

• 论 著 •

临床分离耐甲氧西林表皮葡萄球菌 SCCmec 型别多样性分析

杨永长, 陈 亮, 肖代雯, 喻 华, 刘 华, 黄文芳[△]
(四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 成都 610072)

摘 要:目的 探讨临床分离耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE)SCCmec 型别。方法 收集临床分离并经全自动微生物鉴定系统准确鉴定的表皮葡萄球菌 84 株,通过 PCR 扩增 esp 和 mecA 基因准确鉴定 MRSE,采用多重 PCR 对 MRSE SCCmec 进行分型,分析其分布特点。结果 PCR 扩增结果显示,84 株临床分离表皮葡萄球菌均可扩增出 esp 基因, mecA 检出率为 76.19%(64/84),其中血液、痰液、尿液和伤口分泌物 MRSE 检出率分别为 76.8%、68.8%、100.0%和 71.4%。多重 PCR 扩增结果显示,64 株 MRSE 中,SCCmec 单一型别为 22 株,其中 SCCmec I 型 19 株、SCCmec III 型 3 株;SCCmec 混合型为 42 株,其中 I、II 混合型 2 株, I、III 混合型 14 株, I、II、III 混合型 12 株, II、III 混合型 5 株, III、IV 混合型 9 株。结论 临床分离的 MRSE SCCmec 型别存在明显的多样性,以混合 SCCmec 型别为主。

关键词:耐甲氧西林表皮葡萄球菌; SCCmec 型别; MRSE; 多样性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.026 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)16-2273-03

Diversity of SCCmec type diversity in clinically isolated methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis

YANG Yongchang, CHEN Liang, XIAO Daiwen, YU Hua, LIU Hua, HUANG Wenfang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: **Objective** To investigate the SCCmec types of clinically isolated methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis (MRSE). **Methods** Eighty-four strains of clinically isolated Staphylococcus epidermidis identified by the fully automatic microbiological identification system were collected and performed the MRSE identification by PCR for amplifying esp and mecA genes and SCCmec typing. Its distribution characteristics were analyzed. **Results** Esp gene was amplified in 84 strains and the detection rate of mecA was 76.19% (64/84), in which the MRSE detection rates in blood, sputum, urine and wound secretion were 76.8%, 68.8%, 100% and 71.4% respectively. The multiple PCR amplification displayed that among 64 strains of MRSE, 19 strains were SCCmec simple type, in which 19 strains were SCCmec type I and 3 strains were SCCmec type III; 42 strains were SCCmec mixed type, in which 2 strains were SCCmec mixed type I and II, 14 strains were SCCmec mixed type I and III, 12 strains were SCCmec mixed type I, II and III, 5 strains were SCCmec mixed type II and III, a strains were and SCCmec mixed type III and IV. **Conclusion** The SCCmec type in clinically isolated MRSE shows obvious diversity and its majority is SCCmec mixed type.

Key words: methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis; SCCmec type; MRSE; diversity

近年来,随着抗菌药物的广泛使用,耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE)的检出率越来越高,已成为全世界医院感染的重要病原菌^[1]。我国一项细菌耐药监测结果显示,82.9%的临床分离表皮葡萄球菌对甲氧西林耐药^[2]。携带 mecA 基因是甲氧西林耐药的主要机制,该基因位于新型的可移动元件 SCCmec 基因盒上,目前已发现多种 SCCmec 基因型,其中 SCCmec I、II、III 型为医院获得性,SCCmec IV、V 型为社区获得性。研究发现,凝固酶阴性的甲氧西林耐药葡萄球菌中 SCCmec 型别具有明显的多样性^[3-5],可能同时含有 1~3 种 SCCmec 型别,以及其他新的 SCCmec 类型^[6-8]。本文通过多重 PCR 检测临床分离 MRSE 的 SCCmec 型别,进一步分析 SCCmec 型别的特点,为深入探讨 MRSE 的分子特征奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 84 株表皮葡萄球菌为 2012 年 3 月至 2013 年 3 月本院门诊及住院患者分离的无重复菌株,所有菌株采用全自动微生物鉴定系统鉴定,其中血液分离 56 株,痰液分离 16 株,中段尿液分离 5 株,伤口分泌物分离 7 株。

