

# 金黄色葡萄球菌致病毒素基因与耐药性的相关性研究

刘玉枝<sup>1</sup>, 王凤玲<sup>1</sup>, 陈 洋<sup>1</sup>, 刘 静<sup>2</sup> (1. 河北省沧州医学高等专科学校, 河北沧州 061001; 2. 河北省沧州中西医结合医院, 河北沧州 061001)

**【摘要】 目的** 研究金黄色葡萄球菌的致病毒素基因与耐药性的关系。**方法** 对临床收集的 74 株金黄色葡萄球菌, 采用聚合酶链反应(PCR)检测耐药基因 *mecA* 和致病毒素基因中毒休克综合征毒素-1(TSST-1)、杀白细胞毒素(PVL), 采用纸片扩散法进行药敏试验, 对红霉素耐药和克林霉素敏感的菌株做 D-试验。**结果** 74 株金黄色葡萄球菌中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的检出率为 55.4%。MRSA 除对万古霉素、呋喃妥因敏感外, 对其他抗菌药物均高度耐药, 甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)对抗药物的耐药性较轻, 两组间的耐药性差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PVL 基因阳性的 MRSA 耐药性与 PVL 基因阴性的 MRSA 比较, 两组间耐药性差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。PVL 基因阳性的 MSSA 耐药性比不携带 PVL 基因的 MSSA 强, 两者间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。携带 TSST-1 基因的 MRSA 除对万古霉素、呋喃妥因无耐药菌株外, 对其他 16 种抗菌药物 100% 耐药。D-试验阳性菌株占所检菌株的 10.8%, 占红霉素耐药、克林霉素敏感菌株的 88.9%。只有 1 株 PVL 基因阳性的 MRSA D-试验阳性。**结论** MRSA 的耐药性非常严重, 表现为对多种抗菌药物同时耐药, 并且具有较高的红霉素诱导克林霉素耐药率; PVL 和 TSST-1 可增强金黄色葡萄球菌的致病力及 MSSA 的耐药性, 增加了临床抗感染治疗的难度。

**【关键词】** 金黄色葡萄球菌; 杀白细胞毒素基因; 中毒休克综合征毒素-1 基因; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.17.020 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)17-2151-03

**Study correlation on pathogenic genes and antibiotic resistance of staphylococcus aureus** LIU Yu zhi<sup>1</sup>, WANG Feng-ling<sup>1</sup>, CHEN Yang<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>2</sup> (1. Cangzhou Medical College, Hebei, Cangzhou, 061001, China; 2. Hebei Medical University Fourth Hospital, Hebei, Cangzhou 060011, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate correlation on pathogenic genes and antibiotic resistance of staphylococcus aureus. **Methods** 74 strains of staphylococcus aureus were isolated from the various clinical specimens. PVL gene, *mecA* gene and *Tsst-1* gene were conducted using a novel multiplex PCR. The antimicrobial resistnace was measured by agar diffusion method. The inducible clindamycin resistance was checked by D-test. **Results** The incidence of MRSA from 74 strains of staphylococcal aureus was 55.4%, most of which were multidrug-resistant strains, but susceptible to vancomycin and furadantin. Antimicrobial resistnace of MSSA was lower than MRSA. The difference of MRSA and MSSA had significance ( $P < 0.05$ ). Between antibiotic resistnace of MRSA with PVL gen and MRSA with no PVL gene, the two methods did not show significant difference ( $P > 0.05$ ). Antimicrobial resistnace of MSSA with PVL gene was more serious than MSSA without PVL gene. The two methods have significant difference ( $P < 0.05$ ). MRSA with TSST-1 gene was resistant to 16 antibiotics, except for vancomycin, furadantin. D-test positive strains accounted for 10.8% among detected strains and 88.9% among erythromycin-resistant, clindamycin-susceptible strains. Only 1 strain of D-test positive MRSA had TSST-1 gene. **Conclusion** MRSA strains are seriously resistant to antibiotics. They are characterized by multidrug resistance and high rate of inducible clindamycin resistance. PVL gene and *Tsst-1* gene can increase pathogenic power and antibiotic-resistance of MSSA. This brings difficulty to clinic treatment.

