

# 牛源金黄色葡萄球菌耐药性及甲氧西林敏感和耐甲氧西林菌株演化相关性研究

王登峰, 段新华, 吴建勇, 杨学云, 李建军, 李娜, 王治才\*

(新疆畜牧科学院兽医研究所, 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** 为研究牛源金黄色葡萄球菌耐药性以及甲氧西林敏感(MSSA)和耐甲氧西林(MRSA)菌携带的耐药基因、MRSA的SCCmec基因型,揭示牛源MSSA与MRSA之间的演化相关性和MRSA起源和扩散途径,对2009年以来中国五省区不同牛场分离的54株金黄色葡萄球菌进行了药敏试验。对确定的12株MSSA和MRSA进行了耐药基因检测、SCCmec基因型分型和多位点测序分型(MLST)研究。54株菌的药敏结果显示,对红霉素、克林霉素、青霉素、复方新诺明、多西环素、四环素、氯霉素、环丙沙星、庆大霉素的耐药菌株分别为88.8%、81.5%、88.9%、90.7%、92.6%、94.4%、79.6%、63.0%和70.4%。其中,对所测10种抗生素完全耐药的占5.6%,对5种以上耐药的占85.2%,6株(11.1%)对头孢西丁耐药。12株MSSA和MRSA菌株的药敏和耐药基因检测结果显示,3株MRSA对10种抗生素耐药;6株MSSA菌中,新疆分离株对2~4种抗生素耐药,其它省区分离株对7种以上抗菌素耐药。12株MSSA和MRSA菌均检出*ermC*和*tetK*基因;6株MRSA中均检出 $aac(6')/aph(2'')$ 基因,5株检出*tetM*基因,4株检出 $aph(3')-III$ 基因;6株MSSA均未检出 $aac(6')/aph(2'')$ 和 $aph(3')-III$ ,4株检出*tetM*基因。用多重PCR对MRSA进行SCCmec基因分型显示,5株为SCCmec IV,1株未能分型;12株菌的MLST分型发现,所有菌株分为ST50、ST965、ST6、ST97和ST9序列型。经eBURST v3分析,MRSA分布在CC7、CC4、CC21和CC9四个克隆复合群(CCcs)中,MSSA分布在CC7和CC32克隆复合群中。以上研究表明,我国牛源金黄色葡萄球菌不仅耐药严重,且表现多重耐药;MRSA基因型以SCCmec IV为主。对牛源SCCmec IV型MRSA与同型人源MRSA的耐药谱分析发现有较大差异,推测位于质粒或转座子上的耐药基因可能插入到金黄色葡萄球菌基因组中,导致耐药基因在不同菌株间传播。根据ST97中有MSSA和MRSA以及牛源MRSA与人源MRSA的MLST比较,确认我国牛源MRSA是在抗生素的选择压力下由来源于不同克隆复合群的MSSA获得SCCmec IV而产生,推测同一克隆株MRSA的扩散并不是MRSA大范围出现的主要原因。

**关键词:** 牛; 耐药基因; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; SCCmec分型; 多位点测序分型

中图分类号: S852.611

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)10-1416-10

## The Current Status of the Drug Resistance and Evolutionary Relationship of MSSA and MRSA Isolates from Bovine of China

WANG Deng-feng, DUAN Xin-hua, WU Jian-yong, YANG Xue-yun, LI Jian-jun, LI Na, WANG Zhi-cai\*

(Institute of Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the current status of the antimicrobial resistance of bovine *Staphylococcus aureus* isolates, so as to do research on carried drug-resistant genes and molecular epidemiology profiles of methicillin-susceptibility *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) which isolated from bovine, further, to reveal the evolutionary relationship between MSSA and MRSA, and origin and diffusion of MRSA. Total 54 isolates which isolated from Xinjiang, Zhejiang, Shandong, Neimenggu and Shang-

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 家畜疫病病原微生物学国家重点实验室开放课题基金(SKLVEB2009KFKT017); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2010211B32)

