

金黄色葡萄球菌基因组岛对多重耐药表型与生物被膜能力的影响机制

邓阳¹, 梁晏瑞¹, 苗健¹, 李琳¹, 李冰¹, 徐振波^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 美国马里兰大学微生物病理系, 巴尔的摩 MD21201)

摘要: 本文选择常见的典型食源性微生物金黄色葡萄球菌, 从耐药性微生物感染防控角度出发, 对广州地区临床分离的 127 株葡萄球菌的耐药表型、基因组岛分型与生物被膜生长能力进行研究。通过微量肉汤稀释法检测确定菌株对 26 种抗菌药物的药敏结果; PCR 扩增葡萄球菌属特异性基因 16S rRNA、金黄色葡萄球菌菌株特异性基因 femA、耐药基因 mecA 以检测确定菌株耐药特性; 多重 PCR 检测金葡菌基因组岛 SCCmec 基因元件中 ccr 复合物, mec 复合物以对其进行分型。107 株耐药型金葡菌均为多重耐药, 且呈耐 9 种或以上抗生素占 76.1% (86/113)。113 株葡萄球菌 SCCmec 分型结果为: I 型 0 株, II 型 12 株, III 型 73 株, IV 型 10 株, V 型 11 株, 5 株为无法分型; 本文对基因组岛和金黄色葡萄球菌耐药表型与生物被膜能力的相关性进行分析与探讨, 为进一步对各种食源性微生物引起的食品污染进行安全控制, 提供了研究基础。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 多重耐药性; SCCmec 基因元件; 生物被膜; 防控措施

文章编号: 1673-9078(2015)4-42-50

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.008

Impact Mechanism of *Staphylococcus aureus* Genomic Islands on Multi-drug Resistant Phenotype and Biofilm-forming Capacity

DENG Yang¹, LIANG Yan-rui¹, MIAO Jian¹, LI Lin¹, LI Bing¹, XU Zhen-bo^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Department of biomedical science of university of Maryland, Baltimore 21201, United States)

Abstract: *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) has been long recognized as a common food-borne pathogen in food safety. To study their drug resistance, genomic island typing and biofilm-forming capacity, a total of 127 clinical isolates of staphylococci strains from Guangzhou were subject to the investigation. A detection of *Staphylococcus aureus* was conducted with a Micro-broth dilution method to determine the strain susceptibility results from 26 kinds of antibiotics. *S.aureus* was further confirmed with the detection of specific 16S rRNA, femA, mecA genes by PCR. Ccr and mec complexes of *S.aureus* SCCmec genomic island elements were typed by multi-PCR. In this experiment, 107 drug-resistant staphylococci are all multi-drug resistant strains, and 76.1% (86/113) show resistance to nine kinds of antibiotics or more. 113 *Staphylococcus* SCCmec typing results: typeI (0 strains), typeII (12 strains), typeIII (73 strains), typeIV (10 strains), typeV (11 strains), 5 strains is not typing. In this paper, the correlation of genomic islands with *Staphylococcus aureus* drug-resistance phenotype and biofilm-forming capacity is analyzed and discussed. It provides a research base for further security control on a variety of food contamination caused by food-borne microorganisms.

Key words: *Staphylococcus aureus*; multi-drug resistance; SCCmec genomic elements; biofilm; prevention measures

近年来, 食品安全成为全球公共卫生和人类健康领域最为突出的问题之一, 而由抗生素滥用引起的食源性微生物耐药性, 也成为食品安全研究的重点而日益备受关注。目前, 我国是国际上抗生素滥用最严重

收稿日期: 2014-07-24

基金项目: 国家“973”计划项目(2012CB720800); 国家自然科学基金青年基金项目(31201362); 广东省优秀博士学位论文作者资助项目; 中央高校基本科研业务费面上项目(2012ZM0060)

通讯作者: 徐振波(1982-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食源性微生物安全控制与致毒机理研究

