

论著 · 临床研究

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析及 SCCmec 分型*

邹玉涵¹, 刘庆中², 张 骥¹, 周凌琴³, 陈 超¹, 闫佩毅¹, 金 姝^{1△}

(1. 上海市普陀区人民医院检验科, 上海 200060; 2. 上海交通大学附属第一人民医院检验科, 上海 201620; 3. 上海市普陀区中医医院检验科, 上海 200062)

摘要:**目的** 了解上海市普陀区人民医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)耐药情况及 SCCmec 型别, 为预测耐药菌株的发展趋势、为临床预防和治疗 MRSA 感染提供理论依据。**方法** 收集该院 2012 年 1 月至 2016 年 12 月临床分离的 MRSA 共 380 株, 采用微量肉汤稀释法进行体外药敏试验, 采用多重聚合酶链反应检测 SCCmec 型别。**结果** 所有菌株对利奈唑胺、万古霉素均敏感, 敏感率为 100.0%; 对利福平、复方磺胺甲噁唑耐药率较低, 分别为 5.0% 和 7.6%; 对红霉素、左氧氟沙星、四环素高度耐药, 耐药率分别是 100.0%、94.2%、93.4% 和 90.0%; 对青霉素耐药率为 100.0%。380 株 MRSA 有 SCCmec II 型 281 株(73.9%), SCCmec III 型 59 株(15.5%), SCCmec IVa 型 5 株(1.3%), 另有 35 株(9.2%) 未能分型。**结论** 上海市普陀区人民医院分离的 MRSA 标本以 SCCmec II 型为主, 具有多重耐药的特征, 不同 SCCmec 型别的耐药谱有所差异。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 耐药性; SCCmec 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.010 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2018)02-0159-04 **文献标识码:**A

Drug resistance analysis and Staphylococcal cassette chromosome SCCmec genotypes of methicillin resistant Staphylococcus aureus*

ZOU Yuhuan¹, LIU Qingzhong², ZHANG Ji¹, ZHOU Lingqin³, CHEN Chao¹, YANG Peiyi¹, JIN Shu^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Putuo District People's Hospital, Shanghai 200060, China;

2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated People's Hospital,

Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201620, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Putuo District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

Abstract:**Objective** To investigate the drug resistance situation and Staphylococcal cassette chromosome mec(SCCmec) genotypes of methicillin resistant Staphylococcus aureus(MRSA) strains isolated from Shanghai Putuo District People's Hospital in order to provide a theoretical basis for predicting the trend of drug resistant bacterial strains and clinical treatment and prevention of MRSA. **Methods** Three hundreds and eighty clinically isolated MRSA strains in this hospital were collected from January 2012 to December 2016. The in vitro drug susceptibility test was performed by adopting the broth microdilution method. The SCCmec genotypes were examined by adopting the multiplex polymerase chain reaction. **Results** All strains were sensitive to linezolid and vancomycin, the sensitivity rate was 100.0%; the resistance rates to rifampicin and cotrimoxazole were lower, which were 5.0% and 7.6% respectively; but the strains were highly resistant to erythromycin, levofloxacin and tetracycline, with the resistance rate of 100.0%, 94.2%, 93.4% and 90.0%. The resistance rate to penicillin was 100.0%. Among 380 strains of MRSA, there were 281 strains(73.9%) of SCCmec II, 59 strains(15.5%) of SCCmec III and 5 strains(1.3%) of SCCmec IVa, other 35 strains(9.2%) of MRSA could not be classified. **Conclusion** MRSA strains isolated in the Shanghai Putuo District People's Hospital are mainly the type SCCmec II, which has the multi-drug resistant characteristics, and the drug resistance spectrum of different SCCmec genotypes is different.

Key words: methicillin resistant Staphylococcus aureus; drug resistance; SCCmec gene

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)自 20 世纪 60 年代被发现以来, 逐渐成为医院感染流行的主要病

* 基金项目: 普陀区卫生系统自主创新科研资助项目(普 KW15101)。

作者简介: 邹玉涵, 女, 主管技师, 主要从事病原微生物耐药机制的研究。 △ 通信作者, E-mail: jinshushu@sina.com。

本文引用格式: 邹玉涵, 刘庆中, 张骥, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析及 SCCmec 分型[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2):

