

儿童感染 MRCNS 的药敏分析及 *SCCmec* 基因分型研究

熊玉玲, 夏小荣, 朱玉林, 李长春, 王亚亭

摘要 目的 了解安徽地区儿童感染耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)的耐药现状和葡萄球菌盒式染色体(*SCCmec*)基因型分布及各基因型的耐药特点。方法 对安徽地区近6年临床分离的儿童感染凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)进行表型筛选,并利用聚合酶链反应(PCR)扩增*mecA*的方法收集MRCNS菌株。采用标准琼脂倍比稀释法测定MRCNS 16种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)值,同时利用PCR对MRCNS进行*SCCmec*基因分型。结果 经表型筛选及*mecA*基因检测双重方法共收集MRCNS 186株,包括耐甲氧西林表皮葡萄球菌、耐甲氧西林溶血葡萄球菌、耐甲氧西林人葡萄球菌及少数其他类型MRCNS,分别为45.7%(85/186)、24.7%(46/186)、18.8%(35/186)及10.8%(20/186)。耐药分析显示MRCNS对青霉素、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢曲松、亚胺培南、美罗培南耐药率达100%,红霉素和阿奇霉素的耐药率大多在90%以上,对环丙沙星、克林霉素耐药率为80%左右,对庆大霉素、左氧氟沙星的耐药率为40%左右,对利福平的耐药率为20%左右,对氯霉素的耐药率为10%左右,对替考拉宁、万古霉素的耐药率分别为2.2%(4/186)、0.5%(1/186)。186株MRCNS的*SCCmec*分型共有I~V 5种亚型,以III型为主,IV型检出IVa、IVc、IVd 3种亚型,并有较多的混合型存在。各基因型对多种抗菌药物呈不同程度的耐药。结论 安徽地区临床分离的儿童MRCNS对多种常用抗菌药物不敏感,具有多重耐药性,其中出现万古霉素表型耐药菌株,应予警惕。不同类型的MRCNS所携带的*SCCmec*型别不同,*SCCmec* III型为主要流行菌株。*SCCmec*基因型与耐药谱有着密切的关系。

关键词 儿童;耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌;耐药性;聚合酶链反应;*SCCmec*基因型

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1430-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.008

凝固酶阴性葡萄球菌(*coagulase negative Staphylococcus*, CNS)属于革兰阳性球菌的重要一员,因不能产生血浆凝固酶和溶血素等物质一直被认为是

皮肤黏膜的正常菌群或者机会致病菌。近年来,随着分子生物学材料领域的迅速发展,许多侵入性诊疗技术以及新的高效广谱抗菌药物、激素、免疫抑制剂在儿科临床中的广泛应用,由CNS造成的感染日趋严重,成为医院感染的重要病原菌^[1-2]。国内外资料^[3]显示CNS是儿科感染最常见的病原菌,尤其是新生儿、早产儿、低出生体重儿败血症的常见病原菌,其中耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(*methicillin resistant coagulase negative Staphylococcus*, MRCNS)占主导地位。儿童MRCNS的检出率和多重耐药性呈逐年增高趋势,已成为儿科感染和临床治疗的重要问题。葡萄球菌盒式染色体*mec*(*Staphylococcal chromosomal cassette mec*, *SCCmec*)是携带*mecA*基因的新型移动基因元件,主要由携带*mecA*基因的*mec*基因复合体、编码位点特异性重组酶的盒式染色体重组酶基因复合物以及功能未知的可变区域构成,具有自发剔除、重组的特性,是葡萄球菌耐药性产生、耐药谱扩大的根本原因^[4]。该研究对安徽地区近6年儿童感染MRCNS菌株进行*SCCmec*基因分型研究,为了解菌株来源、流行趋势和临床合理选用抗菌药物以及制定MRCNS感染的防治措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源及鉴定 收集安徽省细菌耐药监测中心38所医院近6年住院患儿的各种临床送检血液标本无重复分离的MRCNS共186株。全部菌株已由Microscan WalkAway-40全自动微生物分析仪(美国DADE公司)自动鉴定系统初步鉴定,经表型筛选后由聚合酶链反应(*polymerase chain reaction*, PCR)扩增甲氧西林耐药基因*mecA*而确定为MRCNS。质控菌株ATCC43300、ATCC25923和ATCC29213由安徽省细菌耐药监控中心保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

