

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的两种新 *SCCmec* 型别及其抗药性研究

欧阳范献^{1,2}, 胡永华¹, 黄惠琴¹, 卜平凤², 鲍时翔^{1*}

(¹ 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 热带作物技术国家重点实验室 海口 571101)

(² 海南省农垦总局医院 海口 570311)

摘要:为探明本地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的耐药性、流行病学分布状况及携带的葡萄球菌染色体 *mec* 盒(*SCCmec*)型别,用 K-B 琼脂扩散法、E-test 和多位点 PCR,对临床分离的金黄色葡萄球菌菌株进行了 *SCCmec* 分型及耐药性测定。结果发现了两种新的 *SCCmec* 型别,新 1 型含 II 型的 *mecA* 上游特异性位点 B 和位于 *mecA* 内的 M 位点以及 III 型的下游位点 F,缺乏 II 型上游位点 C 和下游位点 D、G;新 2 型含 I、II 型的上游特异性位点 A、B 和两个 III 型的下游位点 F、H,同样缺乏位点 C、D、G,可能分别为原有 II 型和 I、II 型与 III 型的基因重组株;且携带有新 *SCCmec* 型别的 MRSA 菌株,其流行病学分布特点及抗药性也与国外已报导的菌株不同,多来自门诊病人,且耐药性高,抗药谱广,值得引起高度重视和关注。

关键词:甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),葡萄球菌染色体 *mec* 盒(*SCCmec*);多位点 PCR;分型

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)06-0890-05

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)可引起皮肤、粘膜、深部组织感染及菌血症、脓毒血症、中毒性休克等多种疾病。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA),是金黄色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,它于 1961 年首次在英国报导,现已在世界各地广为流行,并成为医院和社区获得性感染的主要病原菌。由于它耐药谱广,耐药强度高,给临床治疗带来了很大困难,也因此受到了广泛关注和重视,有关它的耐药机理、携带的耐药基因及基因传递、播散机制,现已成为全世界多学科竞相研究的热点。

在研究中发现,所有 MRSA 均有一特征性结构,它位于染色体复制起始点附近、大小在不同菌株间存在较大差异,从约 20kb 到 70kb 不等,可自主从染色体上切除,切除后形成的环状体,以适当方式转移到其它葡萄球菌菌株后,可再次重组到受体菌染色体中,使受体菌获得抗药性。测序分析发现,此特征性结构由保守和可变区域构成,*mecA* 及其调控基因是其保守结构之一,因其结构内的基因相互关联,常以整体形式在菌株间传递,因而将其命名为葡萄球菌染色体 *mec* 盒(staphylococcal chromosome cassette

mec *SCCmec*);又因它是耐药性基因插入、堆积部位,几乎所有耐药基因均位于此处,因此,也有人将其称为金黄色葡萄球菌的耐药岛(Resistance Island, RI)^[1-3]。

SCCmec 可自发切除、重组的特性和耐药岛功能,使它成为了耐药基因传递的运载工具,也是耐药谱不断扩大的根本原因;不同 MRSA 菌株的 *SCCmec* 结构、分型,以及型别与菌株的耐药性、耐药谱、流行性的关系国外已有报道^[2-4],至今为止,共发现了 5 种主要型别和 13 种亚型^[5,6,9,11]。

SCCmec 分型,不尽是区分医院和社区获得性感染的重要指标,而且可以探讨 MRSA 与其它菌株间的遗传进化联系和耐药基因携带状况,是分子流行病学和耐药机理研究的一种重要手段^[6,10]。

对地区性 MRSA 进行 *SCCmec* 分型,不但可以探明该地区流行株的 *SCCmec* 型别、分布及其耐药基因携带现状,为预测耐药菌株的发展趋势、治疗 MRSA 感染病例、预防其暴发流行提供对策和依据;而且可以与其它地区或国家的流行株进行对比分析,探讨其遗传进化关系,同时还可今后的新药开发寻找突破口、为耐药机理研究奠定科学基础。

基于 PCR 的 *SCCmec* 分型方法,现有鉴定 *mecA*

基金项目 海南省自然科学基金资助(30013)

