

社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌RAPD基因分型及药敏分析

陈荣忠 向蓉* 莫和国 徐宁
(南方医科大学附属小榄医院检验科, 中山 528415)

摘要: **目的** 探讨社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)对临床常用抗菌药物的耐药性及其分子流行病学情况。**方法** 收集从CA-MRSA感染患者伤口分泌物分离的金黄色葡萄球菌, 采用PCR扩增*mecA*基因确定为MRSA菌株, 同时对其进行17种抗菌药物耐药性检测。利用随机扩增多态性DNA(RAPD)方法对51株CA-MRSA进行同源性分析。**结果** 51株CA-MRSA对红霉素、克林霉素、四环素的耐药率均在30%以上, 未发现对莫西沙星、利福平、利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素、奎奴普丁/达托霉素以及呋喃妥因的耐药菌株, 经RAPD分型可分为I~V个亚型, 以I型(53.70%)为主。CA-MRSA感染患者主要分布于普外科(39.22%)和皮肤门诊(27.45%)。**结论** 为有效预防和控制CA-MRSA的感染, 临床应合理选用抗菌药物, 采用RAPD技术对MRSA进行同源性分析, 可为基层医院控制感染提供流行病学监测。

关键词: 社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 耐药性; 随机扩增多态性DNA; 流行病学

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

RAPD genotyping and drug sensitivity analysis of community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus*

Chen Rong-zhong, Xiang Rong, Mo He-guo and Xu Ning
(Affiliated Xiaolan Hospital, Southern Medical University, Zhongshan 528415)

Abstract Objective To investigate the drug resistance of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) to antimicrobial agents commonly used in clinical and its molecular epidemiology. **Methods** *Staphylococcus aureus* isolated from wound exudates of CA-MRSA patients was collected and the *mecA* gene was used to identify MRSA strains by PCR. At the same time, 17 kinds of antimicrobial resistance were detected. 51 strains of CA-MRSA was typed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Results** The resistance rates of 51 strains of CA-MRSA to erythromycin, clindamycin, and tetracycline were more than 30%. There were no strains that were resistant to moxifloxacin, rifampicin, linezolid, teicoplanin, vancomycin, quinuprine/daptomycin, and nitrofurantoin. RAPD typing could be divided into I~V subtypes, and type I was the major type with the frequency of 53.70%. CA-MRSA infections were mainly distributed in general surgery (39.22%) and skin clinic (27.45%). **Conclusion** In order to prevent and control the infections of CA-MRSA effectively, antimicrobial agents should be used rationally. Homology analysis of MRSA using RAPD technique can provide epidemiological surveillance for infection control in primary hospitals.

Key words Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Drug resistance; Random amplified polymorphic DNA; Epidemiology

收稿日期: 2017-12-01

基金项目: 中山市医学科研基金项目(No. 2015A020100); 广东省医学科学技术研究基金项目(No. B2016117)

作者简介: 陈荣忠, 男, 生于1989年, 初级检验技师, 主要从事临床微生物相关研究, E-mail: 644701730@qq.com

*通讯作者, E-mail: crzgavin@163.com

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)因其传播速度快、耐药谱广以及耐药机制复杂多变为医院感染的重要致病菌之一。自20世纪80年代,在加拿大首次报道社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA)以来,MRSA的感染趋势呈现向社区扩散^[1],且易感人群多为没有医院经历和医院感染史的健康人群^[2]。CA-MRSA多见于皮肤和软组织感染,甚至可继发败血症和坏死性肺炎。目前,采用传统的细菌鉴定及分型方法不能快速进行基因分型,不利于病原菌的溯源分析。为探讨本地区CA-MRSA的流行情况和临床常用抗菌药物的耐药性,本文对脓液标本分离的CA-MRSA进行耐药性分析及随机扩增多态性DNA分型(random amplified polymorphic DNA, RAPD)研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2015年10月—2016年10月来我院就诊的CA-MRSA感染患者的伤口脓液标本,剔除同一患者相同部位的重复菌株,共分离CA-MRSA菌株51株。CA-MRSA诊断标准参照卫生部发布的《医院感染诊断标准》:(1)患者在门诊或者入院48h内分离的MRSA;(2)1年内无住院或与医疗机构接触史;(3)无留置各种导管及其他穿透皮肤的医用装置;(4)无手术透析史。

1.2 仪器和试剂

VITEK-2全自动微生物分析仪及其配套GP鉴定卡、AST-GP67药敏卡(法国Bio Mérieux公司),凝胶成像仪系统(美国Bio-rad公司),2720Thermal Cycler PCR扩增仪,WD-9403C紫外仪,DYY-2C型电泳仪,细菌基因组DNA提取试剂盒、琼脂糖、RAPD引物、DNA Mark、Premix溶液(包含Mg²⁺、Taq酶、dNTPs)等PCR相关试剂均购自达安基因股份有限公司, *mecA*基因检测试剂盒(上海生物有限公司),质控菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC43300),购自卫生部临检中心。