的国家, 抗生素在畜牧业中的长期大量使用, 不仅直接导致动物食品中低剂量残留的抗生素, 食用后引起身体不良反应; 同时还为微生物的生存与进化提供了抗生素的选择压力, 滋生多种抗生素耐药菌并传播给人类, 威胁人类健康^[1]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为典型的食源性微生物, 由其引起的食品中毒事件在革兰氏阳性菌中高居首位。随着微生物的耐药性日趋严重, 耐药性金葡菌作为院内和社区感染的重要致病菌可以引起各种不同程度的感染, 近年来被大量报道, 为细菌性感染疾病的治疗

及防控提出了严重的挑战,其中,耐甲氧西林金葡萄菌(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)对多种抗生素耐药,使其在院内感染、食品安全及生物恐怖主义等领域引起了广泛的担忧^[2-3],因此MRSA被普遍认为是潜在的“超级细菌”。此外,金葡萄菌易于在各种刚性表面形成生物被膜,使其耐药能力进一步增强,且难以根治^[4]。

MRSA的耐药性主要通过其携带的*mecA*基因编码的一种对 β -内酰胺类抗菌药物具低亲和力的青霉素结合蛋白PBP2a;*mecA*是一个外源基因,来自凝固酶阴性葡萄球菌或肠球菌属,通过转座子或R质粒转到原本敏感的金葡萄菌中,并整合在染色体第10节段上。该基因组岛被称为葡萄球菌染色体盒(Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type),代表着葡萄球菌的流行进化状况,其基因元件由*mec*复合物(一段包含*mecA*, *mecR*, *IS/mecI*, *IS431*基因的区域)和*ccr*复合物(一段包含重组酶基因如*ccrA*, *ccrB*或*ccrC*的区域)组成^[5-6]。基于结构和片段大小的不同,SCC*mec*分为11种类型(SCC*mec* I-SCC*mec* XI),目前绝大部分流行性金葡萄菌被报道属于前五种类型(SCC*mec* I、II、III、IV和V型)。SCC*mec*带多种耐抗生素、耐重金属及毒素基因^[7],*ccr*复合物编码的位点特异性重组蛋白*ccr*,是基因组岛SCC*mec*产生耐药性的关键组件;国际上常应用多重PCR技术检测*ccr*复合物的类型。*Mec*复合物上带有最重要的耐药基因*mecA*及其它耐药辅助因子,因此如果说*ccr*复合物是SCC*mec*耐药性形成的原因,则*mec*复合物就是SCC*mec*耐药性的体现。在确定*ccr*复合物类型后,根据结果选择不同引物对,利用PCR分析*mec*复合物以确证SCC*mec*类型。

本文通过对127株流行性葡萄球菌的耐药表型和基因组岛进行分型,对其基因组岛对多重耐药表型与生物被膜生长能力的相关性进行分析,为当前流行金葡萄菌基因组岛与耐药表型的分布提供研究基础,将为进一步研究其基因组岛与耐药表型和生物被膜的内在机理提供科学依据。

1 材料

1.1 菌株

本研究共包括127株葡萄球菌,均在此前研究中通过常规生化鉴定、M43葡萄球菌乳胶凝集试剂盒、Staph API条等对其进行菌种鉴定;通过核酸检测法进行甲氧西林耐药性检测。甲氧西林敏感型金葡萄菌(Methicillin-sensitive *S. aureus*, MSSA)质控菌株

ATCC25923,为本实验室保存。SCC*mec*分型标准MRSA菌株NCTC10442、N315、85/2082、JCSC4469、WIS等由日本Juntendo大学Ito教授提供。

1.2 抗菌药物

抗菌药物标准品包括:青霉素、苯唑西林、头孢西丁、红霉素、克林霉素、环丙沙星、庆大霉素、莫西沙星、四环素、利福平、复方新诺明、呋喃妥因、奎奴普汀/达福普汀、利奈唑胺及万古霉素、亚胺培南、万古霉素,购自广州华奇盛生物科技有限公司。