原菌。因其多重耐药、易暴发流行、治疗困难和病死率高等特点,MRSA 感染已成为威胁全球公共卫生安全的严重问题^[1]。甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)通过水平转移获得了移动遗传元件导致了 MRSA 的出现,该元件存在于葡萄球菌盒式染色体 SCCmec 中^[2]。携带多种耐药基因 SCCmec 转移造成遗传信息的交换,耐药基因在不同菌属间的传递,从而使得 MRSA 临床治疗更加困难。本研究对 2012-2016 年上海市普陀区人民医院临床分离的 MRSA 进行耐药性分析和 SCCmec 分型,为预测耐药菌株的发展趋势,预防其爆发流行提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 收集上海市普陀区人民医院 2012 年 1 月至 2016 年 12 月门诊及住院部分离的 380 株 MRSA 标本,剔除重复菌株,同一患者只取第 1 次分离株。ATCC25923 作为质控标准菌。

1.2 仪器与试剂 VITEK-32 全自动微生物鉴定及药物敏感试验分析系统(法国 Bio-Mérieux 公司)、Universal 16R 台式冷冻离心机(德国 HETTICH 公司)、聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国 Bio Red 公司)、凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)等。MH 琼脂购自上海伊华医学科技有限公司,药敏纸片购自 Oxiod 公司,Taq DNA 聚合酶、dNTPs 试剂购自 Thermo 公司蛋白酶 K、溶葡萄球菌酶购自上海生物工程有限公司,PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。引物序列见参考文献[3]。

1.3 方法

1.3.1 标本接种 一般细菌标本接种血平板,痰液标本经涂片平均每个低倍(10×)显微镜视野鳞状上皮细胞数小于 10 个作为合格标本,考虑为致病菌。

1.3.2 菌株鉴定 菌株分离鉴定按照临床检验操作规程进行。应用头孢西丁纸片法筛选 MRSA,PCR 扩增 mecA 基因确认 MRSA。

1.3.3 药敏实验 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)2016 M100 S26 要求,采用微量肉汤稀释法检测 MRSA 对抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)。抗菌药物包括青霉素、红霉素、左氧氟沙星、四环素、庆大霉素、克林霉素、利福平、复方磺胺甲噁唑、万古霉素和利奈唑胺。D 试验测定红霉素对克林霉素的诱导耐药表型。

1.3.4 总 DNA 模板提取及基因检测 挑取若干血平板上纯培养的金黄色葡萄球菌单菌落,混悬于 90 μL 的 TE 裂解缓冲液(pH=8.0)中,加溶葡萄酶(1 mg/mL)10 μL,蛋白酶 K (20 mg/mL)10 μL,56 ℃ 水浴 30 min,100 ℃ 煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 10 min;取上清液即为 PCR 扩增模板,-70 ℃ 保存备用。mecA 基因检测和 SCCmec 分型按参考文献[3]方法进行操作。

1.4 统计学处理 用 SPSS19.0 软件进行统计学分

析,采用 χ^2 检验和确切概率法进行统计分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株分布特征 所有检出 MRSA 患者中男性 244 例(64.2%),女性 136 例(35.8%),MRSA 感染者的平均年龄为(78±15)岁,患者年龄中位数为 83 岁。标本主要来源于痰液和咽拭,分别占 62.1%(236/380)和 18.2%(69/380);MRSA 的科室分布前 5 位为重症监护室(ICU)、呼吸内科、神经外科、老年内科和消化内科,分别占总数的 22.9%(87/380)、19.7%(75/380)、14.7%(56/380)、11.8%(45/380)和 8.9%(34/380)。

2.2 药敏试验结果 380 株 MRSA 对青霉素耐药率为 100.0%,对红霉素、四环素、左氧氟沙星的耐药率均在 90.0%以上,对庆大霉素的耐药率为 79.0%,克林霉素的耐药率为 74.7%,利福平的耐药率为 7.6%,对复方磺胺甲噁唑耐药率为 5.0%,无利奈唑胺、万古霉素耐药菌株。D 试验测定诱导耐药表型结筛选结果显示,358 株红霉素耐药金黄色葡萄球菌中有 25 株为红霉素耐药而克林霉素敏感,其中 22 株为 D 试验阳性,为诱导性耐药。见表 1。