* 通讯作者。Tel 86-898-66890695, Fax 86-898-66890978, E-mail bxqhhq@yahoo.com.cn

作者简介 欧阳范献(1964-)男,湖南省新化县人,副主任技师,博士研究生,研究方向为细菌耐药基因。E-mail hmkoyfx@yahoo.com.cn

其他作者 陈允凤²

收稿日期 2006-01-12,接受日期 2006-02-10,修回日期 2006-05-08

操纵子和 *ccr* 基因型别的简单分型法^[5]和多位点 PCR 分型法^[6],后者是近年新开发的具有很强分型能力的技术。

有关 MRSA 的 SCCmec 分型及多态性研究在国内还未见报导,为了探明海口地区 SCCmec 多态性,本研究采用多位点 PCR 分型法,首次对海口地区 MRSA 携带的 SCCmec 进行了分型测定,结果发现了两种新的 SCCmec 型别。本文就其结构特点、在海口地

区的分布和对常用抗生素的耐药性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源及其临床资料:2001年7月~2004年4月,从海南省农垦总局医院临床标本中分离,经常规鉴定并确证为 MRSA 菌株,共9株,其相关的临床资料见表1。

表1 菌株的临床资料

Table 1 The clinical data of bacteria isolated in this study

Serial sample No.	Detect date	Ward	Type of sample	Type of SCCmec
3724	31-Jul-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New1
4791	05-Mar-2002	D. of out-patient service	leucorhea	New1
5694	31-Jul-2002	D. of out-patient service	prostate liquid	New1
5714	20-Sep-2002	Dep. of geriatrics	sputum	New1
7366	07-Oct-2003	D. of out-patient service	prostate liquid	New1
M-liu	14-Apr-2004	D. of out-patient service	prostate liquid	New1
3584	17-Jul-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New2
3964	07-Sep-2001	neuromedicine	urine	New2
5071	27-Apr-2002	D. of out-patient service	Semen liquid	New2

1.1.2 主要试剂和仪器:青霉素结合蛋白 2a (Penicillin Binding Protein 2a, PBP2a)检测试剂盒, K-B 琼脂扩散法药敏测定试纸为 Oxid 公司产品, E-test MIC 测定卡为 Sweden AB BIODISK 公司产品;多位点 PCR 测定试剂和仪器为 Sangon 公司产品;蛋白酶 K, RNase 溶液为 Amresco 分装; *Taq* DNA 聚合酶,华美生物工程公司产品;100bp DNA Marker, 宝生物工程公司产品;PCR 扩增仪(Tpersonal), Biometra Co. Ltd. 凝胶成像系统(GelDoc-It Imaging station)美国 UVP 公司产品。

1.2 MRSA 的筛选及确证方法

收集的金黄色葡萄球菌菌株,按文献[8]的方法统一进行 MRSA 筛选,用 PBP2a 检测试剂盒检测 PBP2a,确证 MRSA,实验时用金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作 MRSA 的阴性对照菌。

1.3 耐药性及最低抑菌浓度测定

采用 NCCLS 推荐的 K-B 琼脂扩散法测定待测菌对 EM、DC、AK、VA、CL、CI、OX 的耐药性;用 E-test MIC 测定卡测定待测菌对上述药物的 MIC,操作及结果判断依说明书及 NCCLS 标准进行。

1.4 细菌培养及 DNA 提取

细菌培养采用过夜旋转培养法, DNA 提取采用溶菌素消化加碱提取法,详细操作过程参见文献[8]。

1.5 多位点 PCR 测定

位点和位点引物设计参照文献[6],引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。各位点的位置、意义及扩增产物大小见表2。

多位点 PCR 反应条件:94℃ 4min;94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 1min, 30个循环, 72℃ 4min。

扩增产物在凝胶成像系统中扫描记录结果。

表2 多位点 PCR 所选取的扩增位点位置、意义及其扩增产物大小

Table 2 The position, meaning of loci used in the multiplex PCR and the amplicon size

