

MRSA 的 7 种新 *SCCmec* 型别及其抗药特性

欧阳范献^{1,2}, 卜平凤², 黄惠琴¹, 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 571101)

摘 要: 为探明海口地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药性和携带的葡萄球菌染色体 *mec* 盒(*SCCmec*)型别, 对收集的 1174 株金黄色葡萄球菌用 PBP2a 检测法确证为 MRSA 有 686 株, 用多重 PCR 对 58 株进行 *SCCmec* 分型测定, 并用 K-B 琼脂扩散法和 E-test 法测定其对临床常用 7 类抗生素的代表性药物耐药性。结果在 17 株中又发现了 7 种新的 *SCCmec* 型别, 其结构特点为: New3 含 A、F、H、M 4 个位点, New4 型含 F、H、M 3 个位点, New5 含 D、B、M 3 个位点, New6 型含 A、B、M 3 个位点, New7 型含 H、E、C、M 4 个位点, New8 型含 A、M 两个位点, New9 型含 A、C、M 3 个位点, 它们均与报道型别的结构特点存在明显差异, 且携带新型的 MRSA 菌株, 其分布特点及抗药性也与已报道的菌株存在差异: 多分自门诊病人, 且耐药性高, 抗药谱较广, 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*), 多重 PCR, 分型

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)02-0201-07

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 年首次在英国报道, 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, 也因此受到广泛关注 and 重视。在结构研究中发现, 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。并且发现, 此结构在细菌染色体上的插入位置固定、还有方向性, 它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, 而可变区则由不同种类、数量的插入子、转位子、质粒组成, 耐药基因就携带在这些结构中。此特征性结构内的基因相互关联, 且内有 *mecA* 基因, 又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 可自发剔除、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和储存池, 是耐药性产生、耐药谱扩大的根本原因。为了研究 MRSA 的起源、流行、多重耐药性扩大及传递机制, 依据 *SCCmec* 的结构特征将它进行了分型, 从而可进行对比和分子流行病学以及结构基因的功能研究。基于 PCR 的 *SCCmec* 分型方法, 现有鉴定 *mecA* 操纵子和染色体盒重组酶基因(cassette chromosome recombinase, *ccr*)型别的简单分型法^[4]和多重 PCR 分型法^[5], 后者是近年新开发的具有很强分型能力的技术, 它依据现有型、亚型的结构特性, 选取了 A~H、M 等 9 个位点, 其中包括了特异性位点、共同位点、鉴别位点和阳性对照位点, 设计 9 对引物, 同时进行多重 PCR 测定, 依据各位点的有无确定其型别。

MRSA 菌株的 *SCCmec* 型别与菌株的耐药性、耐药谱、流行性关系的研究国外已有报道^[2~6], 至今为止, 国外共发现了 5 种主要型别和 13 种亚型^[2~10]; 在国内, 我们曾检测到了典型的 III 型、IV-dcs 亚型, 并发现了一种新型和一种新亚型^[11], 进一步研究,

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, 在职博士研究生, 研究方向为细菌耐药基因。E-mail hnnkoyfx@yahoo.com.cn

收稿日期 2006-06-14 接受日期 2006-08-17 修回日期 2006-11-07

我们又发现了 7 种新型或新亚型,本文就其结构特点、来源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 2000 年 8 月~2004 年 12 月,从海南省农垦总局医院、海南省人民医院、海南医学院附属医院、海口市人民医院和解放军

