

· 论著 ·

甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 基因分型及耐药现状研究

姚明 关立锋 吴银生 贾伟 王琳琳 李刚 吴学军 孙涛



【摘要】 目的 研究烧伤病房分离的甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)的葡萄球菌盒式染色体 mec (SCCmec) 基因分型及耐药现状。 **方法** 2012 年 9 月—2013 年 9 月,从笔者单位烧伤整形科 ICU 及普通病房送检的患者创面分泌物、血液及痰液标本中,检出非重复金黄色葡萄球菌 179 株 (ICU 来源 68 株、普通病房来源 111 株)。采用头孢西丁 K-B 纸片扩散法检测金黄色葡萄球菌 MRSA 表型,对 ICU 和普通病房中 MRSA 检出率进行比较。采用 PCR 法对 MRSA 进行 SCCmec 分型,经检测甲氧西林耐药决定子 mecA 基因对前述 MRSA 鉴定结果进行验证。采用 K-B 纸片扩散法检测 MRSA 与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA) 对 23 种临床常用抗菌药物的耐药情况。除去 MRSA 对其耐药率为 100.0% 或 0 的抗菌药物,将 SCCmec III 型 MRSA 与非 SCCmec III 型 MRSA 对剩余抗菌药物的耐药率进行比较。对数据进行 Pearson χ^2 检验或校正 χ^2 检验。 **结果** 179 株金黄色葡萄球菌中 148 株鉴定为 MRSA 占 82.7%,其中 ICU 来源 62 株、普通病房来源 86 株;其余 31 株为 MSSA 占 17.3%。ICU 中 MRSA 在该病区内检出金黄色葡萄球菌中所占百分比为 91.2% (62/68),显著高于普通病房中的 77.5% (86/111), $\chi^2 = 5.526, P = 0.019$ 。PCR 检测显示 148 株 MRSA 均携带 mecA 基因,其中 106 株为 SCCmec III 型阳性占 71.6%;ICU 与普通病房中 SCCmec III 型 MRSA 占各自病区内检出 MRSA 的百分比分别为 72.6% (45/62) 和 70.9% (61/86),差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.048, P = 0.826$)。148 株 MRSA 对青霉素及头孢类抗生素共 8 种抗菌药物 100.0% 耐药,对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、替加环素、呋喃妥因及奎奴普汀/达福普汀的耐药率均为 0。除 2 种菌对其耐药率为 0 的 6 种抗菌药物外,MRSA 对剩余 17 种抗菌药物的耐药率均显著高于 MSSA (χ^2 值为 4.091 ~ 138.546, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。106 株 SCCmec III 型 MRSA 对左氧氟沙星、环丙沙星、利福平、四环素、红霉素、林可霉素、庆大霉素、克林霉素的耐药率分别为 56.6% (60/106)、85.8% (91/106)、89.6% (95/106)、86.8% (92/106)、84.9% (90/106)、78.3% (83/106)、92.5% (98/106)、74.5% (79/106),均显著高于 42 株非 SCCmec III 型 MRSA 的 33.3% (14/42)、61.9% (26/42)、71.4% (30/42)、66.7% (28/42)、69.0% (29/42)、57.1% (24/42)、71.4% (30/42)、52.4% (22/42), χ^2 值为 4.801 ~ 11.377, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。 **结论** 笔者单位烧伤病房的 MRSA 检出率高且耐药现状十分严峻,流行情况以 SCCmec III 型为主,未见对糖肽类抗生素耐药情况。

【关键词】 烧伤; 抗甲氧西林金黄色葡萄球菌; 抗药性; 葡萄球菌盒式染色体 mec 基因分型

Genotyping and drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Yao Ming, Guan Lifeng, Wu Yinsheng, Jia Wei, Wang Linlin, Li Gang, Wu Xuejun, Sun Tao. Department of Burns and Plastic Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China
Corresponding author: Guan Lifeng, Email: guansunny1010@163.com, Tel: 13895179460

【Abstract】 Objective To investigate the genotype of staphylococcal chromosomal cassette mec (SCCmec) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from burn wards and its current status of drug resistance. **Methods** One hundred and seventy-nine strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from wound excretion, blood, and sputum samples of patients that were admitted to ICU or public wards of our Department of Burns and Plastic Surgery from September 2012 to September 2013. Among them, 68 strains were from ICU and 111 strains from public wards. The MRSA phenotype of *Staphylococcus*