作者简介: 王登峰(1982-), 男, 河南省信阳人, 硕士, 主要从事微生物应用技术研究, E-mail: wangdengfeng713@163.com

\* 通讯作者: 王治才, E-mail: zhicai.w@163.com

hai in 2009 were investigated antibiotics susceptibility by disc diffusion method, and 12 isolates of MSSA and MRSA which confirmed by Cefoxitin sensitive test by disc diffusion method and *mecA* PCR were used to detected the antimicrobial resistance genes and typed by multilocus sequence typing (MLST). Drug sensitive test results showed that 88.8% isolates resisted to erythromycin, 81.5% to clindamycin, 88.9% to penicillin, 90.7% to ulfamethoxazole compound, 92.6% to doxycycline, 94.4% to tetracycline, 79.6% to chloramphenicol, 63.0% to ciprofloxacin, 70.4% to gentamicin. Besides that, 5.6% isolates resisted to all 10 antibiotics, 85.2% isolates resisted to more than 5 antibiotics, 6 isolates (11.1%) resisted to cefoxitin. Furthermore, 3 MRSA isolates resisted to 10 antibiotics, Xinjiang MSSA isolates resisted to 2-4 antibiotics, other provinces MSSA isolates resisted to 7 antibiotics, and analyzed result of the antimicrobial resistance gene of MSSA and MRSA, found all isolates carried *ermC* and *tetK* genes, but no *ermA* gene, 6 MRSA isolates carried *aac(6')/aph(2'')*, 5 and 4 MRSA isolates carried *tetM* and *aph(3')-III* respectively, but only 4 MSSA isolates carried *tetM* gene, no MSSA isolates carried *aac(6')/aph(2'')* and *aph(3')-III*. Staphylococcal chromosomal cassette (SCC) *mec* of MRSA was typed by multi-PCR, the results showed that 5 isolates were SCCmec IV and 1 isolate can not identified type. The MLST results of MSSA and MRSA proved that the isolates belonged to ST50, ST965, ST6, ST97 and ST9, further analysis found that 6 MRSA isolates distributed in CC7, CC4, CC21 and CC9 and MSSA isolates distributed in CC32 and CC7. The results suggest that drug resistance of Chinese bovine *Staphylococcus aureus* isolates are serious and most isolates represent multidrug resistance, MSSA and MRSA are multidrug-resistant strains and carries more than 2 antimicrobial resistance genes, epidemical bovine MRSA is MRSA-SCCmec IV. By analyzing the results of MLST and comparing with MLST results of human MRSA, found that, in China, bovine MRSA was different with human's and speculated that bovine MRSA emerged when MSSA which belonged to different CCs gained SCCmec IV by antibiotic selection, in addition, MRSA stains isolated from different areas were not the same ancestor, further analysis, presume those genes similar to plasmid or transposon can free communication in different isolates than depend on SCCmec.

**Key words:** bovine; antimicrobial resistance gene; MRSA; SCCmec type; MLST

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是奶牛乳房炎主要的传染性病原菌之一<sup>[1]</sup>, 随着抗菌素的广泛应用, 金黄色葡萄球菌对抗菌素呈现越来越普遍的耐药和多重耐药<sup>[2]</sup>。研究表明, 金黄色葡萄球菌的耐药基因与其耐药表型密切相关<sup>[3-4]</sup>, 金黄色葡萄球菌携带的氨基糖苷修饰酶基因 *aac(6')/aph(2'')* 和 *aph(3')-III*、大环内酯类甲基化酶基因 *ermA* 和 *ermC*、四环素类核糖体保护蛋白基因 *tetM* 和外排泵蛋白基因 *tetK* 在该类菌抗大环内酯类、氨基糖苷类以及四环素类中发挥关键作用<sup>[5-11]</sup>。此外, 被定义为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的菌株对苯唑西林或头孢西丁耐药, 它们大多携带甲氧西林耐药决定簇 (*mecA*)。对 MRSA 深入的研究发现, MRSA 的 *mecA* 基因位于葡萄球菌染色体 *mec* (SCCmec) 上, 该结构类似于转座子, 可以介导

*mecA* 基因游离传播, 使敏感的葡萄球菌获得甲氧西林耐药性并可在 SCC 上整合多种耐药基因。SCC 基因型不同, 携带耐药基因和对抗菌素的耐药谱也不相同, 通过检测 SCCmec 基因复合体的 *ccr* (cassette chromosome recombinase) 和 *mec* 基因, 可将 SCCmec 分为至少 5 种基因型。其中, SCCmec I ~ IV 型较为常见, 不同型别 SCCmec MRSA 抗菌素耐药谱明显不同, SCCmec II 型和 III 型 MRSA 菌株表现为多重耐药, SCCmec IV 型菌株表现对非  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物敏感<sup>[12-13]</sup>。因此, 研究耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 与甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA) 进化关系, 对追溯 MRSA 的来源、预测流行趋势以及合理使用抗菌素都具有重要意义。多位点测序分型 (Multilocus sequence typing, MLST) 技术是一种以核苷酸序列分析为基础的病

原菌分型方法,它将高通量测序技术和成熟的群体遗传学相结合,在流行病学调查和病原菌分型鉴定中广泛应用,国内外常应用该技术进行多种原核病原微生物的分子分型和追踪溯源,以了解不同地区病原菌株的亲缘关系<sup>[14]</sup>。Enright等<sup>[15]</sup>对人源MRSA的SCCmec基因型和MLST研究显示,世界范围的大多数MRSA感染仅由少数MRSA克隆株(CC5、CC8、CC22、CC30及CC45)引起。

为了解我国牛源金黄色葡萄球菌的耐药现状,本研究通过对我国新疆、浙江、山东、内蒙古、上海分离的54株金黄色葡萄球菌的临床药敏试验和*mecA*基因检测,鉴定出6株MRSA和6株MSSA阳性菌株,检测了这些菌株的氨基糖苷修饰酶基因*aac*(6′)/*aph*(2′′)和*aph*(3′)-Ⅲ、大环内酯类甲基化酶基因*ermA*和*ermC*、四环素类核糖体保护蛋白基因*tetM*和外排泵蛋白基因*tetK*共计6种耐药基因的携带情况,并对MRSA的SCCmec基因进行了分型,使用多位点测序分型技术(MLST)分析了这12株菌的进化关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株来源