178 医院临床标本中分离、收集金黄色葡萄球菌 1174 株,经鉴定复核、并用 PBP2a 检测法确证为 MRSA 的有 686 株,以菌株编号为依据,按 10% 比例随机抽取,因少数抽取的菌株在保存过程中已经死亡,最后对 58 株用多重 PCR 进行了 SCC_{mec} 分型测定,在 17 株中又发现了 7 种新的 SCC_{mec} 型别,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 SCC _{mec}
3687	28-Jul-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New3
4158	12-Oct-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New3
shi-18	9-Apr-2001	D. of orthopaedics	blood	New3
4394	26-Nov-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New3
3037	16-May-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New4
3554	13-Jul-2001	D. of geriatrics	sputum	New4
4949	4-Apr-2002	D. of out-patient service	leucorrhea	New4
2514	28-Feb-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New5
8924	9-Aug-2004	D. of out-patient service	prostate liquid	New5
3558	13-Jul-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New6
4932	30-Mar-2002	D. of out-patient service	leucorrhea	New6
1496	29-Aug-2000	D. of Convalescent	sputum	New7
2308	13-Jan-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New7
4801	6-Mar-2002	D. of out-patient service	prostate liquid	New7
3308	22-Jun-2001	D. of out-patient service	prostate liquid	New8
4940	2-Apr-2002	D. of orthopaedics	wound secretion	New8
4952	4-Apr-2002	D. of orthopaedics	wound secretion	New9

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 最低抑菌浓度(Minimum inhibition concentration, MIC)测定卡为 Sweden AB BIODISK 公司产品;葡萄球菌溶菌酶(lysostaphin)为 Sangon 公司产品;蛋白酶 K 为 Merck Co. Ltd 产品;RNase 溶液由 Amresco 分装; *Taq* DNA 聚合酶为华美生物工程公司产品; 100bp DNA Marker 为宝生物工程公司产品。PCR 扩增仪(Tpersonal)为 Biometra 公司产品。凝胶成像系统(GelDoc-It Imaging station)为美国 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,依 NCCL 推荐的高渗琼脂扩散法进行 MRSA 筛选,用 PBP2a 检测试剂盒检测 PBP2a,确证 MRSA,试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

用 K-B 和 E-test 法分别测定菌株的耐药性和 MIC,包括 7 类临床常用抗生素的代表性药物,即 β -内酰胺类——苯唑西林(Oxacillin, OX) 糖肽类——

万古霉素(Vancomycin, VA) 四环素类——多西四环素(Doxycyclin, DC) 氨基糖苷类——丁胺卡那霉素(Amikacin, AK) 红霉素类——红霉素(Erythromycin, EM) 氯霉素类——氯霉素(Chloramphenicol, CL) 喹诺酮类——环丙沙星(Ciprofloxacin, CI),具体方法参见文献 [11]。

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,详细操作参见文献 [12]。

1.5 多重 PCR 测定

参见文献 [5] 选择的 9 个 PCR 测定位点,其中 M 位点位于 *mecA* 基因的中部,为所有 SCC_{mec} 型、亚型共有,是 MRSA 的确认位点和试验的阳性对照位点; A 是 I 和 IA 型的共同位点,位于其对胞浆素敏感的表面蛋白基因(plasmin sensitive surface protein, *pls*) 的下游,是 *pls* 的指示位点,而 G 位点是两者的鉴别位点,位于插入子 IS431 和质粒 pUB110 的结合部,是 pUB110 的指示位点, II 型也有; B 位点是 II 型的特异性位点,位于钾依赖性操纵子(potassium dependent operon, *kdp*) 的上游,是 *kdp* 的指示位点; C

位点位于 *mecA* 的抑制基因——*mec I* 的上游,是 *mec I* 的指示位点,为 II、III 型共有;III 型还有两个特异性基因位点 E、F,E 位于 pI258 和 Tn554 之间,F 位于 Tn554 与 SCCmec 右结合点间的假 *ccrAB* ($\phi ccrAB$)内;H 位点是 III 和 IIIA 型的鉴别位点,位于 IS431 与 pT181 结合处,是 pT181 的指示位点;D 位

点为 I、II、IV 型共有,在 *mecA* 的下游恒定序列 (down constant sequence, *dcs*)内,是 *dcs* 的指示位点。各位点的位置、特性见表 2,各位点在几种主要型别上的位置、数量见图 1^[5,40],各位点引物序列、多重 PCR 扩增参数、使用的引物浓度、方法参见文献 [12]。