1.3 方法

1.3.1 药物敏感实验

标本的采集、运送及分离培养均严格按照《全国临床检验操作规程》进行。采用VITEK2全自动微生物分析仪对分纯后的菌株进行菌株鉴定及药敏试验,

按照2017年美国临床和实验室标准协会(CLSI)-M100公布的药物敏感试验方案对结果进行判断。

1.3.2 *mecA*基因检测

严格按照*mecA*基因检测试剂盒说明书操作,提取金黄色葡萄球菌的DNA,4℃以下保存备用,使用特异性引物扩增*mecA*基因。引物序列:上游5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3',下游5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'。PCR扩增参数:94℃预变性2min,94℃变性1min,42℃退火1min,72℃延伸1min,35个循环,最后72℃延伸5min。

1.3.3 随机扩增多态性DNA分型

根据研究报道^[3-5]设计RAPD分型引物,建立RAPD反应体系:总反应体系为20μL,10xBuffer 5μL,25mmol/L MgCl₂ 3.5μL,Taq酶0.5μL,10mmol/L dNTP 1μL,50pmol/μL引物(5'-AAGTAAGTGACTGAGCG-3')1.5μL,模板DNA 2μL,灭菌双蒸水补足20μL。PCR扩增参数:94℃预变性5min,94℃变性1min,25℃退火1min,72℃延伸2min,40个循环,最后72℃延伸5min。采用2%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)对扩增产物进行电泳,在凝胶成像仪下观察扩增条带并拍照保存。

1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析,计数资料以率表示,组间比较使用χ²检验,P<0.05为存在统计学差异;应用WHONET 5.6软件分析CA-MRSA菌株的药敏结果。

2 结果

2.1 临床资料

2015年10月—2016年10月共收集CA-MRSA感染患者51例,其中男性31例,女性20例(表1);年龄0~83岁[平均值(36±22)岁],20~40岁组人数最多,占47.05%(χ²=13.39,P<0.05)。51株CA-MRSA菌株均分离自患者的伤口脓液分泌物。

表1 51例CA-MRSA患者各年龄段分布(例数)
Tab. 1 51 cases of CA-MRSA patients in all age distribution

性别	年龄/岁				合计/岁
	<20	20~40	41~60	>60	
男	6	15	5	5	31
女	4	9	3	4	20
合计	10	24	8	9	51

2.2 *mecA*基因检测结果

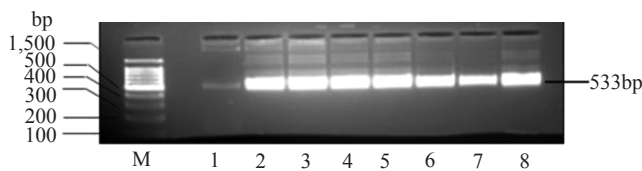
采用PCR扩增法对51株初步鉴定为MRSA的菌株进行*mecA*基因检测。51株均具有*mecA*特异性电泳条带(533bp), 确定为MRSA(图1)。

2.3 药物敏感实验结果

对51株CA-MRSA菌株进行17种抗菌药物体外敏感试验(表2), 耐药率前5位分别是青霉素(100%)、苯唑西林(100%)、红霉素(90.2%)、克林霉素(90.2%)以及四环素(35.29%)。此次实验未发现对莫西沙星、利福平、利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素、奎奴普丁/达托霉素以及呋喃妥因的耐药菌株。

2.4 CA-MRSA菌株RAPD基因分型结果

对51株CA-MRSA菌株进行RAPD分析, 每株菌株均能扩增出1~4条不等的有效电泳条带。根据电泳条带数目的差异, 51株MRSA可分为I~V个亚型(图2), 其中I型29株, II型6株, III型11株, IV型与V型



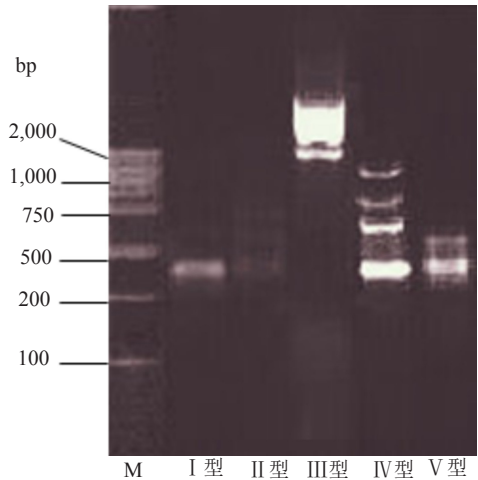
注: M: Marker; 1~8: 菌株编号

图1 *mecA*基因PCR电泳图谱

Fig. 1 PCR results for *mecA* gene

表2 51株CA-MRSA菌株对17种抗菌药物的药敏实验结果
Tab. 2 Antibiotic susceptibility of 51 strains of CA-MRSA to 17 antimicrobial agents