用于药敏试验的54株金黄色葡萄球菌包括从新疆乌鲁木齐、昌吉、奎屯、伊犁等不同地区牛场乳房炎病例分离的20株菌和浙江、山东、内蒙古、上海牛场分离的34株,其中浙江20株,山东6株,内蒙古6株,上海2株。所有菌株均保存于20%甘油生理盐水,置-25℃冻存,使用时接种于哥伦比亚固体培养基37℃培养18~24h。

### 1.2 临床药敏试验

药敏试验使用纸片扩散法。抗菌素药敏纸片选取参考抗菌药物敏感性实验执行标准的第十九版信息增刊(M100-S19)<sup>[16]</sup>中“美国临床微生物学实验室非苛养菌常规药敏试验和报告抗菌药物的建议分组”,首选验并常规报告的A组药物为红霉素、克林霉素、头孢西丁、青霉素、复方新诺明;首选试验有选择报告的B组药物为多西环素和四环素;补充试验有选择报告的C组药物为氯霉素、环丙沙星和庆大霉素。对药敏试验的结果解释遵循“抗菌药物敏感性实验执行标准的第十九版信息增刊”中“表2C葡萄球菌属抑菌环直径和MIC解释标准”。

药敏试验中使用的培养基、培养时间、试验操作和质量控制按照第十版纸片法抗菌药物敏感试验的

的执行标准(M02-A10)<sup>[17]</sup>进行;质量控制菌株金黄色葡萄球菌ATCC25923由中国科学院菌种保存中心提供;试验用药敏片购自杭州天和微生物试剂有限公司。

### 1.3 MSSA与MRSA鉴定

选取临床药敏试验中青霉素敏感和头孢西丁耐药的菌株进行*mecA*基因的检测。检测用引物和扩增方法参考文献[18]进行。青霉素敏感菌株且*mecA*基因阴性者确定为MSSA菌株,头孢西丁耐药且*mecA*基因检测阳性者确定为MRSA菌株。共鉴定出的6株MRSA和6株MSSA菌株,它们分别为新疆3株(XJH1、XJH26和XJH39),杭州2株(HZ2、HZ35),金华3株(JH43、JH45和JH55),宁波2株(NB66、NB73),山东2株(SD132、SD141)。

### 1.4 MSSA和MRSA携带耐药基因的检测

1.4.1 金黄色葡萄球菌基因组提取 金黄色葡萄球菌基因组提取按照细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生物技术公司)操作说明书进行。

1.4.2 耐药基因检测 使用PCR方法进行氨基糖苷修饰酶基因*aac*(6′)/*aph*(2′′)和*aph*(3′)-Ⅲ、大环内酯类甲基化酶基因*ermA*和*ermC*、四环素类核糖体保护蛋白基因*tetM*和外排泵蛋白基因*tetK*基因检测,使用的引物序列和反应条件参考文献[19]。

### 1.5 SCCmec分型

使用Oliveira等<sup>[18]</sup>建立的多重PCR方法对分离的6株MRSA进行SCCmec基因分型,引物和反应程序按照参考文献合成和扩增。

### 1.6 多位点测序分型

多位点测序分型(MLST)中使用的引物和反应程序严格按照伦敦帝国学院MLST数据库提供的资料(<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>)合成和扩增。

## 2 结果

### 2.1 临床耐药试验结果

54株金黄色葡萄球菌的A组抗菌素临床药敏试验显示:88.8%(48株)的菌株对红霉素耐药,81.5%(44株)对克林霉素耐药,11.1%(6株)对头孢西丁耐药,88.9%(49株)对青霉素耐药,90.7%(49株)对复方新诺明耐药;B组抗菌素临床药敏试验显示:92.6%(50株)对多西环素耐药,94.4%(51株)对四环素耐药;C组抗菌素临床药敏试验显示:79.6%(43株)对氯霉素耐药,63.0%(34株)对环丙沙星耐药,

70.4%(38株)对庆大霉素耐药。所有药敏试验结果 见表1。

表1 新疆、浙江、山东、内蒙古、上海5省区54株金黄色葡萄球菌临床药敏试验分析

Table 1 The drug sensitivity test result of 120 bovine *Staphylococcus aureus* isolates from Xinjiang, Zhejiang, Shandong, Neimenggu and Shanghai