Locus	Position	Meaning	Amplicon size/bp
A	Locate at downside of <i>pls</i> , upstream of <i>mecA</i>	Specific locus of type-I	495
B	Locate at upside of <i>kdp</i> , upstream of <i>mecA</i>	Specific locus of type-II	284
C	Locate in <i>mec I</i> , upstream of <i>mecA</i>	Shared by type-II and III	209
D	Locate in the <i>dcs</i> , downstream of <i>mecA</i>	Shared by type-I, II, IV	342
E	Locate between pI258 and Tn554, downstream of <i>mecA</i>	Specific locus of type-III	243
F	Locate between Tn554 and right-joint of SCCmec, downstream of <i>mecA</i>	Specific locus of type-III	414
G	Locate at the joint of IS431 <i>mec</i> with pUB110, downstream of <i>mecA</i>	Shared by type-I A and II, indicator of pUB110	381
H	Locate at the joint of IS431 <i>mec</i> with pT181, downstream of <i>mecA</i>	Distinctive locus between type-III and III A, indicator of pT181	303
M	Locate in the <i>mecA</i>	Positive control	162

pls: Plasmin-sensitive protien gene; *kdp*: Potassium dependent operon; *dcs*: down constant sequence.

2 结果

2.1 新 SCCmec 型别的多位点 PCR 表型及与已有型别的比较

新 I 型的多位点 PCR 表型特点为:含 II 型上游位点 B, 阳性对照位点 M, 但缺乏 II 型的上游位点 C

和下游位点 D、G, 却多了一个 III 型的下游位点 F。新 2 型为, 含 I、II 型上游位点 A、B, 阳性对照位点 M, 同样缺乏 II 型的上游位点 C 和 I、II 型的共同下游位点 D、I A 与 II 型的共同下游位点 G, 却多了两个 III 型的下游位点 F、H。新型与已有型别的表型比较见表 3, 新型的电泳图谱见图 1。

表 3 各型、亚型的 SCCmec 多位点 PCR 扩增表型

Table 3 The PCR phenotype of SCCmec types and subtypes

SCCmec types	Size of bands(locus)	PCR phenotypes and speciality
I	495(A), 342(D), 162(M)	
I A	495(A), 381(G), 342(D), 162(M)	I + pUB110 + IS431
II	381(G), 342(D), 284(B), 209(C), 162(M)	
II A	381(G), 342(D), 209(C), 162(M)	II - <i>kdp</i> , IS1182 be inserted in <i>mec I</i>
II B	381(G), 342(D), 209(C), 162(M)	II - <i>kdp</i> , in L-C region lack Tn554
II C	381(G), 342(D), 162(M)	II - <i>kdp</i> , <i>mec I</i> contain class A.3 <i>mec</i>
II D	342(D), 209(C), 162(M)	II - <i>kdp</i> , pUB110
II E	342(D), 162(M)	II - <i>kdp</i> , <i>mec I</i> , pUB110
III	414(F), 303(H), 243(E), 209(C), 162(M)	
III A	414(F), 243(E), 209(C), 162(M)	III - pT181
III B	209(C), 162(M)	III - pT181, p1258/Tn256, Tn254/attR
IV A	342(D), 162(M)	distinguished by L-C region length, IV A > IV B
IV B	342(D), 162(M)	
IV C	162(M)	distinguished by sequencing L-C and M-R region
IV E	162(M)	
IV F	162(M)	
V	162(M)	contain <i>ccrC</i> and <i>hsdM</i> , <i>hdsJ</i> , <i>hdsR</i> in L-C region
New1	414(F), 284(B), 162(M)	Lack D locus of II and contain F locus of III
New2	495(A), 414(F), 303(H), 284(B), 162(M)	Contain A locus of I, B locus of II and F, H loci of III

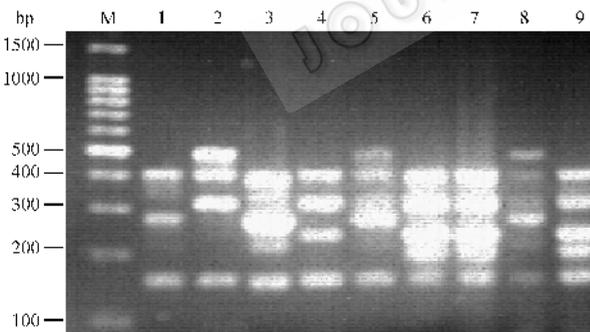


图 1 两种新的 SCCmec 型别多位点 PCR 产物电泳图谱

Fig.1 The electrophoresis graph of 2 kinds of new SCCmec-types. M, 100bp DNA ladder; 1, 3, type-new1; 4, 6, 7, 9, type-III; 5, 8, type-new2.

