

皮肤软组织感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCC *mec* 分型和同源性分析

汪轩轩, 黄颖, 胡媛媛, 陈鹤, 王中新, 徐元宏

摘要 目的 对从皮肤软组织感染(SSTI)患者中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)进行葡萄球菌染色体 *mec* 盒(SCC *mec*)分型和同源性分析,并了解其耐药情况,为规范合理使用抗生素和医院感染控制提供实验室依据。方法 收集从SSTI患者中分离的44株MRSA,采用药敏纸片扩散(K-B)法和Vitek 2 Compact仪器法进行抗菌药物敏感性试验,采用普通PCR检测 *mec A* 基因,多重PCR进行SCC *mec* 基因分型,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术进行同源性分析。结果 44株MRSA通过普通PCR检测均含有 *mec A* 基因,多重PCR共分出II、III、IVa 3种SCC *mec* 基因型别,II型5株(11.36%),III型12株(27.27%),IVa型8株(18.18%),未分型19株(43.18%)。MALDI-TOF MS将44株MRSA分为两大簇。结论 SSTI患者分离的MRSA以SCC *mec* III型为主,通过SCC *mec* 基因分型和MALDI-TOF MS技术结合,为不同菌株间的同源性分析提供依据,并了解特定地区MRSA的分子生物学和流行病学特征。

关键词 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; SCC *mec* 分型; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱; 同源性分析

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1565-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.011

皮肤软组织感染(skin and soft tissue infections, SSTI)是化脓性病原菌感染表皮、真皮及皮下组织引起的炎症性疾病,包括从浅表性感染至坏死性感染^[1]。有研究^[2]表明坏死性SSTI截肢率为12%~20%,死亡率为6%~33%。引起SSTI最常见致病菌是金黄色葡萄球菌,其中25%为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)^[3]。MRSA中的葡萄球菌染色体 *mec* 盒(SCC *mec*)是一个可移动的遗传元件,包含两个基本的遗传成分(*mec* 基因复合体和 *ccr* 基因复合体)。根据 *mec* 和 *ccr* 基因复合体组合 SCC-

mec 可分为 I~V 型^[4]。SCC *mec* 中含有多种耐药基因和位于 *mec* 基因复合体的甲氧西林耐药(*mecA*)基因,与MRSA的传播和多重耐药密切相关^[5]。通过SCC *mec* 类型可区分医院获得性MRSA(HA-MRSA)和社区获得性MRSA(CA-MRSA)。因此,SCC *mec* 分型作为一种分子工具是了解MRSA分子流行病学的基础。现对SSTI住院患者分离的MRSA菌株进行SCC *mec* 分型并了解其耐药情况,同时分析菌株间的同源性,为临床合理规范使用抗生素及医院感染控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集2019年6月-2020年9月安徽医科大学第一附属医院检验科保存的从SSTI患者中分离的MRSA共44株,剔除同一患者相同部位分离的重复菌株,其中HA-MRSA 40株,CA-MRSA 4株。阴性质控菌株为ATCC25923,阳性质控为ATCC43300。CA-MRSA的判断标准根据《耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识》:从门诊、住院48 h内的患者中分离的MRSA菌株,既往无MRSA感染和定植病史,无留置导管或经皮的医疗装置,无血透和手术史,1年内未住入医院、养老院^[6]。不符合上述标准判断为HA-MRSA。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 东胜龙 ETC 811 基因扩增仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司); MULTIFUGE X1R 高速冷冻离心机、HERAcell-240i CO₂ 培养箱(美国赛默飞世尔科技公司); DYY-60 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司); JS-2000 紫外线凝胶成像仪(上海培清科技有限公司); Vitek 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析仪、Vitek MS 质谱仪(法国梅里埃公司)。

1.2.2 主要试剂 Mltiplex PCR Kit(德国 QIAGEN 生物公司); 2 × Pro Taq Master Mix 含染料、GL DNA marker 2000、GoldView 核酸凝胶染料、琼脂糖凝胶(湖南艾科瑞生物有限公司); 哥伦比亚血平板(合肥天达诊断试剂有限公司); GL DNA marker