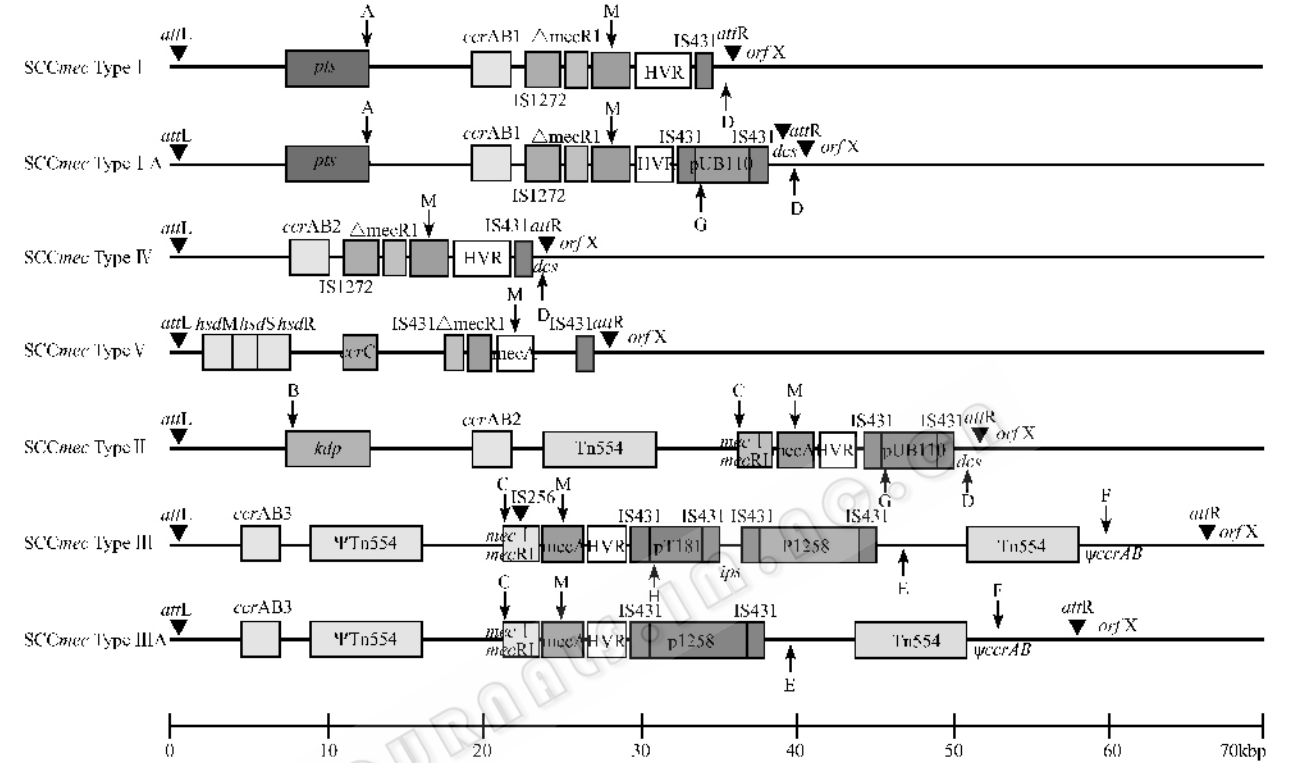


图 1 主要 SCCmec 型、亚型上多重 PCR 测定位点定位示意图

Fig.1 Location of the loci using in multiplex PCR on the main types and subtypes. Based on (2001), Oliveira DC *et al.* (2002) and Ito *et al.* (2004). *pls*: plasmin sensitive surface protein, *kdp*: potassium-dependent operon. HVR: hypervariable region; *dcs*: down constant sequence and conserved region in SCCmec types I, II, IV between the IS431 copy and *orfX*; *ips*: region between the IS431 right flanking copy of pT181 and the left flanking copy of pI258 in SCCmec III; *hsd*: type I restriction-modification system.

