

医院感染的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药基因分析

张 珏¹, 乔 昀¹, 倪语星²

(1. 上海中医药大学附属曙光医院检验科, 上海 200021;

2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院临床微生物科, 上海 200025)

摘要:目的 探讨医院感染的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)耐药基因的存在情况。方法 对2006年6至7月临床分离的20株医院感染MRSA进行mecA、teM、aac(6)/aph(2)、aph(3)、ant(4 4)耐药基因检测。结果 20株MRSA检出mecA阳性率为100%,aac(6)/aph(2)阳性率75%,teM阳性率70%,aph(3)阳性率40%、ant(4 4)阳性率为20%。结论 多数MRSA菌株存在耐β-内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类等多种抗生素耐药基因,与表型一致,表型与遗传学均支持MRSA具有耐多药特征。

关键词:医院感染;耐甲氧西林;金黄色葡萄球菌;抗生素;耐药基因

The analysis of MRSA drug-resistant gene inducing the nosocomial infection ZHANG Jue¹, QIAO Yun¹, NI Yuxing². (1. Department of Clinical Laboratory, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China; 2. Department of Clinical Microbiology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University Medical College, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To investigate the existence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) drug-resistant gene inducing the nosocomial infection. **Methods** The drug-resistant gene including mecA, teM, aac(6)/aph(2), aph(3), ant(4 4) were detected in 20 strains of MRSA isolated from clinical infectious specimen between June and July in 2006. **Results** Among 20 strains of MRSA, the positive rates of mecA, teM, aac(6)/aph(2), aph(3) and ant(4 4) were 100%, 70%, 75%, 40% and 20% respectively. **Conclusions** The genes resisting β-lactamase, tetracycline, aminoglycoside and other multi-antibiotic-resistant genes have already existed in the majority of strains, which accords with the phenotypes. The phenotypes and the genetics support MRSA's characteristic of multidrug resistance.

Key words: Nosocomial infection; Methicillin resistant; *Staphylococcus aureus*; Antibiotic; Drug-resistant gene

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是社区和医院感染的重要病原菌之一。自英国首次报道MRSA以来,世界各国相继报道逐渐增多,国内有报道MRSA感染率高达70%以上,MRSA的迅速发展造成治疗上的困难及病死率增高,已成为全球关注的严重感染^[1]。MRSA具有耐多药特征,是临床抗感染治疗的难点之一。为了解我院医院感染的MRSA耐药表型与基因型之间的关系,我们对2006年6至7月感染MRSA患者进行统计,并对院内感染的20例临床分离MRSA进行了mecA、teM、aac(6)/aph(2)、aph(3)、ant(4 4)耐药基因检测。

材料和方法

一、菌株来源及鉴定

所有菌株均来源于我院2006年6至7月患者的各种标本,菌株培养按临床检验操作规程方法进行,采用生物梅里埃ATB仪的Staph鉴定板,标准菌株ATCC 25923,基因检测菌株为医院感染的MRSA菌株。

二、医院感染及社区获得性感染的统计

对我院2006年6至7月各种分离到金黄色葡萄球菌34例进行统计,标本送检离入院时间>48h为医院感染,门诊标本和标本送检离入院时间<48h为社区获得性感染。

三、抗生素敏感试验

采用生物梅里埃公司ATB Staph药敏试验板和BD公司的Phoenix-100 G⁺鉴定药敏复合板,质控菌株ATCC 25923。

四、聚合酶链反应(PCR)扩增模板制备

作者简介:张珏,女,1964年生,学士,副主任技师,主要从事临床微生物学研究。

挑取培养菌落置 100 μL生理盐水的 0.5 mL离心管内,以 15 000 r/min离心,吸取上清液,加 50 μL蛋白酶溶液,混匀后置入 55 °C保温 1 h,后置入 95 °C保温 5 min,10 000 r/min离心 30 s,吸取上清液移入另一新的 0.5 mL离心管内作为模板液,置 -20 °C冰箱备用。

五、耐药基因检测

均为 PCR,采用蛋白酶 K消化法提取细菌 DNA,各种靶基因引物序列和目的产物长度见表 1^[2]。耐药基因检测试剂盒由无锡市克隆遗传技

术研究所提供,热循环参数为 93 °C预变性 2 min,然后 93 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 60 s,循环 35周期,最后 72 °C延长至 2 min(其中 mecA、teM基因按 93 °C预变性 2 min,然后 93 °C 60 s,55 °C 60 s,72 °C 60 s,循环 35周期,最后 72 °C延长 2 min)。PCR扩增产物作 2%琼脂糖凝胶电泳,出现与阳性对照分子相当的目的条带判为阳性,并摄像保存。PCR检测阳性对照 DNA由无锡市克隆遗传技术研究所微生物 DNA收集与保存室提供。