2021-07-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171606)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 汪轩轩, 男, 医师, 硕士研究生;

徐元宏, 男, 教授, 主任技师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xyhong1964@163.com

1000(山东思科捷生物技术有限公司);药敏纸片(英国Oxoid公司);引物购自上海生工生物公司。

1.3 方法

1.3.1 MRSA 鉴定及药敏分析 菌株复苏后四区划线接种在哥伦比亚血平板上 37 °C 培养箱培养 16 ~ 18 h ,挑取单个菌落用 Vitek MS 质谱仪重新鉴定。药敏结果采用头孢西丁药敏纸片扩散(K-B)法和革兰阳性球菌药敏卡片在 Vitek 2 Compact 仪器上分析。结果判读根据 2018 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)推荐的执行标准。

1.3.2 提取模板 DNA 挑取单个菌落 5 ~ 8 个于 200 μl 无菌去离子水中,在漩涡混合器上振荡混匀 20 s ,置于干式恒温器中 100 °C 加热 20 min ,高速离心机 15 000 r/min 离心 10 min ,取 100 μl 上清液转移至新的无菌 EP 管中即为 DNA 模板。

1.3.3 检测 mecA 基因 采用 PCR 方法检测模板 DNA 的 mecA 基因,引物序列参考文献[7] 见表 1。反应体系为 25 μl ,包括 2 × Pro Taq Master Mix 12.5 μl ,上下游引物(10 μmol /L) 各 1 μl ,模板 DNA 4 μl ,无菌去离子水 6.5 μl 。反应条件为 94 °C 30 s 预变性;98 °C 10 s 变性、50 °C 30 s 退火、72 °C 1 min 退火,35 个循环;72 °C 2 min 最终延伸。PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,置于紫外凝胶成像仪下观察,阳性菌株确证为 MRSA。

表 1 mec A 基因和 SCC mec 分型引物序列表

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	目的基因
MecA147	F: GTGAAGATATACCAAGTGATT R: ATGCGCTATAGATTGAAAGGA	147	mec A
Type I	F: GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG R: GTTCTCTCATAGTATGACGCTCC	613	SCCmec I
Type II	F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGCTTAATGACCC	398	SCCmec II
Type III	F: CCATATTGCTACGATGCC R: CCTTAGTGTGCTAACAGATCG	280	SCCmec III
Type IVa	F: GCCTTATTGGAAGAAACCG R: CTACTCTCTGAAAGCGCTCC	776	SCCmec IVa
Type IVb	F: TCTGGAATTACTTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC	493	SCCmec IVb
Type IVc	F: ACAATATTGCTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGTATTGCTGG	200	SCCmec IVc
Type IVd	F: CTCAAAATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAAG	881	SCCmec IVd
Type V	F: GAACATGTTACTTAAATGAGCG R: TGAAGTGTACCCTTGACACC	325	SCCmec V

1.3.4 SCC mec 分型 采用多重 PCR 方法对模板

DNA 进行 SCC mec 分型,各引物序列参考文献[7] 见表 1。反应体系为 25 μl ,包括 2 × QIAGEN Mltiplex PCR Master Mix 12.5 μl ,引物混合液(2 μmol /L) 2.5 μl 模板 DNA 4 μl ,无菌去离子水 6 μl 。反应条件为 95 °C 15 min 预变性;94 °C 30 s 变性、57 °C 90 s 退火、72 °C 90 s 延伸,35 个循环;72 °C 2 min 最终延伸。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,置于紫外凝胶成像仪下观察结果。

1.3.5 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS) 同源性分析 菌株复苏后接种在哥伦比亚血平板上 37 °C 培养箱培养 16 ~ 18 h ,无菌接种环挑取少量菌落厚薄均匀涂布于靶板上,在菌膜未干燥时用 1 μl CHCA 基质液均匀覆盖菌膜表面,自然晾干后置于 Vitek MS 质谱仪上采用 RUO 模式检测。通过 LaunchPad 获得质谱,结果实时发送至 SARAMIS ,并通过 VITEK MS SARAMIS Premium 软件查看。将获得的图谱导入图谱数据库进行聚类分析,相似度 < 70% 的结果认为是不同的质谱型别。

