

• 论 著 •

# 深圳东部地区耐甲氧西林葡萄球菌 SCCmec 基因型分析\*

陈日炳, 万彦彬, 胡 琴, 崔海燕, 谢春燕  
(广东省深圳市龙岗区人民医院检验科 518172)

**摘 要:**目的 了解深圳东部地区耐甲氧西林葡萄球菌的流行现况,并探讨分析 MRS 所携带 SCCmec 主要的基因亚型,为 MRS 流行病学调查及其防控提供理论依据。方法 头孢西丁琼脂稀释法对 MRS 进行筛查,PBP2a 进行表型确证,并用 PCR 法进行 SCCmec 分型,确认 MRS 所携带的 SCCmec 亚型。结果 1 093 例葡萄球菌临床分离株中共检出 127 例为 MRS,占 11.62%,除氨苄西林、青霉素、万古霉素 3 种抗生素外,MRS 对其他抗生素的耐药性均较甲氧西林敏感葡萄球菌高,且有 66.9% 的 MRS 表现为多重耐药。SCCmec 基因分型共检出 II、III、IV 3 个亚型,检出例数分别为 20 株(15.75%)、97 株(76.38%)和 10 株(7.87%),II、III 型菌株对多种  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药,对利福平的耐药率均较低,对万古霉素完全敏感,其中 III 型 MRS 菌株有 76 例表现为多重耐药,耐药率明显高于 II、IV 型 MRS 菌株。结论 本地区临床分离的 MRS 所携带的 SCCmec 基因以 III 型为主,且具有对抗生素多重耐药的特性。

**关键词:**甲氧西林; 葡萄球菌属; 抗药性; SCCmec

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0265-03

## Genotyping of SCCmec gene in methicillin-resistant Staphylococcus and in certain area\*

Cheng Ribin, Wan Yanbin, Hu Qin, Cui Haiyan, Xie Chunyan

(Department of Clinical Laboratory, Longgang District People's Hospital, Shenzhen Guangdong 518172, China)

**Abstract:** Objective To understand the prevalence situation of methicillin-resistant Staphylococcus (MRS) in Eastern district of Shenzhen City and analyze the main gene types of SCCmec gene in order to apply theoretic foundations for epidemiological research, and the prevention and control of MRS infection. Methods MRS strains were tested by Cefoxitin agar dilution method, and identified by PBP2a method. PCR was performed for the confirmation of the subtype of SCCmec genes. Results 127 strains of MRS were segregated from 1 093 strains of Staphylococci and the detected rate was 11.6%. Except ampicillin, penicillin and vancomycin, all of the MRS strains were more resistant to other antibiotics than methicillin-sensitive Staphylococcus (MSS), and 66.9% of MRS were with multidrug resistance. Three subtypes of SCCmec gene were identified, including 20 SCCmec II strains (15.75%), 97 SCCmec III strains (76.38%) and 10 SCCmec IV strains (7.87%). MRS, carrying SCCmec II or III gene, were with multidrug resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, low resistance to rifampicin and high sensitivity to vancomycin. 76 strains of MRS, carrying SCCmec III gene, were with multidrug resistance, and were with higher drug resistance than MRS strains carrying SCCmec II or IV gene. Conclusion In this district, most clinical strains of MRS were positive with SCCmec III gene, and with obviously multidrug resistance to different antibiotics.