表 2 多重 PCR 所选取的扩增位点及其定位

Table 2 Location and meaning of loci used in the multiplex PCR			
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	Locat in <i>mecI</i> , upstream of <i>mecA</i>	Shared by type-II, 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	Locat at the joint of IS431 <i>mec</i> with pUB110, downstream of <i>mecA</i>	Shared by type-IA, II indicator of pUB110	381
H	Locat at the joint of IS431 <i>mec</i> with pT181, downstream of <i>mecA</i>	Distinctive locus between type-III and IIIA, indicator of pT181	303
M	Locate in the <i>mecA</i>	Positive control	162

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

2 结果

2.1 新 SCCmec 型别的多重 PCR 扩增结果及特性

图 2 中泳道 2 是 New(标本号 shi-18)的扩增图

谱,含 A(495bp)、F(414bp)、H(303bp)和 M(162bp) 4 条扩增带。特别为:含有 I 型的上游特异性位点 A,但缺乏其下游位点 D,却多了两个 III 型的下游位点 F、H。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

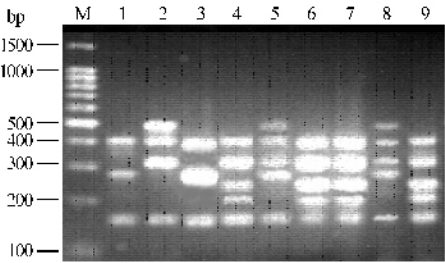


图2 Ⅲ和 New1 ~ 3 型/亚型 *SCCmec* 的多重 PCR 扩增图谱

Fig.2 The electrophoresis graphs of *SCCmec* type-Ⅲ and type/subtype-New1 ~ 3. M. 100bp DNA ladder ; 1 3. Type-New1 ; 4 6 7 9. Type-Ⅲ ; 5 8. Type-New2 2. Type-New3.

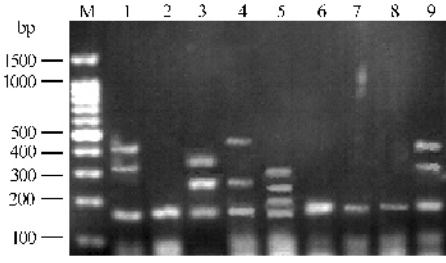


图3 Ⅳ-*dsc* 和 New4 ~ 7 新型/亚型 *SCCmec* 的多重 PCR 扩增图谱

Fig.3 The electrophoresis graphs of the *SCCmec* type-VI-*dcs* and type/subtype-New4 ~ 7. M. 100bp DNA ladder ; 1 9. Type-New4 ; 2 6 7 8. Type-VI-*dcs* 3. Type-New5 4. Type-New6 5. Type-New7.

图3中泳道1(标本号3037)和9(标本号3554)是New4型的图谱,依次为F(414bp)、H(303bp)和M(162bp)带,特点是和典型的Ⅲ型比较,只含两个下游位点F、H,缺失上游位点C和一个下游位点E。泳道3(标本号8924)是New5型的图谱,依次为D(342bp)、B(287bp)和M(162bp)带,特点是和典型的Ⅱ型比较,只含上游位点B和下游位点D,缺失上游位点C和下游位点G。泳道4(标本号3558)为New6型的图谱,依次为A(495bp)、B(287bp)和M(162bp)带,特点是含Ⅰ、Ⅱ型的上游特异性位点A、B,但缺乏其下游位点D。泳道5(标本号1496)为New7型的图谱,依次为H(303bp)、E(243bp)和C(209bp)带,特点是和典型的Ⅲ型相比只少一个下游位点F。

图4中泳道6(标本号4940)是为New8型的图谱,依次为A(495bp)和M(162bp)两条带,特点是含Ⅰ型上游位点A和阳性对照位点M,但缺失其下游位点D。泳道8(标本号4952)是New9型的图谱,依次为A(495bp)、C(209bp)和M(162bp)三条带,特点