1.4 统计学处理 采用 WHONET 5.6 软件分析药物敏感性试验结果,SPSS 19.0 进行数据统计分析,卡方检验确切概率法比较不同 SCC mec 类型 MRSA 耐药率的差异, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SSTI 患者一般临床资料 44 例 SSTI 患者中男性 30 例,女性 14 例,男女比例为 2.1 : 1。年龄为 10 个月 ~ 80 岁,平均(42.59 ± 21.96) 岁,感染类型中术后切口感染 17 例(38.63%)、烧伤感染 14 例(31.82%)、皮疹和皮肤脓疱疮 7 例(15.90%)、外伤创面感染 3 例(6.82%)、骨髓炎 2 例(4.54%)、受压区压疮 1 例(2.27%)。

2.2 mecA 基因检测结果 44 株 MRSA 进行经 PCR 扩增后 mecA 基因均为阳性,结果见图 1。

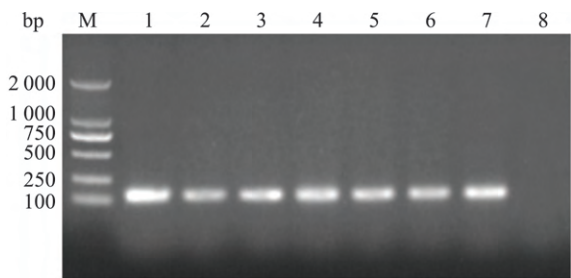


图 1 mecA 检测结果

M: GL DNA Marker 2000; 1 ~ 6: 随机抽取的菌株标本; 7: 阳性质控 ATCC43300; 8: 阴性质控 ATCC25923

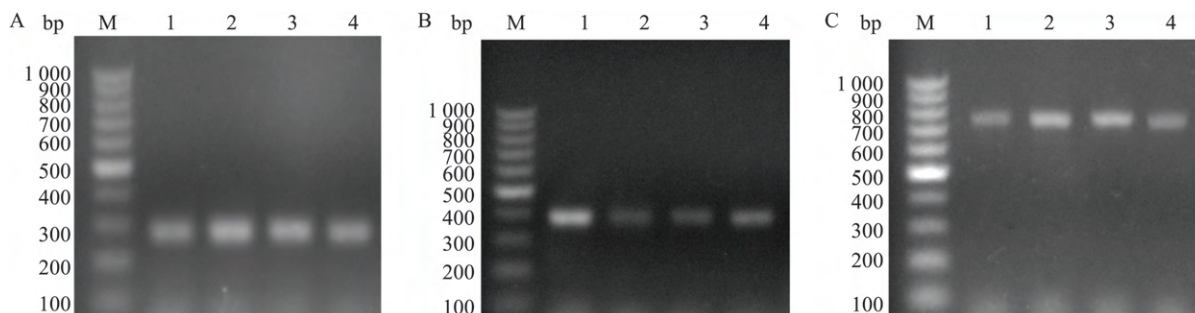


图2 SCC mec 检测结果

A、B、C: SCC mec Ⅲ、Ⅱ、Ⅳa 型电泳条带; M: GL DNA Marker 1000; 1~4: 各型别随机抽取的4 株标本

表2 不同相似区间的菌株科室分布表

相似度区间(%)	菌株数(株)	病区分布
100	7	烧伤科 2 株; 显微修复外科 2 株; 骨科 1 株; 皮肤科 1 株; ICU 1 株
90~100	16	烧伤科 11 株; 皮肤科 3 株; 显微修复外科 1 株; 脊柱外科 1 株
80~90	11	烧伤科 5 株; 骨科 2 株; 胃肠外科 1 株; 皮肤科 1 株; 泌尿外科 1 株; 肾脏内科 1 株
70~80	9	烧伤科 7 株; 骨科 1 株; 风湿免疫科 1 株
< 70	1	烧伤科 1 株