1.3 PCR引物

基因组岛SCC*mec*基因元件*ccr*基因复合物及*mec*基因复合物分型所需的引物由江苏南京金斯瑞生物工程有限公司合成,见表1。

1.4 主要试剂与仪器

2×Taq PCR MasterMix(包含400 μ mol/L dNTPs, 0.1 U Taq DNA聚合酶, 3 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl等)、DNA Marker、Tritonx-100、基因组提取试剂盒,购自广州东盛生物科技有限公司;西班牙琼脂糖,购自GENE Company Ltd;乙二胺四乙酸(EDTA),购自国药集团化学试剂有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris),购自天津科密化学试剂有限公司;血琼脂平皿、胰酶大豆肉汤培养基TSB,购自广东环凯微生物有限公司。所用设备包括:PCR扩增仪(EDC-810,东胜国际贸易有限公司)、GELDOC-200凝胶成像系统(GeL Doc EQ,美国BIO-RAD公司)、酶标仪(SUNRISE,瑞士Tecan有限公司)等。

2 实验方法

2.1 耐药表型分析

微量肉汤稀释法是微生物检验中常用的定量方法,操作简便,是目前公认的测定细菌最低抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)标准实验方法。本实验采用微量肉汤稀释法测试菌株的最低抑菌浓度,随着抗菌药物浓度的递减,对细菌生长繁殖的抑制作用减弱,当小孔内抗生素浓度恰完全抑制细菌生长时,该最低药物浓度即为MIC。当阳性对照孔(即不加抗生素孔)内细菌明显生长,实验结果可信。当在微量肉汤稀释法出现单一的跳孔时,应记录抑制细菌生长的最高药物浓度。孔中无细菌生长者,其药物最低浓度即为受试菌的MIC。通过无菌操作,将倍比

稀释后不同浓度的抗菌药物溶液分别加到无菌 96 孔聚苯乙烯板中,其中第 1 至第 11 孔加药液,每孔 10 μ L,第 12 孔不加药液作为生长对照。第 1 孔至第 11 孔药物浓度分别为 128 (2^7)、64 (2^6)、32 (2^5)、16 (2^4)、8 (2^3)、4 (2^2)、2 (2^1)、1 (2^0)、0.5 (2^{-1})、0.25 (2^{-2})、0.125 (2^{-3}) μ g/mL。冰冻干燥后密封, -20 $^{\circ}$ C 以下保存备用。在无菌环境中,用无菌接种环挑取琼脂平板

上形态相同的待检菌落 4~5 个,接种至 3~5 mL 水解酪蛋白 (MH) 肉汤中,调配成 0.5 麦氏比浊标准的菌悬液。用 MH 肉汤将上述菌悬液进行 1:1000 稀释后备用。向每孔中加 100 μ L,密封后置于 37 $^{\circ}$ C 普通空气孵箱中,孵育 24 h 判断结果。结果判断参照 CLSI (2013) 标准。

表 1 基因组岛 SCCmec 分型中 *ccr*、*mec* 复合物分型所需引物

Table 1 Primers for *ccr* and *mec* complex from SCCmec typing

target	Primer designation (gene)	Primer sequence(5'-3')	Annealing temperature/ $^{\circ}$ C	Amplicon size/bp
ccrAB1	ccrB	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	48	700
	ccrA1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT		
ccrAB2	ccrB	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	48	1000
	ccrA2	TAAAGGCATCAATGCACAAACT		
ccrAB3	ccrB	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT	48	1600
	ccrA3	AGCTCAAAAAGCAAGCAATAGAAT-3'		
ccrAB4	ccrA4-F	ATGGGATAAGAGAAAAAGCC	49	1400
	ccrB4-R	TAAITACCTTCGTTGGCAT		
ccrC	ccrC-F	ATGAATTCAAAGAGCATGGC	49	336
	ccrC-R	GATTTAGAATTGTCGTGATTGC		
A mec	mI4	CAAGTGAATTGAAACCGCCT	53	1800
	mcR3	GTCTCCACGTTAATCCATT		
B mec	IS5	AACGCCACTCATAACATATGGAA	49	2000
	mA6	TATACCAAACCCGACAAC		
C mec	mA2	AACGTTGTAACCAACCCAAGA	49	2000
	IS2	TGAGGTTATTCAGATATTTTCGATGT		