**Key words:** methicillin; staphylococcus; drug resistance; SCCmec

耐甲氧西林葡萄球菌 (methicillin-resistant staphylococcus, MRS) 是医院获得性感染和社区感染的最常见病原菌之一,常可引起败血症、呼吸道、泌尿道、皮肤及软组织的感染。自从 1961 年英国首次报道耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA) 后<sup>[1]</sup>, MRS 感染也逐渐引起人们的关注,这十年来,尤其是 MRSA 的感染亦呈日益增加的趋势,这给临床抗感染治疗及医院感染的防控均带来了莫大的困难。葡萄球菌耐甲氧西林的机制主要是由于细菌获得外源性 mecA 基因,主要定位于葡萄球菌染色体 mec 基因盒 (staphylococcal cassette chromosomemec, SCCmec) 上,该基因盒为一可移动的基因序列,由 mec 和 ccr 基因复合体组成,片段大小为 21 bp 到 67 bp 不等,目前 SCCmec 已发现有 I~VIII 型,可作为载体在葡萄球菌菌株之间水平传播,同时它还可以通过整合子 ccr 整合 mec 基因以外的其他耐药基因,因此 MRS 菌株常表现为多重耐药<sup>[2]</sup>。本文通过对深圳东部地

区临床 MRS 菌株进行分型检测,从而了解该地区 MRS 主要耐药机制,为 MRS 的流行病学调查和临床治疗提供理论依据,并为制定该地区 MRSA 感染的防控措施提供参考。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源及鉴定** 收集 2009 年 8 月至 2010 年 7 月临床葡萄球菌分离株共 1 093 例,其中龙岗区人民医院 782 例,坪山新区人民医院 105 例,大鹏人民医院 46 例,龙岗中心医院 160 例。所有菌株均经法国生物梅里埃微生物分析仪鉴定到种。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、43300 标准菌株,均购自中国药品生物制品所。

**1.2 主要试剂和仪器** 生物梅里埃公司青霉素结合蛋白 2a (Penicillin Binding Protein 2a, PBP2a) 检测试剂盒、VITEK 32 微生物分析仪及配套的 GP 鉴定板和 GPS 药敏板、北京天根生化科技有限公司细菌 DNA 提取试剂盒及 PCR MasterMix 试剂盒、美国 ABI 7300 PCR 扩增仪、DYY. IOC 型凝胶电泳

\* 基金项目:深圳市科技局立项(深科信函 200903239)。

仪等。

### 1.3 方法

**1.3.1 头孢西丁表型筛查** 参照 2009 年临床实验室标准化委员会(CLSI)标准,采用头孢西丁琼脂稀释法对 MRS 进行表型筛查,具体操作如下:用 MH 琼脂粉和头孢西丁粉剂制成含 4 μg/mL 头孢西丁的药敏平板,吸取 5 μL 0.5 个麦氏单位的菌悬液点种在含头孢西丁的药敏平板上,35℃培养 16~20 h,有菌生长即为甲氧西林耐药,反之则敏感。金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、43300 分别作为 MRS 的阴、阳性对照菌。

**1.3.2 PBP2a 表型确证** 对表型初筛阳性的菌株再进行 PBP2a 表型确证,严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.3.3 SCCmec 基因分型** 依据 SCCmec 基因盒结构选择特征型基因(I 型:mecA+ccrA1+IS1272; II 型:mecA+mecI+ccrA2; III 型:mecA+mecI+ccrA3; IV 型:mecA+ccrA2+IS1272)进行引物设计,引物序列见表 1,由上海生物工程公司合成。根据试剂盒说明书提取 PBP2a 表型确证阳性菌株的 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系 25 μL,热循环参数为:94℃预变性 5 min,94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 45 s,循环 30 次,72℃延伸 10 min,扩增产物作 2 g/L 琼脂糖凝胶电泳并在凝胶电泳紫外成像仪下观察记录结果。

表 1 目的基因引物序列及产物长度

目的基因	序列	产物长度(bp)
MecA	P1:5'-GCAATCGCTAAAGAACTAAG -3'	224
	P2:5'-AATGGGACCAACATAACCTA -3'	
MecI	P1:5'-CATTCAGGCTTTCGTTA -3'	614
	P2:5'-ATGGATGGTTGGTAGGTTAT -3'	
CCRA1	P1:5'-GTCAGCTTGGCCGAAGTACAATC -3'	717
	P2:5'-CAGCTGCTCGTGATTGAGTGTAAG -3'	
CCRA2	P1:5'-ATAGCGACAAACAATCAGGAC -3'	795
	P2:5'-AATCAGACAAAGCGAGAAG -3'	
CCRA3	P1:5'-AACGAGCCATTGGTTATTTGC -3'	617
	P2:5'-CTGATAAGGCTTGCGGGTAAT -3'	
IS1272	P1:5'-GGATTCTAAAGCCCTCTACCA -3'	536
	P2:5'-TTGATTCATACCATAACCTGC -3'	