抗菌药物	敏感/株	中介/株	耐药/株	耐药率/%
青霉素	0	0	51	100
苯唑西林	0	0	51	100
左氧氟沙星	48	2	1	1.96
莫西沙星	50	1	0	0
红霉素	5	0	46	90.2
四环素	33	0	18	35.29
利福平	44	7	0	0
庆大霉素	49	0	2	3.92
复方磺胺甲噁唑	48	0	3	5.88
克林霉素	5	0	46	90.2
利奈唑胺	51	0	0	0
替考拉宁	51	0	0	0
万古霉素	51	0	0	0
环丙沙星	48	0	3	5.88
奎奴普丁/达托霉素	51	0	0	0
呋喃妥因	51	0	0	0
阿米卡星	42	2	7	13.73



注: M: Marker

图2 CA-MRSA菌株的RAPD分型电泳图谱

Fig. 2 Result of RAPD typing of CA-MRSA strains

分别为3株和2株。不同科室分离的CA-MRSA菌株分型情况见表3。结果显示本医院CA-MRSA菌株以I型为主($\chi^2=60.147$, $P<0.05$), 各菌株主要分布于普外科, 占39.22%; 皮肤门诊占27.45%; 呼吸内科占9.8%; 儿科、五官科、骨科、妇产科和手外科的检出率分别在3.92%~5.88%之间。

3 讨论

近年来, CA-MRSA的感染趋势呈现逐年升高, 这是由于CA-MRSA的易感因素、发病特征及耐药特性均与医院获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, HA-MRSA)感染存在差异, 在一定程度上增加了CA-MRSA的防控难度。目前关于CA-MRSA的国内专题研究较少, 缺乏多中心、大样本的详细流行病学资料报道, 不利于院内感染的监控, 甚至可

表3 不同科室的CA-MRSA菌株分布情况

Tab. 3 Distribution of CA-MRSA strains in different departments

科室	I 型/株	II 型/株	III 型/株	IV 型/株	V 型/株	合计/株
儿科	2	0	0	0	0	2
普外科	12	2	5	1	0	20
皮肤门诊	7	0	5	2	0	14
五官科	2	0	0	0	1	3
骨科	0	1	0	0	1	2
妇产科	1	0	1	0	0	2
呼吸内科	4	1	0	0	0	5
手外科	1	2	0	0	0	3
合计	29	6	11	3	2	51

造成区域性的暴发流行。本研究对CA-MRSA进行RAPD基因分型及体外药敏试验,探讨本地区CA-MRSA的流行病学情况,旨在从病原菌的溯源分析角度为CA-MRSA的防控提供理论依据。

CA-MRSA的感染主要累及皮肤和软组织,常引起疖、痈、蜂窝织炎等临床症状。从CA-MRSA在各科室的分布情况可知,51株菌株均来自伤口分泌物,患者年龄主要集中在20~40岁之间,科室以普外科和皮肤门诊为主,占66.67%,提示CA-MRSA主要定植和感染部位以受损皮肤、外科伤口及软组织多见,与相关报道相一致^[6]。

在药物敏感试验中,初筛为MRSA的菌株均通过分子生物学方法检测*mecA*基因,从而避免由于MRSA异质性耐药而导致的假阳性和假阴性^[7-8]。51株CA-MRSA对青霉素、苯唑西林、红霉素、克林霉素、四环素的耐药率均在30%以上,提示在临床首次经验治疗CA-MRSA感染时,应避免使用青霉素类、大环内酯类、克林霉素和四环素类抗菌药物。本实验中CA-MRSA对莫西沙星、利福平、利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素、奎奴普丁/达托霉素以及呋喃妥因的耐药率均为0,提示本地区在治疗CA-MRSA感染患者时可首选此类药物。根据2015年CHINET细菌耐药性监测网数据可知^[9],MRSA对利福平、喹诺酮类及氨基糖苷类药物的耐药率均超过30%,而本地区CA-MRSA对左氧氟沙星、环丙沙星、庆大霉素、利福平和复方磺胺甲噁唑的耐药率远远低于10%,两者数据存在一定差异,这可能由于HA-MRSA与CA-MRSA所携带的*PVL*基因与*SCCmec*类型不同所导致^[10]。研究表明CA-MRSA与MRSA的遗传背景及耐药特点并不一致^[11-12],在临床治疗CA-MRSA感染时,应根据本地区CA-MRSA的耐药特点进行个性化用药治疗,选取合适的抗菌药物。