表 1 耐药基因 PCR引物序列

靶基因	序列	产物长度 (bp)
mecA	P1: 5'-AAAA TCGA TGGTAAA GGTGGC-3'	533
	P2: 5'-AGTCTGCA GTACCGGA TTTGC-3'	
teM	P1: 5'-GTGTGACGAAC TTTACCGAA-3'	501
	P2: 5'-GCTTTGTA TCTCCA GAACAC-3'	
aac(6) /aph(2)	P1: 5'-CCAA GA GCAA TAA GGGCA TA-3'	220
	P2: 5'-CACTA TCA TAACCACTACCG-3'	
aph(3)	P15: 5'-GCCGA TGTGGA TTGCGAAAA-3'	292
	P2: 5'-GCTTGA TCCCA GTAA GTCA-3'	
ant(4 4)	P1: 5'-GCAA GGACCGACAACA TTTC-3'	165
	P2: 5'-TGGCACA GA TGGTCA TAACC-3'	

结 果

一、金黄色葡萄球菌感染情况

2006年 6至 7月我院 34例金黄色葡萄球菌中,MRSA 25例,占 73.5% (25/34),其中医院感染 20例,占 80% (20/25),社区感染 5例,占 20% (5/25);甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA) 9例,占 26.5% (9/34),其中医院感染 7例,占 77.8% (7/9),社区感染 2例,占 22.2% (2/9)。

二、医院感染的 MRSA 相关基因耐药性

20株医院感染的 MRSA 菌株对苯唑西林均

耐药 [最低抑菌浓度 (MIC) 4 mg/L], Phoenix-100仪器显示青霉素药物敏感试验 MIC均 > 1 μg/mL,头孢唑啉 > 16 μg/mL,庆大霉素、四环素 > 8 μg/mL,与 ATB 仪器显示耐药结果一致。

三、耐药基因检测结果

20株医院感染的 MRSA 耐药基因检测和表型检测结果见表 2。mecA 阳性检出率为 100%, teM 阳性率 70%, aac(6) /aph(2) 阳性率 75%, aph(3) 阳性率 40%, ant(4 4) 阳性率均为 20%。mecA 基因 PCR 电泳图见图 1, aph(3) 基因 PCR 电泳图见图 2。

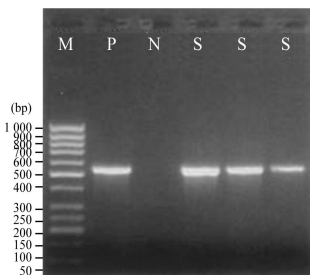
表 2 耐药基因检测和表型检测结果

菌株号	耐药基因型				表型				
	mecA	teM	aac(6) / aph(3) / aph(2)	ant(4 4)	青霉素	苯唑西林	头孢唑啉	四环素	庆大霉素
1	+	+	+	-	R	R	R	R	R
2	+	+	+	-	R	R	R	R	R
3	+	-	+	-	R	R	R	R	R

续表 1

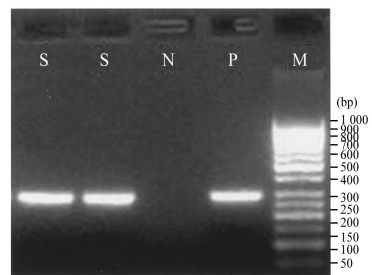
菌株号	耐药基因型					表型				
	mecA	teM	aac(6) / aph(3) / aph(2)	ant(4,4)		青霉素	苯唑西林	头孢唑啉	四环素	庆大霉素
4	+	-	+	+	-	R	R	R	R	R
5	+	-	+	+	-	R	R	R	R	R
6	+	+	-	+	-	R	R	R	R	R
7	+	-	+	-	-	R	R	R	R	R
8	+	+	-	-	+	R	R	R	R	R
9	+	-	+	+	-	R	R	R	R	R
10	+	+	+	-	-	R	R	R	R	R
11	+	+	+	+	-	R	R	R	R	R
12	+	+	+	-	-	R	R	R	R	R
13	+	+	-	-	+	R	R	R	R	R
14	+	-	+	+	-	R	R	R	R	R
15	+	+	+	+	-	R	R	R	R	R
16	+	+	-	-	+	R	R	R	R	R
17	+	+	+	-	-	R	R	R	R	R
18	+	+	+	-	-	R	R	R	R	R
19	+	+	-	+	+	R	R	R	R	R
20	+	+	+	-	-	R	R	R	R	R

注：R为耐药



注：M为相对分子质量标记，由上而下分别为 1 000、900、800、700、600、500、400、300、250、200、150、100、50 bp；P为阳性对照；N为阴性对照；S为本标阳性

图 1 mecA基因 PCR电泳图



注：M为相对分子质量标记，由上而下分别为 1 000、900、800、700、600、500、400、300、250、200、150、100、50 bp；P为阳性对照；N为阴性对照；S为本标阳性