**1.4 药物敏感试验** 用 VITEK 32 微生物分析仪 GPS 药敏板对所有葡萄球菌进行药敏检测,药敏结果严格按照 CLSI 标准进行判读。

**1.5 统计学处理** 统计学数据采用 SPSS13.0 统计学分析软件包进行处理,检验方法采用四格表资料  $\chi^2$  检验,检验水准取  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

**2.1 菌株来源** 深圳东部地区 4 家医院共收集葡萄球菌临床分离株 1 093 例,其中金黄色葡萄球菌 743 例,占 68.0%,凝固酶阴性葡萄球菌 350 例,占 32.0%,包括表皮葡萄球菌 197 例,溶血葡萄球菌 68 例,腐生葡萄球菌 52 例,其他 33 例。

**2.2 MRS 表型初筛及确认** 1 093 例葡萄球菌临床分离株中有 127 例为头孢西丁初筛阳性的菌株,并且这 127 例菌株经 PBP2a 胶乳凝集实验均证实为 MRS,MRS 检出率为 11.6%,其中,有 107 例 MRS 为 MRSA,MRSA 检出率为 9.8%,占 MRS 的 84.3%。

**2.3 SCCmec 基因分型** 127 例 MRS 菌株中有 20 例为 SCCmec II 型,占 15.75%,97 例为 SCCmec III 型,占 76.38%,10 例为 SCCmec IV 型,占 7.87%,未检出 SCCmec I 型。107 例 MR-

SA 菌株中 SCCmec II 型有 10 例,III 型 96 例,IV 型 1 例,耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)所携带的 SCCmec 基因以 II、IV 型为主,各有 10 例和 9 例,III 型仅有 1 例。

**2.4 药敏试验** 根据 MRS 基因检测结果,将葡萄球菌药敏结果分为 MRS 和 MSS,二者之间的比较见表 2。由表 2 可知,MRS 和 MSS 对氨苄西林、青霉素、万古霉素 3 种抗生素耐药性无明显差异,但是二者对其余 7 种抗生素的耐药性均具有明显差异,MRS 的耐药率均明显高于 MSS,而且在 127 例 MRS 中有 85 例为多重耐药菌株,占 66.9%。根据 SCCmec 基因分型结果将 MRS 分成 3 种基因亚型,携带这 3 种基因亚型的 MRS 对各抗生素的耐药性见表 3。由表 3 可知,3 种基因型菌株对青霉素、氨苄西林、苯唑西林和头孢唑啉等  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药率均很高,对利福平等抗生素耐药率较低,对万古霉素完全敏感。III 型 MRS 菌株有 76 例表现为多重耐药,耐药率明显高于 II、IV 型 MRS 菌株。

表 2 MRS 与 MSS 药敏结果比较

抗菌药物	MRS		MSS		P 值
	耐药数	耐药率(%)	耐药数	耐药率(%)	
氨苄西林	127	100	524	54.2	>0.05
苯唑西林	127	100	0	0	<0.05
青霉素	127	100	839	86.9	>0.05
头孢唑啉	121	100	51	5.3	<0.05
红霉素	115	90.1	21	2.2	<0.05
四环素	85	66.9	0	0	<0.05
庆大霉素	79	62.2	36	3.7	<0.05
左氧氟沙星	79	62.2	0	0	<0.05
利福平	32	25.2	0	0	<0.05
万古霉素	0	0	0	0	>0.05
多重耐药	85	66.9	0	0	<0.05