是在New8的基础上多了一个Ⅱ、Ⅲ型的上游位点C。

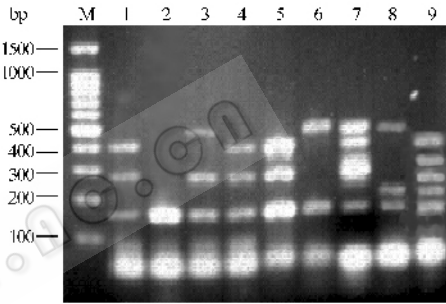


图4 Ⅲ、Ⅳ-*dsc* 和 New1、2、6、8、9 型/亚型 *SCCmec* 的多重 PCR 扩增图谱

Fig.4 The electrophoresis graph of the *SCCmec* type-Ⅲ, VI-*dcs* and type/sub-type-New1, 2, 6, 8, 9. M. 100bp DNA ladder ; 1 4 5. Type-New1 ; 2. Type-VI-*dcs* ; 3. Type-New6 ; 6. Type-New8 ; 7. Type-New2 ; 8. Type-New9 9. Type-Ⅲ.

2.2 58株 MRSA 进行 *SCCmec* 分型结果

58株 MRSA 进行 *SCCmec* 分型测定后所得各型或亚型的构成情况见表3。从表可知本地区 MRSA 携带的主要 *SCCmec* 型别为Ⅲ型,其次为Ⅳ-*dcs*。

表3 58株 MRSA 菌株 *SCCmec* 的分型结果

Table 3 The *SCCmec* typing-results of 58 MRSA

Type	Ⅲ	Ⅳ- <i>dcs</i>	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	Total
Number	20	12	6	3	4	3	2	2	3	2	1	58
Component-rate(%)	34.5	20.7	10.3	5.2	6.9	5.2	3.4	3.4	5.2	3.4	1.7	100.0

N : New.

2.3 新 *SCCmec* 型别与原有型别的多重 PCR 扩增带谱比较及来源分析

7种新型或亚型的多重 PCR 扩增带谱与已有型别的区别见表4。New1和New2型结构特点及其抗药性,我们已有过描述^[11],这里不再赘述。

New3型含Ⅰ型 *SCCmec* 的 *mecA* 上游特异性位点A和Ⅲ型下游特异性位点F、H,因此可推测,

New3的上游部份来自Ⅰ型,下游部份来自Ⅲ型,可能是Ⅰ、Ⅲ型菌株基因重组后或是在Ⅰ型的 *mecA* 下游插入了 pT181 和 ϕ ccrAB 基因后再剪切修饰的结果,可算是Ⅰ型的一个亚型(ⅠB)。