图 2 aph(3) 基因 PCR电泳图

讨 论

MRSA是医院感染的重要病原菌，由于该菌的多重耐药性，给临床的治疗带来困难，该菌已成为世界范围内耐药性监测的重点^[3]。对我院 6至 7月金黄色葡萄球菌感染情况分析发现，我院 MRSA感染占 73.5%，MSSA占 26.5%，在 MRSA感染中，社区感染占 22.2%，医院感染占 77.8%，

说明我院 MRSA 感染率较高，并且多为医院感染，应引起临床的重视。本实验中，20株院内感染的 MRSA在生物梅里埃 ATB 仪器显示的药物敏感试验与 BD公司的 Phoenix-100 仪器显示的药物敏感试验一致，青霉素、苯唑西林、头孢唑啉、四环素、庆大霉素均显示耐药。

金黄色葡萄球菌对 内酰胺类药物耐药的原因主要是 mecA基因编码产生的低亲和力的青

霉素结合蛋白 2a(PBP2a),从而对 内酰胺类药物耐药^[4]。获得 mecA 基因的葡萄球菌对全部青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、碳头孢烯类和 内酰胺类 酶抑制剂复合药物耐药。美国临床实验标准化委员会(NCCLS)在 2002 版抗生素药敏试验操作标准更新内容中指出,金黄色葡萄球菌一旦检出 mecA 基因或 PBP2a 蛋白即可定为 MRSA^[5]。本实验中,在 MRSA 中全部检出 mecA 基因与表型试验的结果相符。

四环素类药物耐药机制有 2 类。一类为产核糖体保护蛋白;另一类为产四环素外排泵蛋白^[6]。葡萄球菌耐四环素为获得 tetM 基因表达核糖体保护蛋白所致^[7]。本实验 20 株 MRSA 中 tetM 基因检出 14 株,阳性率为 70%。

细菌对氨基糖苷类耐药是通过表达钝化酶,使该类物质活性丧失而达到耐药的。钝化酶有乙酰转移酶(aac)、磷酸转移酶(aph)和核苷转移酶(add)3 类 20 余种^[8]。革兰阳性菌通常携带 aac(6)/aph(2)基因而耐药。我们对 20 株 MRSA 菌检测显示,aac(6)/aph(2)阳性率为 75%,aph(3)阳性率 40%,Ant(4 4)阳性率为 20%,与表型均为庆大霉素耐药相符。

最近国内学者报道葡萄球菌已是医院感染分离率最高的细菌,其中 MRSA 比例较高^[9]。本研究中,多数菌株已存在耐 内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类等多种抗生素耐药基因,与表型一致,表型与遗传学均支持 MRSA 具有耐多药特征。本研究结果提示,对常见医院感染病原菌展开耐药性检测和耐药基因的分子流行病学研究对进一步了解耐药基因分布情况、控制多重耐药菌株播散等提供分子生物学依据具有重要意义。

(上接第 389 页)

殖的调控起着重要作用^[2],而 CA125 的升高是否参与对心肌细胞的增殖调控,值得进一步探讨。

本研究发现慢性 CHF 患者中,出现胸水者其血清 CA125 水平显著高于无胸水患者。这可能是胸腔积液刺激了胸膜上的间皮细胞大量分泌 CA125 并渗透入血所致。由于恶性胸水患者及结核性胸水患者血清 CA125 水平也增高^[3],因此这是一种非特异性的增高,高水平的血清 CA125 是否影响慢性 CHF 的发展和预后,还有待于深入研究。

参 考 文 献

- [1] 陈世敏. 耐甲氧西林葡萄球菌耐药特点及其分子生物学基础 [J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2003, 30(3): 188-189.
- [2] 糜祖煌, 陆亚华. 葡萄球菌耐药基因检测 [J]. 现代实用医学, 2004, 16(2): 67-68.
- [3] 侯晓娜, 丁雪松, 付炜昕, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的基因多态性研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2003, 13(10): 919-921.
- [4] Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, et al. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA-positive susceptible strains [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(11): 3946-3951.
- [5] 胡继红, 高振翔, 尹铭芳. 美国 NCCLS2002 版抗生素药敏试验操作标准更新内容 [J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(6): 367-369.
- [6] Aninov R I, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, (1): 22-32.
- [7] 黄支密, 陆亚华, 诸葛青云, 等. 多重耐药 MRSA 耐消毒剂基因及抗生素耐药相关基因检测 [J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(5): 270-273.
- [8] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001: 90-112.
- [9] 姚春艳, 府伟灵. 葡萄球菌医院感染的耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(1): 104-106.

(收稿日期: 2007-03-12)

(本文编辑: 姜 敏)

参 考 文 献

- [1] Nagele H, Bahl M, Klapdor R, et al. CA125 and its relation to cardiac function [J]. Am Heart J, 1999, 137(6): 1044-1049.
- [2] Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress [J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(1): 133-140.
- [3] 徐 宁, 黄小萍. CA125 对恶性和结核性胸腔积液的鉴别意义 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15(3): 155-156.

(收稿日期: 2006-08-09)

(本文编辑: 姜 敏)