	A组 Group A														
	红霉素 Erythromycin			克林霉素 Clindamycin			头孢西丁 Cefoxitin			青霉素 Penicillin			复方新诺明 Sulfamethoxazole Compound		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
菌株数/株 Number of isolates	6	0	48	10	0	44	48	0	6	6	0	48	5	0	49
百分比/% Percentage	11.1	0	88.8	18.5	0	81.5	88.9	0	11.1	11.1	0	88.9	9.3	0	90.7
	B组 Group B						C组 Group C								
	多西环素 Doxycycline			四环素 Tetracycline			氯霉素 Chloramphenicol			环丙沙星 Ciprofloxacin			庆大霉素 Gentamicin		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
菌株数/株 Number of isolates	4	0	50	0	3	51	6	5	43	18	2	34	12	4	38
百分比/% Percentage	7.4	0	92.6	0	5.6	94.4	11.1	9.3	79.6	33.3	3.7	63.0	22.2	7.4	70.4

S. 敏感;I. 中介;R. 耐药

S. Sensitive; I. Intermediary; R. Resistance

对54株金黄色葡萄球菌的临床药敏试验数据分析发现,3株对所测试的10种抗菌素完全耐药,占5.6%;46株对5种以上抗菌素耐药,占85.2%(表2)。

## 2.2 MSSA和MRSA分离菌株的临床药敏试验结果

金黄色葡萄球菌对10种抗菌素的药敏试验显示,所鉴定出的12株菌对除头孢西丁和青霉素外的红霉素、克林霉素、复方新诺明、多西环素、四环素、氯霉素、环丙沙星和庆大霉素的耐药率为41.7%~100%;6株MRSA菌株中,除3株对环丙沙星敏感外,另外3株对所测试的10种抗菌素均耐药。6株MSSA菌株中,新疆分离的3株菌(XJH1、XJH26和XJH39)耐药率较低,但也对所测的2~4种抗生素耐药;浙江(HZ2)、山东(SD132和SD141)分离株

对7种以上抗生素耐药(表3)。

表2 新疆、浙江、山东、内蒙古、上海5省区54株金黄色葡萄球菌耐药现状分析

Table 2 The multi-drug resistance situation of 54 bovine *Staphylococcus aureus* isolates from Xinjiang, Zhejiang, Shandong, Neimenggu and Shanghai

	完全耐药 Resisted to 10 antibiotics	耐药性≥5种抗菌素 Resisted to more than 5 antibiotics
菌株数/株 Number of isolates	3	46
百分比/% Percentage	5.6	85.2

表 3 12 株金黄色葡萄球菌临床药敏试验结果  
Table 3 The antibiotics susceptibility test result of 12 *Staphylococcus aureus* isolates

菌株编号 Isolate	A 组 Group A			B 组 Group B			C 组 Group C			
	红霉素 Erythromycin	克林霉素 Clindamycin	头孢西丁 Cefoxitin	青霉素 Penicillin	复方新诺明 Sulfamethoxazole Compound	多西环素 Doxycycline	四环素 Tetracycline	氯霉素 Chloramphenicol	环丙沙星 Ciprofloxacin	庆大霉素 Gentamicin
HZ35	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
JH43	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
JH45	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
JH55	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NB66	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
NB73	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
HZ2	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S
SD132	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
SD141	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R
XJH1	S	S	S	S	R	S	R	I	S	S
XJH26	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R
XJH39	S	R	S	S	R	R	R	S	I	S
耐药菌株 比例/%	75.0	83.3	50.0	50.0	91.7	91.7	100.0	75.0	41.7	75.0
Percentage of drug resistant isolate										

S. 敏感; I. 中介; R. 耐药

S. Sensitive; I. Intermediary; R. Resistance

### 2.3 耐药基因检测结果

对分离的金黄色葡萄球菌进行氨基糖苷修饰酶基因 *aac(6')*/*aph(2'')* 和 *aph(3')*-III、大环内酯类甲基化酶基因 *ermA* 和 *ermC*、四环素类核糖体保护蛋白基因 *tetM* 和外排泵蛋白基因 *tetK* 6 种耐药基因的检测显示,所有菌株均检出 *ermC* 和 *tetK* 基因,未

检出 *ermA* 基因。*aac(6')*/*aph(2'')* 和 *aph(3')*-III 基因的检出率分别为 41.7%(5/12)、33.3%(4/12),*tetM* 基因的检出率为 75.0%。6 株 MRSA 中均检出 *aac(6')*/*aph(2'')* 基因,5 株检出 *tetM* 基因,4 株检出 *aph(3')*-III 基因;6 株 MSSA 均未检出 *aac(6')*/*aph(2'')* 和 *aph(3')*-III,4 株检出 *tetM* 基因(表 4)。

表 4 12 株金黄色葡萄球菌的 6 种耐药基因检测

Table 4 Detection of 6 antimicrobial resistance genes in 12 *Staphylococcus aureus* isolates