New4与New3的区别是少了一个A位点,与Ⅲ型的区别是缺乏上游的位点C和下游位点E,即 *mecI* 基因的前部缺失和 *mecA* 下游第4个插入子

表 4 各型、亚型的 *SCCmec* 多重 PCR 扩增带谱

Table 4 The PCR phenotype of <i>SCCmec</i> types and subtypes		
<i>SCCmec</i> types	Size of bands(locus)	PCR phenotypes and speciality
I	49Ⅹ(A), 34Ⅹ(D), 16Ⅹ(M)	
I A	49Ⅹ(A), 38Ⅰ(G), 34Ⅹ(D), 16Ⅹ(M)	I + pUB110 + IS431
II	38Ⅰ(G), 34Ⅹ(D), 28Ⅰ(B), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	
II A	38Ⅰ(G), 34Ⅹ(D), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	II - <i>kdp</i> , IS1182 be inserted in <i>mec</i> I
II B	38Ⅰ(G), 34Ⅹ(D), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	II - <i>kdp</i> , in L-C region lack Tn554
II C	38Ⅰ(G), 34Ⅹ(D), 16Ⅹ(M)	II - <i>kdp</i> , <i>mec</i> I contain class A.3 mec
II D	34Ⅹ(D), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	II - <i>kdp</i> , pUB110
II E	34Ⅹ(D), 16Ⅹ(M)	II - <i>kdp</i> , <i>mec</i> I, pUB110
III	41Ⅰ(F), 30Ⅹ(H), 24Ⅹ(E), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	
III A	41Ⅰ(F), 24Ⅹ(E), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	III -pT181
III B	20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	III -pT181, p1258/Tn256, Tn254/attR
IV A	34Ⅹ(D), 16Ⅹ(M)	distinguished by L-C region length, IV A > IV B
IV B	34Ⅹ(D), 16Ⅹ(M)	
IV C	16Ⅹ(M)	distinguished by sequencing L-C and M-R region
IV E	16Ⅹ(M)	
IV F	16Ⅹ(M)	
V	16Ⅹ(M)	contain <i>ccrC</i> and <i>hsdM</i> , <i>hsdS</i> , <i>hsdR</i> in L-C region
New1	41Ⅰ(F), 28Ⅰ(B), 16Ⅹ(M)	Lack D locus of II and contain F locus of III
New2	49Ⅹ(A), 41Ⅰ(F), 30Ⅹ(H), 28Ⅰ(B), 16Ⅹ(M)	Contain A locus of I, B locus of II and F, H loci of III
NewⅩ I B)	49Ⅹ(A), 41Ⅰ(F), 30Ⅹ(H), 16Ⅹ(M)	Lack D locus of I, but contain F, H loci of III
NewⅠ III C)	41Ⅰ(F), 30Ⅹ(H), 16Ⅹ(M)	Contain F, H and M loci of III only
NewⅠ II G)	34Ⅹ(D), 28Ⅰ(B), 16Ⅹ(M)	Lack C and G loci of II
New6	49Ⅹ(A), 28Ⅰ(B), 16Ⅹ(M)	Contain special A locus of I and B of II, but lack mutual D locus of them
NewⅠ III D)	30Ⅹ(H), 24Ⅹ(E), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	Lack F locus of III
NewⅠ I C)	49Ⅹ(A), 16Ⅹ(M)	Lack D locus of I
NewⅠ I D)	49Ⅹ(A), 20Ⅹ(C), 16Ⅹ(M)	Lack D locus of I, but contain mutual C locus of II and III

IS431 与 Tn554 之间的区段有部分缺失(图 1),因此可算是Ⅲ型的一个亚型(Ⅲ C),而 New3 型则可能是此型与 I 型重组的产物。

New5 型与 II 型比较缺乏上游位点 C 和下游位点 G,即 *mec* I 基因的前部和 pUB110 缺失,与现有的其它亚型也存在差异,因此,应该是 II 型的一个新亚型(II G)。

同理,New6 型含有 I、II 型的 *mecA* 上游特异性位点 A、B 和内对照位点 M,缺乏其共同的下游位点 D,此型应是 I、II 型重组的结果,在重组时,下游 *des* 片段被删节,造成 D 位点缺失,因此,可以认为是一新的 *SCCmec* 型别。

New7 型与 III 型比较缺乏下游特异性位点 F,即 Tn554 与 *SCCmec* 右结合点间的 $\psi ccrAB$ 部份缺失(图 1),因此应是 III 型的一个新亚型(III D)。

New8 型与 I 型比较缺乏下游位点 D,是 I 型 *SCCmec* 的 *des* 片段被删节的结果,因此,此型应是

I 型的一个新亚型(I C)。

New9 型与 I 型比较缺失下游位点 D,与 New8 比较多了一个 C 位点,与 II D、III B 也有差异。A 是 I 型的特异性位点,C 在 *mec* I 基因前部,是 A 型 *mec* 操纵子所拥有的位点^[10],为 II、III 型共有,因此,New9 可能是一种带有 A 型 *mec* 操纵子的新型,或是 I 与 II D 的重组型。