1.1.2.1 试剂 dNTP Mixture、Taq Buffer、DL 600 DNA Marker、DL 2 000 DNA Marker、6×Loading Buffer、琼脂糖、PCR反应引物均购自上海生工生物工程

2016-05-30 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085QH157)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

作者简介:熊玉玲,女,硕士研究生;

王亚亭,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: wangyating1348@126.com

公司; 溴化乙锭干粉、溶葡萄球菌素(SIGMA) 购自大连宝生物公司; Mueller-Hinton(M-H) 培养基、琼脂粉均购自英国 Oxoid 公司。

1.1.2.2 抗菌药物 用于 MIC 测定的抗菌药物: 苯唑西林、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢曲松、庆大霉素、氯霉素、克林霉素、红霉素、阿奇霉素、青霉素、亚胺培南、美罗培南、环丙沙星、左氧氟沙星、万古霉素、替考拉宁、利福平共 17 种, 均购自中国药品生物制品检定所, 均在有效期内使用。

1.1.2.3 仪器 多点接种仪(英国 AQS Manufacturing 公司); 电热恒温培养箱(上海精宏公司); 32R 低温离心机(德国 Hettich 公司); 电子天平(上海名桥精密科学仪器公司); 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); PCR 仪器(德国 Biometra 公司); 电泳仪加电泳槽(北京六一仪器厂); 超低温冰箱(日本三洋制冷设备公司); 纯水机(美国 Labconco 公司); 移液器(德国 Eppendorf 公司); 一次性玻璃试管、PCR 管、EP 管、一次性细菌培养皿(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.1.3 PCR 引物 参照文献^[5]报道设计 PCR 引物序列, 并在 Pubmed 上进行 BLAST 基因序列比对, 委托上海生工生物工程技术有限公司合成, 见表 1。

表 1 *SCCmec* 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
<i>SCCmec</i> I	F: GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG R: GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	613
<i>SCCmec</i> II	F: CGTTGAAGATGATGAAGCG R: CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398
<i>SCCmec</i> III	F: CGATATTGTGTACGATGCG R: CCTTAGTTGCTGTAACAGATCG	280
<i>SCCmec</i> IV ^a	F: GCCTTATTCGAAGAAACCG R: CTACTCTTCTGAAAAGCGTCG	776
<i>SCCmec</i> IV ^b	F: TCTGGAATTACTTCAGCTGC R: AAACAATATTGCTCTCCCTC	493
<i>SCCmec</i> IV ^c	F: ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC R: TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200
<i>SCCmec</i> IV ^d	F: CTCAAAATACGGACCCCAATACA R: TGCTCCAGTAATTGCTAAAAG	881
<i>SCCmec</i> V	F: GAACATTGTTACTTAATGAGCG R: TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325
<i>mecA</i>	F: GTGAAGATATACCAAGTGATT R: ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT	147

1.2 方法

1.2.1 表型筛选 MRCNS 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI) 2013 推荐的表型筛选耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus*

aureus, MRSA) 的方法, 用标准琼脂倍比稀释法进行苯唑西林最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC) 值的测定及结果判读, 若苯唑西林 MIC 值 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$, 则初筛该菌株为 MRCNS, 对初筛的 MRCNS 再进行 *mecA* 基因检测, 两种检测方法均为阳性者确定为 MRCNS 菌株。

