

• 论 著 •

杀白细胞素基因阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性分析

王凤玲¹, 张金艳², 李红岩¹, 刘 静³

(1. 沧州医学高等专科学校, 河北沧州 061001; 2. 河北医科大学第四医院检验科, 石家庄 050011;

3. 河北省沧州市中西医结合医院检验科 061001)

摘要:目的 了解杀白细胞素(PVL)基因阳性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药情况, 指导临床合理用药。方法 对临床收集的 47 株 PVL 基因阳性 MRSA 采用 PCR 法检测 PVL 基因, 采用纸片扩散法进行药敏试验, 并对结果进行分析。结果 47 株 MRSA 的 PVL 基因检出率为 46.8%, PVL 基因阳性、阴性 MRSA 对 β -内酰胺类抗菌剂均 100.0% 耐药, PVL 基因阳性 MRSA 对氨基糖苷类、利福平、四环素、红霉素、环丙沙星、亚胺硫霉素等抗菌剂全部耐药, 对盐酸克林霉素的耐药率为 95.5%; PVL 基因阴性 MRSA 对上述抗菌剂的耐药性虽比 PVL 基因阳性 MRSA 轻, 但耐药率也在 88.0% 以上, 2 组间耐药性比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。对复方新诺明敏感率在 90.0% 以上, 未发现对万古霉素耐药株。结论 PVL 基因阳性 MRSA 在临床检出率已较高, 耐药性严重并呈多重耐药特征, 增加了临床抗感染治疗的难度。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; 杀白细胞素类; 抗药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0023-02

Drug resistance analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive with panton-valetine leukocidin gene

Wang Fengling¹, Zhang Jinyan², Li Hongyan¹, Liu Jing³

(1. Cangzhou Medical College, Cangzhou, Hebei 061001, China; 2. Department of Clinical Laboratory,

The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 3. Department of Clinical Laboratory,

Cangzhou Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou, Hebei 061001, China)

Abstract: **Objective** To study the resistance of panton-valetine leukocidin(PVL) positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) for improving clinical therapy. **Methods** 47 strains of MRSA were isolated from various clinical specimens. The susceptibility of the MRSA strains to 14 kinds of antibiotics was tested by agar diffusion method. PVL gene was detected by polymerase chain reaction. **Results** Among all 47 strains of MRSA, the positive rate of PVL gene was 46.8%. The resistant rate of all MRSA strains to β -lactamase antibiotics was up to 100.0%. The resistant rate to aminoglycosides, rifampicin, tetracycline, erythromycin, ciprofloxacin, imipenem of MRSA positive with PVL gene were all up to 100.0%, and to clindamycin was 95.5%. Although antibiotic resistance of MRSA negative with PVL gene was lighter than MRSA positive with PVL gene, the resistant rate also exceeded 88.0% and was not significantly different with MRSA positive with PVL gene. The resistant rate of MRSA to trimethoprim/sulfa exceeded 90.0%. No vancomycin resistant isolate was found. **Conclusion** The detection rate of PVL gene positive MRSA was relatively high and PVL gene positive MRSA strains might be seriously resistant to antibiotics with multidrug resistance, causing clinical treatment more difficult.

Key words: *Staphylococcus aureus*; leukocidins; drug-resistance

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是引起医院感染的重要致病菌, 随着抗菌剂在临床的广泛应用, MRSA 的耐药性日趋严重并呈多重耐药性, 杀白细胞素(PVL)的 MRSA 毒力非常强, 感染后与疾病的严重程度有关^[1]。MRSA 感染增加了护理难度和患者痛苦, 延长了患者住院时间, 同时给患者造成了沉重的经济负担^[2]。本研究对 47 株 MRSA 进行 PVL 基因检测和药敏试验, 以探讨 PVL 基因阳性 MRSA 的耐药特点, 现将情况报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 47 株 MRSA 分离自 2007 年 1 月至 2008 年 2 月的住院患者的痰液、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引流物等标本, 无重复分离株, 质控菌株为 ATCC25923。

1.2 试剂 革兰阳性球菌鉴定药敏复合板 PC20 购于美国 DADE-BERING 公司, PVL 检测的 PCR 引物、Taq DNA 酶、10 $\times$ 缓冲液、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)、MgCl₂ 均为上海生物工程有限公司产品。

1.3 引物 根据 GenBank 发布的基因序列及参考文献[3]自

行设计 PVL 基因引物, 委托上海生物工程有限公司合成。P1: 5'-GTG ATG GCG CTG AGG TAG TC-3', P2: 5'-GCT GGG GGT AAT TCA TTG TCT G-3'。