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1009-2587.2014.05.015

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关计划(2012)

作者单位:750004 银川,宁夏医科大学总医院烧伤整形科(姚明、关立锋、吴银生、吴学军、孙涛),医学实验中心(贾伟、王琳琳、李刚)

通信作者:关立锋,Email:guansunny1010@163.com,电话:13895179460

1.4 SCCmec 分型

采用 PCR 法对 MRSA 进行 SCCmec 分型,同时通过检测甲氧西林耐药决定子 *mecA* 基因对 1.3 中 MRSA 鉴定结果进行验证,具体操作如下。对各菌株进行分离纯化,挑取培养的 3~5 个新鲜菌落,混悬于 30 μ L 双蒸水中,采用 PCR 扩增仪于 99 $^{\circ}$ C 煮 10 min,离心 30 s 后取上清液即为细菌总 DNA。参照文献[2]设计 SCCmec 多重 PCR 引物,引物序列见表 1。*mecA* 基因上游引物为 5'-GTGAAGATAT-ACCAAGTGATT-3',下游引物为 5'-ATGCGCTAT-AGATTGAAAGGAT-3',大小 147 bp。PCR 反应体系为 50 μ L,其中 2 倍稀释的含染料 PCR 混合溶液 25 μ L、细菌上清液 10 μ L、上下游引物各 2 μ L,双蒸水补足 50 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,65 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共计 10 个循环;再 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物于水平核酸电泳仪内行凝胶电泳并用凝胶成像系统拍照。以标准菌株 SCCmec III 型 MRSA ATCC 25923 为阳性对照。

表 1 SCCmec 基因 PCR 引物序列及产物大小

SCCmec 型别	引物序列(5'→3')	产物大小 (bp)
SCCmec I	上游:GCTTTAAAGACTGTCGTTACAGG 下游:GTTCTCTCATAAGTATGACGTCC	613
SCCmec II	上游:CGTTGAAGATGATGAAGCG 下游:CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398
SCCmec III	上游:CCATATTGTGTACGATGCG 下游:CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	280
SCCmec IV a	上游:GCCTTATTCGAAGAAACCG 下游:CTACTCTTCTGAAAAGCGTCC	776
SCCmec IV b	上游:TCTGGAATTAATTCAGCTGC 下游:AAACAATATTGCTCTCCCTC	493
SCCmec IV c	上游:ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC 下游:TGCTATGAGGTATTGCTCG	200
SCCmec IV d	上游:CTCAAATAACGGACCCCAATACA 下游:TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881
SCCmec V	上游:GAACATTGTTACTTAAATGAGCG 下游:TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325

注:SCCmec 为葡萄球菌盒式染色体 *mec*

1.5 药物敏感试验

采用 K-B 纸片扩散法检测鉴定出的 MRSA 及 MSSA 对青霉素、头孢类抗生素、糖肽类抗生素等共 23 种临床常用抗菌药物的耐药情况,操作及结果判定参照美国临床和实验室标准协会 2009 年标准^[1],

以标准菌株 SCCmec III 型 MRSA ATCC 25923 为质控菌株。此外,除去 MRSA 对其耐药率为 100.0% 或 0 的抗菌药物,将 SCCmec III 型 MRSA 与非 SCCmec III 型 MRSA 对剩余抗菌药物的耐药率进行比较。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,用率进行统计描述,对 MRSA 检出率及其对不同抗菌药物耐药率的比较行 Pearson χ^2 检验或校正 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