2.2 基因组 DNA 提取

对受试金葡菌进行相关基因组提取,其方法参照试剂盒说明书,简述如下:取 1.5 mL 处于对数生长期的菌液,置于 1.5 mL 无菌离心管中,12000 r/min 离心 1 min,吸尽上清液,向收集到的菌体沉淀中加入 180 μ L 缓冲液 (20 mM Tris, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton100) 和 50 mg/mL 的溶菌酶,使终浓度为 20 mg/mL,振荡混匀 37 $^{\circ}$ C 静置 60 min;随后分别加入 4 μ L RNase A (100 mg/mL) 溶液 (震荡混匀,室温放置 5 min)、20 μ L 蛋白酶 K 溶液 (55 $^{\circ}$ C 静置 30 min)、220 μ L 裂解液 MS (振荡至形成均一悬浮液,65 $^{\circ}$ C 静置 15 min 至溶液变清亮) 与 220 μ L 无水乙醇混匀;离心并弃滤液后,分别通过蛋白液 PS 与漂洗液 PE 洗涤,以彻底去除纯化柱中残留的液体。最终通过洗涤纯化柱中的 DNA 即得高纯度的基因组 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。对提取的基因组 DNA 使用超微量紫外仪和凝胶电泳进行测定,选择浓度为 80~200

ng/ μ L、纯度为 1.8 的基因组进行扩增。

2.3 基因组岛 SCCmec 分型

对 107 株 MRSA 菌株进行基因组岛 SCCmec 分型,根据国际上最新的基因组岛 SCCmec 分型标准,从上述 *ccr* 和 *mec* 复合物入手,分析构成从而判断 SCCmec 的类型。首先检测菌株的 *ccr* 复合物类型,再根据 *ccr* 复合物类型选择引物进行 *mec* 复合物类型的确定;最终通过生物信息学分析,确定基因组岛类型。

2.3.1 Ccr 复合物分型

对于第 1~3 型的 *ccr* 复合物,在 *ccrB* 基因上有一段共同的序列,选择位于共同序列上的引物 *ccrB*,同时在 *ccrA1-3* 上选取一段各自不同的序列为引物,即 *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3*。对于第 4、5 型 *ccr* 复合物,则分别设计特异性引物对 *ccrA4-F*、*ccrB4-R* 和 *ccrC-F*、*ccrC2*。以上引物序列详见表 1。将 1~3 型的 *ccr* 复合物引物同时加进去反应体系进行多重 PCR 反应,根据

反应的产物判断 *ccr* 复合物, 产物长度为 700 bp 为第 1 型, 1000 bp 为第 2 型, 1600 bp 为第 3 型。阳性对照设置为 10442 (*ccr1*)、N315 (*ccr2*) 和 JP25 (*ccr3*)。若未检测出前 3 种类型的 *ccr* 复合物, 则进行第 4 和 5 型 *ccr* 复合物检测。产物长度为 1000 bp 为第 4 型, 336 bp 为第 5 型。阳性对照设置为 MRSA-JCSC4469 (*ccr4*)、MRSA-WIS (*ccrC*)。