1.2.2 DNA 模板的提取 将平板上的经 16~18 h 过夜培养的新鲜 MRCNS(经表型筛选后) 单个菌落, 加入 200 μl 灭菌去离子水和适量葡萄球菌溶菌素, 混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10~15 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液作为 PCR 扩增反应模板, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 PCR 法鉴定 MRCNS PCR 反应在 0.5 ml 薄壁管中进行, 总反应体积为 25 μl : 10 mmol/L dNTP 0.5 μl , 10 pmol/L 上下游引物(表 1) 各 1 μl , 10 \times PCR buffer 2.5 μl , 模板 DNA 1 μl , TaqDNA 聚合酶 0.5 U(5 U/ μl) 25 mmol/L MgCl_2 1.5 μl , 最后灭菌去离子水补齐至 25 μl 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后进入 PCR 循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 每次用标准株 ATCC43300 作阳性对照。将 5 μl PCR 扩增产物和 1 μl 6 \times Loading Buffer 混匀后, 加在 1% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭和 1 \times TAE) 上, 电泳电压为 120 V, 电流为 80 mA, 30 min, 凝胶成像分析系统摄像, 保存结果。对于 147 bp 处有明亮条带者判定为 MRCNS, 阴性菌株重复试验 1 次。

1.2.4 MRCNS 药敏试验 采用标准琼脂倍比稀释法对 MRCNS 进行 MIC 值的测定和结果判读。以 ATCC29213、ATCC25923 为质控标准株, 质控标准菌株对各种抗菌药物药敏结果均在 CLSI2013 规定的范围内。

1.2.5 MRCNS 的 *SCCmec* 基因分型 对明确为 MRCNS 的菌株进行 *SCCmec* 基因分型, 反应体系及反应条件同 1.2.3, PCR 扩增产物经电泳后, 凝胶成像分析系统摄像, 分析并保存结果。对阴性菌株重复试验 1 次。

1.2.6 扩增产物的测序和分析 PCR 产物委托上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 所得测序结果在 Pubmed 中进行 BLAST 基因序列比对。

2 结果

2.1 MRCNS 种类分布及检出率 186 株 MRCNS 经表型筛选及 PCR 检测 *mecA* 均为阳性, 其中包括

耐甲氧西林表皮葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*, MRSE) 85 株、耐甲氧西林溶血葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus haemolyticus*, MRSH) 46 株、耐甲氧西林人葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus hominis*, MRSHo) 35 株、耐甲氧西林木糖葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus xylosus*, MRSX) 6 株、耐甲氧西林松鼠葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus sciuri*, MRSSc) 4 株、耐甲氧西林模仿葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus simulans*, MRSSi) 4 株、耐甲氧西林华纳葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus warneri*, MRSW) 3 株、耐甲氧西林腐生葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus saprophyticus*, MRSSa) 1 株、耐甲氧西林耳葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus auricularis*, MRAS) 1 株、耐甲氧西林头状葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus capitis*, MRSCa) 1 株, MRCNS 分类构成比见表 2。

2.2 MRCNS 耐药性分析 MRCNS 对 16 种常见抗菌药物耐药率见表 3。1 株携带 *mecA* 基因的万古霉素表型耐药菌株, 其对除利福平、左氧氟沙星等多种抗菌药物耐药。

2.3 MRCNS 的 *SCCmec* 基因分型 186 株 MRCNS 的 *mecA* 基因均为阳性, 共检出 I ~ V 5 种型别, IV 型检出 IV a、IV c、IV d 3 种亚型, 电泳结果见图 1。不同类型的 MRCNS 所携带的 *SCCmec* 型别检出结果见表 4。

表 2 MRCNS 分类构成比

病原菌	株数(n)	构成比(%)
MRSE	85	45.7
MRSH	46	24.7
MRSHo	35	18.8
MRSX	6	3.2
MRSSc	4	2.2
MRSSi	4	2.2
MRSW	3	1.6
MRSSa	1	0.5
MRAS	1	0.5
MRSCa	1	0.5
合计	186	100.0