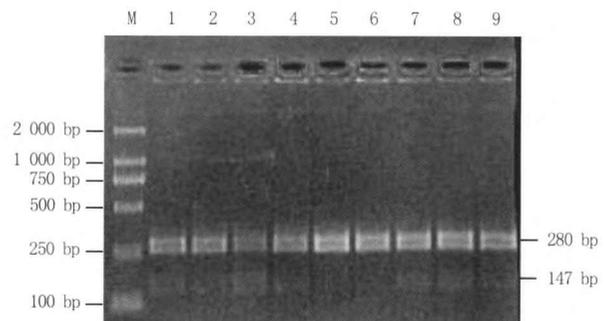
2 结果

2.1 MRSA 的检出情况

179 株金黄色葡萄球菌中 148 株鉴定为 MRSA 占 82.7%,其中 ICU 来源 62 株、普通病房来源 86 株;其余 31 株为 MSSA 占 17.3%。148 株 MRSA 中,111 株分离自创面分泌物占 75.0%,其中 ICU 来源 35 株、普通病房来源 76 株;25 株分离自血液占 16.9%,其中 ICU 来源 19 株、普通病房来源 6 株;12 株分离自痰液占 8.1%,其中 ICU 来源 8 株、普通病房来源 4 株。ICU 中 MRSA 在该病区内检出金黄色葡萄球菌中所占比例为 91.2% (62/68),显著高于普通病房中的 77.5% (86/111), $\chi^2 = 5.526$, $P = 0.019$ 。

2.2 MRSA 的 SCCmec 分型结果

PCR 检测显示 148 株 MRSA 均携带 *mecA* 基因,未见 SCCmec I、SCCmec II、SCCmec IV、SCCmec V 型阳性菌株;共检出 106 株 SCCmec III 型阳性菌株占 71.6% (图 1),其中 ICU 来源 45 株、普通病房来源 61 株。ICU 与普通病房中 SCCmec III 型 MRSA 占各自病区内检出 MRSA 的百分比分别为 72.6% (45/62) 和 70.9% (61/86),差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.048$, $P = 0.826$)。



注:M. marker;1. 标准菌株 SCCmec III 型 MRSA ATCC 25923;2~9. 均为检出 SCCmec III 型阳性 MRSA

图 1 8 株甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (MRSA) 葡萄球菌盒式染色体 *mec* (SCCmec) PCR 电泳图

2.3 MRSA 及 MSSA 的耐药情况

148 株 MRSA 对青霉素以及头孢类抗生素共 8 种抗菌药物均 100.0% 耐药;31 株 MSSA 对青霉素的耐药率为 77.4%,而对头孢类抗生素的耐药率均低于 40.0%。MRSA 及 MSSA 对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、替加环素、呋喃妥因及奎奴普汀/达福普汀的耐药率均为 0。除 2 种菌对其耐药率为 0 的 6 种抗菌药物之外,MRSA 对剩余 17 种抗菌药物的耐药率均显著高于 MSSA ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 MRSA 及 MSSA 对临床常用抗菌药物的耐药情况 [株(率, %)]

抗菌药物	MRSA	MSSA	χ^2 值	P 值
青霉素	148(100.0)	24(77.4)	29.030	<0.001
头孢曲松	148(100.0)	11(35.5)	101.092	<0.001
头孢噻肟	148(100.0)	9(29.0)	113.257	<0.001
头孢呋辛	148(100.0)	7(22.6)	125.738	<0.001
头孢他啶	148(100.0)	10(32.3)	107.136	<0.001
头孢西丁	148(100.0)	5(16.1)	138.546	<0.001
头孢唑林	148(100.0)	12(38.7)	95.124	<0.001
氨苄西林/舒巴坦	148(100.0)	8(25.8)	119.457	<0.001
左氧氟沙星	74(50.0)	9(29.0)	4.531	0.033
环丙沙星	117(79.1)	16(51.6)	10.108	0.001
利福平	125(84.5)	14(45.2)	22.811	<0.001
四环素	120(81.1)	17(54.8)	9.829	0.002
红霉素	119(80.4)	19(61.3)	5.304	0.021
林可霉素	107(72.3)	13(41.9)	10.693	0.001
庆大霉素	128(86.5)	11(35.5)	38.423	<0.001
克林霉素	101(68.2)	11(35.5)	11.745	0.001
复方磺胺甲噁唑	33(22.3)	2(6.5)	4.091	0.043
万古霉素	0(0)	0(0)	—	—
替考拉宁	0(0)	0(0)	—	—
利奈唑胺	0(0)	0(0)	—	—
替加环素	0(0)	0(0)	—	—
呋喃妥因	0(0)	0(0)	—	—
奎奴普汀/达福普汀	0(0)	0(0)	—	—

注:MRSA 为甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌,共 148 株;MSSA 为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌,共 31 株;“—”表示无此项