菌株编号 Isolate	大环内酯类甲基化酶基因 Methylase genes of macrolide		氨基糖苷修饰酶基因 Aminoglycoside modifying enzyme genes		四环素类核糖体 保护蛋白基因 Tetracycline ribosomal protection protein genes	四环素外排泵 蛋白基因 Tetracycline efflux pump protein
	<i>ermA</i>	<i>ermC</i>	<i>aac(6')</i> / <i>aph(2'')</i>	<i>aph(3')</i> -III	<i>tetM</i>	<i>tetK</i>
HZ35	—	+	+	—	+	+
JH43	—	+	+	+	+	+
JH45	—	+	—	+	—	+
JH55	—	+	+	+	+	+
NB66	—	+	+	+	+	+
NB73	—	+	+	—	+	+
HZ2	—	+	—	—	+	+
SD132	—	+	—	—	+	+
SD141	—	+	—	—	+	+
XJH1	—	+	—	—	—	+
XJH26	—	+	—	—	—	+
XJH39	—	+	—	—	+	+
比例/% Percentage	0.0	100.0	41.7	33.3	75.0	100.0

### 2.4 SCCmec 分型及 MLST 结果

用多重 PCR 方法对鉴定出的 6 株 MRSA 进行 SCCmec 基因分型,结果显示:JH43、JH55、JH45、JH73 和 NB66 为 MRSA-IV 型,未能对 HZ35 进行 SCCmec 分型。

采用 MLST 技术对金黄色葡萄球菌的 7 个持家基因 *arrc-aroE-glpf-gmk-pta-tpi-yqil* 进行测序分型(<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>),结果显示,12 株菌可以分为 5 个序列型(sequence type, ST):HZ2、XJH39、XJH1、XJH26、JH55、JH45 和 NB66 为 ST97 型,SD132 和 SD141 为 ST50 型,JH43 为 ST965 型,JH73 为 ST6 型,HZ35 为 ST9 型(<http://saureus.mlst.net>, ID No. 3722-3733)。根据每个菌株的等位基因谱(allelic profile),使用邻位相联法(Neighbor-joining method)构建进化树(图 1)。

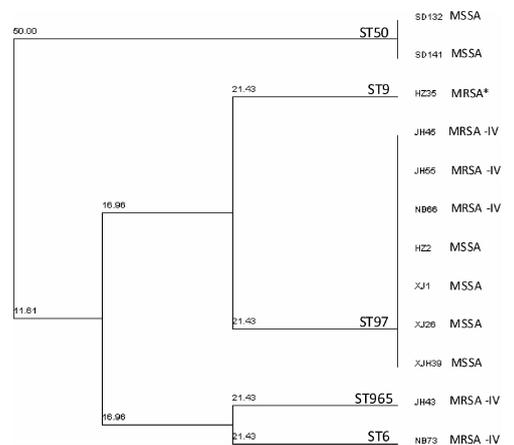
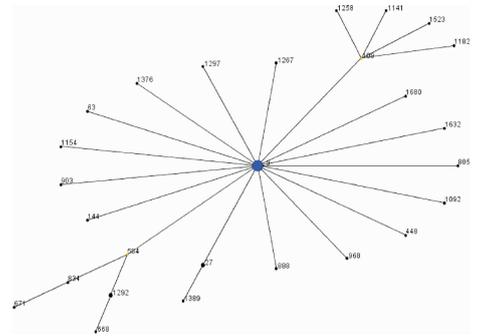
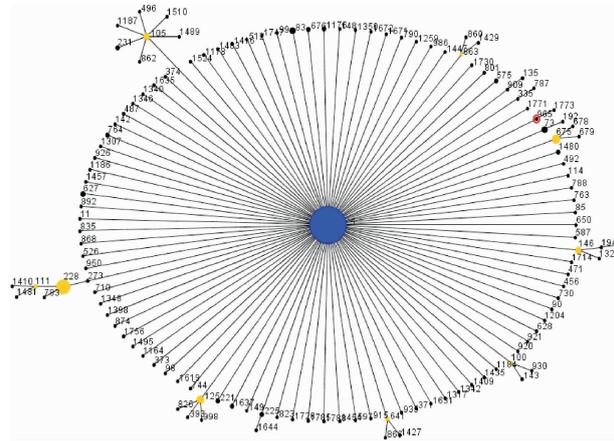


图 1 12 株牛源金黄色葡萄球菌进化关系分析  
Fig. 1 The evolutionary relationship among 12 *Staphylococcus aureus* isolates

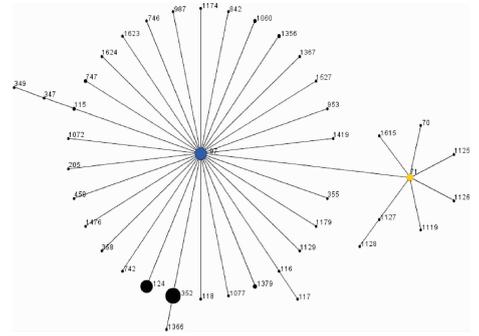
用菌株基因相关性分析软件 eBURST v3 (<http://saureus.mlst.net/eburst/>) 分析发现,这 5 个序列型分别属于 5 克隆复合群:ST97 属于 CC7 群,推测起始序列型(predicted founder)为 ST97;ST50 属于 CC32 群,推测起始序列型为 ST50;ST965 属于 CC4 群,推测起始序列型为 ST5;ST6 属于 CC21 群,推测起始序列型为 ST6;ST9 属于 CC9 群,推测起始序列型为 ST9(图 2)。