**【Key words】** staphylococcal aureus; panton-valentine leukocidin gene; toxic shock syndrome toxin-1 gene; antibiotic-resistance

金黄色葡萄球菌是医院感染的重要病原菌之一, 随着抗菌药物的广泛应用, 金黄色葡萄球菌尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药性日益增强, 并呈现多重耐药性, 而且红霉素具有诱导克林霉素耐药的作用, 给临床抗感染治疗带来困难。本研究对 74 株金黄色葡萄球菌进行耐药基因 *mecA*、致病毒素基因杀白细胞毒素(PVL)基因和中毒休克综合征毒素-1(TSST-1)基因检测和药敏试验、D-试验, 以探讨金黄色葡萄球菌尤其 MRSA 的耐药性及诱导耐药性与致病毒素基因的相关性, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 74 株金黄色葡萄球菌来源于 2007 年 1 月至 2008 年 4 月沧州中西医结合医院住院患者各种临床标本中分离的金黄色葡萄球菌, 包括痰液、脓液、血液、腹腔引流物、肾囊肿穿刺液、胸腔积液、脓疱液、疱液、导管下段及导管尖端, 无重复分离株, 经全自动微生物分析仪鉴定为金黄色葡萄球菌, 质控菌株为 ATCC25923。

**1.2 主要仪器** WalkAway-40 型全自动微生物分析仪(美国 DADE-BERING 公司产品), 聚合酶链反应(PCR)仪(美国 Ep-

pendorf 公司产品), 凝胶成像仪(美国 Fotodyne 公司产品), 电泳仪(瑞典 Pharmacia 公司产品)。

**1.3 药敏试验** 采用标准的纸片扩散法, 操作及结果判读均严格按照 CLSI 标准。其中红霉素与克林霉素两纸片间的距离为 16~20 mm。如果红霉素耐药、克林霉素敏感, 临近红霉素纸片侧克林霉素抑菌圈出现切迹呈大写字母“D”时, 判为 D-试验阳性或红霉素对克林霉素具有诱导耐药性<sup>[1]</sup>。

**1.4 基因的检测**

**1.4.1 引物的设计** 根据 GenBank 中已发布的各型基因序列并参考部分文献<sup>[2]</sup> 自行设计 TSST-1 基因、PVL 基因、mecA 基因引物, 委托上海生工生物工程有限公司合成。PVL:P1 为 5'-GTG ATG GCG CTG AGG TAG TC-3', P2 为 5'-GCT GGG GGT AAT TCA TTG TCT G-3'。TSST-1:P1 为 5'-GCT ATC GTA AGC CCT TTG TTG C-3', P2 为 5'-GCT GGA TCC GTC ATT CAT TGT T-3', mecA:P1 为 5'-GCC GTA GTT GTC GGG TTT GG-3', P2 为 5'-GGC GGA TGT GCG ATT GTA TTG C-3'。

**1.4.2 PCR 检测** 基因 mecA、TSST-1、PVL 采用 20 μL 反应体系: 模板 1 μL, 引物 2 μL, dNTP 15 μL, Taq 酶 0.2 μL, 10× 缓冲液 2 μL, Mg<sup>2+</sup> 离子 2 μL, 双蒸水 11.3 μL。PCR 反应条件: 94.0 °C 4 min; 94.0 °C 30 s, 52.0 °C 30 s, 72.0 °C 2.5 min, 35 个循环; 72.0 °C 延伸 15 min, 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色 20 min, 清水冲洗后凝胶成像系统观察结果。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理, P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 MRSA 的分离率** 74 株金黄色葡萄球菌中 mecA 基因阳性 41 株, MRSA 检出率为 55.4%。

表 1 金黄色葡萄球菌对抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	MRSA(n=41)		MSSA(n=33)	
	敏感率	耐药率	敏感率	耐药率
青霉素	0.0	100.0	6.1	93.9
苯唑青霉素	0.0	100.0	100.0	0.0
头孢噻吩	0.0	100.0	100.0	0.0
来胺硫霉素	0.0	100.0	100.0	0.0
头孢唑啉	0.0	100.0	100.0	0.0
头孢噻肟	0.0	100.0	100.0	0.0
阿莫西林/棒酸	0.0	100.0	100.0	0.0
氨苄青霉素	0.0	100.0	6.1	93.9
红霉素	2.4	97.6	30.3	69.7
克拉霉素	2.4	97.6	48.5	51.5
氯林可霉素	21.3	78.7	39.4	60.6
庆大霉素	2.4	97.6	66.7	33.3
四环素	2.4	97.6	97.0	3.0
环丙沙星	2.4	97.6	93.0	6.1
利福平	12.8	87.2	97.0	3.0
呋喃妥因	100.0	0.0	100.0	0.0
万古霉素	100.0	0.0	100.0	0.0

注: MRSA 与 MSSA 的耐药性比较, P<0.05。

**2.2 致病毒素基因检出情况** 74 株金黄色葡萄球菌中检出 PVL 基因阳性 22 株, 其中 MRSA 中 PVL 基因阳性 15 株, 甲

氧西林敏感金黄色球菌(MSSA)中 7 株; TSST-1 基因阳性检出 5 株, 5 株 TSST-1 基因阳性的菌株 PVL 基因也阳性, 全部是 MRSA。

