

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 SPA 基因分型研究与耐药性分析*

段宝生 (内蒙古医科大学鄂尔多斯临床医学院, 内蒙古鄂尔多斯 017000)

摘要:目的 探讨鄂尔多斯地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)分离株杀白细胞毒素(PVL)基因分布特点及药物敏感性。**方法** 收集2012年6月~2014年12月临床分离的 SCCmec II型和III型 MRSA 菌株66株,应用聚合酶链反应对菌株进行PVL基因型检测,用琼脂稀释法测定PVL阳性菌株对常用抗菌药物的敏感性。**结果** 66例MRSA有6例PVL阳性,阳性率9.09%,其中II型4株,III型2株;6株PVL阳性菌均对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺和对多种非β内酰胺类抗菌药敏感,对β内酰胺类、大环内酯类和克林霉素高度耐药。**结论** 在鄂尔多斯地区MRSA菌株中PVL阳性菌株较低,4株为CA-MRSA,2株为HA-MRSA,若以PVL阳性作为区分MRSA类型的标志有待进一步研究。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;杀白细胞毒素;聚合酶链反应;琼脂稀释法

中图分类号:R378.11;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)02-080-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.024

Resistance Drug Analysis and the Detection of PVL Gene of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*

DUAN Bao-sheng (Medical College of Ordos,
Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia Ordos, 017000, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of Panton-Valentine leukocidin gene Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Mongolian in Ordos, and the antimicrobial susceptibility of clinical isolates of MRSA strains. **Methods**

A total of 66 MRSA isolates were collected from July 2012 to December 2014 of SCCmec II and SCCmec III. The polymerase chain reaction (PCR) were used to determine PVL gene. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics for all isolates were determined by agar dilution method. **Results** Among 66 MRSA strains, the PVL genes were found in 9.09%, 4 were identified as SCCmec II and 2 as SCCmec III. All PVL positive strains were susceptible to vancomycin, teicoplanin, linezolid and non-β-lactam antibiotics, all were resistant to β-lactam antibiotics, macrolides and clindamycin. **Conclusion**

The PVL gene positive rate of MRSA isolates was low in Ordos. Among 6 PVL gene positive isolates of MRSA, four belonged to CA-MRSA, two belonged to HA-MRSA. However, a considerable sign of MRSA strains might be undecided by PVL gene.

Keywords: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; panton-valentine leukocidin; PCR; minimal inhibitory concentrations

目前,由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA)引起的临床感染所占比例呈逐年上升的趋势,是引起医院和社区获得性感染的重要病原菌^[1]。依据mec和ccr基因复合体的多态性,可分为十余种类型^[2],不同地区的基因型可能不同,不同遗传背景的克隆株所携带的毒力基因常存在一定的差异。金黄色葡萄球菌致病力强弱与其产生的毒素及侵袭性酶密切相关,目前具有超过30种以上的毒力因子,如杀白细胞毒素(PVL)等,介导以血管扩张、炎性细胞浸润、组织坏死等为表现的炎性反应。因此,收集MRSA的菌株及临床资料,对其进行PVL毒力基因及药物敏感性研究,最终结合临床资料进一步分析其感染现状及致病特征,为感染和

防治提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集鄂尔多斯地区2012年6月~2014年12月期间门诊及住院检出的MRSA分离株阳性标本66例及其临床资料,标本为血、胸腔积液、封闭脓汁、下呼吸道痰标本、支气管灌洗液、引流液以及尿液、伤口分泌物等。对鉴定为MRSA菌株的标本采用无菌ALT纸片法保存于一70℃冰箱中。标本排除同一患者同一部位重复分离株。本研究获得内蒙古医科大学伦理委员会的批准,并签署知情同意书。

1.2 试剂和仪器 美国贝克曼公司生产的台式离心机;美国Alpha Innotech有限公司生产的凝胶成像仪;Gene Amp基因有限公司生产的PCR9700

* 基金项目:内蒙古自然科学基金(2013MS1116)。

作者简介:段宝生(1969—),男,汉族,硕士,主任检验师,主要从事微生物耐药机制研究, Tel:15049456590。

扩增仪; BIO-RAD 有限公司生产的电泳仪; 细菌基因组提取试剂盒购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; Taq 酶、Marker 及 PCR 相关试剂购于北京 TIANGEN 生物技术服务有限公司; PCR 所有引物均由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 基因提取: 采用 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司生产的细菌基因组提取试剂盒, 依照说明提取基因组 DNA, 用多重 PCR 的方法对其进行 SCCmec 分型, 阳性基因产物保存 -70°C 冰箱中备用。

1.3.2 毒力基因检测: 参照文献[3]合成 PVL 引物(PVL-正向和 PVL-反向), 并按照 mPCR 扩增反应体系和条件对 MRSA 菌株 PVL 毒力基因进行扩增及检测, 于紫外凝胶成像系统观察结果, 将其 PCR 阳性扩增产物纯化, 送上海生工生物技术