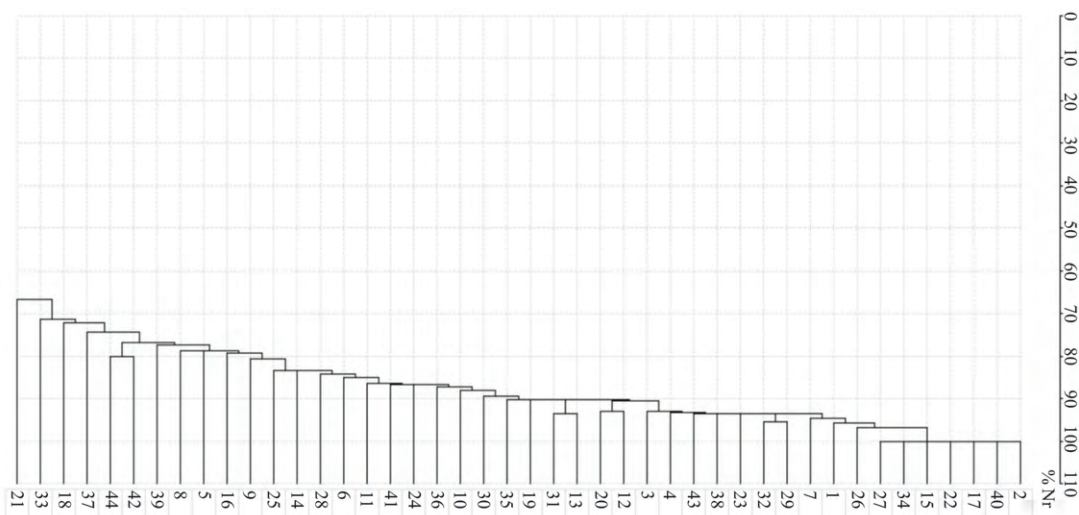


图3 44 株 MRSAMALDI-TOF MS 同源性分析

2.3 SCC mec 分型结果 经过多重 PCR 扩增后共分出 Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ a 三种类型。其中 Ⅱ 型 5 株 (11.36%)、Ⅲ 型 12 株 (27.27%)、Ⅳ a 型 8 株 (18.18%)、未分型 19 株 (43.18%) ,各分型电泳结果见图 2。已分型的 25 株 MRSA 中包含 22 株 HA-MRSA 和 3 株 CA-MRSA ,HA-MRSA 中 Ⅱ 型 5 株 (22.73%)、Ⅲ 型 11 株 (50.00%)、Ⅳ a 型 6 株 (27.27%) ,CA-MRSA 中 Ⅲ 型 1 株 (33.33%)、Ⅳ a 型 2 株 (66.67%)。

2.4 MALDI-TOF MS 同源性分析 通过 VITEK MS SARAMIS Premium 软件对 44 株 MRSA 的蛋白

图谱进行聚类分析并构建发育树。根据各菌株间相似度小于 70% 为不同类型的标准进行判别 ,44 株 MRSA 分为两大簇; 21 号菌株为一簇 ,其他 43 株标本为另一簇 结果见图 3 ,其中不同相似度的菌株科室分布见表 2。

2.5 不同 SCC mec 类型的 MRSA 耐药结果 不同 SCC mec 类型 MRSA 对青霉素、苯唑西林、头孢西丁等 β-内酰胺类抗生素均表现为耐药 ,对利奈唑胺和万古霉素均表现出敏感。3 种类型的 MRSA 对环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素和莫西沙星的耐药率差异有统计学意义。见表 3。

表3 不同 SCCmec 类型 MRSA 的耐药率(%)

抗菌药物	SCCmec II (5株) 耐药率	SCCmec III (12株) 耐药率	SCCmec IVa (8株) 耐药率	χ^2 值	P 值
青霉素	100.0	100.0	100.0	-	-
苯唑西林	100.0	100.0	100.0	-	-
头孢西丁	100.0	100.0	100.0	-	-
红霉素	60.0	100.0	75.0	4.911	0.085 8
克林霉素	60.0	100.0	75.0	4.911	0.085 8
四环素	60.0	75.0	25.0	4.911	0.085 8
环丙沙星	60.0	75.0	12.5	7.672	0.021 6
左氧氟沙星	60.0	75.0	12.5	7.672	0.021 6
庆大霉素	40.0	75.0	0	11.000	0.004 1
复方新诺明	0	8.3	0	1.128	0.568 8
莫西沙星	40.0	75.0	0	11.000	0.004 1
利奈唑胺	0	0	0	-	-
万古霉素	0	0	0	-	-