图 1 中第 1 (标本编号为 M-liu) 3 (5714) 泳道是本次研究发现的新的 I 型 SCCmec 的多位点 PCR 扩增产物电泳图谱, 从上往下依次为 414bp (F), 284bp (B) 和 162bp (M) 3 条泳带; 第 5 (3964), 8 (3584) 泳道为新 2 型的电泳图谱, 依次含有 495bp (A), 414bp (F), 303bp (H), 284bp (B) 和 162bp (M) 5 条泳带, 两者均与以往报导的多位点 PCR 表型图谱^[6,9,11]有明显区别。

2.2 携带有两种新 SCCmec 型别 MRSA 菌株对抗生素的耐药性

携带有两种新的 SCCmec 型别的 MRSA 菌株对临床常用的几种抗生素的耐药性(表 4)。

3 讨论

位点 A 位于 *pls* 基因下段, 是 *pls* 的指示基因, 为 I 型特异性基因; B 位于 *kdp* 基因上段, 为 *kdp* 存在标志, 是 II 型特异性基因; C 位于 *mec I* 基因起始处, II、III 型均有; M 位于 *mec A* 基因内, 是 *mec A* 存在的标志, 也是试验的阳性对照位点; 位点 A、B、C 均在 *mec A* 上游。

位点 D 位于 SCCmec 的左结合点与 IS431 *mec* 间的下游恒定片段(*dcs*)内, 是 I、II、IV 型的共有位点; E 位于质粒 p1258 与转座子 Tn554 之间, 是 III 型的特异性位点; F 位于转座子 Tn554 与 SCCmec 右结合点之间的 ϕ_{ccr} 内, 是 III 型的特异性位点; G 位于 II 型的 IS431 *mec* 与质粒 pUB110 交界处, 是 pUB110 的指示位点, 为 I A、II 型共有, 也是区分 I 与 I A 的标志; H 位于 III 型的 IS431 *mec* 与质粒 pT181 交界

表 4 携带新型 SCCmec 的菌株对临床常用抗生素的耐药性及其最低抑菌浓度(MIC)

Table 4 The resistance of MRSA strains carrying new SCCmec type to routine-used antibiotics and their MIC

Serial No.	Type of SCCmec	Susceptibility							Minimum inhibiting concentration(MIC)						
		OX	VA	DC	AK	EM	CL	CI	OX	VA	DC	AK	EM	CL	CI
3724	New1	R	S	R	S	R	S	R	64	2	3	64	>256	2	>32
4791	New1	R	S	R	S	S	S	R	32	2	3	8	0.064	1.5	>32
5694	New1	R	S	R	R	R	S	R	>256	2	4	>256	128	1.5	>32
5714	New1	R	S	S	S	R	R	R	64	1.5	0.25	16	>256	64	>32
7366	New1	R	S	S	R	R	S	I	>256	3	0.25	128	>256	3	2
M-liu	New1	R	S	S	R	R	S	R	128	2	0.125	>256	>256	0.75	>32
3584	New2	R	S	R	R	R	R	R	32	1.5	4	64	128	64	>32
3964	New2	R	S	R	R	S	S	S	16	2	4	32	0.25	3	0.25
5071	New2	R	S	R	S	S	S	S	16	2	3	0.25	0.125	3	1

OX-Oxacillin, VA-Vancomycin, DC-Doxyeyclin, AK-Amikacin, EM-Erythromycin, CL-Chloramphenicol, CI-Ciprofloxacin.

处是 pT181 的指示位点,也是区分 III A 与 III 型的标志,它们均位于 mecA 的上游^[6]。

新 1 型 SCCmec 含 II 型特异性位点 B 和内对照位点 M,缺乏 C 位点,说明它虽含 II 型的上游片段,但其 mec I 的前部或缺失,如是部分缺失,则携带的 mec 操纵子类型是 A.3 或 A.4^[9];如为全缺失,则 mec 操纵子类型不是 A 型;然而,此型有 F 位点,说明其下游片段来自 III 型,II 型和 III 型的 mec 操纵子均为 A 型^[9],因此,其 mec 操纵子类型只可能是 A.3 或 A.4 型,由此推测新 1 型可能是 II 型与 III 型的重组型,可算是 II 型的一个新亚型。