公司测序, 测序结果与数据库已公布的数百种重复序列和 spa 型别比对, 根据串联重复序列出现的次数和排列方式确定型别。

1.3.3 药敏试验: 采用 CLSI 推荐的琼脂对倍稀释法测定最低抑菌浓度(MIC), 选取红霉素、克林霉素、庆大霉素、左旋氧氟沙星、利福平、复方新诺明、夫西地酸、万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺和呋喃妥因对收集菌株进行药敏试验。整个过程参照 NCCLSM100-S18 文件中的规定进行。全部药敏结果输入世界卫生组织(WHO)耐药监测组提供的 WHONET 软件, 分析耐药模式。

2 结果

2.1 PVL 基因检测结果 66 株 MRSA 均进行了 PVL 毒力基因扩增, 有 6 例 PVL 阳性, 阳性率 9.09%, 其中 II 型 4 株, 为 CA-MRSA; III 型 2 株, 为 HA-MRSA, 代表株测序图谱见图 1。

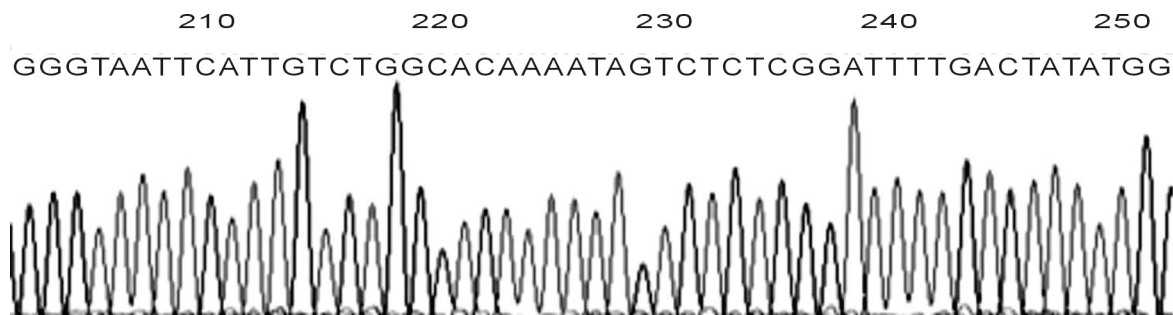


图1 MRSA 菌株 PVL 基因测序序列图谱

2.2 耐药结果 66 株 MRSA 对复方新诺明、夫西地酸均表现为较高的敏感率, 分别为 76.6%, 88.12%; 对庆大霉素、红霉素、利福平、克林霉素、左旋氧氟沙星均表现为较高的耐药率, 分别为 87.8%, 87.2%, 85.6%, 88.8%, 82.9%; 对呋喃妥因、利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁均表现为敏感。

3 讨论 金黄色葡萄球菌致病力强弱与其产生的毒素及侵袭性酶密切相关, 目前具有超过 30 种以上的毒力因子, 毒力因子具有一定的通透性, 可使细胞发生溶解, 中性粒细胞释放免疫酶和细胞因子, 介导以血管扩张、炎性细胞浸润、组织坏死等为表现的炎性反应, 并可能通过抑制巨噬细胞的功能, 引起感染进一步扩散, 从而在金黄色葡萄球菌侵袭组织、逃避宿主免疫系统、产生耐药性等方面具有重要作用。而且不同菌株所携带的毒力基因常存在一定的差异。因此, 探究不同菌株之间携带毒力基因的差异性, 分析不同毒力基因型菌株之间的相关性及分布规律, 并结合临床资料分析其致病特征, 探究其致病机制。

PVL 是由携带 PVL 基因金黄色葡萄球菌分

泌的一种穿孔素, 由 S 和 F 蛋白组成, 是金黄色葡萄球菌的重要外毒素。它可通过细胞凋亡和细胞坏死变性等方式对人的多形核细胞产生特异性的杀伤作用, 并且可诱导金黄色葡萄球菌分泌蛋白、细胞壁锚定蛋白等基因转录水平的全面改变。从而导致人体皮肤软组织反复感染, 产生慢性骨髓炎和坏死性肺炎。从罹患蜂窝组织炎脓肿和疖肿等疾病的感染者身上获取的金黄色葡萄球菌 PVL 阳性率达 50%, 引起甲沟炎的金黄色葡萄球菌中 PVL 阳性率为 13%^[4]。杜娜等^[5]对国内 5 所医院检测数据表明, PVL 检出率以武汉同济医院最高(15.8%), 浙江大学第一附属医院最低(2.5%)。近年来, 有研究资料表明, PVL 基因和 CA-MRSA 菌株之间存在一定的相关性^[6]。在社区获得性金黄色葡萄球菌(CA-MRSA)菌株中, 携带 PVL 基因的菌株比例达 33%~50%, 而在医院获得性金黄色葡萄球菌(HA-MRSA)菌株中, 携带 PVL 基因的菌株不足 0.5%。但本次研究中, 4 株为 CA-MRSA, 2 株为 HA-MRSA, 以 PVL 阳性是否能作为区分 MRSA 类型的标志还有待进一步研究。而

