

• 论 著 •

金黄色葡萄球菌耐药基因及致病毒素基因的相关性研究

王凤玲¹, 侯振江¹, 张金艳², 李红心³, 代荣琴¹

(1. 沧州医学高等专科学校医技系, 河北 061001; 2. 河北医科大学第四医院检验科, 石家庄 050011; 3. 河北省沧州市人民医院检验科 061001)

摘要:目的 研究携带 *TSST-1* 和 *PVL* 基因的金黄色葡萄球菌耐药特点、分布特征及与致病性的关系。方法 临床收集 74 株金黄色葡萄球菌, 采用 PCR 法检测 *TSST-1*、*PVL* 和 *mecA* 基因, 纸片扩散法进行 17 种抗菌剂的耐药性检测。结果 74 株金黄色葡萄球菌中 *mecA* 基因检出率为 55.4%, 其中 22 株检出 *PVL* 基因 (30.3%), *PVL* 阳性的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 为 15 株 (36.6%), 甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA) 为 7 株 (21.2%), 两者间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。5 株金黄色葡萄球菌中检出 *TSST-1* 基因 (6.3%), 均为 MRSA。MRSA 耐药性严重, 并呈多重耐药性, 携带基因 *PVL* 和 *TSST-1* 的 MRSA 除对万古霉素敏感外, 对其他抗菌剂均耐药。结论 携带基因 *TSST-1* 和 *PVL* 的金黄色葡萄球菌耐药性及致病力更强, 增加了临床抗感染治疗的难度。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; *mecA* 基因; *PVL* 基因; *TSST-1* 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)16-1820-02

Correlation between drug-resistant genes and pathogenic genes of *Staphylococcus aureus*

Wang Fengling¹, Hou Zhenjiang¹, Zhang Jinyan², Li Hongxin³, Dai Rongqin¹

(1. Department of Medical Technology, Cangzhou Medical College, Hebei 061001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Cangzhou People's Hospital, Hebei 061001, China)

Abstract: Objective To investigate the antibiotic-resistant characters and distribution of *Staphylococcus aureus* (S. aureus) with *PVL*, *TSST-1* genes and the correlation between the genes and the pathogenicity. Methods 74 strains of S. aureus were collected and detected for *PVL*, *mecA* and *TSST-1* genes by PCR. Drug-resistance was detected by disk diffusion method. Results In total 74 strains, the detection rate of *mecA* gene was 55.4%, among which 22 (30.3%) strains were with *PVL* gene. Among the strains with *PVL* gene, 36.6% were MRSA and 21.2% were MSSA, and the difference between the constituent ratios of MRSA and MSSA were not statistically significant ($P>0.05$). 5 (6.3%) strains were with *TSST-1* gene and were all MRSA. MRSA strains were resistant to 16 antibiotics with the exception of vancomycin. Conclusion S. aureus with *PVL* and *TSST-1* genes could possess stronger drug-resistance and pathogenicity, which might bring difficulty to clinic treatment.

Key words: staphylococcal aureus; *mecA* gene; Pantone-Valentine leukocidin gene; toxic shock syndrome toxin-1 gene

金黄色葡萄球菌是人类化脓性感染中最常见病原菌, 随着抗生素的广泛应用, 耐药性日益增加, 尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 具有多重耐药性, 已成为临床抗感染治疗的一大难题^[1]。本研究对 74 株金黄色葡萄球菌检测基因 *mecA*、*TSST-1* 和 *PVL* 及进行药敏试验, 分析产 *PVL*、*TSST-1* 金黄色葡萄球菌的耐药性、分布特征及与致病性的关系, 为临床治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 74 株金黄色葡萄球菌, 分离于 2007 年 1 月至 2008 年 1 月住院患者痰液、脓液、血液、腹腔引流物、胸腔积液、脓疱液等标本, 无重复分离株, 全自动微生物分析仪鉴定为金黄色葡萄球菌。质控菌株 ATCC25923。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 纸片扩散法进行药敏试验, 按 2006 年美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 标准判断结果。

1.2.2 引物合成 引物根据 Gen Bank 发布的基因序列并参考文献设计 *mecA*、*TSST-1*、*PVL* 基因引物, 委托上海生物工程技术有限公司合成^[2-3]。*mecA*: P1, 5'GCC GTA GTT GTC GGG TTT GG3'; P2, 5'GGC GGA TGT GCG ATT GTA TTG C3'; *PVL*: P1, 5'GTG ATG GCG CTG AGG TAG TC3'; P2, 5'GCT GGG GGT AAT TCA TTG TCT G3'; *TSST-1*: P1, 5'GCT ATC GTA AGC CCT TTG TTG C3'; P2, 5'GCT GGA TCC GTC ATT CAT TGT T3'。