1.2 仪器与试剂 PCR 反应试剂、100 bp DNA Ladder 购自北京康为世纪,PCR 扩增仪购自美国 Bio-Rad 公司,高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司,电泳仪购自美国 Savant 公司,凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。esp、mecA 和 SCCmec 分型的引物由上海英俊公司合成。

1.3 检测方法

1.3.1 细菌收集与 DNA 提取 复苏低温保存的表皮葡萄球菌,接种至血平板,37℃ 5% CO₂ 培养 24 h,收集细菌,按文献[9]提取表皮葡萄球菌 DNA。

1.3.2 PCR 扩增 esp 基因 按照文献[10]的方法扩增 esp 基因,根据凝胶电泳结果判断临床分离菌株是否为表皮葡萄球菌。

1.3.3 PCR 扩增 mecA 基因 按照文献[10]的方法扩增 mecA 基因,依据凝胶电泳结果区分 MRSE 和甲氧西林敏感表皮葡萄球菌(MSSE)。

1.3.4 多重 PCR 对 MRSE SCCmec 分型 按照文献[11]合成引物,采用多重 PCR 扩增 MRSE 菌株 SCCmec 基因盒上 8

个位点确定其型别。

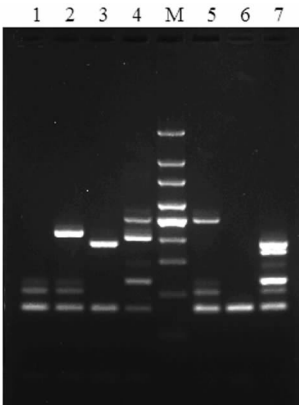
1.4 统计学处理 采用 Excel2007 软件进行数据处理及统计学分析。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 esp 基因鉴定表皮葡萄球菌 PCR 扩增结果显示,所有临床分离菌株均可扩增出 244 bp 的 esp 基因片段,表明这些菌株都是表皮葡萄球菌。

2.2 PCR 扩增 mecA 基因区分 MSSE 和 MRSE 临床分离的 84 株表皮葡萄球菌中, mecA 扩增阳性 64 株(76.19%), mecA 阴性 20 株,其中血液、痰液、尿液和伤口分泌物 MRSE 检出率分别为 76.8%、68.8%、100.0%和 71.4%,提示不同来源分离的表皮葡萄球菌均以 MRSE 为主。

2.3 临床分离 MRSE SCCmec 分型结果 多重 PCR 扩增结果显示, 64 株 MRSE 中, SCCmec 单一型别为 22 株(34.38%),其中 SCCmec I 型 19 株(29.69%),SCCmec III 型 3 株(4.69%)。SCCmec 混合型为 42 株(65.62%),其中 I、II 混合型 2 株(3.13%), I、III 混合型 14 株(21.88%), I、II、III 混合型 12 株(18.75%), II、III 混合型 5 株(7.81%), III、IV 混合型 9 株(14.06%)。部分菌株的多重 PCR 凝胶电泳结果见图 1。



注:泳道 1~7 为临床分离 MRSE SCCmec;M 为 100 bp DNA Ladder。

图 1 多重 PCR 检测 MRSE SCCmec 的电泳结果

3 讨 论

SCCmec 是葡萄球菌属所特有的一种遗传结构,至今未发现在其他菌种含有该元件,它主要由 mec 基因复合体、盒式染色体重组酶基因(ccr)和无功能 J 区组成,根据 mec 和 ccr 可将 SCCmec 分为 SCCmec I、II、III、IV 和 V。目前,MRSA 的 SCCmec 分型研究比较成熟,而耐甲氧西林的凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)中 SCCmec 的研究则相对较少,且所携带的 SCCmec 也相对比较复杂,研究中不断发现新的型别和亚型。因此,研究 SCCmec 型别对了解 MRCNS 的分子特征具有重要意义。