**2.3 药敏试验结果分析** 药敏结果显示 MRSA 对 β-内酰胺类抗菌药物 100% 耐药, 对红霉素、克拉霉素、环丙沙星、庆大霉素、四环素的耐药率达 97.6%, 对氯林可霉素和利福平的耐药率分别为 78.7% 和 87.2%。MSSA 的耐药性较轻, 除对青霉素、氨苄青霉素耐药率较高, 为 93.9%, 对红霉素、氯林可霉素、克拉霉素的耐药率在 50% 以上, 对环丙沙星、利福平、四环素较敏感, 敏感率分别为 93.0%、97.0% 和 97.0%。MRSA 和 MSSA 均未发现对万古霉素、呋喃妥因耐药的菌株。MRSA 与 MSSA 两组间的耐药性差异有统计学意义(P<0.05), 见表 1。携带 PVL 基因的 MRSA、MSSA 比不携带 PVL 基因的 MRSA、MSSA 的耐药性强, 只有 MSSA 两组间耐药性差异有统计学意义(P<0.05)。同时携带 TSST-1、PVL 基因的 MRSA 除对万古霉素、呋喃妥因敏感外, 对其他抗菌药物均 100% 耐药。金黄色葡萄球菌对红霉素和克林霉素不同耐药表型及 D-试验结果见表 2。

表 2 携带致病毒素基因的金黄色葡萄球菌耐药性结果分析(%)

抗菌药物	PVL+	PVL-	PVL+	PVL-	TSST-1+
	MRSA	MRSA	MSSA	MSSA	MRSA
青霉素	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0
苯唑青霉素	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0
头孢噻吩	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0
氨苄青霉素	100.0	100.0	100.0	96.2	100.0
头孢唑啉	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0
头孢噻肟	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0
阿莫西林	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0
亚胺硫霉素	100.0	100.0	0.0	0.0	100.0
红霉素	100.0	96.2	85.7	65.4	100.0
克拉霉素	100.0	96.2	85.7	42.3	100.0
氯林可霉素	100.0	88.5	85.7	60.9	100.0
万古霉素	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
环丙沙星	100.0	96.2	14.3	0.0	100.0
庆大霉素	100.0	96.2	71.4	23.1	100.0
利福平	100.0	84.6	14.3	0.0	100.0
四环素	100.0	96.2	14.3	0.0	100.0
呋喃妥因	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注: MRSA 与 MSSA 两组间的耐药性比较, P<0.05。

表 3 金黄色葡萄球菌对红霉素和克林霉素不同耐药表型(株)及 D 试验阳性的发生率[n(%)]

菌种	菌株数	E-S,CI-S	E-R,CI-R	E-R,CI-S	
				D-test(+)	D-test(-)
MRSA	41	1(2.4)	33(80.5)	6(14.6)	1(2.4)
MSSA	33	8(24.3)	23(69.7)	2(6.1)	0(0.0)
合计	77	9(12.2)	56(75.7)	8(10.8)	1(1.4)

注: E 为红霉素, CI 为克林霉素, R 为耐药, S 为敏感。

**2.4 D-试验结果** 74 株金黄色葡萄球菌中有 9 株红霉素耐药而克林霉素敏感, D-试验阳性 8 株, 占红霉素耐药克林霉素敏感的 88.9%, 其中有 1 株 D-试验阳性的 MRSA 携带 PVL 基因。D-试验结果见表 3。

### 3 讨 论

近年来 MRSA 的临床分离率呈明显上升趋势, 肖松生等<sup>[3]</sup>报道 MRSA 检出率为 34.13%, 杨长顺等<sup>[4]</sup>研究显示 MRSA 的检出率为 52.34%, 熊薇等<sup>[5]</sup>报道 MRSA 的检出率较高为 66.7%; 本研究中 74 株金黄色葡萄球菌 MRSA 的检出率介于其间, 为 55.4%, 研究结果表明 MRSA 在金黄色葡萄球菌引起的感染中占有较高的比例。药敏结果显示, MRSA 除对万古霉素、呋喃妥因敏感外, 对其他抗菌药物均高度耐药, MRSA 对  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、红霉素、克拉霉素、四环素、利福平等抗菌药物的耐药率均显著高于 MSSA, 与金咏絮等<sup>[6]</sup>报道相似, 表明临床上治疗 MRSA 选用的抗菌药物种类已较少。MSSA 的耐药性较轻, 除对青霉素、氨苄青霉素、红霉素、氨林克霉素、克拉霉素耐药率较高外, 对其他抗菌药物均较敏感。MRSA 与 MSSA 两组间的耐药性差异有统计学意义。