此型菌株的抗药性特点是对 AK、EM、CI 的耐药性较大,可能在 mecA 基因的下游含有相应的耐药基因。

新 2 型 SCCmec 含 I、II 型特异性位点 A、B,同样缺乏位点 C,说明其上游片段来自 I、II 型,且其 mec I 的前部或缺失,因此, mec 操纵子类型有可能是上述的 A.3 或 A.4 型,也可能是 I 型拥有的 B 型;此型还有 F 和 H 位点,两者均是 III 型的下游特异性位点,说明其下游片段来自 III 型,因此,新 2 型 SCCmec 可能是 I、II、III 型的重组型,应该视为一种新型。

新 2 型拥有 H 位点,说明它含有 pT181 质粒, pT181 携带有四环素耐药基因,应表现出对四环素类抗生素耐药^[16],从表 4 可见,所有 3 株新 2 型菌株均对多西四环素耐药。

国外流行病学调查及 SCCmec 分型研究显示,社区、门诊病人中分离的 MRSA 多携带 IV 型 SCCmec,且耐药性不高;而 I、II、III 型多由住院病人中的 MRSA 菌株携带,耐药性也较高。从表 1 和表 4 也可以看出,携带新的 SCCmec 型别的 MRSA 菌株多来自门诊病人的泌尿生殖道标本,且耐药性高

和耐药谱也较广,说明本地区医院外环境存在的 MRSA 菌株,也携带了较多的抗药基因,其抗药谱也已相当普遍。这与本地金黄色葡萄球菌的流行病学及抗药性分析资料相符^[7],必须引起卫生行政部门及医疗部门的高度重视。

参 考 文 献

[1] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44**(6):1549-1555.

[2] Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2001, **45**(5):1323-1336.

[3] 欧阳范献, 鲍时翔. mec 复合体和 SCCmec 盒与 MRSA 耐药性的研究进展. *中国感染控制杂志*, 2004, **3**(4):375-377.

[4] Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in *Staphylococci*: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, **46**(1):1-20.

[5] Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**(11):4289-4294.

[6] Oliveire DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec Elements in methicillin-resistant *S. aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2002, **46**(7):2155-2161.

[7] 欧阳范献, 陈允凤, 卜平凤, 等. 近四年海口地区耐药金黄色葡萄球菌检测及其流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 2005, **26**(10):827.

[8] 欧阳范献, 黄惠琴, 胡永华, 等. 葡萄球菌染色体 mec 盒多位点 PCR 分型测定. *中华医院感染学杂志*, 2006, **17**(11):472-478.

[9] Anna S, Angela SR, Conor TK. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2005, **49**(5):2070-2083.

- [10] Ito T, Okuna K, Ma XX *et al.* Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance Updates* 2003, 6: 41 – 52.
- [11] Ito T, Ma XX, Fumihiko T, *et al.* Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 2004, 48(7): 2637 – 2651.

Two kinds of new SCC*mec* type in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and their susceptibility to the antibiotics

OUYANG Fan-xian^{1,2}, HU Yong-hua¹, HUANG Hui-qin¹, BU Ping-feng², BAO Shi-xiang^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

(² Nongken Chief Board Hospital of Hainan Province, Haikou 571101, China)

Abstract : In order to explore the resistance, epidemical distribution and the staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) types of Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in the area of Haikou, the resistance and SCC*mec* type of MRSA isolated from clinical sample has been tested using the K-B Agar diffuse, E-test and multiplex PCR strategy, resulting that two kinds of new SCC*mec* types were found in them. Type-new1 possess three loci of B, M, F. Locus M, which locate in *mecA*, is the indicator of *mecA*, and also used as the positive control. Locus B, which locate in upstream of *mecA*, is specific for type-II and F, which locate in downstream of *mecA*, is specific for type-III; and so, type-new1 was combined from the type-II and -III. Type-new2 possess five loci of A, B, M, F, H. Locus A, which is locate in upstream of *mecA*, is specific for type-I and H, which is locate in downstream of *mecA*, is also specific for type-III; and so, type-new2 was combined from the type-I, -II and -III.

The strains carrying new SCC*mec* types are different from that carrying old SCC*mec* types in the epidemical distribution and resistance to the antibiotics. They can be usually isolated from the out-patients and have high level and wider range of resistance to antibiotics. It must be paid more attention to them.

Keywords : Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA); Staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*); Multiplex PCR; Typing