2.4 携带新型的 MRSA 菌株的耐药特性

表 5 是携带新型 *SCCmec* 的菌株对临床常用抗生素代表性药物的耐药性及其最低抑菌浓度(MIC)。

从表可见:各型菌株对红霉素、氯霉素的耐药率和耐药程度(MIC)相对较大,对多西四环素、丁胺卡那霉素的耐药率和耐药程度相对较少,但菌株之间的差别较大,即使同型菌株对相同抗生素也有不同的药敏结果,说明 *SCCmec* 型别与药敏表征之间还存在差距。

表 5 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 5 The resistance of MRSA strains carrying new *SCCmec* type to routine-used antibiotics and their MIC

Type of SCCmec	Serial No.	Susceptibility							Minimum inhibiting concentration(MIC)						
		OX	VA	DC	AK	EM	CL	CI	OX	VA	DC	AK	EM	CL	CI
New3	3687	R	S	S	S	R	S	S	16	1	3	8	≥256	2	1
New3	4158	R	S	S	S	R	R	S	32	2	3	16	≥256	64	1
New3	shi-18	R	S	R	R	R	R	S	≥256	0.75	16	≥256	128	128	0.25
New3	4394	R	S	S	S	R	R	R	32	1	4	2	≥256	64	≥32
New4	3037	R	S	S	R	R	R	R	128	1.5	4	≥256	128	≥256	≥32
New4	3554	R	S	S	S	R	S	R	≥256	2	0.25	2	≥256	1.5	≥32
New4	4949	R	S	R	S	R	R	R	64	1.5	8	1	≥256	128	≥32
New5	2514	R	S	S	S	S	R	S	≥256	1	3	8	0.125	128	0.125
New5	8924	R	S	R	R	R	R	R	128	0.75	16	64	64	≥256	≥32
New6	3558	R	S	S	R	R	R	S	128	2	0.25	128	≥256	128	0.5
New6	4932	R	S	R	S	R	S	S	64	1	6	0.25	≥256	1.5	0.125
New7	1496	R	S	S	R	R	R	R	128	2	0.25	≥256	≥256	64	≥32
New7	2308	R	S	S	S	S	R	R	64	3	4	1	0.125	128	≥32
New7	4801	R	S	S	S	S	R	R	≥256	2	0.125	0.5	2	128	≥32
New8	3308	R	S	R	S	S	R	R	16	2	8	0.5	0.125	64	≥32
New8	4940	R	S	S	R	R	R	R	≥256	2	3	128	≥256	128	≥32
New9	4952	R	S	S	R	R	R	R	≥256	2	3	64	≥256	128	≥32

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

2.5 携带新型的 MRSA 菌株的分布

表 1 是携带新 *SCCmec* 型别的 MRSA 菌株的临床资料 ,由表可见 ,70.6%(12/17)的携带新型的菌株来自门诊病人的泌尿道生殖道标本 ,说明此类菌株多分布在医院外的社区环境中 ,以泌尿道生殖道感染为主 ;分离的时间 ,2001 年占 58.8%(10/17) ,2002 年占 29.4%(5/17)。

3 讨论

SCCmec 是耐药性基因插入、堆积部位 ,又可自主地从染色体上剔除 ,以适当方式转移到其它葡萄球菌菌株后再次重组到受体菌染色体中 ,如果受体菌是对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 ,则可以使其变成 MRSA ,如果是 MRSA ,则可使受体菌的耐药基因叠加、耐药谱扩大 ,菌体内修饰酶系统对重组后染色体剪切修饰 ,又造成了其结构变化 ,由此可理解 *SCCmec* 在 MRSA 产生和耐药谱扩大中的作用 ,也可以理解为何早期分离的 MRSA 菌株携带的是耐药性低、耐药谱窄的 I 型或 II 型菌株 ,而近年分离的菌株多是含耐药基因多、耐药谱广的 III 型菌株 ,也可以解释为何 *SCCmec* 型别具有高度多样性、新的型别在不断产生^[8]。

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* ,耐药性不高 ,但流行性大 ;而 I、II、III 型多由住院病人中的 MRSA 菌株携带 ,耐药性高、耐药谱