通过多重 PCR 方法对 107 株 MRSA 的 *ccr* 复合物进行分型。多重 PCR 技术扩增反应体系 25 μ L, 内含 2 \times Taq PCR MasterMix 物 12.5 μ L, 浓度为 10 pmol/ μ L 的引物(上下游引物各 1 μ L, 片段 1000 bp 及以上的引物各 2 μ L), 模板 DNA 为 1 μ L, 补纯水至总反应体积 25 μ L。扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, T_m 温度下(表 1) 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存 PCR 产物。反应产物经 1.5% 琼脂糖电泳, 每孔加 5 μ L PCR 扩增产物, 0.5 \times 的 Tris-硼酸-EDTA 缓冲液电泳 30 min, 电压 100 V, 经 0.5 μ g/mL 的溴化乙啶染色后, 在凝胶成像系统下观察产物片段。

2.3.2 *Mec* 复合物分型

根据 *ccr* 类型, 选择不同的引物对, 进行 *mec* 复合物的检测。若 *ccr* 复合物为 1 型, 则选用引物对 IS5 和 mA6 扩增 *IS1272-mecA* (B 类 *mec* 复合物独有), 如产物为 2 kb, 可确认为 B 类 *mec* 复合物, 则 SCC*mec* 类型为 1B (I 型 SCC*mec*)。若 *ccr* 复合物为 2 型, 则分别选用引物对 IS5 和 mA6 扩增 *IS1272-mecA* (B 类 *mec* 复合物独有) 和引物对 mL4 和 mCR3 扩增 *mecI-mecR1* (A 类 *mec* 复合物独有), 如引物对 IS5 和 mA6 扩增出 2 kb 产物且引物对 mL4 和 mCR3 扩增阴性, 可确认为 B 类 *mec* 复合物, 则 SCC*mec* 类型为 2B (IV 型 SCC*mec*); 如引物对 mL4 和 mCR3 扩增出 1.8 kb 产物且引物对 IS5 和 mA6 扩增阴性, 可确认为 A 类 *mec* 复合物, 则 SCC*mec* 类型为 2A (II 型 SCC*mec*)。如 *ccr* 复合物为 3 型, 则选用引物 mL4 和 mCR3 扩增 *mecI-mecR1* (A 类 *mec* 复合物独有), 如产物为 1.8 kb, 可确认为 A 类 *mec* 复合物; 则 SCC*mec* 类型为 3A (III 型 SCC*mec*)。如 *ccr* 复合物为 4 型, 选用引物对 IS5 和 mA6 扩增 *IS1272-mecA* (B 类 *mec* 复合物独有), 如产物为 2 kb, 可确认为 B 类 *mec* 复合物, 则 SCC*mec* 类型为 4B (VI 型 SCC*mec*)。如 *ccr* 复合物为 5 型, 选用引物对 mA2 和 IS2 扩增 *IS431-mecR-mecA* (C 类 *mec* 复合物), 如产物为 2 kb, 可确认为 C 类 *mec* 复合物, 则 SCC*mec* 类型为 5C (V 型 SCC*mec*)。其中每个 PCR 反应均设置了阳性与阴性对照; 阳性对照为 N315 (A 类 *mec* 复合物)、10442

(B 类 *mec* 复合物) 和 WIS (C 类 *mec* 复合物)。

2.3.3 生物信息学分析

在获得 *ccr* 复合物和 *mec* 复合物后, 通过登录葡萄球菌基因组岛数据库 (<http://www.sccmec.org>), 应用 IWG-SCC 程序, 输入相应 *ccr* 复合物和 *mec* 复合物结果, 获得基因组岛分型结果。

2.4 数据分析

根据耐药表型与基因组岛的结果, 对耐药表型与基因组岛的相关性, 以及基因组岛与生物被膜能力的相关性进行分析。其中, 耐药表型数据的统计与作图分析采用 Excel 软件 2010 版本, 基因组岛和耐药表型及生物被膜能力相关性分析采用 SPSS 软件。

