

· 论 著 ·

## 院内外环境分离金黄色葡萄球菌的耐药性及毒素基因检测

袁梦\*, 袁月明, 陈辉, 黄锐敏, 鞠长燕, 俞慕华

**摘要:**目的 检测医院及环境样中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)耐药基因及毒素基因,了解其分布情况。方法 采用多重聚合酶链反应(multiplex polymerase chain reaction, PCR)技术分别检测耐药基因 *mecA*、*femA* 与毒素基因 TSST、PVL。结果 83 株金黄色葡萄球菌,仅 3 株(3.61%)菌检出 *mecA* 基因,22 株菌(26.50%)检出 *femA* 基因,15 株菌(18.07%)同时检出 *mecA* 与 *femA* 基因。医院样本检出 12 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),3 株甲氧西林耐药凝固酶阴性的金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant and coagulase negative *Staphylococcus aureus*, MRCNS)。83 株分离自医院及环境样本 SA,2 株分离自咽拭子的样本检出 TSST 基因,检出率 4.54%(2/44);1 株分离自血液的样本检出 PVL 基因,检出率 2.27%(1/44),其余菌株未检出毒素基因。结论 院内样本中,部分菌株携带 *mecA* 基因,环境样本未发现携带 *mecA* 菌株,两者存在差异。83 株 SA 菌,毒素基因携带率较低。检测耐药、毒素基因携带率,为临床治疗及院内感染控制,食物中毒溯源提供依据。

**关键词:** 多重聚合酶链反应,金黄色葡萄球菌,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,甲氧西林耐药凝固酶阴性金黄色葡萄球菌,毒素基因

中图分类号: R378.11 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)5-542-03

Detection of antibiotic genes and toxic genes of *Staphylococcus aureus*. YUAN Meng, YUAN Yue-ming, CHEN Hui et al.(Nanshan District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518054, Guangdong, P. R. China)

**Abstract** Objective To detect the antibiotic and toxic genes of *Staphylococcus aureus* in hospital and environment. Methods The antibiotic genes *mecA*, *femA* and toxic genes TSST, PVL of *Staphylococcus aureus* were detected separately by multiplex polymerase chain reaction (PCR). Results In all 83 *Staphylococcus aureus* strains, only 3 strains(3.61%) carried *mecA* genes, 22 strains(26.50%) carried *femA* genes, 15 strains(18.07%) carried *mecA* and *femA* genes. 12 MRSA strains and 3 MRCNS strains were detected from samples from hospital, 44 strains *Staphylococcus aureus* were isolated from samples of hospital and environment, 2 strains from samples of Throat swabs carried TSST gene (4.54%, 2/44) and 1 strains from sample of blood carried PVL gene (2.27%, 1/44), all of the rest strains did not carry the two toxic genes. Conclusion Some strains from hospital samples carry *mecA* genes, but those isolated from environment do not carry this gene. The detection rate of toxic genes were lower in 83 *Staphylococcus aureus* strains.

**Key words:** Multiplex polymerase chain reaction, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Methicillin-resistant and coagulase negative *Staphylococcus aureus*, Toxic genes

金黄色葡萄球菌是医院和社区获得性感染的常见病原菌之一,可以引起皮肤和全身的广泛感染<sup>[1]</sup>以及食物中毒。MRSA 在医院内感染和社区感染中占有较大的比例,其检出率逐年增高,医院感染是全球医学界的严重问题,是导致患者久治不愈和医院病死率增加的重要原因之一。*mecA* 基因是甲氧西林耐药性的遗传决定子<sup>[2]</sup>,是 MRSA 耐药性表达的前提。SA 可以产生多种毒素,主要有葡萄球菌肠毒素、杀白细胞素(Panton-Valentine leukocidin, PVL)、表皮剥脱性毒素以及中毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin 1, TSST-1)等<sup>[3]</sup>。

本研究采用多重 PCR 方法调查院内环境及外环

境(医院涂抹样、食物中毒样、食品)样本金黄色葡萄球菌耐药基因 *mecA* 与 *femA*、毒素基因 PVL 及 TSST-1。了解 SA 毒素基因、*mecA* 基因携带和分布情况,为临床疾病防治及感染控制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-sensitive and coagulase positive *Staphylococcus aureus*, MSSA) ATCC25923,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC29213,临床样本分离 SA44 株,环境样本分离 SA39 株(9 株医院环境涂抹样、12 株食物中毒样、18 株食品样)。