表 1 380 株 MRSA 抗菌药物药敏实验					
抗菌药物	耐药 (%)	中介 (%)	敏感 (%)	MIC50 (mg/L)	MIC90 (mg/L)
青霉素	100.0	0.0	0.0	>8	>8
红霉素	94.2	0.5	5.3	>4	>4
左氧氟沙星	93.4	0.0	6.6	>4	>4
四环素	90.0	0.0	10.0	>8	>8
庆大霉素	79.0	0.2	20.8	>8	>8
克林霉素	74.7	4.5	20.8	>4	>4
利福平	7.6	1.3	91.1	≤1	≤1
复方磺胺甲噁唑	5.0	0.0	95.0	≤0.5/9.5	≤2/38
利奈唑胺	0.0	0.0	100.0	1	2
万古霉素	0.0	0.0	100.0	1	2

除万古霉素和利奈唑胺无耐药外,其余各类抗菌药物均有耐药菌株,将抗菌药物分成 8 类抗菌药物类别,分别为 I β-内酰胺类(青霉素)、II 大环内酯类(红霉素)、III 喹诺酮类(左氧氟沙星)、IV 四环素类(四环素)、V 氨基糖苷类(庆大霉素)、VI 林克酰胺类(克林霉素)、VII 安沙霉素类(利福平)、VIII 磺胺类(复方磺胺甲噁唑)。380 株 MRSA 表现出 10 种不同耐药模式。95.8%(364/380)的菌株为多重耐药株(对 3 类或 3 类以上抗菌药物同时耐药),以红霉素、左氧氟沙星、四环素、庆大霉素、克林霉素同时耐药最常见,占 59.5%(226/380);其次为红霉素、左氧氟沙星、四环素、庆大霉素同时耐药,占 13.9%(53/380),见表 2。

2.3 SCCmec 分型及 mecA 基因检测 380 株 MR-

SA 中, *mecA* 检出率为 100.0%。SCC*mec* 型别分布情况是 II 型占 73.9% (281/380), III 型占 15.5% (59/380), IV a 型占 1.3% (5/380), 未能分型占 9.2% (35/380)。PCR 产物电泳结果见图 1。

表 2 MRSA 的耐药模式

耐药模式	耐药谱	分离株数(<i>n</i>)	分离率(%)
1	I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII	1	0.3
2	I、II、III、IV、V、VI、VII	14	3.7
3	I、II、III、IV、V、VI	226	59.5
4	I、II、III、IV、V	53	13.9
5	I、II、III、IV	41	10.8
6	I、II、III	23	6.1
7	I、III、IV、V、VII	3	0.8
8	I、III、IV、VII	3	0.8
9	I、III	9	2.4
10	I	7	1.8

2.4 不同 SCC*mec* 型别菌株的耐药性 SCC*mec* II、

表 3 不同 SCC*mec* 型别对抗菌药物的耐药结果

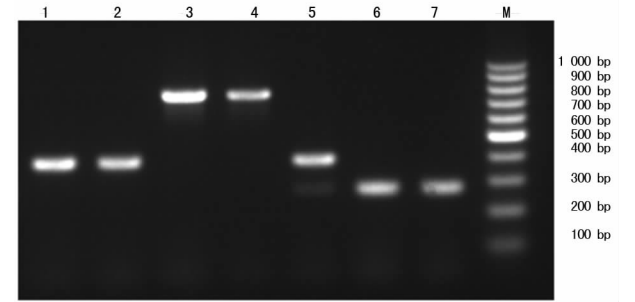
抗菌药物	SCC <i>mec</i> II (<i>n</i> =281)		SCC <i>mec</i> III (<i>n</i> =59)		SCC <i>mec</i> IV a (<i>n</i> =5)		未定型 (<i>n</i> =35)	
	<i>n</i>	耐药 (%)	<i>n</i>	耐药 (%)	<i>n</i>	耐药 (%)	<i>n</i>	耐药 (%)
青霉素	281	100.0	59	100.0	5	100.0	35	100.0
红霉素	281	100.0	49	83.1	3	60.0	25	74.0
左氧氟沙星	281	100.0	52	88.1	1	20.0	21	60.0
四环素	276	98.2	48	81.4	1	20.0	17	48.6
庆大霉素	244	86.8	42	71.2	0	0.0	14	40.0
克林霉素	234	83.6	31	52.5	2	40.0	17	48.6
利福平	6	2.1	22	37.3	0	0.0	1	2.9
复方磺胺甲噁唑	7	2.5	12	20.3	0	0.0	0	0.0