3 讨论

本研究 44 例住院患者中 38.63% 为术后切口, 38.63% 为烧伤感染, 主要由于皮肤屏障破坏, 创面微环境形成了感染的温床, 部分患者同时存在免疫力低下、糖尿病、慢性肾功能不全等高危因素。早期识别 MRSA SSTI 的高危人群并采取合理的治疗措施至关重要。

SCCmec 基因目前主要分为 I ~ V 型, 本研究结果以 III 型 (27.27%) 为主, 其次为 IV a 型 (18.18%) 和 II 型 (11.36%), 与国内相关文献^[8]报道一致。但国内部分地区和日本以 II 型为主^[9-10], 说明不同国家和地区有较大的差异。本研究中未分型菌株占 43.18%, 高于国内部分报道^[9,11], 可能与以下原因有关: ① 由于部分菌株保存条件不当导致耐药基因缺失; ② 随着不同抗菌药物的使用导致 SCCmec 出现新的型别或者亚型, 目前实验条件尚未检测到, 需要实验进一步验证。

本研究中共有 HA-MRSA 40 株, CA-MRSA 4 株, 说明本院以 HA-MRSA 感染为主。虽然研究^[12]表明 HA-MRSA 以 SCCmec I - III 型居多, CA-MRSA 以 SCCmec IV、V 型居多, 但本院 SSTI 患者中 HA-MRSA IV a 型的比例 (27.27%) 超过了 II 型 (22.73%), CA-MRSA 中也出现了 III 型 (33.33%), 可见随着患者在社区和医院之间不断流动, HA-MRSA 与 CA-MRSA 差异逐渐缩小。我国也有文献^[13]报道由 IV、V 型引起的医院获得性感染正逐年增加, 有超过由 III 型引起医院获得性感染的趋势。其机制尚不明确, 可能和以下原因有关: ① IV、V 型携带的耐药基因小, 更容易对抗生素做出适应性改变; ②

IV、V 型更有可能携带杀白细胞素 (PVL) 基因; ③ IV、V 型和 I - III 型菌株相比, 可表达更高水平的 RNA III, 它是辅助基因调节系统 (Agr) 效应器, 调节多种毒素的表达, 在未接触抗生素的情况下保持毒力, 接触抗生素后可用 Agr 活性来换取对甲氧西林的耐药性^[14]。

本研究显示 SCCmec III 型和 II 型总体耐药率较高, IV a 型相对较低, 三种类型的 MRSA 对环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素和莫西沙星的耐药率差异均有统计学意义。原因是 II 型和 III 型由于分子结构长, 携带多种耐药基因呈多重耐药性, 而 HA-MRSA 中的 IV 型除 mecA 以外携带其他耐药基因较少^[15]。

本研究采用 MALDI-TOF MS 进行同源性分析, 将 44 株 MRSA 分为两大簇, 其中 43 株均在一簇, 仅 21 号菌株在另一簇, 表明本院 SSTI 患者中的 MRSA 具有高度同源性。本研究中有 7 株 MRSA 相似度达到 100%, 并分布在不同病区, 说明可能存在同一菌株在不同病区之间相互传播。从表 2 可以看出在不同相似区间, 来自烧伤科的菌株均多于其他病区, 因此烧伤科更应提高医务人员和患者控制感染的意识, 严格执行消毒隔离制度, 加强病区病原菌监测, 避免细菌院内爆发感染。

4 株 CA-MRSA 编号分别为 33、14、29、3, 其中 33 号菌株在 70% ~ 80% 相似区间, 14 号菌株在 80% ~ 90% 相似区间, 29 号和 3 号菌株在 90% ~ 100% 相似区间。查阅病史 29 号、3 号菌株患者近两个月均有规律的医疗机构接触史, 可能是造成与 HA-MRSA 菌株相似度较高的原因。MALDI-TOF MS 技术是基于蛋白质水平对菌株鉴定分析, 对不同菌株间同源性分析迅速, 为判断是否发生院内感染提供依据。但其检测受多种因素影响, 目前利用 MALDI-TOF MS 进行同源性分析仍属于研究阶段。脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型通过检测染色体上所有酶切位点的变化反映全部基因的相关性, 被认为是基因分型的“金标准”^[16]。本研究中利用 MALDI-TOF MS 同源性分析后期仍需要 PFGE 分型验证, 以便进一步探讨 MALDI-TOF MS 技术在细菌同源性分析中的价值。