由于地域和抗菌药物使用习惯的不同,各国流行的 MRCNS 菌株存在一定的差异,美国主要以 SCCmec IV 型 MRSE 为主^[12],而巴西医源性 MRCNS 主要携带 SCCmec I、III 型^[13]。芬兰一家医疗单位分离出的 61 例 MRCNS 中,49 例(80%)为 MRSE,SCCmec 类型分布具有多样性:20 例(33%)IV 型,11 例(18%)V 型,4 例(6%)I 型,3 例(4%)II 型,还有 23 例(38%)是新类型^[14]。国内有关 MRCNS 研究显示 SCCmec 型别也具

有明显的多样性^[5]。本研究应用 Oliveira 法对 64 株 MRSE 的 SCCmec 分型显示,SCCmec I 型占 29.69%,SCCmec III 型占 4.69%,SCCmec 混合型占 65.62%(包括 3.13%的 I、II 混合型,21.88%的 I、III 混合型,18.75%的 I、II、III 混合型,7.81%的 II、III 混合型,14.06%的 III、IV 混合型),大量混合型 SCCmec 菌株的出现反映了 MRSE 中 SCCmec 型别的多样性。

目前世界各地不断有新的 SCCmec 基因型被报道。爱尔兰学者发现在 MRSA 中存在 SCCmec I -pls 型(不含 pls)、SCCmec III -pI258/Tn554 型(不含 pI258/Tn554)和 SCCmec IV -dcs 型(无 dcs 区)等变异体^[15]。我国学者在海南省分离的 MRSA 中检测出包括缺少 dcs 区的 I 型、缺少 dcs 区但包含 mec I 区的 I 型等 7 种 SCCmec 新型别^[16]。本文研究结果显示 MRSE 中混合型 SCCmec 占绝大多数,笔者推测可能是由于 SCCmec 基因变异率高,自身不断地发生突变、插入、缺失或重组,使某些菌株不能用现有方法进行分型。

本研究利用多重 PCR 发现,临床分离的 MRSE SCCmec 具有明显的多样性,主要以混合型 SCCmec 为主,为进一步了解 MRSE 的分子特征奠定了基础。

参考文献

[1] Raad I, Hanna H, Maki D. Intravascular catheter-related infections; advances in diagnosis, prevention, and management[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(10): 645-657.

[2] Xiao YH, Wang J, Li Y. Bacterial resistance surveillance in China: a report from Mohnarín 2004-2005[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008, 27(8): 697-708.

[3] Vitali LA, Petrelli D, Lamikanra A, et al. Diversity of antibiotic resistance genes and staphylococcal cassette chromosome mec elements in faecal isolates of coagulase-negative staphylococci from Nigeria[J]. BMC Microbiol, 2014, 14(11): 106-109.

[4] Rolo J, de Lencastre H, Miragaia M. Strategies of adaptation of Staphylococcus epidermidis to hospital and community: amplification and diversification of SCCmec[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(6): 1333-1341.

[5] Zong Z, Peng C, Lü X. Diversity of SCCmec elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20191.

[6] Qi W, Ender M, O'Brien F, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Zurich, Switzerland(2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users[J]. J Chin Microbiol, 2005, 43(10): 5164-5170.

[7] Bispo PJ, Hofling-Lima AL, Pignatari AC. Characterization of ocular methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis isolates belonging predominantly to clonal complex 2 subcluster II[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(5): 1412-1417.