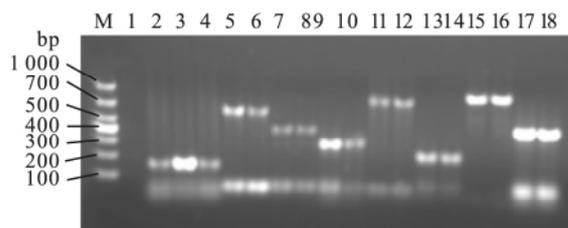


图 1 *mecA* 与 *SCCmec* 基因扩增产物电泳结果

M: Marker; 1: ATCC29213; 2: ATCC43300; 3 ~ 4: *mecA*; 5 ~ 6: *SCCmec* I; 7 ~ 8: *SCCmec* II; 9 ~ 10: *SCCmec* III; 11 ~ 12: *SCCmec* IV a; 13 ~ 14: *SCCmec* IV c; 15 ~ 16: *SCCmec* IV d; 17 ~ 18: *SCCmec* V

2.4 MRCNS 不同 *SCCmec* 型别的耐药率 所有型别对青霉素、头孢噻肟、头孢哌酮、头孢曲松、美罗培南、亚胺培南、阿奇霉素、红霉素、克林霉素及环丙沙星的耐药率均很高; 除个别 III 型和混合型外, 所有型别对替考拉宁和万古霉素敏感; I、II、III、混合

表 3 148 株儿童 MRCNS 对 16 种抗生素的耐药率 [n(%)]

抗菌药物	MRCNS 菌株											总计
	MRSE (n = 85)	MRSH (n = 46)	MRSHo (n = 35)	MRSX (n = 6)	MRSSc (n = 4)	MRSSi (n = 4)	MRSW (n = 3)	MRSSa (n = 1)	MRAS (n = 1)	MRSCa (n = 1)	(n = 186)	
青霉素	85(100.0)	46(100.0)	35(100.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	186(100.0)	
头孢哌酮	85(100.0)	46(100.0)	35(100.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	186(100.0)	
头孢噻肟	85(100.0)	46(100.0)	35(100.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	186(100.0)	
头孢曲松	85(100.0)	46(100.0)	35(100.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	186(100.0)	
亚胺培南	85(100.0)	46(100.0)	35(100.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	186(100.0)	
美罗培南	85(100.0)	46(100.0)	35(100.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	186(100.0)	
红霉素	80(94.1)	42(91.3)	33(94.3)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	175(94.1)	
阿奇霉素	82(96.5)	46(100.0)	35(100.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	3(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	183(98.4)	
环丙沙星	75(88.2)	39(84.8)	29(82.9)	4(66.7)	4(100.0)	2(66.7)	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	154(82.8)	
左氧氟沙星	30(35.3)	18(39.1)	15(42.9)	2(33.3)	1(25.0)	1(25.0)	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	68(36.6)	
利福平	26(30.6)	6(13.0)	11(31.4)	2(33.3)	1(25.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	47(25.3)	
克林霉素	68(80.0)	36(78.3)	28(80.0)	6(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	2(66.7)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	151(81.2)	
氯霉素	10(11.7)	7(15.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(25.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	18(9.7)	
庆大霉素	35(41.2)	21(45.7)	15(42.9)	1(16.6)	0(0.0)	2(50.0)	2(66.7)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	79(42.5)	
替考拉宁	2(1.1)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.2)	
万古霉素	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	

表4 SCCmec 基因分布结果[n(%)]