表 3 不同 SCCmec 基因型的耐药株数

抗菌药物	II 型(20 株)	III 型(97 株)	IV 型(10 株)
氨苄西林	20	97	10
苯唑西林	20	97	10
青霉素	20	97	10
头孢唑啉	15	97	9
红霉素	10	97	8
四环素	9	76	0
庆大霉素	8	71	0
左氧氟沙星	8	71	0
利福平	3	29	0
万古霉素	0	0	0
多重耐药	9	76	0

## 3 讨 论

葡萄球菌属是医院感染和社区感染的主要病原菌,尤其是金黄色葡萄球菌,据美国疾控中心报道,由金黄色葡萄球菌引起的食物中毒占第二位,仅次于大肠埃希菌,金黄色葡萄球菌占有所有医院获得性肺炎的 15%~35%<sup>[3]</sup>。根据国外的报道,近几年,MRSA 检出率从 1994~2001 年间的 33%上升到 65%<sup>[4]</sup>。2005 年协和、瑞金等 7 家医院的 MRSA 检出率为 56.1%~93.2%,平均 69.5%<sup>[5]</sup>。而本研究发现在深圳东部地区 MRS 检出率为 14.4%,明显低于上述报道,这可能与地区差异性及标本来源不同有关,而不同医院抗生素使用情况不同,也可能成为 MRSA 检出率差异的原因之一<sup>[6]</sup>。MRS 是葡

萄球菌获得甲氧西林抗性决定子——*mecA* 基因后产生的一种高耐药性菌株。目前通过对 SCC*mec* 基因分型的结果研究还发现, SCC*mec* 基因分型与 MRS 的流行背景有关, 不同地区 SCC*mec* 可能不同, 不同遗传背景的克隆株携带的 SCC*mec* 也可能不同, 对 SCC*mec* 进行基因分型可以追踪传染源, 具有流行病学意义<sup>[7]</sup>。来自医院内感染的 MRS 主要基因型别为 I、II、III 型, 很少为 IV 型, 其耐药特点是对多种抗菌药物耐药, 而来自社区感染的 MRS 菌株基因型别为 IV 型, 耐药特点是对非  $\beta$ -内酰胺类抗生素敏感, 提示 SCC*mec* 基因分型在区分医院内和社区感染的 MRS 亦有着重要的意义。本研究表明, 深圳东部地区 SCC*mec* 以 II、III 型为主, 主要来自于 MRSA, IV 型则主要来自于 MRCNS。就耐药性而言, 携带 SCC*mec* 基因的菌株对青霉素、氨苄西林、苯唑西林和头孢唑啉等  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药率均很高, 对利福平等抗生素耐药率较低, 对万古霉素完全敏感, 特别是 SCC*mec* III 型菌株除对利福平和万古霉素敏感外, 耐药率均在 80% 以上, 而且 III 型 MRS 菌株有 76 例表现为多重耐药, 耐药率明显高于 II、IV 型 MRS 菌株。研究表明<sup>[8]</sup> SCC*mec* 基因型与耐药谱有着密切的关系, SCC*mec* II 型和 SCC*mec* III 型由于基因序列长, 内含有耐药基因的质粒或转座子, 多呈多重耐药性, 而 SCC*mec* IV 基因盒较短, 除了携带 *mecA* 基因外几乎不带其他耐药基因, 常不表现为多重耐药, 除了对青霉素类及头孢菌素类耐药外, 对其他抗生素则较为敏感。本实验没有发现 I 型菌株, 可能与 I 型菌株为早期发现菌株, 流行时间长, 流行趋势可能被 II、III 菌株取代有关<sup>[9]</sup>。

参考文献

[1] Soge OO, Meschke JS, No DB, et al. Characterization of methicil-

lin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. Isolated from US West Coast public marine beaches[J]. J Antimicro Chemother, 2009, 64(6): 1148-1155.

[2] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(3): 531-540.

[3] DeRyke CA, Lodise TP, Rybak MJ, et al. Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Nosocomial Bacteremic *Staphylococcus aureus* Pneumonia[J]. Chest, 2005, 128(12): 1414-1422.