本研究对携带致病毒素基因的 MRSA 和 MSSA 的耐药性进行综合分析, 发现携带 PVL 基因的 MRSA 除对万古霉素、呋喃妥因 100% 敏感外, 对其他抗菌药物均完全耐药, 但与 PVL 基因阴性的 MRSA 间耐药性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 可能与 MRSA 自身的耐药性非常严重并呈多重耐药性有关。PVL 基因阳性的 MSSA 对环丙沙星、庆大霉素、利福平、四环素、克拉霉素、氯林克霉素、红霉素的耐药性比不携带 PVL 基因的 MSSA 强, 两组间的耐药性差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。TSST-1 基因阳性的 MRSA 同时携带 PVL 基因, 除对万古霉素、呋喃妥因外, 对其他 16 种抗菌药物也均 100% 耐药。葡萄球菌对大环内酯类抗菌药物耐药表型分为结构型耐药和诱导型耐药; 结构型耐药对红霉素和克林霉素均耐药, 诱导型耐药对红霉素耐药而对克林霉素敏感, 只有通过 D-试验才能检测出来<sup>[7]</sup>。D-试验结果显示结构型耐药的 MRSA 和 MSSA 分别为 80.5% 和 69.7%, 占全部金黄色葡萄球菌的 75.7%, 与刘庆中等<sup>[8]</sup>报道的结果相似。红霉素耐药而克林霉素敏感的 MRSA 和 MSSA 分别有 7 株和 2 株, 其中 D-试验阳性的 8 株, 诱导耐药阳性率为 88.9%, 明显高于彭少华等<sup>[9]</sup>的报道的结果, 金黄色葡萄球菌的总诱导耐药率为 10.8%, 低于詹燊<sup>[10]</sup>的研究结果。有 1 株 PVL 基因阳性的菌株 D-试验阳性, 因其检测的菌株较少, 不能有效反映 PVL 基因与细菌的诱导耐药性的相关性。

综上所述, MRSA 的耐药性非常严重, 表现为对多种抗菌

药物同时耐药, 并且具有较高的红霉素诱导克林霉素耐药特性, PVL 和 TSST-1 可增强金黄色葡萄球菌的致病力及耐药性, 尤其能明显增强 MSSA 的耐药性, 这些应引起临床的高度重视。今后应进一步研究金黄色葡萄球菌致病毒素基因与耐药性的相关性, 为阐明细菌的耐药机制, 研制检测致病毒素基因的方法及开发新抗菌药物提供理论依据<sup>[11]</sup>。

### 参考文献

- [1] 段颖卿, 舒向荣, 江莎莎. 金黄色葡萄球菌“D-试验”阳性率调查及临床意义[J]. 江西医学检验杂志, 2006, 24(1): 25-26.
- [2] 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.
- [3] 肖松生, 吴伟元, 文丽霞, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及其 SCCmec 基因型的研究[J]. 中国感染控制杂志, 2007, 6(3): 153-155.
- [4] 杨长顺, 刘文恩, 廖经忠, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的流行病学调查[J]. 中国感染控制杂志, 2009, 8(2): 77-85.
- [5] 熊薇, 王洪波, 涂敏. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及分子流行病学调查[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(2): 119-123.
- [6] 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.
- [7] 钱凤银, 唐文明. 772 株葡萄球菌中红霉素对克林霉素诱导耐药检测[J]. 抗感染药学杂志, 2010, 7(1): 44-46.
- [8] 刘庆中, 刘欢乐, 陈志雄, 等. 金黄色葡萄球菌对大环内酯、林可酰胺和链阳霉素 B 类耐药性检测[J]. 中华医院感染杂志, 2007, 17(2): 207-209.
- [9] 彭少华, 罗少锋, 吕霞. 葡萄球菌中两类 D 试验阳性表型及基因分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(6): 408-411.
- [10] 詹燊. 葡萄球菌属 D-试验阳性率调查及其临床意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(15): 2029-2010.
- [11] 孙自镛, 徐金莲, 朱旭慧, 等. 2005 年武汉同济医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(4): 238-243.

(收稿日期: 2012-03-20)

(上接第 2150 页)

ship between glomerular filtration rate and the adipokines adiponectin, adiponectin and leptin in coronary patients with predominantly normal or mildly impaired renal function[J]. Clinica Acta, 2007, 376(2): 108-113.

- [13] 谢林森. 2 型糖尿病肾病患者血清脂联素、BNP 和 HCY 的测定意义[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(15): 3618-

3619.

- [14] 李晓红, 马小莉. 2 型糖尿病肾病患者血清脂联素水平及与胰岛素抵抗关系的探讨[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(13): 3098-3099.

(收稿日期: 2012-03-15)