1.2.3 细菌模板 DNA 制备 将冰冻菌株用胰酶大豆肉汤复苏、转种哥伦比亚羊血培养基。取培养菌落于 100 μ L 裂解液中, 100 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 冷却后等量 1 mol 盐酸中和, 离心去沉淀, 加乙醇沉淀, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 冷冻 30 min, 离心 15 min, 弃上清液。再用 70% 乙醇 200 μ L 离心 5 min, 吸干上清液, 用双蒸水溶解备用。

1.2.4 PCR 检测 *mecA*、*TSST-1*、*PVL* 基因 采用 20 μ L 反应体系: 模板 1 μ L, 引物 2 μ L, 三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 1.5 μ L, *Taq* 酶 0.2 μ L, 10 \times 缓冲液 2 μ L, Mg^{2+} 离子 2 μ L, 双蒸水 11.3 μ L。扩增条件: 预变性 94.0 $^{\circ}$ C 4 min, 94.0 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 52.0 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72.0 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 35 个循环, 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 15 min, 产物 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理, 行 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *mecA* 基因检测结果 74 株金黄色葡萄球菌检出 *mecA* 基因 41 株, MRSA 的检出率为 55.4%。

2.2 药敏试验结果 74 株金黄色葡萄球菌对 17 种抗菌剂的耐药率, 见表 1。

2.3 致病毒素基因检出情况 74 株金黄色葡萄球菌中致病毒素基因检出结果, 见表 2。

2.4 致病毒素基因的分布情况 47 株痰液中 *PVL* 基因阳性

12 株(25.5%),15 株脓液中 6 株(40.0%),4 株血液中 1 株(25.0%),患者多来自呼吸内科、血液科、肿瘤内科和骨外科。TSST-1 基因阳性标本痰液 4 株(8.5%),在脓液 1 株(6.7%),均来自 ICU 的重症患者。

表 1 74 株金黄色葡萄球菌对 17 种抗菌剂的耐药率(%)

抗菌剂	MRSA	MSSA	PVL ⁺	PVL ⁺ 、
			金葡萄菌	TSST-1 ⁺ MRSA
青霉素	100.0	93.9	100.0	100.0
苯唑西林	100.0	0.0	100.0	100.0
头孢噻吩	100.0	0.0	100.0	100.0
氨苄西林	100.0	93.9	100.0	100.0
头孢唑啉	100.0	0.0	55.4	100.0
头孢噻肟	100.0	0.0	55.4	100.0
阿莫西林/棒酸	100.0	0.0	55.4	100.0
亚胺培南	100.0	0.0	55.4	100.0
红霉素	97.6	69.7	100.0	100.0
克拉霉素	97.6	51.5	86.4	100.0
盐酸克林霉素	78.7	60.6	90.9	100.0
万古霉素	0.0	0.0	0.0	0.0
环丙沙星	97.6	6.1	72.7	100.0
庆大霉素	97.6	33.3	81.8	100.0
利福平	87.2	3.0	72.7	100.0
四环素	97.6	3.0	72.7	100.0
复方新诺明	4.3	3.0	9.1	100.0

表 2 74 株金黄色葡萄球菌中致病毒素基因检出结果

菌种	菌株数 (n)	PVL ⁺	PVL ⁺	TSST-1 ⁺	TSST-1 ⁺
		菌株(n)	检出率(%)	菌株(n)	检出率(%)
MRSA	41	15	36.6	5	12.2
MSSA	33	7	21.2	0	0.0
总计	74	22	29.7	5	6.8

3 讨论

近年来,MRSA 所致医院感染呈上升趋势,传播速度快、流行范围广、多部位感染,并呈多重耐药性^[4],携带毒素因子(如 PVL、TSST-1)的金黄色葡萄球菌毒力更强,与感染后疾病的严重程度相关。本研究 74 株金黄色葡萄球菌中甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MRSA)的检出率为 55.4%,低于参考文献^[5-6]报道的结果,比金咏絮等^[7]报道的高。药敏试验结果显示,MRSA 耐药性比 MSSA 严重,表现对多种抗菌剂同时耐药,仅对万古霉素、复方新诺明敏感,与张保华等^[8]的研究结果相似。菌株来源以痰液、脓液、血液为主,与李争鸣等^[9]报道相符合。PVL 是金黄色葡萄球菌产生的外毒素,由 Luks-PV 和 LukF-PV 基因编码,通过噬菌体携带后与金黄色葡萄球菌的染色体结合,是重要的致病因子,可破坏人体 WBC 及组织,在儿童和成人患者中造成坏死性肺炎和坏死性皮肤损害等。本研究的资料显示金黄色葡萄球菌 PVL 阳性率为 29.7%,比杜娜等^[10]报道 7.2% 高;MRSA 的 PVL 阳性率为 36.6%,高于张征等^[11]报道的 27%。值得注意的是在 MSSA 中检出携带 PVL 基因的菌株,阳性率达 21.2%,而张青等^[12]研究结果显示携带 PVL 基因的金黄色葡萄球菌全部为 MRSA,这可能于标本来源不同有关。由于 MSSA 的耐药性不严重,所引起的感染往往被临床忽视,产 PVL 的细菌致病力更强,可能会给患者造成不良后果。22 株 PVL 基因阳性标本 12 份来自痰液,6 份来自脓液,1 份来自血液,说明产 PVL 的金黄色葡萄球菌感染以呼吸系统感染、化脓性感染和败血症为主。TSST-1 是金黄色葡萄球菌产生的外毒素,属于致热原性超抗原家族,由 TSST-1 基因编码,位于细菌染色体上。TSST-1 可增强机