[4] Vandecasteele SJ, Boelaert JR, De Vriese AS. *Staphylococcus aureus* infections in hemodialysis; What a nephrologist should know[J]. Clin J Amer Socie Nephrol, 2009, 4(8): 1388-1400

[5] 张保华, 付光林, 余桂香, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 131-133.

[6] 郭素芳, 张勇, 孟峻. 356 株金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 269-269.

[7] 李因, 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 SCC*mec* 基因的分型研究[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(1): 32-35.

[8] 邵冬华, 徐国宾. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCC*mec* 分型方法的比较[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(9): 1633-1636.

[9] 孙光明, 马筱玲, 戴媛媛. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCC*mec* 基因分型研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(5): 287-290.

(收稿日期: 2011-10-09)

(上接第 264 页)

这 2 项值均会维持在一个不正常的水平, 而临床医生一般不会有特殊的紧急处理措施。因此笔者认为肌酐、肌钙蛋白 I 在第一次危急值报告后的再次或多次危急值检测报告, 有别于第一次出现危急值的紧急状态, 很大程度上只具有警告值的意义。例如, 本院 2011 年 8 月的危急值分析, 该月内科危急值报告 77 例次, 其中有 1 名尿毒症患者肌酐危急值报告 14 次, 完全符合危急值的报告范围, 但临床病历上未体现有针对危急值报告的处置措施。很多慢性疾病患者的检测结果虽然在危急值范围, 但其生命仍在平稳状态或无奈状态, 临床医生不考虑采取紧急抢救措施。

Hortin 和 Csako<sup>[6]</sup> 撰文指出, 他们并不认同美国临床病理学家协会 (ASCP) 实用参数委员会颁布的《危急值使用参数指南》, 认为在很多情况下, 发出的“critical value”或“panic value”的报告并不真实, 并不代表患者处在危急的生命阈值状况, 尤其是分析前和分析中的标本错误, 导致分析错误而不得不重新留取患者标本重新分析。“panic”使用不当, 容易导致患者和家属的不安和担忧, 作者认为启用“alert value”更恰当。Dighe 等<sup>[7]</sup> 在 2008 年调查了美国医疗机构反馈的 731 份问卷表明, 在过去 30 年中应用“panic”的医院只有 14.2%, 应用“critical”或“critical test result”的医院占 78.1%。笔者认为当第 1 次检测结果达到危急值的界限时应用“critical”, 而其后出现的危急值用“alert”较为合适。

虽然, 本院的危急值报告制度和危急值界限表是参考

2004 年 Kots 危急值表, 结合 CAP 和 JCAHO 的指南以及国内的报道, 与临床科室共同商讨制定, 但在回顾和分析 2010 年 9 月至 2011 年 8 月危急值的临床应用情况时, 发现有个别危急值项目在设定中仍有不完善之处, 例如: 肌酐、肌钙蛋白 I 等非监测性的指标, 存在持续改进的必要。

参考文献

[1] Lundberg GD. When to panic over abnormal value [J]. MLO Med Lab Obs, 1972, 4(1): 47-54.

[2] Anand SD, Arjun R, Amanda BC, et al. Analysis of laboratory critical value reporting at a large academic medical center [J]. Am J Clin Pathol, 2006, 125(5): 758-764.

[3] 杨大千, 郭希超, 徐根云, 等. 危急值项目的数据挖掘分析 [J]. 浙江检验医学, 2007, 5(3): 37-40.

[4] Boone DJ. Governmental perspectives on evaluating laboratory performance [J]. Clin Chem, 1993, 39(7): 1461-1467.

[5] Kots GJ. Critical limits for urgent clinician notification at US medical centers [J]. JAMA, 1990, 263(5): 704-707.

[6] Hortin GL, Csako GY. Critical Values, Panic values or alert values [J]. Am J Clin Pathol, 1998, 109(4): 496-497.

[7] Dighe AS, Jones JB, Parham S, et al. Survey of critical value reporting and reduction of false-positive critical value results [J]. Arch Pathol Lab Med, 2008, 132(10): 1666-1671.

(收稿日期: 2011-07-09)