[8] Lebeaux D, Barbier F, Angebault C, et al. Evolution of nasal carriage of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a remote population[J]. (下转第 2277 页)

量减少基质效应影响。用于 AMR 验证的物质必须覆盖低、中、高各浓度,至少需要 4 个以上验证品,验证过程应形成文件^[9-11]。

当开始应用一种新方法时,就有必要对该方法进行 AMR 验证,如果某种方法是全点定标(3 点以上),则之后无需再进行 AMR 验证,但如果是一点或者两点定标,则此后至少每 6 个月应再验证一次^[1]。当不可获得 CAP 或其他权威机构验证标本时,实验室可使用患者新鲜血清混合样品进行 AMR 验证,如上文所述,所使用验证品不同时验证过程也不尽相同。

每个实验室都应规定可接受的质量指标,对于 CAP 标本 AMR 验证的可接受偏倚,参照 CAP 能力验证线性评估的允许偏倚,本室采用 $1/2 \times$ 美国临床实验室改进修正法案规定的允许总误差。对于患者新鲜血清混合样品 AMR 验证的可接受质量指标,可参照行业标准或相关文献设定^[12]。

本研究中 CAP 验证品以及患者新鲜血清混合验证品测量值与靶值(或预期值)间无明显差异,具有较好的相关性,且偏倚范围、差异都在可接受范围内。这反映厂家说明书标示的血清肌酐在 Roche Cobas 501 生化分析仪上的分析测量范围验证通过,厂家说明书标示的 AMR 本实验室可以采用。

参考文献

[1] 邱方,张世忠,冯涛. COBAS E601 电化学发光检测系统测定 β -HCG 的分析测量范围和临床可报告范围的验证[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(5): 384-385.

[2] 魏昊,从玉隆,中国实验室国家认可委员会技术委员会医学分委会. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 59-75.

[3] Department of Health, Human Services, Centers for Medicare & Medicaid Services. Clinical laboratory improve-

ment amendments of 1988: final rule[S]. Fed Register, 2003: 3704-3710.

[4] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.

[5] 李林海,李莹,石玉玲,等. 罗氏 Cobas c501 检测系统尿素分析测量范围的验证及评价[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(4): 568-570.

[6] 毕波,吕元. 定量检测系统的方法学性能验证实验结果的评价[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(12): 1332-1335.

[7] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods. Proposed guideline(second edition): EP6-P2 [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002: 1-55.

[8] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 138-162.

[9] 朱薇,王丽娜,王静,等. 同型半胱氨酸检测试剂与厂家声明的一致性验证[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 41-42.

[10] 兰克涛,陈娟,赵白云,等. 两种方法检测血清糖类抗原 125 性能验证与临床应用评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(19): 4365-4367.

[11] 李熙建,王鹏,邓述琴,等. 自建检测系统与目标检测系统检测结果一致性的方法探讨[J]. 检验医学, 2008, 23(6): 655-659.

[12] 李林海,李莹,石玉玲,等. 罗氏 Cobas c501 检测系统总胆红素分析测量范围的验证及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 491-492.

(收稿日期: 2016-04-01 修回日期: 2016-06-18)

(上接第 2274 页)

Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(1): 315-323.

[9] 杨永长,陈亮,肖代雯,等. SCCmec 相关的 psm-mec 在血液来源人葡萄球菌中的分布[J]. 成都医学院学报, 2014, 9(3): 266-270.

[10] 杨永长,陈亮,肖代雯,等. SCCmec 相关 psm-mec 在临床分离表皮葡萄球菌中的分布和特征分析[J]. 四川医学, 2015, 36(4): 484-487.

[11] 陈亮,杨永长,肖代雯,等. SCCmec 相关的 psm-mec 在血液来源人葡萄球菌中的基因定位[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(1): 27-29.

[12] Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, et al. Related clones containing SCCmec type IV Predominate among clinically significant Staphylococcus epidermidis isolates [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(11): 3574-3579.

[13] Mombach PM, Reiter KC, Paiva RM, et al. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types

I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil [J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt10): 1328-1333.

[14] Ibrahim S, Salmenlinna S, Virolainen A, et al. Carriage of methicillin-resistant staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(1): 32-37.

[15] Shore A, Rossney AS, Keane CT, et al. Seven novel variants of staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Ireland [J]. Antimicrob Agents Chem, 2005, 49(5): 2070-2083.

[16] 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.

(收稿日期: 2016-01-24 收稿日期: 2016-03-29)