

· 论 著 ·

# 深圳东部地区耐甲氧西林葡萄球菌 SCCmec 基因型分析<sup>\*</sup>

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<sup>\*</sup>

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 chromosome 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 ~ III 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

<sup>\*</sup> 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'-AATGGGACCAACATAAACCTA -3'	
MecI	P1:5'-CATTCAGGCTTTCGTTA -3'	614
	P2:5'-ATGGATGGTTGGTAGGTAT -3'	
CCRA1	P1:5'-GTCAGCTTGCCGAACTAGAACATC -3'	717
	P2:5'-CAGCTGCTCGTATTGAGTGTAG -3'	
CCRA2	P1:5'-ATAGCGACAAACAATCAGGAC -3'	795
	P2:5'-AATCACAGACAAAGCGAGAAG -3'	
CCRA3	P1:5'-AACGAGGCCATTGGTTATTGTC -3'	617
	P2:5'-CTGATAAGGCTTGCGGGTAAT -3'	
IS1272	P1:5'-GGATTCTAAAGCCCTCTACCA -3'	536
	P2:5'-TTGATTCACTACCATAACCTGC -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β-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基因型的耐药珠数

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中毒占第二位,仅次于大肠埃希菌,金黄色葡萄球菌占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

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 SCCmec 基因分型的研究还发现,SCCmec 基因分型与 MRS 的流行背景有关,不同地区 SCCmec 可能不同,不同遗传背景的克隆株携带的 SCCmec 也可能不同,对 SCCmec 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 β-内酰胺类抗生素敏感,提示 SCCmec 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 SCCmec 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 SCCmec 基因的菌株对青霉素、氨苄西林、苯唑西林和头孢唑啉等 β-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 SCCmec 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> SCCmec 基因型与耐药谱有着密切的关系,SCCmec II 型和 SCCmec 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 SCCmec 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-

(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。

Horten 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

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 SCCmec 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 SCCmec 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 SCCmec 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)

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)