1.4 PCR 反应体系及扩增条件 20 μ L 反应体系: Taq DNA 酶 1 μ L, 10 $\times$ 缓冲液 2 μ L, 模板 2 μ L, 引物 4 μ L, dNTP 1.5 μ L, Mg²⁺ 离子 2 μ L, 双蒸水补足体积。PCR 反应条件: 93.0 $^{\circ}$ C 2 min 预变性, 变性 93.0 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 55.0 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸 72.0 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环, 最后 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, PCR 产物在 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭液染色 20 min, 冲洗后凝胶成像系统观察结果。

1.5 菌种鉴定 采用 WalkAway-40 型全自动微生物分析仪鉴定金黄色葡萄球菌, 头孢西丁纸片法检测 MRSA, MRSA 检测判读标准: 抑菌圈直径小于或等于 19 mm 为耐药, 抑菌圈直径大于或等于 20 mm 为敏感^[4]。

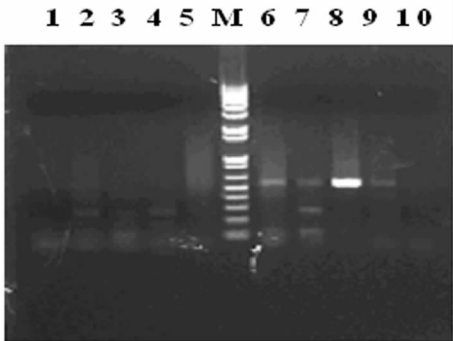
1.6 药敏试验 采用纸片扩散法测定 MRSA 对 14 种抗菌剂的敏感性, 结果判定参照 NCCLS M1002 S13 文件的规定进行。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处

理,并行 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PVL 基因检出情况 47 株 MRSA 的 PVL 基因检出率 46.8%(22/47),PVL 基因的 PCR 电泳结果见图 1。



8:PVL 阳性株。

图 1 PVL 基因的 PCR 电泳结果

2.2 PVL 基因阳性、阴性 MRSA 对 14 种抗菌剂的药敏试验结果 PVL 基因阳性、阴性 MRSA 对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、利福平、四环素、红霉素、环丙沙星、亚胺硫霉素等抗菌剂耐药率高,对万古霉素、复方新诺明敏感率较高,试验结果见表 1。

表 1 PVL 基因阳性、阴性 MRSA 对 14 种抗菌剂的药敏试验结果(%)

抗菌剂	PVL 阳性		PVL 阴性	
	耐药率	敏感率	耐药率	敏感率
头孢噻吩	100.0	0.0	100.0	0.0
青霉素	100.0	0.0	100.0	0.0
氨苄西林	100.0	0.0	100.0	0.0
头孢唑啉	100.0	0.0	100.0	0.0
阿莫西林	100.0	0.0	100.0	0.0
盐酸克林霉素	95.5	4.5	92.0	8.0
万古霉素	0.0	100.0	0.0	100.0
利福平	100.0	0.0	88.0	12.0
四环素	100.0	0.0	96.0	4.0
复方新诺明	9.1	91.9	8.0	92.0
亚胺硫霉素	100.0	0.0	100.0	0.0
左氧氟沙星	45.5	44.5	44.0	46.0
环丙沙星	100.0	0.0	96.0	4.0
红霉素	100.0	0.0	92.0	8.0

3 讨 论

MRSA 耐药的主要机制是由于获得编码低亲和力 PBP2a 的 *mecA* 基因,从而表现对 β -内酰胺类抗菌剂耐药。*mecA* 基因位于金黄色葡萄球菌染色体盒(SCCmec)侧面 DNA 的特有片段上。SCCmec 是一个携带 *mec* 基因复合体的可移动基因岛,甲氧西林耐药基因和其他抗菌剂耐药基因在此不断积累,形成耐药岛,从而导致 MRSA 对抗菌剂多重耐药^[5]。PVL 属于 synergohymenotropic 毒素家族,由 *Luks-PV* 基因和 *LukF-PV* 基因编码共同转录,前噬菌体片段携带并整合到 SCCmec 上。PVL 基因能为金黄色葡萄球菌提供 SCCmec 插入、生存所必需的适合结构,可通过噬菌体转导在细菌中传播^[6]。PVL 是以八聚体形式在宿主细胞膜上形成孔道,损伤细胞膜,导致

