

· 临床检验研究论著 ·

金黄色葡萄球菌耐药表型及基因型研究

孙茜¹, 贾曦¹, 王聪²

(1. 保定市第一中心医院检验科, 河北保定 071000; 2. 河北北方学院医学院, 河北张家口 075000)

摘要:目的 探讨金黄色葡萄球菌耐药基因检测与其对抗菌药物的耐药表型是否一致。方法 对临床分离得到的 74 株金黄色葡萄球菌, 采用纸片扩散法进行药敏试验, 用法国生物梅里埃公司全自动分析仪进行鉴定, 同时, 根据从检索到的耐药基因序列, 设计了特异性引物, 采用聚合酶链反应(PCR)检测该金黄色葡萄球菌对抗菌药物的耐药基因。结果 菌株对抗菌药物呈多重耐药。对该研究中抗菌药物的耐药率均在 60.0% 以上。MRSA 多重耐药菌株占 64% 以上。MRSA 耐药表型检出率和耐药基因 *mecA* 的检出率基本一致。3 种氨基糖苷类修饰酶基因的检出率由高至低依次为 *aac6*、*aph3*、*ant4*。结论 携带 *mecA* 基因是金黄色葡萄球菌多重耐药的主要原因。耐药表型的检出率与采用 PCR 检测金黄色葡萄球菌抗菌药物耐药基因的检出率基本一致。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; 微生物敏感性试验; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)04-0424-02

Phenotype and genotype of drug resistance in *Staphylococcus aureus*Sun Qian¹, Jia Xi¹, Wang Cong²

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Central Hospital of Baoding City, Baoding, Hebei 071000, China;

2. School of Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To investigate the antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the first central hospital between 2012 and 2013. Methods Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were identified and characterized using PCR method. The aminoglycoside antibiotic resistance gene and aminoglycoside modifying enzymes were analyzed by PCR, those sequences were measured by DNA sequence analysis. Results The antibiotic resistance ratios of 74 strains *Staphylococcus aureus* isolated from the First Central Hospital to 11 kinds antimicrobial agents were from 64.86% to 98.64%; the incidence the 3 genes from high to low were *aac6*, *aph3*, *ant4*; the incidence of *TEM* gene were 98.6%; the incidence of *tetM* gene were 71.62%. Conclusion MRSA isolated from the First Central Hospital is the major reason of multiple antibiotic resistance.

Key words: *Staphylococcus aureus*; microbial sensitivity tests; polymerase chain reaction

金黄色葡萄球菌是临床最常见的致病菌之一, 其分离率位居前列^[1], 具有多重耐药性, 容易造成院内感染的暴发流行, 已成为临床抗感染治疗的一大难题。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是目前研究的热点, 临床上已发现耐万古霉素及对万古霉素中度敏感的金黄色葡萄球菌^[2]。美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)指出, 一旦金黄色葡萄球菌 *mecA* 或 *PBP2a* 检测阳性即可判定为 MRSA^[3]。本研究采用全自动细菌分析仪, 并采用聚合酶链反应(PCR)对上述菌株的耐药基因进行了检测, 旨在为临床合理使用抗菌药物提供参考。同时希望能找到一种快速、可靠的方法来检测菌株对相应抗菌药物的耐药性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 74 株金黄色葡萄球菌于 2012~2013 年分离自保定市第一中心医院患者的痰、脓液、血液等标本。经法国梅里埃全自动微生物分析仪鉴定核实。

1.2 质控菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 购于卫生部临床检验中心。

1.3 仪器 法国梅里埃全自动微生物分析仪鉴定, Effendorf 公司 Master cycler gradient 梯度 PCR 仪(德国), 测序仪为 377 型, 由 ABI 公司提供, 美国凝胶成像仪为 FOTODYNE 公司提供(美国)。

1.4 引物设计 *TEM*、*mecA*、*aac6*、*aph3*、*ant4*、*tetM* 的 PCR 引物序列见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。寡核苷酸引物委托上海生物工程公司合成。

1.5 方法

1.5.1 耐药表型检测 β -内酰胺酶检测: 挑取可疑菌落涂在头孢硝噻吩诊断纸片上, 30 min 内观察结果, 如变为红色, 为 β -内酰胺酶阳性。MRSA 检测: 头孢西丁纸片稀释法检测。