基金项目: 深圳市科技计划项目(No.201103296)

作者单位: 深圳市南山区疾病预防控制中心,广东 深圳 518054

作者简介: 袁梦(1979~),女,汉族,广东东莞市人,硕士,主管技师,主要从事病原微生物研究工作。

\* 通讯作者 Email: yuanmeng726@163.com

1.1.2 主要试剂与仪器 GP 生化鉴定卡(法国梅里埃) ;PCR 相关试剂(大连宝生物工程有限公司) ;基因扩增仪(英国 Barloworld 公司) ;电泳仪(Major Science) ;凝胶成像系统(Bio- Rad 公司)。

1.1.3 引物 多重 PCR 扩增耐药基因、毒素基因引物<sup>[4-5]</sup>由上海生物工程有限公司合成,见表 1。

表 1 目的基因 PCR 引物序列

Table 1 Target gene PCR primer sequence

引物名称	引物序列	PCR 产物(bp)
Primer	Primer sequence	PCR product(bp)
mecA1	5'-CTGGAAGTGTGAGCAGAG-3'	310
mecA2	5'-TGGCTATCGTGACAAATCG-3'	
femA1	5'-ATGTCGCTTGTATGTGC-3'	686
femA2	5'-CTTACTTACTGGCTGTACCTG-3'	
TSST-1	5'-TTCATAATTTGTAAGTGTGACACCCACT-3'	445
TSST-2	5'-TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT-3'	
PVL-1	5'-ATCATTAGGTAAATGTCTGGACATGATCCA-3'	433
NPVL-2	5'-GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC-3'	

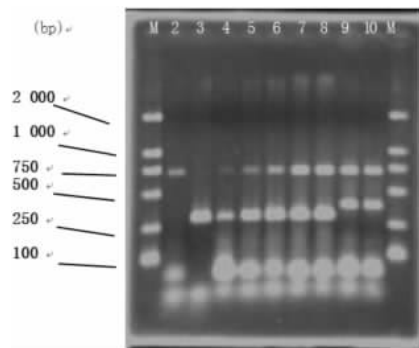
1.2 方法

1.2.1 菌株的分离鉴定 按照 GB/T4789.10-2010 检验方法 :7.5%氯化钠肉汤增菌 ,Baird- Parker 平板划线分离 ,挑取可疑菌落 ,进行革兰氏染色镜检及血浆凝固酶试验 ,用全自动生化仪 VITEC(法国梅里埃)对 SA 进行生化确定鉴定。

1.2.2 多重 PCR 检测耐药、毒素基因 模板 DNA 提取采用煮沸法。多重 PCR 扩增 mecA 与 femA 基因。扩增体系 :10 × PCR Buffer 2.5μ l ;10 mM dNTPs 2.0μ l ;10μ M mecA、femA 基因上下游引物分别各 1.0μ l ;Taq 酶(5u/μ l)0.3μ l ;50ng DNA 模版 5μ l ,总体积 25μ l。扩增条件 :预变性 94℃ 5min ;变性 94℃ 30s ,退火 52℃ 30s ,延伸 72℃ 2min ,共 25 个循环 ;最后延伸为 72℃ 5min<sup>[6]</sup>。毒素基因扩增体系与耐药基因扩增体系一致 ,扩增条件 :预变性 94℃ 5min ;变性 94℃ 30s ,退火 55℃ 30s ,延伸 72℃ 1min ,共 30 个循环 ,最后延伸为 72℃ 5min<sup>[4]</sup>。PCR 扩增产物电泳 ,凝胶成像仪观察结果并拍照。

2 结果

2.1 耐药基因扩增结果 利用多重 PCR 同时进行 mecA、femA 基因扩增 ,目的条带清晰。mecA 目的条带为 310bp ,femA 目的条带为 686bp。仅扩增出 femA 条带为 MSSA ;仅扩增出 mecA 条带为 MRCNS ;同时扩增出 mecA 与 femA 条带为 MRSA ;未扩增出 mecA 与 femA 条带为甲氧西林敏感凝固酶阴性的金黄色葡萄球菌 (methicillin-sensitive and coagulase negative Staphylococcus aureus ,MSCNS) ,见图 1。