目前,糖肽类与噁唑烷酮类药物的出现虽然暂时缓解了MRSA的感染治疗压力,但是寻找一种适合基层医院开展、快速便捷、可行性强、重复性好的基因分型技术仍然尤为重要。脉冲场凝胶电泳分型(PFGE)及多位点序列分型(MLST)技术由于其分辨力与重复性高,适用于MRSA基因序列研究^[13],但实验条件要求高、操作复杂、费用昂贵,难以在基层医院有效开展。与前两者相比,随机扩增多态性DNA分型(RAPD)技术采用一条通用引物对MRSA基

因组DNA进行PCR扩增,通过分析扩增产物DNA片段的多态性,从而反映该MRSA基因组DNA的多态性。由于RAPD分型技术实验操作简单、成本低廉、灵敏度高、实验周期短,因此可用于区域性流行菌株的溯源分析^[14-16]。本研究结果显示51株CA-MRSA菌株经过RAPD分型,均能获得1~4条不等的有效电泳条带,可分为5个基因亚型,分型率达100%。I型CA-MRSA菌株检出29株,比例高达56.86%,为本院的主要流行菌株;其次III型CA-MRSA菌株共检出11株,两者均主要分布于普外科和皮肤科门诊,说明本院的普外科和皮肤科门诊存在I型和III型菌株的流行趋势,这主要原因是CA-MRSA感染多以皮肤损伤、外科伤口为主,侵袭性操作频繁、易合并感染、患者流动性强等原因导致。通过本研究发现,RAPD分型技术可用于伤口分泌物中CA-MRSA的基因溯源分析,从而发现可疑的MRSA感染暴发流行,为制定防控措施争取宝贵时间。

综上所述,本研究通过分析CA-MRSA的临床常用抗菌药物的药敏结果,并且采用RAPD技术对其进行基因分型,为评估MRSA的分子流行病学趋势提供了一种快速便捷、经济实用、灵敏度高、适合基层医院推广的研究方法。与此同时,全面健全门诊及病房的管理制度,严格执行无菌操作、消毒隔离,加强临床合理用药宣传,有助于控制CA-MRSA的院内感染及耐药性的蔓延。

参考文献

- [1] Lee B Y, Singh A, David M Z, *et al.* The economic burden of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(6): 528-536.
- [2] Xie X, Bao Y, Ouyang N, *et al.* Molecular epidemiology and characteristic of virulence gene of community-acquired and hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Sun Yat-sen Memorial hospital, Guangzhou, Southern China[J]. *BMC Infect Dis*, 2016, 16(1): 339.
- [3] 王震,施瑜,曹珍娣,等. 2006—2012年院内感染金黄色葡萄球菌耐药性监测及同源性分析[J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(7): 873-874.
- [4] 徐荣,张敏. MRSA医院感染危险因素及分子流行病学调查[J]. *上海医药*, 2015, 36(15): 33-35, 39.
- [5] 魏智艺,程君涛,李小毅,等. 福建东南沿海某战区医院MRSA感染特点及基因多态性分型研究[J]. *解放军医药杂志*, 2015, 27(3): 79-84.

- [6] 李克诚, 夏菲, 张青. 瑞安地区社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌spa分型和耐药特征[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(1): 134-138.
- [7] Li S, Ning X, Song W, *et al.* Clinical and molecular characteristics of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Chinese neonates[J]. *APMIS*, 2015, 123(1): 28-36.
- [8] 刘德华, 胡大春, 马婷. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌6年发生率及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1253-1255.
- [9] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015年细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6): 685-694.
- [10] 牛瑞兵, 郭利平, 王新刚, 等. 医院获得性与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性差异[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(7): 476-478.
- [11] 陈华桂, 周秀萍. 儿童烧伤患者感染MRSA的耐药性及分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(3): 299-300, 303.
- [12] 臧婉, 鲁卫平. 社区、医院获得性MRSA感染分布及耐药性分析[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(18): 2881-2883.
- [13] 纪冰, 王凤霞, 赵红梅, 等. 社区和医院获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌MLST联合SCCmec基因分型及耐药性比较[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(1): 52-55.
- [14] 卞彩云, 路永红, 周培媚, 等. 178例儿童脓疱疮皮损中金黄色葡萄球菌药敏及随机扩增多态性DNA分析[J]. 中华皮肤科杂志, 2012, 45(11): 767-770.
- [15] 李鹏, 刘军辉, 王淑梅. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的基因多态性分型研究[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31(6): 777-781.
- [16] 贺文强, 陈宏斌, 赵春江, 等. 2010—2011年中国10个主要城市金黄色葡萄球菌分子流行病学研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(4): 247-251.