菌株	SCCmec 基因分型								
	I	II	III	IV ^a	IV ^c	IV ^d	V	混合型	未分型
MRSE(n = 85)	4(4. 7)	2(2. 4)	40(47. 1)	4(4. 7)	1(1. 5)	-	1(1. 5)	23(27. 1)	10(11. 8)
MRSH(n = 46)	1(2. 2)	-	25(54. 3)	1(2. 2)	-	1(2. 2)	-	9(19. 6)	9(19. 6)
MRSHo(n = 35)	3(8. 6)	2(5. 7)	21(60. 0)	2(6. 9)	-	1(3. 4)	2(6. 9)	2(6. 9)	2(5. 7)
MRSX(n = 6)	-	1(16. 7)	3(50. 0)	-	-	-	-	-	2(33. 3)
MRSSc(n = 4)	-	-	1(25. 0)	-	-	-	-	1(25. 0)	2(75. 0)
MRSSi(n = 4)	-	1(25. 0)	1(25. 0)	-	-	-	-	1(25. 0)	1(25. 0)
MRSW(n = 3)	-	-	2(66. 7)	-	-	-	-	-	1(50. 0)
MRSSa(n = 1)	-	-	1(100. 0)	-	-	-	-	-	-
MRAS(n = 1)	-	1(100. 0)	-	-	-	-	-	-	-
MRSCa(n = 1)	-	-	-	-	-	-	1(100. 0)	-	-
总计(n = 186)	8(4. 3)	7(3. 8)	94(50. 5)	7(3. 8)	1(0. 5)	2(1. 1)	4(2. 2)	36(19. 4)	27(14. 5)

表5 MRCNS 不同 SCCmec 基因型的耐药率[n(%)]

抗菌药物	SCCmec 型别									总计
	I (n = 8)	II (n = 7)	III (n = 94)	IV ^a (n = 7)	IV ^c (n = 1)	IV ^d (n = 2)	V (n = 4)	混合型 (n = 36)	未分型 (n = 27)	
青霉素	8(100. 0)	7(100. 0)	94(100. 0)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	4(100. 0)	36(100. 0)	27(100. 0)	186(100. 0)
头孢唑酮	8(100. 0)	7(100. 0)	94(100. 0)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	4(100. 0)	36(100. 0)	27(100. 0)	186(100. 0)
头孢噻肟	8(100. 0)	7(100. 0)	94(100. 0)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	4(100. 0)	36(100. 0)	27(100. 0)	186(100. 0)
头孢曲松	8(100. 0)	7(100. 0)	94(100. 0)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	4(100. 0)	36(100. 0)	27(100. 0)	186(100. 0)
亚胺培南	8(100. 0)	7(100. 0)	94(100. 0)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	4(100. 0)	36(100. 0)	27(100. 0)	186(100. 0)
美罗培南	8(100. 0)	7(100. 0)	94(100. 0)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	4(100. 0)	36(100. 0)	27(100. 0)	186(100. 0)
红霉素	7(87. 5)	6(85. 7)	90(95. 7)	6(85. 7)	1(100. 0)	2(100. 0)	3(75. 0)	35(97. 2)	25(92. 6)	175(94. 1)
阿奇霉素	8(100. 0)	7(100. 0)	93(98. 9)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	4(100. 0)	34(94. 4)	27(100. 0)	183(98. 4)
环丙沙星	6(75. 0)	7(100. 0)	78(83. 0)	3(42. 9)	1(100. 0)	1(50. 0)	3(75. 0)	32(88. 9)	23(85. 2)	154(82. 8)
左氧氟沙星	3(37. 5)	1(14. 3)	36(38. 3)	3(42. 9)	0(0. 0)	1(50. 0)	1(25. 0)	13(36. 1)	10(37. 0)	68(36. 6)
利福平	0(0. 0)	2(28. 6)	25(26. 6)	3(42. 9)	0(0. 0)	1(50. 0)	1(25. 0)	11(30. 6)	4(14. 8)	47(25. 3)
克林霉素	5(62. 5)	7(100. 0)	76(80. 9)	7(100. 0)	1(100. 0)	2(100. 0)	3(75. 0)	30(83. 3)	20(74. 1)	151(81. 2)
氯霉素	0(0. 0)	0(0. 0)	8(8. 5)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	5(13. 9)	5(18. 5)	18(9. 7)
庆大霉素	4(50. 0)	4(57. 1)	37(39. 4)	3(42. 9)	0(0. 0)	1(50. 0)	3(75. 0)	13(36. 1)	14(51. 9)	79(42. 5)
替考拉宁	0(0. 0)	0(0. 0)	3(3. 2)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	1(2. 8)	0(0. 0)	4(2. 2)
万古霉素	0(0. 0)	0(0. 0)	1(1. 1)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	0(0. 0)	1(0. 5)