且在 PVL 基因扩增阳性率仅为 9.09%, 较低, 其原因可能和地域特征及民族特征有一定的关系, 不同地区、不同民族的阳性率可能也不同。另外含有杀白细胞毒素的金黄色葡萄球菌可能具有更高的致死率。在金黄色葡萄球菌引起的肺炎病例中, 分离菌株携带 PVL 基因的病人在住院后 48h 内死亡率为 37%, 最终死亡率达 75%; 而分离菌株不携带 PVL 基因的病人在住院 48 h 内死亡率仅为 6%^[7]。本研究发现 MRSA 对多种抗生素耐药, 具有多重耐药性, 未发现对万古霉素的耐药菌株。

综上所述, 一般认为金黄色葡萄球菌通过噬菌体溶原转换机制获得产 PVL 能力, 并可能存在通过感染性质粒途径在不同菌株间水平传播。因此它的传播势必加大 MRSA 所造成的危害, 所以, 对 MRSA 进行 PVL 基因的监测是非常必要的。

参考文献:

- [1] Li S, Skov RL, Han X, et al. Novel types of *Staphylococcal* cassette chromosome mec elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6):3046-3050.
- [2] Shore AC, Deasy EC, Slickers P, et al. Detection of *Staphylococcal* cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(8): 3765-3773.
- [3] van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, et al. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 126(4):383-389.
- [4] 周信云, 胡龙华, 熊建球, 等. 金黄色葡萄球菌儿童临床分离株携带 PVL 基因状况的分析[J]. 中国微生物学杂志, 2011, 23(10):897-898, 901.
Zhou XY, Hu LH, Xiong JQ, et al. The detection of panton-valentine leukocidin gene of *Staphylococcus aureus* clinically isolated from children[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(10):897-898, 901.
- [5] 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.
Du N, Wang H, Niu JQ, et al. Detection of SCCmec typing and toxic genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at five teaching hospitals in China [J]. Chin J Lab Med, 2007, 30(5):499-504.
- [6] 王艳海, 段宝生, 巴特尔, 等. 鄂尔多斯地区蒙古族人群耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型[J]. 检验医学, 2014, 29(2):110-114.
Wang YH, Duan BS, Bateer, et al. Genotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from mongolian in Ordos[J]. Laboratory Medicine, 2014, 29(2): 110-114.
- [7] Raab U, Kahlau D, Wagenlehner F, et al. Prevalence of and risk factors for carriage of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among residents and staff of a German nursing home[J]. Infection control and Hospital Epidemiology, 2006, 27(2):208-211.

收稿日期:2015-09-16

修回日期:2015-12-01

(上接 79 页)

- Zhong LB, Wu QQ, Lü SP, et al. Clinical value of neutrophil alkaline phosphatase stain on bone marrow smear in non-Hodgkin's lymphoma diagnosis[J]. Experimental and Laboratory Medicine, 2014, 32(1):19-20.
- [4] 刘景华, 周凡, 刘彦琴, 等. 中性粒细胞碱性磷酸酶染色对淋巴瘤病理分型及病情评估的意义[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(23):4210-4212.
Liu JH, Zhou F, Liu YQ, et al. Significance of neutrophil alkaline phosphatase stain on pathology typing and prognosis evaluation of lymphoma [J]. Journal Practical Medicine, 2011, 27(23):4210-4212.
- [5] 饶国洲, 王华, 苍金荣, 等. 一种对组织工程支架材料上细胞的非特异性荧光染色方法的建立[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3):78-80.
Rao GZ, Wang H, Cang JR, et al. Establishment and

application of the method of A non-specific fluorescence staining with cells on tissue engineering scaffolds materials [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3):78-80.

- [6] 韩树林, 张淑英, 曲延章. 一种新的中性粒细胞碱性磷酸酶染色方法[J]. 黑龙江医学, 2000(9):39.
Han SL, Zhang SY, Qu YZ. A new neutrophil alkaline phosphatase staining method[J]. Heilongjiang Medical Journal, 2000(9):39.
- [7] 李福德, 曹元, 周赫男, 等. 骨髓涂片中性粒细胞碱性磷酸酶染色法的改进[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(6):705-706.
Li FD, Cao Y, Zhou HN, et al. Improved bone marrow smears neutrophil alkaline phosphatase staining method[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2012, 28(6):705-706.

收稿日期:2015-05-20

修回日期:2016-01-05