参考文献

[1] Sartelli M, Guirao X, Hardcastle T C, et al. 2018 WSES/SIS-E consensus conference: recommendations for the management of skin and soft-tissue infections [J]. *World J Emerg Surg*, 2018, 13: 58.
 [2] Psounos C M, Flahive J M, Shaw J J, et al. Contemporary trends

- in necrotizing soft-tissue infections in the United States [J]. *Surgery*, 2013, 153(6): 819–27.
- [3] Kaku N, Ohnishi T, Matsumoto T, et al. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from skin and soft tissue infections collected in the Japanese nationwide surveillance [J]. *J Dermatol*, 2019, 46(12): 1205–9.
- [4] Ito T, Okuma K, Ma X X, et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC [J]. *Drug Resist Updat*, 2003, 6(1): 41–52.
- [5] 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* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(5): 1323–36.
- [6] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家委员会. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识 2011 年更新版 [S]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2011, 5(3): 372–84.
- [7] Zhang K, McClure J A, 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): 5026–33.
- [8] 夏小荣, 熊玉玲, 朱玉林, 等. 85 株儿童感染金黄色葡萄球菌耐药性及流行病学研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(4): 574–8.
- [9] 张宇琼, 张仪, 陆文香, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 SCCmec 分型和耐药特点以及同源性分析 [J]. 现代预防医学, 2018, 45(1): 113–8.
- [10] Yamaguchi T, Ono D, Sato A. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2069: 59–78.
- [11] 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): 159–62.
- [12] Nakaminami H, Sugiyama T, Okamura Y, et al. Comparative analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from outpatients of dermatology unit in hospitals and clinics [J]. *J Infect Chemother*, 2019, 25(3): 233–7.
- [13] Yang X, Liu Y, Wang L, et al. Clonal and drug resistance dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric populations in China [J]. *Pediatr Investig*, 2019, 3(2): 72–80.
- [14] Painter K L, Krishna A, Wigneshweraraj S, et al. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22(12): 676–85.
- [15] Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, et al. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *Infect Chemother*, 2013, 45(2): 117–36.
- [16] Aguadero V, González Velasco C, Vindel A, et al. Evaluation of rep-PCR/DiversiLab versus PFGE and spa typing in genotyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Br J Biomed Sci*, 2015, 72(3): 120–7.

SCC mec typing and homology analysis of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in skin and soft tissue infection

Wang Xuanxuan, Huang Ying, Hu Yuanyuan, et al

(Dept of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from patients with skin and soft tissue infection (SSTI), and to analyze the homology of staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec), so as to provide laboratory basis for standardizing the rational use of antibiotics and nosocomial infection control. **Methods** 44 strains of MRSA isolated from patients with SSTI were tested for antimicrobial susceptibility by K-B method and Vitek 2 Compact instrument. MecA gene was detected by ordinary PCR, SCC mec genotyping was performed by multiplex PCR, and homology was analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Results** Mec A gene was detected in all 44 MRSA strains by common PCR detection. Three SCC mec genotypes of II, III and IVa were identified by multiple PCR, including 5 strains of type II (11.36%), 12 strains of type III (27.27%), 8 strains of type IVa (18.18%) and 19 strains of untyped type (43.18%). 44 MRSA strains were divided into two clusters by MALDI-TOF MS. **Conclusion** The main type of MRSA isolated from SSTI patients is SCCmec III type. Through the combination of SCCmec genotyping and MALDI-TOF MS technology, it provides a basis for homology analysis among different strains and understands the molecular biology and epidemiological characteristics of MRSA in specific areas.

Key words methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; SCC mec typing; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; homology analysis