广^[2~10]。我们的研究也显示了相似结果 :即在海口地区 ,从医院住院病人分离菌株的型别多为 III 型 ,从门诊病人(社区感染)分离的菌株多携带 IV-*dcs* 型。但携带新 *SCCmec* 型别的菌株多来自门诊病人(表 1) ,且耐药性较高、耐药谱也较广(表 5) ,这表明本地区 MRSA 的流行性和抗药性有地区特色 ,社区感染株的型别与医院感染株重叠 ,耐药性也较强。

本地区发现的新型别较多 ,且结构与 I、II、III 型关系密切 ,而典型的 I、II、IV 型在研究中未检测到。这是否与本地区环境气温较高、适宜细菌生长和金黄色葡萄球菌的环境生存能力强、加上人们自行、不规则用药以及抗菌剂的广泛应用使菌株在社区环境的繁殖过程中易获得耐药性质粒和发生重组、而造成古老的 I、II 型菌株变异形成新型株、并使耐药性、耐药谱大幅度提高有关 ,还待进一步研究。

菌株的抗药性结果显示 ,除有抗菌谱的相似性外 ,还有同型菌株抗药程度相差悬殊的特殊性 ,这说明 *SCCmec* 型别不能完全预示菌株的抗药性 ,同型菌株的 *SCCmec* 结构可因测定位点外区域插入基因的不同而存在较大差异 ,如果是插入了耐药基因 ,则其耐药表征会相差悬殊。

携带新型的菌株多来自门诊病人的泌尿生殖道标本 ,除与本地环境有关外还与金黄色葡萄球菌易致皮肤粘膜感染有关 ,这与本地金黄色葡萄球菌的流行病学及致病性分析资料相符^[13]。

金黄色葡萄球菌在本地区的多变性、分布的广

泛性以及高耐药性和宽耐药谱现状,必须引起卫生行政部门及医疗部门的高度重视,有必要强调依抗生素应用规范,合理、有效应用抗生素的重要性,宣传依药敏结果、在医生指导下用药的必要性和重要性。

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] 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.
- [4] 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.
- [5] Oliveira 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.
- [6] 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.
- [7] Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 2001 **9**(10):486 – 493.
- [8] Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 **46**(4):1147 – 1152.
- [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] Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in *Staphylococci*: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006 **46**(1):1 – 20.
- [11] 欧阳范献, 胡永华, 黄惠琴, 等. 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. *微生物学报*, 2006 **46**(6):32 – 36.
- [12] 欧阳范献, 黄惠琴, 胡永华, 等. 葡萄球菌染色体 mec 盒多重 PCR 分型测定. *中华医院感染学杂志*, 2007, **17**(11):8 – 11.
- [13] 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.

Seven kinds of new SCCmec type in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and their susceptibility to the antibiotics

OUYANG Fan-xian^{1,2}, BU Ping-feng², HUANG Hui-qin¹, 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 and the staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) types of Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in the area of Haikou, 686 strains of MRSA had been distinguished from 1174 strains of *S. aureus* using PBP2a testing. The resistance to the seven deputies of seven kinds antibiotics which in common use in clinic, including Oxacillin, Vancomycin, Doxycycline, Amikacin, Erythromycin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, and SCCmec type of 58 strains had been tested using the K-B Agar diffuse, E-test and multiplex PCR strategy, and seven kinds of new SCCmec types were found in 17 strains. Their specialties of structure are: type-new3 possess four loci of A, F, H, M; New4 possess three loci of F, H, M; New5 possess three loci of D, B, M; New6 possess three loci of A, B, M; New7 possess four loci of H, E, C, M; New8 possess two loci of A, M; New9 possess three loci of A, C, M. All of them are different from the types reported. The strains carrying new SCCmec types are different from that carrying old SCCmec types in the epidemical distribution and resistance to the antibiotics: they were mostly isolated from the out-patients and have high level and wider range of resistance to antibiotics and deserve to pay more attention.

Keywords: Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA); staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec); multiplex PCR; typing