2.4 SCCmec III 型 MRSA 与非 SCCmec III 型 MRSA 耐药率比较

106 株 SCCmec III 型 MRSA 对左氧氟沙星、环丙沙星、利福平、四环素、红霉素、林可霉素、庆大霉素、克林霉素的耐药率均显著高于 42 株非 SCCmec III 型 MRSA ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

3 讨论

烧伤患者皮肤呈开放性损伤,创面渗出液、分泌物成为 MRSA 繁殖的天然“培养基”,易导致 MRSA 感染。本研究 148 株 MRSA 中有 111 株分离自烧伤

表 3 不同类型 MRSA 对部分抗菌药物的耐药情况 [株(率, %)]

抗菌药物	SCCmec III 型	非 SCCmec III 型	χ^2 值	P 值
左氧氟沙星	60(56.6)	14(33.3)	6.516	0.011
环丙沙星	91(85.8)	26(61.9)	10.415	0.001
利福平	95(89.6)	30(71.4)	7.586	0.006
四环素	92(86.8)	28(66.7)	7.943	0.005
红霉素	90(84.9)	29(69.0)	4.801	0.028
林可霉素	83(78.3)	24(57.1)	6.724	0.010
庆大霉素	98(92.5)	30(71.4)	11.377	0.001
克林霉素	79(74.5)	22(52.4)	6.808	0.009
复方磺胺甲噁唑	25(23.6)	8(19.0)	0.357	0.550

注:SCCmec 为葡萄球菌盒式染色体 mec,MRSA 为甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌;SCCmec III 型 MRSA 106 株,非 SCCmec III 型 MRSA 42 株

创面分泌物占 75.0%,充分说明创面是烧伤病房 MRSA 感染的最主要根源。此外,烧伤 ICU 中分离自血液及痰液的 MRSA 较多,主要原因是重症烧伤患者多合并有全身感染及吸入性损伤,吸入性损伤患者大部分需行气管切开,该措施在通畅气道的同时也增加了呼吸道感染的发生率。另外,大面积烧伤患者伴有明确的全身免疫功能低下,使 MRSA 感染的概率进一步增加。本研究中 MRSA 在检出金黄色葡萄球菌中所占比例为 82.7%,明显高于近几年笔者单位全院平均水平的 50%~60%,但与全国各大烧伤治疗中心的 70%~80% 基本一致。

本研究中 148 株 MRSA 对青霉素及头孢类抗生素 100.0% 耐药,对左氧氟沙星的耐药率为 50.0%,对红霉素、四环素、利福平及庆大霉素也呈现较高的耐药率,但以上几种抗生素因存在不同程度的毒性和不良反应,临床上已较少将其用于抗感染治疗。本研究中 MRSA 对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺、替加环素、呋喃妥因及奎奴普汀/达福普汀的耐药率均为 0。目前,国内临床上用于治疗 MRSA 感染的最主要抗生素为万古霉素、替考拉宁及利奈唑胺。万古霉素和替考拉宁为糖肽类抗生素,迄今国内尚未见关于检出对万古霉素耐药的葡萄球菌的报道,但已检出对替考拉宁耐药或中介耐药的葡萄球菌。由于万古霉素大量应用于治疗 MRSA 感染,可能会导致 MRSA 对万古霉素敏感性下降并最终耐药,而交替使用万古霉素和替考拉宁也许能延缓这种耐药情况的出现^[3]。利奈唑胺对 MRSA 的抗菌活性及细菌清除率较糖肽类抗生素强,与糖肽类抗生素不产生交叉耐药。呋喃妥因是硝基呋喃类抗菌药,可用做局部外用药,对 MRSA 感染的烧伤创面疗效确切^[4]。奎奴普汀/达福普汀由于可引起严重的静脉刺激、肌痛、关节痛及明显药物相互作用,其应用范

围在一定程度上受到限制^[5]。替加环素是第 1 种被批准的新型静脉注射用甘氨酸四环素类抗生素,有广谱抗菌活性,对多药耐药的细菌如 MRSA、万古霉素耐药肠球菌、青霉素耐药肺炎链球菌有很好的抗菌效果^[6]。