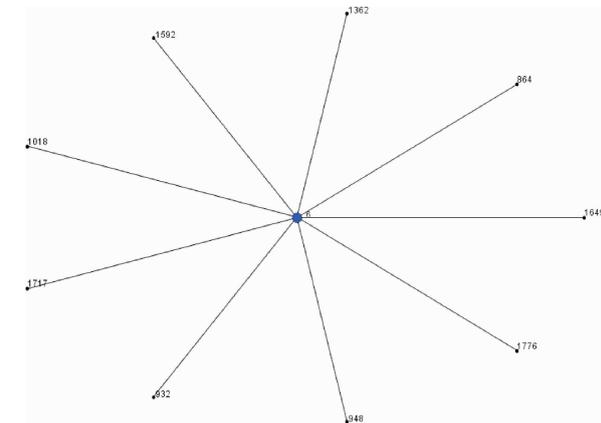
HZ35 为 ST9-MRSA,属于 CC9 群,推测起始序列型为 ST9  
HZ35: ST9-MRSA, belonged to CC9, predicted founder was ST9



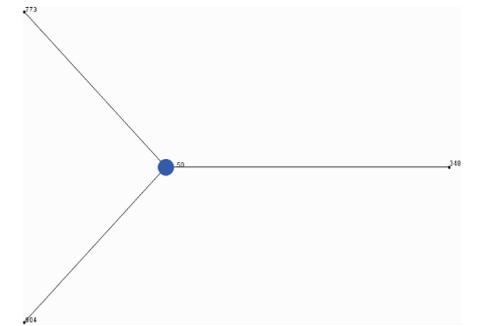
JH43 为 ST965-MRSA-IV,属于 CC4 群,推测起始序列型为 ST5  
JH43: ST965-MRSA-IV, belonged to CC4, predicted founder was ST5



HZ2, XJH39, XJH1, XJH26 为 ST97-MSSA 和 JH55、JH45、NB66 为 ST97-MRSA-IV,属于 CC7 群,推测起始序列型为 ST97  
HZ2, XJH39, XJH1, XJH26: ST97-MSSA. JH55, JH45, NB66:ST97-MRSA-IV, belonged to CC7, predicted founder was ST97



JH73 为 ST6-MRSA-IV,属于 CC21 群,推测起始序列型为 ST6  
JH73: ST6-MRSA-IV, belonged to CC21, predicted founder was ST6



SD132,SD141 为 ST50-MSSA,属于 CC32 群,推测起始序列型为 ST50  
SD132, SD141: ST50-MSSA, belonged to CC32, predicted founder was ST50

\* 采用多重 PCR 方法未能对该菌株进行 SCCmec 分型  
\* SCCmec type of the isolate can not be identified by multi-PCR

图 2 12 株金黄色葡萄球菌 STs、所属 CCs 和推测起始序列型

Fig. 2 STs,CCs and predicted founder of 12 *Staphylococcus aureus* isolates

### 3 讨论

2005年,杜锐等<sup>[2]</sup>对我国动物源性金黄色葡萄球菌耐药研究显示,分离菌株对氨苄青霉素和链霉素完全耐药,对苯唑西林、氯霉素、卡那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素、链霉素、呋喃妥因、克林霉素、氧氟沙星、罗美沙星、诺氟沙星、环丙沙星 12 种抗菌素的耐药率达 50.0%~84.6%,且表现为多重耐药。本研究对我国部分省区分离的 54 株金黄色葡萄球菌药敏试验发现,这些地区牛源性金黄色葡萄球菌的耐药性非常严重,且表现出严重的多重耐药。药敏试验中发现 6 株(11.1%)对头孢西丁耐药的菌株,并确定是 *mecA* 介导的 MRSA, *mecA* 位于类似于转座子的葡萄球菌染色体 *mec* (SCC*mec*) 上,该结构可以介导甲氧西林耐药决定簇(*mecA*)基因游离传播,使敏感的葡萄球菌获得甲氧西林耐药性<sup>[20]</sup>。牛源 MRSA 菌株的出现是对金黄色葡萄球菌性奶牛乳房炎抗生素治疗的极大挑战。长期、大量滥用抗菌药物所产生的选择性压力是细菌耐药性产生的源动力,耐药基因经过传代、转移、扩散以及不断变异,通过多种机制形成复杂的多重耐药性<sup>[21]</sup>。严格掌握适应证,合理使用抗菌药物,有针对性的足量用药、轮换用药、联合用药,建立科学的耐药监控体系,将防止或延缓多重耐药的产生和蔓延<sup>[22]</sup>。