1.5.2 酶基因检测

1.5.2.1 细菌模板 DNA 的制备 将 74 株金黄色葡萄球菌复苏、扩增, 挑取少许菌落, 用裂解液(1 mol/L NaOH + 2% SDS)100 μ L 处理, 100 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 冷却后用等量的 1 mol/L 盐酸中和, 离心(13 000 r/min, 10 min)去沉淀后, 用乙醇沉淀 DNA, 完全晾干沉淀后, 用 30 μ L 双蒸水溶解 DNA 作为 PCR 模板备用。

1.5.2.2 PCR PCR 退火温度为 52 $^{\circ}$ C 最佳。PCR 采用 20 μ L 反应体系: 模板 1 μ L, 5'引物 1 μ L, 3'引物 1 μ L, dNTP 1.5 μ L, Taq 酶 0.2 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, Mg²⁺ 离子溶液 2 μ L, 双蒸水 11.3 μ L。PCR 反应条件: 先 94.0 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 94.0 $^{\circ}$ C 30 s, 52.0 $^{\circ}$ C 30 s, 72.0 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 最后 72.0 $^{\circ}$ C 2 min。

1.5.2.3 琼脂糖电泳 PCR 结束后, 取 PCR 产物并加入 10 μ L 6 \times 电泳缓冲液, 进行琼脂糖电泳; 电泳条件电压 115 V, 电流 240 mA 时间 30 min。电泳结束后, 将胶置于紫外灯下, 观察结果, 按照标准带比大小, 大小正确的为阳性。

2 结果

2.1 耐药表型 74 株金黄色葡萄球菌中, 47 株对苯唑青霉素耐药, 即 MRSA 占 63.5%(47/74), 对除万古霉素外的其他抗菌药物都具有耐药性, 耐药率均在 70% 以上。其他 27 株为甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA), 占 36.5%(27/74)。

见附表 2~4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 基因检出情况 (1) *TEM* 基因:全部 74 株金黄色葡萄球菌中,检出携带 *TEM* 基因的有 73 株,占 98.6%。未检出 *TEM* 基因的 1 株金黄色葡萄球菌为 MSSA。(2) *mecA* 基因:74 株金黄色葡萄球菌中,对 47 株苯唑西林耐药的 MRSA 进行检测,检出携带 *mecA* 基因的有 37 株,占 78.7%;27 株 MSSA 中,携带 *mecA* 基因的有 5 株,占 18.5%。(3) *aac6* 基因:74 株金黄色葡萄球菌中,共检出 *aac6* 基因 47 株,占 63.5%;其中 47 株 MRSA 中 *aac6* 基因检出 39 株,占 83.0%;27 株 MSSA 中, *aac6* 基因检出 8 株,占 29.6%。(4) *aph3* 基因:74 株金黄色葡萄球菌中共检出 *aph3* 基因 14 株,占 16.22%;47 株 MRSA 中 *aph3* 基因检出 11 株,占 23.4%;27 株 MSSA 中 *aph3* 基因检出 3 株,占 11.1%。(5) *ant4* 基因:74 株金黄色葡萄球菌中 *ant4* 基因检出 3 株,占 6.76%;47 株 MRSA 中 *ant4* 基因检出 2 株,占 4.2%;27 株 MSSA 中 *ant4* 基因检出 1 株,占 3.7%。(6) *tetm* 基因检出:74 株金黄色葡萄球菌中 *tetm* 基因检出 54 株,占 71.62%;47 株 MRSA 中 *tetm* 基因检出 46 株,占 97.9%;27 株 MSSA 中 *tetm* 基因检出 8 株,占 29.6%。见附表 5~7(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