细胞溶解,致使携带 PVL 基因的 MRSA 致病性明显强于没有携带 PVL 基因的 MRSA^[7]。本研究中 47 株 MRSA 的 PVL 基因阳性率为 46.8%,与孙桂珍和于艳华^[8]的报道相近,高于张泓等^[9]的研究结果,表明产 PVL 的 MRSA 在临床已占有较高的比例,应引起临床高度重视。药敏试验结果显示,PVL 基因阳性、阴性 MRSA 对 β -内酰胺类抗菌剂均 100.0% 耐药,对左氧氟沙星的耐药性较轻,分别为 45.5% 和 44.0%,对复方新诺明较敏感,敏感率在 90.0% 以上,未发现对万古霉素耐药株。PVL 基因阳性 MRSA 对氨基糖苷类、利福平、四环素、红霉素、环丙沙星、亚胺硫霉素等抗菌剂全部耐药,对盐酸克林霉素的耐药率为 95.5%,PVL 基因阴性 MRSA 对上述抗菌剂的耐药性相对较轻,但耐药率也在 88.0% 以上,2 组间耐药性比较差异无统计学意义($P>0.05$),可能的原因是 MRSA 耐药性已非常严重,PVL 基因对其耐药性的影响可能表现不出来,PVL 基因对细菌的耐药性是否有影响有待进一步研究。结果表明,MRSA 的耐药性严重,表现为多重耐药,仅对万古霉素、复方新诺明敏感性较好,与文献报道的结果较一致,表明临床治疗 MRSA 引起的感染可选择的抗菌药谱已较为狭窄,首选药物是万古霉素,复方新诺明可用于经验用药^[10-13]。但在临床应用过程中会出现万古霉素敏感株向中介株演变,对一些长期使用万古霉素治疗患者需密切注意该类事件的发生^[10]。因此,研究新的抗菌剂迫在眉睫,新上市的蛋白质合成抑制类抗菌剂利奈唑胺对 PVL 基因阳性 MRSA 有非常强的抗菌活性,是目前治疗 PVL 基因阳性 MRSA 引起感染较理想的抗菌剂^[14-15]。

总之,PVL 基因阳性 MRSA 在临床检出率已较高,耐药性严重并呈多重耐药特征,增加了临床抗感染治疗的难度。应进一步研究携带致病毒素基因 MRSA 的耐药特性,为今后阐明细菌的耐药机制、研发新的抗菌剂及临床合理使用抗菌剂提供理论依据。

参考文献

[1] 张征,孙静娜,武艳,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及其 Panton-Valentine 杀白细胞素基因的检测[J].中国药房杂志,2010,21(2):127-129.

[2] 张虹霞,周建群,李晓辉,等.我院 2003~2007 年金黄色葡萄球菌感染趋势及耐药性检测[J].中外医疗杂志,2009,28(11):145-146.

[3] McClur JA,Conly JM,Lau V,et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination methicillin susceptible from resistant Staphylo-cocci[J]. Clin Microbiol, 2006,44(3):1141-1144.

[4] 喻华,刘小琦,黄文方,等.头孢西丁纸片扩散法检测耐甲氧西林葡萄球菌的临床应用评价[J].国际检验医学杂志,2006,27(12):1085-1087.

[5] 王凤玲,李红心,刘静.金黄色葡萄球菌耐药性及克林霉素诱导耐药分析[J].国际检验医学杂志,2009,30(3):283-284.

[6] 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.

[7] 周信云,胡龙华.携带杀白细胞素基因金黄色葡萄球菌的研究进展[J].中国微生态学杂志,2010,22(8):763-765.

[8] 孙桂珍,于艳华.50 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PVL 基因检测及同源性分析[J].中华医院感染学杂志,2009,19(12):1471-1474.

(下转第 26 页)

如表 1 所示,IM 患儿在急性期胞内 IL-17、IL-6 表达水平显著高于对照组($t=34.4,17.8$);急性期胞内 IL-17、IL-6 表达水平显著高于恢复期($t=22.3,14.1$),恢复期与对照组相比($t=10.1,19.7$)。

3 讨 论

IM 是由 EB 病毒感染引起的一种急性或亚急性感染性网状内皮增生性疾病,是累及多系统的全身性疾病。患儿体内 B 淋巴细胞是 EB 病毒侵犯的靶细胞,该细胞表面有 EB 病毒受体,病毒侵入该细胞,在细胞内复制,引起该细胞变性、凋亡。同时引起 T 淋巴细胞强烈反应,此过程不仅导致患儿体液免疫受抑制,而且使其细胞免疫和免疫调节功能也明显受损。

Th17 细胞的发现源于对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)及胶原诱导的关节炎(CIA)的研究。Th17 细胞主要分泌 IL-17(IL-17A、IL-17F 等)炎症因子发挥致炎作用,参与自身免疫和炎症反应,与免疫调节、免疫病理和宿主免疫关系密切^[2-3]。