3 讨 论

本院 MRSA 主要来自于 ICU, 所占比例为 22.9%, 分析原因可能是大部分 ICU 的患者住院时间较长, 辗转科室较多, 且治疗期间有侵入性操作, 增大了交叉感染概率, 其次呼吸内科、神经外科的 MRSA 分离率也较高, 应引起重视。MRSA 标本类型以痰液、咽拭子为主, 与国内报道相一致^[4-5], 这与呼吸道为葡萄球菌属的主要定植部位有关。

MRSA 耐药是因为 *mecA* 基因编码的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)对 β-内酰胺类抗菌药物亲和力低, 使得该类抗菌药物无法作用于 MRSA。抗菌药物敏感性试验显示本院 MRSA 菌株耐药性广泛, 不仅对 β-内酰胺类抗菌药物耐药, 对四环素类、大环内酯类、喹诺酮类等常用抗菌药物普遍耐药(耐药率均在 90% 以上)。这与本院抗菌药物使用情况有关, 临床对于怀疑革兰阳性细菌感染的患者, 常将喹诺酮类、大环内酯类抗菌药物作为治疗首选药物, 因此造成 MRSA 对该类抗菌药物出现较高的耐药率。除糖肽类药物

III 型菌株均存在多重耐药的现象, 对青霉素完全耐药, 对左氧氟沙星、红霉素、克林霉素、利福平、复方磺胺甲噁唑等呈多重耐药。SCC*mec* IV a 型(5 株)除对青霉素均耐药外, 对庆大霉素、利福平、复方磺胺甲噁唑均敏感, 见表 3。其中红霉素、左氧氟沙星、四环素、克林霉素耐药率在 SCC*mec* II、SCC*mec* III 和 SCC*mec* IV a 型中比较差异有统计学意义($P<0.05$)。



注: M 为 100 bp DNA 标志物; 1、2、5 为 SCC*mec* II 型; 3、4 为 SCC*mec* IV a 型; 6、7 为 SCC*mec* III 型

图 1 SCC*mec* 分型电泳结果

(万古霉素)和利奈唑胺外, MRSA 菌株仅对复方磺胺甲噁唑和利福平呈现比较低的耐药率, 分别为 5.0% 和 7.6%, 可作为治疗 MRSA 感染的选择性用药。虽然万古霉素及利奈唑胺等一直是治疗 MRSA 感染的有效药物, 然而近年来, 世界范围内也有报道出现对其耐药的菌株。1997 年, 日本相继报道首例万古霉素中介及异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌, 2002 年美国发现万古霉素耐药金黄色葡萄球菌。本研究尚未发现对万古霉素、利奈唑胺耐药的菌株, 但随着地区间交流广泛, 耐药性的传播是无法避免的, 因此应密切关注 MRSA 对于这些抗菌药物的耐药变化趋势。SCC*mec* 是一个可移动的复合体结构, 大小 21~67 kb, 由 *mec* 基因复合体、*ccr* 基因复合体及 J 区三部分构成。*mecA* 基因位于 *mec* 基因复合体上, J 区则整合了其他耐药基因。SCC*mec* 可以从细菌染色中自发剔除, 也可从一个细菌转移重组至另一个细菌中。SCC*mec* 的基因型与 MRSA 流行背景有关, 是区分医院获得性感染和社区获得性感染的一个重要指

标,医院获得性 MRSA,常常为 SCCmec I、II 或 III 型,不同的是社区获得性 MRSA 携带的是 IV 或 V 型 SCCmec^[6-7]。本研究 SCCmec 分型结果以 II 型为主占 73.9%,III 型占 15.5%,IV a 型标本仅有 5 例占 1.3%。证明本院临床分离的标本大部分属于医院获得性 MRSA,极少数是社区获得性 MRSA。查阅这 5 例标本相关资料,均来自于住院患者,不排除 5 例患者是在社区感染后再转至医院病房治疗,即这 5 例标本属于社区获得性 MRSA。一项对中国 6 大城市 9 所综合教学医院 309 株 MRSA 临床标本的分型研究表明,中国大陆 MRSA 感染以 SCCmec III 型为主,占 57.5%;其次是 II 型,占 22.0%^[8]。国内有研究报道分离自成人或儿童的 MRSA 菌株以 III 型为主^[9-11]。本院 SCCmec 分型结果与上述报道存在差异,可能是 MRSA 地理分布不同所致。朱砚萍等^[12]对上海华东医院老年病房的 57 株 MRSA 分型研究显示,SCCmec II 型占 53.0%,SCCmec III 型占 26.3%,SCCmec IV 型占 3.0%,与本研究结果基本相符,但本院分离株 SCCmec II 型所占比例更高。分析原因,可能由于标本类型较集中(主要来自于痰液)及标本来源单一(老年患者占绝大多数)导致检测到的是单一或同源性较高流行克隆株。另外本研究中有 35 株(9.2%)MRSA 是 SCCmec 未定型菌株,一方面可能与实验条件有关;另一方面医院环境加速了 SCCmec 多样性的出现,可能会导致新的 SCCmec 型别开始流行,但目前尚未能被检测到。因此如何及时地、有效地监测到这些新型 SCCmec,进而控制 MRSA 菌株的流行,对 MRSA 感染的预防至关重要。