型及未分型对利福平、左氧氟沙星、庆大霉素均有不同程度的耐药,且耐药率高于IV、V型; I、II、IV、V未发现氯霉素耐药菌株,见表5。

3 讨论

近年来,我国儿童MRCNS的多数资料集中在75%左右^[2,6]。儿童MRCNS的检出率和多重耐药性呈逐年增高趋势,因其毒力低、侵袭力弱、患儿感染后症状不典型等特点,给临床诊断和治疗带来一定困难。MRCNS不仅对于所有耐酶青霉素如甲氧西林、苯唑西林、氯唑西林耐药,而且对包括各类广谱青霉素和头孢类(如头孢曲松、头孢噻肟、头孢美唑、头孢唑酮等)、氨基糖苷类(如链霉素、庆大霉素等)、大环内酯类、喹诺酮类、碳青霉烯类(如亚胺培南、美罗培南等)、利福平均具有不同程度的耐

药^[7]。MRCNS的耐药性来源,一方面是固有耐药性,这是由染色体介导的;另一方面是获得耐药性,这与质粒产生的 β -内酰胺酶有关,细菌之间传递耐药基因,很多靠质粒来完成,即在葡萄球菌菌属之间通过质粒传递耐药基因,使耐药基因扩大而产生耐药;此外,生物膜的形成和主动外排系统与MRCNS的耐药性有密切关系^[8-9]。本研究分离的儿童MRCNS菌株同样对多种抗菌药物耐药。如MRCNS对青霉素、头孢噻肟、头孢唑酮、头孢曲松、阿奇霉素、红霉素、克林霉素、美罗培南、亚胺培南的耐药性均很高,达90%~100%,一定程度上反应了 β -内酰胺类抗菌药物、三代头孢类抗菌药物、大环内酯类抗菌药物、林可霉素类抗菌药物及碳青霉烯类抗菌药物在临床的广泛应用;相对而言,对左氧氟沙星、庆大霉素、氯霉素及利福平的耐药性较低,可能与其对儿童生长发育有较多的不良反应有关;例如,左氧氟

沙星易引起钙流失,长期使用会导致儿童软骨病发生;庆大霉素会影响儿童脑神经发育,导致听力下降;长期大剂量地使用氯霉素会对儿童骨髓造血系统产生抑制;利福平对儿童的肝功能有严重损害。也可能与单独使用这些抗菌药物易产生耐药等因素有关,所以这些药较少应用于儿科临床治疗。糖肽类抗菌药物如替考拉宁、万古霉素作为 MRCNS 治疗的最后防线,本研究显示其表型耐药菌株,考虑可能是因儿童特殊的生理特点及对多种抗菌药物的不良反应,限制很多药物的使用,而万古霉素有效的临床应用先例,使其在儿科领域广泛应用,给儿童 MRCNS 的治疗带来潜在的威胁。因此,为控制儿童 MRCNS 多重耐药率升高,对考虑败血症的患儿,临床医师宜早期进行血培养及加大抗菌药物使用前微生物标本的送检率,并依据药敏结果合理选用有效抗菌药物,以减少耐药菌株的产生和提高疗效。