IL-6 是体内许多细胞产生的一种具有多种生物活性的刺激因子,又称前炎症反应细胞因子,是炎症细胞因子网络中的关键因子,与感染性疾病的发生、发展与转归密切相关^[4-5],其具有较强的免疫抗感染作用,也是评价患儿免疫反应的重要指标,同时,IL-6 是 Th17 细胞分化所必须的启动因子^[6]。

目前,检测 Th17 细胞的方法主要是采用 FCM 进行胞内细胞因子染色,细胞经 PMA/Ion 作用后,经过固定和透膜,可以在单个细胞水平分析分泌 IL-17 的 Th17 细胞。作者对 30 例 IM 患儿外周 CD4⁺ T 细胞内 IL-17、IL-6 的研究表明,急性期 IL-17、IL-6 水平明显高于对照组($P<0.01$)。说明患儿在 EB 病毒感染后,B 细胞异常增殖,其抗原性也随之发生改变,从而导致 T 细胞出现强烈的免疫应答反应^[7-9]。CD4⁺ T 细胞通过分泌多种细胞因子(如 IL-6、TGF- β 等)使初始 CD4⁺ 细胞转化成 Th17 细胞,Th17 细胞分泌 IL-17 诱导其他炎症细胞因子(如 TNF- α)、趋化因子(如 MCP-1、MCP-2)和基质金属蛋白酶的表达,引起炎症细胞浸润和组织损伤,介导促炎性反应。Hou 等^[10]研究发现,IL-17 能促进持续性病毒感染,并参与病毒感染引起的慢性脱髓鞘疾病的发病。IL-17 上调抗凋亡分子的表达后,通过增强病毒感染细胞的存活能力及阻止 CTL 细胞杀伤靶细胞来维持病毒的持续感染,提示 Th17 细胞在 IM 发病中起着重要作用。中和 IL-17 可清除病毒感染细胞,

促进细胞毒性 T 细胞的溶解功能,从而阻止病毒感染的进展。随着病情的好转,IL-6 呈逐渐下降的趋势,IL-6 诱导 Th17 细胞形成也逐渐减少。但 IM 恢复期患儿 IL-17、IL-6 水平仍高于对照组($P<0.01$),提示细胞因子水平越高,症状越重,细胞因子参与免疫性损伤的程度越强,机体仍处于免疫应激状态,说明此时患儿机体的免疫功能仍未完全恢复。

综上所述,IM 患儿外周血存在异常增高的 Th17 细胞,其水平与病情活动相关,是判断 IM 患儿免疫状态和预后的指标之一,对指导临床合理地应用免疫调节剂,调理细胞因子水平具有重要的临床价值。

参考文献

[1] 胡亚美,江裁芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002:821-825.

[2] Wei L, Laurence A, Elias KM, et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner [J]. J Biol Chem, 2007, 282(48): 34605-34610.

[3] Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease[J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3): 223-246.

[4] 马庆海,杨文东. 2 型糖尿病合并冠心病与 Leptin 及 IL-6、CRP 的相关性[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1209-1210.

[5] 王琦,李红,王宇萍,等. 反复呼吸道感染患儿免疫球蛋白及相关细胞因子水平分析[J]. 宁夏医学院学报, 2007, 29(5): 451-452.

[6] 陈怡丽. Th17 细胞及其在神经免疫疾病中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 242-244.

[7] 胡国强. EB 病毒相关疾病与免疫应答[J]. 国外医学微生物学分册, 1997, 20(6): 926-933.

[8] 周丽芳,蒋丽蓉,王薇,等. 传染性单核细胞增多症和 T 细胞免疫[J]. 临床儿科杂志, 2003, 21(8): 458-460.

[9] Rickinson A. Epstein-Barr virus[J]. Virus Research, 2002, 82(1/2): 109-113.

[10] Hou W, Kang HS, Kim BS. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection [J]. Exp Med, 2009, 206(2): 313-328.

(收稿日期:2011-07-21)

(上接第 24 页)

[9] 张泓,李万华,蔡琴,等. MRSA 杀白细胞素基因检测和 SCCmec 分子流行病学调查[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(4): 248-251.

[10] 周信云,胡龙华. 232 株金黄色葡萄球菌的临床分布特征及耐药性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(10): 930-932.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 朱德妹. 2005 年中国 CHINET 葡萄球菌属耐药性分析[J]. 中国

感染与化疗杂志, 2007, 7(4): 269-273.

[14] Micek ST, Dunne M, Kollef MH. Pleuropulmonary complications of panton-valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production[J]. Chest, 2005, 128(4): 2732-2738.

[15] Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, et al. Impact of antibiotics expression of virulence-associated genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. Infect Dis, 2007, 195(2): 202-211.

(收稿日期:2011-07-25)