在本研究中,6 株 MRSA 检出 *aac*(6')/*aph*(2'')或 *aph*(3')-III 基因,且均对庆大霉素耐药,未检出基因的 6 株 MSSA 菌株,有 3 株对庆大霉素耐药,3 株敏感,这可能与金黄色葡萄球菌还存在氨基糖苷修饰酶基因 *ant*(4', 4'')有关。*ermA* 和 *ermC* 基因检测显示,12 株菌均检出 *ermC* 基因,未检出 *ermA* 基因,而在药敏试验中,9 株对红霉素耐药,其中 6 株 MRSA 均对红霉素耐药,该结果与医源性金黄色葡萄球菌的研究结果不同。Lim 等<sup>[23]</sup>报道,人源金黄色葡萄球菌 *ermA* 阳性检出率达 82.5%,*ermC* 检出 2.6%,由此推测,人源和牛源金黄色葡萄球菌的红霉素耐药基因型可能有较大差异。*tetM* 和 *tetK* 基因检测及四环素药敏试验结果显示,12 株菌均带有 *tetK* 基因,9 株带有 *tetM* 基因,所有菌株对四环素耐药,基因型与表型符合率为 100%。孔海深等研究认为<sup>[4]</sup> MRSA 菌株对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素抗菌素耐药率较 MSSA 高。本次所检测的 MRSA 菌株均带有 3~5 种耐药基因,而

MSSA 菌株带有 2~3 种耐药基因,与上述研究结论相符。

SCC*mec* 是 MRSA 的耐药基础,其基因型与耐药谱有着密切的关系,不同的基因型有不同的耐药表型。目前,在 MRSA 中已发现 5 种 SCC*mec* 基因型,以 SCC*mec* I、II、III 和 IV 多见。SCC*mec* II 和 SCC*mec* III 的核苷酸片段较长(53,66.9 kb),SCC*mec* II 含带有耐药基因的整合质粒 pUB110 和转座子 Tn554,SCC*mec* III 含有整合质粒 pI258、pT181 和 Tn554,其中 pUB110 带有 *ant* 4' 基因,产生对卡那霉素(kanamycin)、妥布霉素(tobramycin)和博来霉素(bleomycin)耐药,pI258 带有对青霉素类和重金属产生抵抗力的蛋白基因,pT181 带有对四环素(tetracycline)耐药的基因,而 Tn554 带有 *ermA* 基因,产生对大环内酯类抗菌素耐药,这也许是 SCC*mec* II 和 SCC*mec* III 型 MRSA 菌株呈多重耐药的原因,而 SCC*mec* I 和 SCC*mec* IV 基因片段较短(34.3 kb,20.9-24.3 kb),除携带 *mecA* 基因外几乎不带有其他耐药基因,常不表现为多重耐药<sup>[13,24]</sup>。

我国余方友等<sup>[25]</sup>对医院分离的 72 株 MRSA 进行 SCC*mec* 分型发现,SCC*mec* III 占 88.9%(64/72),SCC*mec* II 占 2.8%(2/72),SCC*mec* IV 占 1.4%(1/72),有 5 株未能分型,且所有 SCC*mec* III 和 SCC*mec* II 基因型的菌株为多重耐药;基因型为 SCC*mec* IV 的临床分离株只对  $\beta$ -内酰胺类药物交叉耐药,而不表现为多重耐药。本研究对 6 株 MRSA 进行 SCC*mec* 分型,5 株为 SCC*mec* IV,1 株未能分型,证实我国牛源金黄色葡萄球菌中已出现 MRSA 菌株,且以 SCC*mec* IV 为主,与人源 MRSA 基因型有很大差异。本研究发现的 6 株 MRSA 菌株,除 1 株(NB66)对环丙沙星敏感外,其余对所测试的 10 种抗菌素均耐药,表明牛源 SCC*mec* IV 型 MRSA 与同型人源 MRSA 耐药谱存在较大差异。王新等报道猪源 SCC*mec* IV b 型 MRSA 株具有多重耐药特点,与人源 SCC*mec* IV 型 MRSA 株耐药谱存在较大差异<sup>[26]</sup>。这些结果显示,不同动物源 MRSA 的耐药谱与 SCC*mec* 型的相关性并不一致。通过对牛源 MRSA 进行 *aac*(6')/*aph*(2'')、*aph*(3')-III、*ermC*、*tetM* 和 *tetK* 基因的检测和药敏试验,推测这些耐药基因可能位于具有整合能力的质粒或转座子上,可以插入到金黄色葡萄球菌基因组中,在抗菌素选择压力下,耐药基因在不同菌株间传播,而不是依赖 SCC*mec* 进行扩散。