MRSA 对 β 内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制是获得了编码低亲和力青霉素结合蛋白 2 α 的 *mecA* 基因。SCCmec 除了携带 *mecA* 基因以外还编码、整合多种耐药基因,是导致 MRSA 多药耐药的主要原因^[7]。SCCmec 主要分为 5 型,其中 I、II、III 型多见于医院获得性 MRSA, IV、V 型多见于社区获得性 MRSA。SCCmec 基因型与 MRSA 耐药谱有着密切关系,SCCmec III 型 MRSA 含有耐药基因的质粒或转座子,呈多药耐药性。本研究的 148 株 MRSA 中共检出 SCCmec III 型 MRSA 106 株占 71.6%。既往研究证实,除分离自日本和韩国的 MRSA 以 SCCmec II 型为主外,亚洲其他国家分离的 MRSA 均以 SCCmec III 型为主。我国北京、上海、四川、浙江、湖南及台湾等地分离的 MRSA 均为 SCCmec III 型^[8]。

烧伤病房 MRSA 感染日趋严重,由其引起的医院内感染呈蔓延趋势。MRSA 细菌毒力强,由其引起的感染在临床上有明显加重病情的表现,如可致创面加深、移植皮片及皮瓣坏死、呼吸衰竭及全身感染等。MRSA 的耐药率不断上升,给治疗带来极大困难,临床上可用于治疗 MRSA 的有效药物仅限几种。在这样严峻的形势下,加强医院内感染控制及

合理使用抗生素显得尤为重要。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S19 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- [2] Zhang K, McClure J, Elsayed S, et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 5026-5033.
- [3] 逢崇杰, 巩路, 田彬, 等. 替考拉宁和万古霉素对临床分离耐甲氧西林葡萄球菌体外抗菌活性比较[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(6): 360-361.
- [4] 张博, 于兰, 王振国, 等. 呋喃妥因对烧伤创面 MRSA 感染的疗效分析[J]. 长春中医学院学报, 2000, 16(3): 35.
- [5] 苗丽, 邓万俊. 喹奴普丁-达福普汀治疗多重耐药革兰阳性细菌感染的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2008, 29(3): 118-124.
- [6] 般伟, 吕火祥, 胡庆丰, 等. 替加环素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的体外抗菌活性[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(11): 2807-2808.
- [7] Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, et al. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries; a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(3): 1001-1012.
- [8] 褚海青, 张炜博, 韩立中, 等. 下呼吸道标本 MRSA 耐药性及其 SCCmec 基因分型的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(17): 2221-2225.

(收稿日期: 2013-11-04)

(本文编辑: 谢秋红)

· 消息 ·

《中华烧伤杂志》征稿征订启事

《中华烧伤杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办的全国烧伤学术权威刊物。目前已被美国《Medline 数据库》、《中国科技论文统计源期刊》、《中国科学引文数据库(CSCD)》、《中文核心期刊要目总览》等重要检索机构收录,在国内外医学期刊中具有较大影响。本刊读者对象为从事烧伤治疗、烧伤整形和康复的临床医护人员,以及与烧伤医学有关的科研人员等。主要栏目包括:专家论坛、专家述评、指南与共识、论著、疑难病例析评、综述、护理专栏、经验交流、病例报告、科技快讯、海外发表论文选读,每期重点选题内容丰富,针对性强,涵盖创面修复、感染、脏器损害、再生医学、营养代谢、瘢痕防治、烧伤康复及相关内容。烧伤病情复杂、并发症多,涉及学科范围广泛,既是烧伤也是整个外科的基本问题,特别是创面修复技术,已成为治疗非烧伤领域各类慢性难治性创面的主要手段。为反映烧伤及相关领域的新理论、新观点、新技术与新方法,探索新思路、新特点,充分发挥展示科研成果及增进学术交流的平台作用,本刊真诚向您邀约高质量稿件,尤其欢迎交叉学科的学者积极介入。同时也希望得到您的宝贵意见,使本刊更加贴近您的需要。

《中华烧伤杂志》编辑委员会由国内外著名烧伤外科及相关学科专家组成,杂志具有科学性、实用性,内容新颖,可读性强。本刊为双月刊,大 16 开,80 页哑光铜版纸印刷并配彩图,2015 年起每期 18 元,邮发代号:78-131,欢迎广大作者和读者通过邮局订阅或直接向编辑部邮购。汇款请寄:重庆市沙坪坝区西南医院《中华烧伤杂志》编辑部,邮编:400038。电话:023-65460398(可传真),68754670-602;Email:cmashz@ tmmu. edu. cn;网址: http://www. zhsszz. org。

本刊编辑部