注 M- marker 2~10 为样本 mecA、femA 基因扩增图谱结果。其中 2 : 扩增出 femA 条带 ,3~4 扩增出 mecA 条带 ,5~10 同时扩增出 mecA、femA 条带。

Note M- marker Lanes 2 ~10 were the mecA and femA gene multi- amplification electrophoretic pattern. Lane 2 was the femA gene amplification electrophoretic pattern ,Lane 3 ~4 were the mecA gene amplification electrophoretic pattern ,Lanes 5 ~10 were the multi- amplification electrophoretic pattern of the mecA and femA

图 1 mecA 与 femA 基因多重 PCR 扩增电泳图

Fig 1 mecA and femA gene multi- amplification electrophoretic pattern

2.2 mecA、femA 基因检出情况 83 株 SA 经多重 PCR 扩增 ,仅 3 株 (3.61%) 分离自医院样本检出 mecA 基因 ,22 株 (26.50%) 分离自医院及外环境样本检出 femA 基因 ,12 株 (14.46%) 分离自医院样本同时检出 mecA 与 femA 基因。

2.3 不同标本检出 MRSA、MRCNS 菌情况 83 株 SA 检出 12 株 MRSA ,样本痰检出率较高 62.50% (10/16) ;医院样本检出 6 株 MSSA ;环境样本检出 16 株 MSSA ,其中环境涂抹样 1 株 ,食物中毒样 8 株 ,食品 7 株 ;样本咽拭子检出 3 株 MRCNS ;其余 46 株 SA 均未扩增出 2 种毒素基因 ,见表 2。

表 2 不同标本检出 MRSA、MSSA、MRCNS 分布情况

Table 2 The MRSA、MSSA、MRCNS distribution of different samples

标本来源 Samples	MRSA	MSSA	MRCNS	MSCNS	合计 Total
痰 Sputum	10	1	0	5	16
咽拭子 Throat daubing	2	2	3	11	18
分泌物 Secretions	0	3	0	6	9
血液 Blood	0	0	0	1	1
环境涂抹样 Environment daubing	0	1	0	8	9
食物中毒样 Samples of food poisoning	0	8	0	4	12
食品 Food	0	7	0	11	18

2.4 医院不同来源标本携带 mecA 基因情况 18 株 SA 分离自咽拭子 ,其中 5 株扩增出 mecA 基因 ;15 株 SA 分离自痰 ,其中 11 株扩增出 mecA 基因 ;7 株 SA 分离自分泌物及 1 株 SA 分离自血液未扩增出 mecA 基因。环境样均未扩增出 mecA 基因。

2.5 毒素基因扩增结果 44 株分离自医院 SA 共有 2 株分离自咽拭子的样本检出 TSST 基因, 1 株分离自血液的样本检出 PVL 基因, 其余菌株未检出毒素基因。39 株分离自环境的样本均未检出毒素基因。

### 3 讨论

常规的药敏法仍是鉴定 MRSA 的经典方法, 但其检出率受孵育温度、时间、培养基、菌液数量等多种因素的影响, 且周期较长。葡萄球菌对抗生素耐药主要原因为产生 *mecA* 编码的 PBP2a, 这种耐药称为固有耐药<sup>[6]</sup>, *mecA* 基因可作为 MRSA 的分子标记之一<sup>[5]</sup>。*femA* 基因为 SA 所特有, 它存在于 SA, 而不存在于其它葡萄球菌, 是高度保守的管家基因, 且辅助 MRSA 耐药机制的形成<sup>[7]</sup>。本研究采用多重 PCR 方法同时扩增 *mecA* 与 *femA* 基因, 所得条带清晰, 且具有操作简单、价格低廉、省时等优点。结果表明, 分别检出 12 株 MRSA 与 3 株 MRCNS, 均分离自医院; 检出 22 株 MSSA, 其中 6 株分离自医院, 16 株分离自环境样。环境样未发现携带 *mecA* 基因的菌株, 而院内样本 15 株携带 *mecA* 基因, 检出率为 34.09% (15/44), 医院与环境样本检出 MRSA、MRCNS 菌存在较大差异。