体对内毒素的敏感性,使内毒素的致死效应扩大 10⁵~10⁶ 倍,最终导致炎症失控、多器官损害,严重的导致中毒性休克,死亡率高。本研究 TSST-1 基因检出率为 6.8%,明显低于王敏等^[13]报道的结果,国外报道 TSST-1 基因在 MSSA 检出率为 40%^[14],但本研究在 MSSA 中未检出 TSST-1 基因;TSST-1 基因阳性菌株均是 MRSA,分离自痰液、脓液,表明产 TSST-1 的细菌多造成呼吸系统感染和化脓性感染。5 株标本均来源于 ICU 的重症患者,同时携带 PVL 基因,表明同时产 TSST-1、PVL 的 MRSA 致病力更强。药敏试验结果显示这 5 株标本除对万古霉素敏感外对其他 16 种抗菌剂均耐药,表明同时携带 PVL 和 TSST-1 基因的 MRSA 可造成更严重的感染性疾病,呈现严重的多重耐药性,增加了临床抗感染治疗的难度,甚至危及患者的生命。

综上所述,产 PVL、TSST-1 的金黄色葡萄球菌在临床分离菌中占有一定的比例,尤其同时携带 PVL 和 TSST-1 基因的细菌已检出,应引起临床高度的重视,金黄色葡萄球菌耐药基因与致病毒素基因之间的相关性有待今后进一步研究证实。

参考文献

- [1] 王凤玲,侯英荣,冯秀河. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药基因及致病毒素基因的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(1):72-75.
- [2] McClur JA, Conly JM, Lau V, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination methicillin susceptible from resistant Staphylococci[J]. Clin Microbiol, 2006,44(3):1141-1144.
- [3] 杜娜,王辉,牛俊奇,等. 我国五家教学医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 分型及毒素基因的检测[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(5):499-504.
- [4] 张传栋. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌临床耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2010,21(1):44.
- [5] 张连芝,王欣,周密,等. 医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染现状的分析[J]. 中国实验诊断学杂志,2010,14(6):892-894.
- [6] 曾令晓,韦明新. 金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(9):902-903.
- [7] 金咏絮,林其昌,陈公平,等. 我院 2007~2008 年金黄色葡萄球菌耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(1):53-56.
- [8] 张保华,付光林,余桂香,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(2):131-132.
- [9] 李争鸣,阳大庆,桂芳,等. 128 株金黄色葡萄球菌耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志,2007,6(6):409-412.
- [10] 杜娜,牛俊奇,王辉,等. 我国各地区 18 所教学医院金黄色葡萄球菌临床分离株杀白细胞毒素基因检测及分子流行病学调查[J]. 中国感染与化疗杂志,2008,8(2):112-115.
- [11] 张征,孙静娜,王政民,等. 杀白细胞毒素基因阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的经毒素耐药基因的检测[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(1):24-26.
- [12] 张青,陈增强,黄金伟,等. 金黄色葡萄球菌所致肺部感染的耐药特点及其 Pantone-Valentine 杀白细胞素基因的携带状况分析[J]. 中国微生态学杂志,2008,20(1):51-53.
- [13] 王敏,付灵,李先平. 金黄色葡萄球菌中毒性休克综合征毒素 1 基因的检测[J]. 中国生物制品学杂志,2008,21(4):295-297.
- [14] Layer F, Chebremedhin B, Koing W, et al. Heterogeneity of methicillin-susceptible staphylococcus aureus strains at a German university hospital implicates the circulating strain pool as a potential source of emerging methicillin-resistant S. aureus clones[J]. J Clin Microbiol,2006,44(6):2179-2185.