3 结果与讨论

3.1 耐药表型结果分析

本实验受试菌株共有 127 株葡萄球菌, 包括 107 株 MRSA、6 株 MRCNS、12 株 MSSA 和 2 株 MSS。对 107 株金葡菌进行药敏实验, 测试结果表明, 所有 MRSA 菌株都显示对青霉素、苯唑西林、头孢西丁、头孢克罗、头孢曲松、头孢呋辛酯、头孢噻肟、亚胺培南耐药, 对上述抗生素耐药率为 100% (107/107)。其中, 耐卞卡西林/舒巴坦占 97.2% (104/107)、耐阿莫西林/克拉维酸占 96.3% (103/107); 耐克拉霉素占 93.6% (100/107), 耐红霉素占 92.5% (99/107), 耐阿奇霉素占 92.5% (99/107); 耐克林霉素占 89.7% (96/107); 耐环丙沙星占 89.7% (96/107), 耐左旋氧氟沙星占 87.8% (95/107), 耐莫西沙星 84.1% (90/107); 耐庆大霉素占 86.0% (93/107), 耐四环素占 65.5% (70/107), 耐利福平占 54.2% (58/107), 耐复方新诺明(磺胺甲恶唑(SMZ)/甲氧苄啶(TMP))占 21.5% (23/107), 此外, 2 株 MRSA 分别对呋喃妥因、替考拉宁测试结果出现中敏, 即呋喃妥因、替考拉宁耐药率都为 0.935% (1/107), 所有菌株均对奎奴普汀/达福普汀、利奈唑胺及万古霉素敏感, 即耐药率均为 0%。以上结果见表 2。氟喹诺酮类药物环丙沙星作为医院和社区治疗备用的处方药, 在近年来流行性金葡菌中均有报道其耐药性。由此可见, 当前流行性金葡菌中, 多重耐药性是流行菌株的普遍特性, 包括医院型与社区型菌株。

对于 12 株 MSSA 进行药敏试验, 结果显示, 所有菌株均对青霉素耐药, 耐苯唑西林占 25.0% (3/12); 耐环丙沙星占 41.7% (5/12), 左旋氧氟沙星和莫西沙星的耐药率都为 33.3% (4/12); 耐红霉素、阿奇霉素、

克拉霉素、四环素占 25.0% (3/12); 各有 2 株对头孢西丁、头孢克罗、头孢曲松、头孢呋辛酯、头孢噻肟、克林霉素、庆大霉素和复方新诺明耐药, 即耐药率为 16.7% (2/12), 只有 1 株对亚胺培南耐药, 即耐药率为 8.33% (1/12), 以上结果见表 2。本研究中所有菌株对阿莫西林/克拉维酸、卞卡西林/舒巴坦、利福平、呋喃妥因、奎奴普丁/达福普汀、利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素均敏感, 耐药率为 0% (0/8)。

根据多重耐药的定义, 通过美国临床微生物学会 CLSI 规定的标准方法对微生物进行药敏实验, 如微生物对 3 类及其以上抗生素耐药即为多重耐药菌。本研究通过对 15 类抗生素进行体外抑菌实验, 结果显示, 所有耐药型金葡菌均呈现出多重耐药性 (至少耐 5 类抗生素); 其中, 74.8% (80/107) 耐至少 9 类抗生素; 3 株金葡菌耐 11 类抗生素, 占 2.80% (3/107); 36 株耐 10 类抗生素, 占 33.6% (36/107); 41 株耐 9 类的抗生素, 占 38.3% (41/107); 12 株耐 8 类抗生素, 占 11.3% (12/107); 11 株耐 7 类抗生素, 占 10.3% (11/107); 3 株耐 6 类抗生素, 占 2.80% (3/107); 1 株耐 5 类抗生素, 占 0.935% (1/107)。对于敏感型金葡菌, 其中 6 株 (50%) 呈现多重耐药特性, 对其中 7 类抗生素显示耐药, 其中, 2 株耐 7 类抗生素, 占 16.7% (2/12); 1 株耐 4 类抗生素, 占 8.33% (1/12); 3 株耐 3 类抗生素, 占 25.0% (3/12); 1 株耐 2 类抗生素, 占 8.33% (1/12); 5 株耐 1 类抗生素, 占 41.7% (5/12)。可见, 与耐药型金葡菌相比, 敏感型金葡菌的多重耐药率远低于耐药型金葡菌。Xu 等研究发现, 新型耐药原件整合子系统在葡萄球菌中普遍存在, 同时, 与普通葡萄球菌相比, 携带整合子的菌株显示对磺胺类、庆大霉素、四环素等抗生素的显著耐药性, 多重耐药性进一步增加^[1-3, 5-6]。各种新型耐药原件的出现与泛滥, 进一步增加各种顽固微生物的多重耐药性, 从而引发科学界对超级细菌的担忧。本实验中, 2 株金葡菌对糖肽类抗生素替考拉宁及咪唑烷酮类呋喃妥因分别显示中敏, 提示抵抗耐药性金葡菌的最后防线也可能出现耐药迹象。