44 株医院样本, 儿科样本分离出 20 株菌, 其中 2 株为 MRSA, 2 株为 MRCNS 均分离自咽拭子; 神经内科样本分离出 3 株菌, 2 株菌来源于痰均为 MRSA, 神经外科样本分离出 4 株菌, 3 株菌来源于痰均为 MRSA, 1 株菌来源于咽拭子为 MRCNS; 呼吸内科样本分离出 4 株菌, 2 株菌来源于痰为 MRSA; VIP 样本分离出 2 株菌来源于痰为 MRSA; 重症医学科样本分离出 3 株菌, 1 株菌来源于痰为 MRSA; 其余科室样本分离出菌株, 均未扩增出 *mecA* 基因。

16 份痰标本中, 分离出 10 份 MRSA, 检出率 62.50% (10/16); 18 份咽拭子中, 分离出 2 份 MRSA, 检出率 11.11% (2/18); 其余样本均未检出 MRSA。医院样本检出 MRSA 是否为多重耐药菌株, 有待进一步研究。

PVL 是一种细胞毒素, 由于其毒性强, 近年来受到很大关注, 临床标本分离的 SA, 其 PVL 基因检出率一般不超过 5%<sup>[8]</sup>。本研究中, 44 株医院样本, 仅 1 株分离自血液样本扩增出 PVL 基因, 检出率 2.27% (1/44) 与文献报道相符。环境样本中未检出 PVL 标本。TSST-1 是中毒性休克综合征 (Toxic shock

syndrome, TSS) 的主要致病因子<sup>[1]</sup>。本研究中, 共检出 2 株菌携带 TSST 基因, 均分离自咽拭子, 这 2 株菌没有携带 *mecA* 与 *femA* 基因与邵东华<sup>[2]</sup>等人报道的临床分离 MRSA 中 TSST-1 阳性占有较高比例存在差异。可能与样本来源有较大关系。临床与环境样本, 毒素基因携带情况存在差异, 环境样本中, 是否由其它毒素引起食物中毒, 医院环境涂抹样、食品样是否携带毒素基因, 有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Guan JC, Xia PY, Tang SL, et al. Study on staphylococcal enterotoxin B production and its gene of *Staphylococcus aureus* L-forms [J]. J Be ng bu Med Coil, 2004, 29(4): 283-285. (In Chinese) (管俊昌, 夏佩莹, 唐素兰, 等. 金黄色葡萄球菌 L 型产 B 型肠毒素及其基因的研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(4): 283-285.)
- [2] Shao DH, Sun LY, Yan Y, et al. Detection Antibiotic Resistance, SCCmec typing anti toxic genes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2009, 13(4): 468-471. (In Chinese) (邵东华, 孙立颖, 严岩, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性, SCCmec 分型及毒素基因的检测 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(4): 468-471.)
- [3] Archer GL. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen [J]. Clin Infect Dis, 1998, 26(5): 1179-1181.
- [4] Sophie Jarraud, Christophe Mougé, Jean Thioulouse, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease [J]. Infect Immun, 2002, 70(2): 631.
- [5] Huang ZQ, Ju ZL. Dual polymerase chain reaction in the measurement of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. World Journal of Infection, 2002, 2(4): 242-244. (In Chinese) (黄振球, 居中亮. 应用双重 PCR 技术检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 [J]. 国际感染杂志, 2002, 2(4): 242-244.)
- [6] Zheng B, Li JT. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci [J]. Chin J Med Lab Sci, 1999, 22(3): 145-148. (In Chinese) (郑波, 李家泰. 多重聚合酶链反应检测耐甲氧西林葡萄球菌 [J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(3): 145-148.)
- [7] Nichikawa K, Aagiyama T, Kato M, et al. Non-Helicobacter Pylori and non-NSAID peptic ulcer disease in the Japanese population [J]. Eur J. gastroenterol Hepatol, 2000, 2(6): 635-640.
- [8] Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, et al. The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying *panton-valentine leukocidin* genes and the development of deep-seated follicular infection [J]. Clin Infect Dis, 2005, 40(3): 381-385.

收稿日期: 2012-03-24 编辑: 符式刚