SCCmec 是一种携带 *mecA* 基因的新型移动基因元件。在不同的 MRCNS 菌株中,因外源性耐药基因的转移、嫁接,以及不同 *SCCmec* 之间耐药基因的交换,造成 *SCCmec* 染色体基因序列突变、插入或缺失,使得 *mec* 基因簇、重组酶基因簇及可变区域出现结构上的差异,这种结构上差异性为 *SCCmec* 分型的分子生物学基础。目前国外采用分子生物学技术将 *SCCmec* 基因分成 I ~ VIII 8 种类型,每一型又包含不同亚型,如 IV 型包括 IV a、IV b、IV c、IV d 4 个亚型^[10-11]。*SCCmec* 可自主从染色体上切除,以适当方式重组于受体葡萄球菌染色体上,使其获得耐药性;*SCCmec* 使耐药基因在菌株间水平传播,从而导致耐药谱扩大和新的 *SCCmec* 型别的产生。*SCCmec* 的基因型与 MRCNS 流行背景有关,不同地区和遗传背景的克隆株携带 *SCCmec* 可能不同^[12-14]。本研究的 186 株 MRCNS 可扩增 I ~ V 5 种 *SCCmec* 基因型,IV 型可扩增出 IV a、IV c、IV d。安徽地区儿童 MRCNS 的 *SCCmec* 基因分型以 III 型为主要流行株,占 50.5% (94/186),同国内其他地区报道^[15-16] 结果一致;其次为 I、II 和 III 彼此之间或与其他各型混合,占 19.4% (36/186);剩余的 I、II、IV a、IV c、IV d 及 V 各型所占比例较少,分别为 4.3% (8/186)、3.8% (7/186)、3.8% (7/186)、0.5% (1/186)、1.1% (2/186) 及 2.2% (4/186)。但有 14.5% (27/186) 未能分型,可能由于 *SCCmec* 移动模块的变异率非常高,自身不断地发生突变、插入或缺失,造成了扩增引物区序列的变化,从而 PCR 检测的方法失败;也可能有其他耐药机制或者新的耐药基因的出现,尚不在本研究范围。

现,尚不在本研究范围。

SCCmec 基因型与耐药谱有着密切的关系,I、II、III 型由于基因序列较长,内含耐药基因的质粒或转座子,呈多重耐药性,常常表现对 β -内酰胺类、碳青霉烯类、氨基糖苷类、大环内酯类及氟喹诺酮类等抗菌药物耐药;而 IV、V 型除含 *mecA* 基因外,很少含有其他的耐药基因,对非 β -内酰胺类抗菌药物耐药率大多低于 I、II、III 型,这种耐药程度上的差异可以为临床治疗 MRCNS 提供依据。

综上所述,安徽地区近 6 年临床分离的儿童 MRCNS 具有多重耐药的特征,并存在万古霉素表型耐药菌株,儿科医师应提高感染患儿抗菌药物使用前微生物标本的送检率,尽可能根据药敏结果,合理选用有效抗菌药物。*SCCmec* III 型为主要流行株。因此,*SCCmec* 基因型别的确定,对制定儿童 MRCNS 感染预防和控制措施有重要意义。

参考文献

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-30.
- [2] 杨亚静,张砾,王莉,等. 2011 年度卫生部全国细菌耐药监测报告: 0 至 14 岁儿童细菌耐药监测[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(2): 83-8.
- [3] Pourakbari B, Sadr A, Ashtiani M T, et al. Five-year evaluation of the antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing bloodstream infections in Iran[J]. J Infect Dev Ctries 2012, 6(2): 120-5.
- [4] IWG-SCC. Classification of *staphylococcal* cassette chromosome *mec* (*SCCmec*) guidelines for repositing novel *SCCmec* elements[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 4961-7.
- [5] 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.
- [6] 旷凌寒,江咏梅,胡正强,等. 儿科血液病房血培养病原菌分布及耐药情况分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(4): 259-63.
- [7] Fritsche T R, Rennie R P, Goldstein B P, et al. Comparison of dalbavancin MIC values determined by Etest (AB BIODISK) and reference dilution methods using gram-positive organisms[J]. J Clin Microbiol 2006, 44(8): 2988-90.
- [8] 杨名保,邱书奇,柯朝阳. 细菌生物膜及其相关感染的研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5(9): 2575-6.
- [9] 金浩,顾兵,居会祥,等. 凝固酶阴性葡萄球菌主动外排基因 *MsrA* 的检测分析[J]. 南京医科大学学报, 2012, 32(5): 7135.
- [10] Oliveira D C, Milheirio C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of *staphylococcal* cassette chromosome *mec*, *SCCmec*

