免疫系统功能低下, 或频繁的侵入性操作, 需要大量运用抗菌药物有关。在各类送检标本中, 伤口分泌物及痰液 MRSA 检出率分别为 45.57%、44.80%, 表明伤口与下呼吸道感染仍是 MRSA 感染的主要方式。

MRSA 基因分型方法包括脉冲场凝胶电泳、多位点序列分型、葡萄球菌蛋白 A 分型、葡萄球菌染色体 *mec* 盒 (SCC-mec) 分型等, 其中 SCCmec 染色体盒是 MRSA 中与 *mecA* 基因密切相关的葡萄球菌染色体盒重组酶基因, 根据 SCCmec 基因型不同可将 MRSA 分为社区获得性 MRSA (CA-MRSA)

与医院获得性 MRSA (HA-MRSA), HA-MRSA 携带 SCCmec 基因型通常为 SCCmec I、II、III 型, 这些基因片段较大, 可携带多个耐药基因, 通常表现为多重耐药。而 CA-MRSA 则携带 IV、V 型, 基因片段较小, 临床中对抗菌药物敏感度较高^[6-7]。在本研究分离的 346 株 MRSA 中, 主要为 SCCmec III 型和 SCCmec II 型, 分别占 56.65%、37.57%, SCCmec IV 型及 V 型亦有检出。药敏试验结果显示, 所有菌株对青霉素、苯唑西林均耐药, 对红霉素、头孢西丁、克林霉素、庆大霉素、左氧氟沙星耐药率均高于 80%, 所有菌株对利福平耐药率较低; 未检测到耐万古霉素及替考拉宁的菌株, SCCmec II 对红霉素的耐药性低于其他 3 种型别; SCCmec III 对庆大霉素的耐药率高于其他 3 种型别, SCCmec V 对克林霉素、庆大霉素的耐药性低于其他 3 种型别, SCCmec III 与 SCCmec V 对多种抗菌药物的耐药率均为 100%, 明显高于其他分型。 (下转第 458 页)

RDW、WBC、UA 显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 两组血常规和 UA 水平比较

项目	CHD 组($n=150$)	对照组($n=120$)	P
RDW(%)	13.34±0.73	12.45±0.86	0.000
RBC($\times 10^{12}/L$)	4.98±1.23	4.88±1.12	0.490
Hb(g/L)	126.48±12.78	125.56±13.46	0.566
MCV(fL)	88.25±4.78	89.37±4.56	0.052
WBC($\times 10^9/L$)	8.01±1.67	7.40±1.54	0.002
PLT($\times 10^9/L$)	178.26±34.56	180.98±36.78	0.533
UA($\mu\text{mol}/L$)	378.32±67.20	302.21±66.46	0.000

3 讨论

RDW 是反映红细胞大小分布宽度的指标,其值越大,RBC 体积大小越不均一,多用来诊断各类贫血。近年来有关 RDW 与 CHD 的相关性研究报道较多,报道表明 RDW 的升高是 CHD 的独立危险因素之一,并且与冠状动脉病变严重程度呈独立相关^[5-7]。本文研究结果也表明 RDW 在 CHD 组显著升高,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时 RDW 与心血管病的预后以及长期不良事件密切相关,但 RDW 在心血管疾病中升高的具体机制尚不明确,主要被认为是慢性炎症反应、氧化应激和神经激素通路的激活所致。

UA 是嘌呤代谢的最终产物,主要有细胞代谢分解的核酸和其他嘌呤类化合物以及食物中的嘌呤经酶的分解而来。UA 在 CHD 发病中的作用机制目前尚不完全清楚,主要考虑与以下原因有关:HUA 促进血小板聚集,加速血栓形成,增加冠状动脉栓塞;HUA 时,UA 微结晶容易析出,沉积于血管壁,直接损伤血管内膜^[8],促进脂质沉积和动脉粥样硬化的形成;UA 可诱发和促进高血压病、糖尿病的发生,间接地参与 CHD 的发病过程。UA 作为 CHD 危险因素在近年来受到越来越多的关注,并且同年龄、性别、吸烟、高血压、糖尿病、高胆固醇血症、肥胖等一同用来预测冠状动脉病变的程度。本研究显示,CHD 组的 UA 水平也明显高于对照组。

综上所述,RDW 和 HUA 与 CHD 的发生密切相关,对上

述代谢紊乱进行早期检测和干预治疗可能降低心血管事件的发生。联合 RDW 及 UA 对评估 CHD 患者预后和病情诊断具有重要的临床价值。

参考文献

- [1] Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(1): 40-47.
- [2] Tonelli M, Sacks F, Arnold M, et al. Relation between red blood cell distribution width and cardiovascular event rate in people with coronary disease[J]. Circulation, 2008, 117(2): 163-168.
- [3] Dabbah S, Hammerman H, Markiewicz W, et al. Relation between red cell distribution width and clinical outcomes after acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2010, 105(1): 312-317.
- [4] Nabais S, Losa N, Gaspar A, et al. Association between red blood cell distribution width and outcomes at six months in patients with acute coronary syndromes[J]. Rev Port Cardiol, 2000, 28(1): 905-924.
- [5] Isik T, Uyarel H, Tanboga IH, et al. Relation of red cell distribution width with the presence, severity, and complexity of coronary artery disease[J]. Coron Artery Dis, 2012, 23(1): 51-56.
- [6] Rothenbacher D, Kleiner A, Koenig W, et al. Relationship between inflammatory cytokines and uric acid levels with adverse cardiovascular outcomes inpatients with stable coronary heart disease [J]. PLoS One, 2012, 7(9): 45907.
- [7] 马凤莲, 刘奇志, 刘俊, 等. 红细胞分布宽度与冠心病的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(3): 258-261.
- [8] Kanbay M, Sanchez-Lozada LG, Franco M, et al. Microvascular disease and its role in the brain and cardiovascular system: a potential role for uric acid as a cardiorenal toxin[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(2): 430-437.

(收稿日期: 2015-10-12)

(上接第 456 页)

综上所述,随着抗菌药物的滥用,MRSA 的感染及其流行已日趋严重,除万古霉素、替考拉宁与利福平外,MRSA 对其他抗菌药物都有较高的耐药率。本次研究未发现万古霉素耐药菌株,而世界上已经发现万古霉素耐药的 SA 报道^[8]。因此,应该加强对 MRSA 监测,合理使用抗菌药物,降低万古霉素耐药的 SA 出现。除此之外,医院各科室应做好定时消毒,加强对医护人员的培训,切断 MRSA 接触传播的途径。

参考文献

- [1] 崔巧珍, 张燕军, 郭慧芳. 金黄色葡萄球菌的耐药变迁[J]. 中国药物与临床, 2013, 22(10): 1374-1376.
- [2] 孙恒彪, 黄敏, 张婧, 等. 286 株金黄色葡萄球菌临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22): 3061-3063.
- [3] Jonas D, Grundmann H, Hartung D, et al. Evaluation of the mecA femB duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Eur J Clin Microbiol, 1999, 18(9): 643-647.
- [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] 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 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(7): 2155-2161.
- [6] 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.
- [7] 梁蓓蓓, 王睿. 社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)感染特点及治疗对策的研究进展[J]. 中国药物应用与监测, 2011, 8(6): 325-329.
- [8] Howden BP, Davies JK, Johnson PD, et al. Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 99-139.

(收稿日期: 2015-10-08)