本研究对 74 株金黄色葡萄球菌,进行了药敏试验,同时对几种重要的耐药基因进行了 PCR 检测。传统的体外药物敏感方法检测 MRSA,易受培养基成分,特别是氯化钠浓度、pH 值、接种量、孵育时间、温度以及培养基中是否加诱导剂等多种因素的影响,易造成临床误检,并且较费时,而错误地应用抗菌药物则会引起耐药性更强的耐药菌株的出现,因此临床上迫切需要更为有效、快速的检测 MRSA 的方法。

mecA 基因高度保守,根据其核苷酸序列设计不同的引物,用 PCR 对菌株中青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)靶 DNA 特定片段 *mecA* 进行扩增,以 *mecA* 基因存在与否判定是否为 MRSA 菌株,不受药敏试验条件的影响,因而特异性高,被公认为是其诊断的金标准^[4]。采用了多重引物、*mecA* 基因的特异性引物和基于金黄色葡萄球菌 *femA* 基因引物,同时用两对引物对待测菌进行 PCR 扩增后进行检测,大大提高了鉴定 MRSA 的准确性^[5]。*mecA* 和 *femB* 基因表达均为阳性,方能确诊为 MRSA,可区别其他 *mecA* 基因阳性的葡萄球菌属,可同时鉴定 MRSA、金黄色葡萄球菌和 CNS^[6-8]。但由于 *mecA* 基因的表达受多种因素影响,使以检测 *mecA* 基因检测为基础的 PCR 技术受到了一定限制,因其设备、试剂和费用等要求限制,不易在基层临床实验室常规开展。

本研究所采用的 74 株金黄色葡萄球菌呈多重耐药。对阿莫西林/棒酸、头孢唑啉、头孢噻肟、头孢噻吩、庆大霉素、苯唑西林、青霉素、四环素等 9 种抗菌药物的耐药率均在 60.0%以上。MRSA 多重耐药菌株占 64%以上。MSSA 的耐药表型和耐药基因的检出结果基本一致。74 株金黄色葡萄球菌常规方法检出 MRSA 47 株,其 MRSA 检出率 63.5%;采用 PCR 扩增方法从 74 株标本中检出 *mecA* 阳性 42 株,MRSA 检出率 56.8%。统计基因检测与表型符合率为 78.7%。PCR 法检测 *mecA* 的检出率低于药敏检测结果,分析原因主要是 PCR 所选用的引物及反应条件导致部分假阴性结果的出现,尚有待进一步优化;另外有部分的 MRSA 是由于青霉素结合蛋白与苯唑西林结合力下降,而非产生 PBP2a 导致的耐药,因此检测不到介导 PBP2a 合成的 *mecA* 基因。

氨基糖苷类修饰酶的检出情况:3 种基因的检出率由高到低依次为 *aac6*、*aph3*、*ant4*。与耐药表型的检出率基本一致。 β -内酰胺酶的检出情况:74 株金黄色葡萄球菌 *TEM* 基因的检

出率为 98.6%,普遍对青霉素及氨苄西林耐药。与耐药表型的检出率基本一致。四环素耐药表型的检出率为 74.32%,*tetm* 基因检出率 71.62%,两种方法的检测结果基本一致。

分子生物学的杂交和 PCR 等技术,已经被广泛认可和接受为判断 MRSA 的金标准,灵敏度和特异度高,有较大的临床应用和开发价值^[9-13]。综合本研究检测结果进行分析,应用 PCR 对金黄色葡萄球菌的耐药性进行分子水平的检测结果可靠,检测迅速(3~4 h 可以完成),经进一步优化后可以应用于临床检验。

参考文献

- [1] Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene[J]. N Engl J Med, 2003, 348(14): 1342-1347.
- [2] Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. J Bacteriol, 1984, 158(2): 513-516.
- [3] Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1549-1555.
- [4] Shore A, Rossney AS, Keane CT, et al. Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(5): 2070-2083.
- [5] Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(5): 1323-1336.
- [6] Daum RS, Ito T, Hiramatsu K, et al. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds [J]. J Infect Dis, 2002, 186(9): 1344-1347.
- [7] Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(4): 1147-1152.
- [8] Ito T, Ma XX, Takeuchi F, et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 2637-2651.
- [9] Louie L, Matsumura SO, Choi E, et al. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2170-2173.
- [10] Chediak-Tannoury R, Araj GF. Rapid MRSA detection by a latex kit [J]. Clin Lab Sci, 2003, 16(4): 198-202.
- [11] Lucet JC, Chevret S, Durand-Zaleski I, et al. Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit: results of a multicenter study [J]. Arch Intern Med, 2003, 163(2): 181-188.
- [12] 李兴禄, 张莉萍, 黄长武, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *MecA* 基因快速检测方法的评价 [J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(2): 105-106.
- [13] Soares MJ, Soares C, Mendes AC, et al. Assessment of three rapid methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004, 22(7): 390-391.