参考文献

[1] SCHMITZ G R. How do you treat an abscess in the era of increased community associated methicillin resistant

(上接第 158 页)

[10] 章武战,章国东,陈俊华.胃蛋白酶原 I、II 测定在胃癌早期诊断中的研究[J].中国卫生检验杂志,2014,24(12):1718-1719.

[11] 谷倬宇,李思源,李军,等. MMP-14 和 COX-2 蛋白在胃癌侵袭转移过程中的表达和关系[J].世界华人消化杂志,2014,22(16):2300-2305.

[12] QIU Z Q, QIU Z R. Sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapy drugs in elderly patients and its correlation with cyclooxygenase-2 expression[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2015,16(8):3447-3450.

[13] 张金锋.血清胃蛋白酶原及肿瘤标志物对胃癌的诊断价值[J].中国卫生检验杂志,2014,24(15):2229-2231.

[14] 马冬,杨冬阳,罗少燕,等. COX-2 和 ERCC1 在胃癌中的表达及其临床意义[J].实用医学杂志,2014,30(16):

Staphylococcus aureus(MRSA)[J]. Emerg Med,2011,41(3):276-281.

[2] PHILIPPE R, VANDENSECH F. Staphylococcus aureus:A pathogen with still unresolved issues[J]. Infect Gene Evol,2014,21(1):510-514.

[3] 赵焕强,邹玉涵,金姝,等. tst 和 pvl 基因阳性金黄色葡萄球菌流行情况及分子特征[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(3):353-358.

[4] 贺文强,陈宏斌,赵春江,等. 2010—2011 年中国 10 个主要城市金黄色葡萄球菌分子流行病学研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(4):247-251.

[5] 袁挺,应春妹.成人和儿童金黄色葡萄球菌感染分子流行病学研究[J].检验医学,2015,30(11):1119-1124.

[6] 王斌,史友权,司怡然,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌流行病学特征的研究进展[J].大连医科大学学报,2013,35(2):183-187.

[7] 刘颖超.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌可移动基因元件 SCCmec 的研究进展[J].国际儿科学杂志,2010,37(6):651-654.

[8] 程航.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌临床分离株的分子分型及耐药性[D].重庆:第三军医大学,2013.

[9] 孙丽媛,武昕媛,李钰,等. ICU 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型及耐药性研究[J].中国抗生素杂志,2015,40(10):766-769.

[10] 吴霞,王传清,严秀峰,等.儿童耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染临床及分子学特征研究[J].中华儿科杂志,2013,51(7):512-517.

[11] 王蕾,李武平,刘冰,等. 62 株临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 SCCmec 基因分型及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):769-770.

[12] 朱砚萍,瞿介明,朱惠莉,等.老年病房耐甲氧西林金黄色葡萄球菌葡萄球菌染色体 mec 基因盒基因型和杀白细胞素基因的检测及特点[J].上海医学,2013,36(1):10-14.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-28)

2585-2587.

[15] 罗兴利.血清 PG I,PG II 和 PGR 值对胃癌的诊断价值[J].中国卫生检验杂志,2014,24(20):2951-2953.

[16] ZHAO F, ZHU H, HUANG M, et al. The 765G>C polymorphism in the cyclooxygenase-2 gene and gastric cancer risk;an update by meta-analysis[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2014,15(6):2863-2868.

[17] 谢津璧,万坚,张慧,等.血清胃蛋白酶原在胃癌及胃溃疡筛查中的临床意义[J].世界华人消化杂志,2014,22(31):4820-4824.

[18] 黄喜顺,邓立新,邱耀辉,等.血清 PG、G-17 联合 CA72-4 和¹³C UBT 在早期胃癌的诊断价值[J].重庆医学,2017,46(10):1346-1348.

(收稿日期:2017-07-10 修回日期:2017-09-24)