使用 MLST 技术基因分型,对 12 株属于 ST97、ST965、ST6、ST50 和 ST9 的 5 个序列型菌株经 eBURST v3 分析发现,这 5 个序列型分别属于 5 个克隆复合群。6 株 MRSA 分布在 CC7、CC4、CC21 和 CC9 的 4 个克隆复合群中,其中 CC7 中包括 3 株 MRSA 和 4 株 MSSA。除 CC4 的推测起始序列型为 ST5 外,CC7、CC21 和 CC9 克隆复合群的推测起始序列型与 MRSA 分离株的序列型一致,表明我国牛源 MRSA 并非来源于同一克隆株的跨区域扩散。Enright 等<sup>[15]</sup>和 Okuma 等<sup>[27]</sup>报道,国外分离的人源 MRSA 主要分布在 CC1、CC5、CC8、CC22、CC30、CC298 和 CC5 的 7 个克隆复合群中,我国分离的人源金黄色葡萄球菌的 MLST 与本研究中牛源 MRSA 有很大不同 ([http://saureus.mlst.net/earth/maps/byst\\_earth.asp?country=China](http://saureus.mlst.net/earth/maps/byst_earth.asp?country=China)),这表明我国牛源 MRSA 并非来源于人源 MRSA 克隆株。根据以上研究数据推测,某一地域 MRSA 的出现不局限于其它地域已存在的 MRSA 菌株的克隆扩散,MSSA 菌株获得 SCCmec 基因也可能是 MRSA 扩散的主要原因之一,MSSA 获得 SCCmec IV 型基因可能是我国牛源 MRSA 产生和广域分布的主要原因。Smyth 等<sup>[28]</sup>对欧洲、拉丁美洲和美洲 12 个国家分离的 118 株动物源金黄色葡萄球菌研究认为,与动物相关的金黄色葡萄球菌序列型主要分布在 CC1、CC5、CC8、CC20、CC22、CC25、CC30、CC50、CC96、CC97、CC101、CC121、CC126、CC130、CC133、CC151、CC350、CC479 和 CC703 克隆复合群中,本研究得到的数据与此并不一致,可能动物源金黄色葡萄球菌存在较大的地区差异。

**致谢:**本文用到的浙江、山东、内蒙古和上海分离株共 34 株由浙江大学胡松华教授惠赠,在此表示感谢。

### 参考文献:

- [1] HOGAN J, LARRY SMITH K. Coliform mastitis [J]. *Vet Res*, 2003, 34(5): 507-519.
- [2] 杜 锐, 韩文瑜, 雷连成, 等. 动物源性金黄色葡萄球菌耐药性的检测 [J]. *中国兽医科技*, 2005, 35 (3): 230-232.
- [3] 陆亚华, 时庭文, 陈 虹, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及耐药基因研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(7): 744-745.
- [4] 孔海深, 徐根云, 李雪芬, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌多重耐药基因检测 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(10): 1027-1029.
- [5] SUTCLIFFE J, GREBE T, TAIT-KAMRADT A, et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 2562-2566.
- [6] LINA G, QUAGLIA A, REVERDY M E, et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Staphylococci* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43: 1062-1066.
- [7] MINOV R I, GARRIGUES JEANJEAN N, MACKIE R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2-32.
- [8] CHOPRA I, ROBERTS M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65: 232-260.
- [9] HUYS G, D'HAENE K, COLLARD J M, et al. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 1555-1562.
- [10] TRZCINSKI K, COOPER B S, HRYNIEWICZ W, et al. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2000 Jun; 45 (6): 763-770.
- [11] SCHMITZ F J, FLUIT A C, GONDOLF M, et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals [J]. *J Antimicrob Chemother*. 1999, 43: 253-259.
- [12] HANSEN AM, SOLLID JU. SCC mec in staphylococci: genes on the move [J]. *Immunology and Medical Microbiology*, 2006, 46: 8-20.
- [13] DEURENBERG R H, VINK C S, KALENIC A W. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13: 222-235.
- [14] ENRIGHT M C, DAY N P J, DAVIES C E, et al. Multilocus sequence typing for the characterization of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-susceptible (MSSA) clones of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 1008-1015.
- [15] ENRIGHT M C, ROBINSON D, RANDLE G, et

- al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7687-7692.
- [16] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing [M]. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
- [17] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement [S]. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
- [18] OLIVEIRA D C, DE LENCASTRE H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 46: 1008-1015.
- [19] 纪冰. 金黄色葡萄球菌耐药表型特征及耐药机制研究 [D]. 安徽医科大学硕士学位论文, 2007.
- [20] ARAJ G F, TALHOUK R S, Simaan C J, et al. Discrepancies between *mecA* PCR and conventional tests used for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 1999, 11: 47-52.
- [21] UBUKATA K, NONOGUCHI R, MATSCHASHI M, et al. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein [J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(5): 2882-2885.
- [22] 杨平满, 周建英. 常见多重耐药菌的耐药机制及防治对策 [J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(12): 1434-1437.
- [23] LIM J A, KWON A R, KIM S K, et al. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin in antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49: 489-495.
- [24] MA X X, 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: 1147-1152.
- [25] 余方友, 李美兰, 林晓梅, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 SCCmec 基因型及耐药谱研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 6(26): 543
- [26] 王新, 黄山, 周婷, 等. 猪源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及其 SCCmec 基因分型研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2010, 12: 975-977.
- [27] OKUMA K, IWAKAWA K, TURNIDGE J D, et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community [J]. *J Clinical Micro*, 2002, 40(11): 4289-4294.
- [28] SMYTH D S, FEIL EDWARD J, MEANEY W J, et al. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus* [J]. *J Medical Micro*, 2009, 58(10): 1343-1353.

(编辑 白永平)