- type VI[J]. *Antimicrob Agents Chemother* ,2006 ,50(10) : 3457 -9.
- [11] Zhang K , McClure J A , Elsayed S , et al. Novel *staphylococcal* cassette chromosome *mec* type , tentatively designated type VIII , harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ,53(2) : 531 -40.
- [12] Valsesia G , Rossi M , Bertschy S , et al. Emergence of *SCCmec* Type IV and *SCCmec* Type V methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leukocidin genes in a large academic teaching hospital in central Switzerland: external invaders or persisting circulators? [J]. *J Clin Microbiol* ,2010 , 48 (3) : 720 -7.
- [13] Argudin M A , Fetsch A , Tenhagen B A , et al. High heterogeneity within methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolates , defined by macrorestriction-pulsed-field gel electrophoresis profiles and *spa* and *SCCmec* types [J]. *Appl Environ Microbiol* 2010 ,76 (3) : 652 -8.
- [14] Conceição T , Tavares A , Miragaia M , et al. Prevalence and clonality of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Atlantic Azores islands: predominance of *SCCmec* types IV , V and IV [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010 ,29 (5) : 543 -50.
- [15] 陈日炳 , 万彦彬 , 胡 琴 等. 深圳东部地区耐甲氧西林葡萄球菌 *SCCmec* 基因型分析 [J]. *国际检验医学杂志* ,2012 ,33(3) : 265 -7.
- [16] 王爱玲 , 纪 冰 , 宿振国 , 等. MRSA 的 *SCCmec* 分型研究及耐药性分析 [J]. *中国病原生物学杂志* ,2012 ,7(12) : 897 -900.

On antibiotic resistance and *SCCmec* molecular epidemiology of methicillin resistant coagulase negative *Staphylococci* in Children

Xiong Yuling , Xia Xiaorong , Zhu Yulin , et al

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

Abstract Objective To learn the drug resistance of methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus* (MRCNS) and to investigate the distribution and antimicrobial resistance of different MRCNS *SCCmec* genotyping from children in Anhui. **Methods** Resistance phenotype screening and Polymerase Chain Reaction (PCR) *mecA* gene detection were conducted in clinical strains of coagulase negative *Staphylococcus* , in order to collect MRCNS in recent six years from children in Anhui. Minimal inhibitory concentrations of 16 antibiotics were determined by agar dilution method , then *SCCmec* types were determined by PCR methods. **Results** A total of 186 MRCNS were detected by resistance phenotype screening and PCR *mecA* gene detection methods. There were 45.7% (85/186) methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* , 24.7% (46/186) methicillin resistant *Staphylococcus haemolyticus* , 18.8% (35/186) methicillin resistant *Staphylococcus hominis* , 10.7% (20/186) other types of MRCNS. Drug resistance analysis showed the resistance rates to penicillin , cefoperazone , cefotaxime , ceftriaxone , imipenem , and meropenem were 100% , to erythromycin and azithromycin were about 90% , to ciprofloxacin and clindamycin were about 80% , to gentamicin and levofloxacin were about 40% , to rifampicin was about 20% , to chloramphenicol , teicoplanin and vancomycin were 10% , 2.2% and 0.5% . I to V *SCCmec* genotypes were detected in 186 MRCNS , the major type was *SCCmec* type III . Three subtypes of IV genotype were identified , including IV a , IV c and IV d , the second type was hybrid type. Each genotype showed varying degrees of resistance to several antibiotics. **Conclusion** Clinical strains of children infected MRCNS isolated from Anhui have multiple resistances to commonly used antibiotics. It should be on alert that vancomycin phenotypic drug resistant strain appears. Different types of MRCNS carry different types of *SCCmec* , *SCCmec* III genotype is the major epidemic isolates. *SCCmec* genotype and drug resistance spectrum have a close relationship.

Key words children; methicillin resistant coagulase negative *Staphylococci*; drug resistance; polymerase chain reaction; *Staphylococcal* cassette chromosome *mec*