3.2 基因组岛 SCCmec 分型

对 107 株 MRSA 进行 SCCmec 分型, 首先检测菌株的 *ccr* 复合物类型, 再根据 *ccr* 复合物类型选择引物进行 *mec* 复合物类型的确定。

3.2.1 Ccr 复合物分型结果分析

在多重 PCR 检测菌株的 *ccr* 复合物类型中, 如扩增出 700 bp 片段则为 1 型 *ccr*, 1000 bp 片段为 2 型 *ccr*, 1600 bp 则为 3 型 *ccr*, 阳性对照设置为 10442 (*ccr1*)、

N315 (*ccr2*) 和 85-2082 (*ccr3*); 对 1、2、3 型 *ccr* 复合物为阴性的菌株中分别进行 4 型和 5 型 *ccr* 检测, 1400 bp 片段为 4 型 *ccr*, 336 bp 则为 5 型 *ccr*, 阳性对照设置为 JCSC4469 (*ccr4*)、WIS (*ccrC*)。对 107 株 MRSA 检测, 结果显示, 0、22、72、1、11 株分别扩增出 700、1000、1600、1400、336 bp 条带, 证实其携带第 1、2、3、4、5 型 *ccr* 复合物, 进一步验证 *mec* 复合物; 另有 1 株既携带 2 型又携带 3 型 *ccr* 复合物。在 6 株 MRCNS 中, 1 株扩增出 1600 bp 条带, 另外 5 株无法分型, 证实其携带第 3 型 *ccr* 复合物, 进一步验证 *mec* 复合物, 结果见图 1~3。

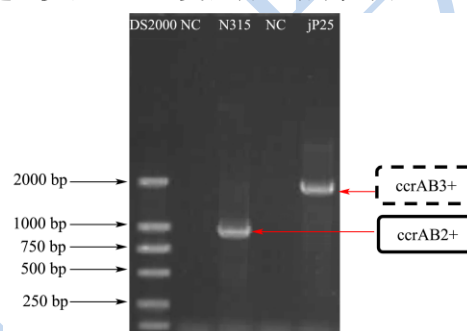


图 1 MRSA 标准菌株多重 PCR 检测 1、2 和 3 型 *ccr* 复合物的结果

Fig.1 Multi-PCR detection of *ccrAB1*, *ccrAB2* and *ccrAB3* genes in standard MRSA strains

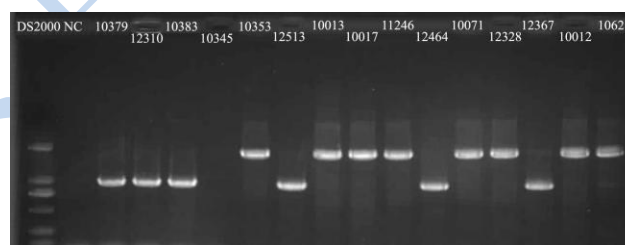


图 2 MRS 菌株多重 PCR 检测 1、2 和 3 型 *ccr* 复合物的结果

Fig.2 Multi-PCR detection of *ccrAB1*, *ccrAB2* and *ccrAB3* genes in MRS strains

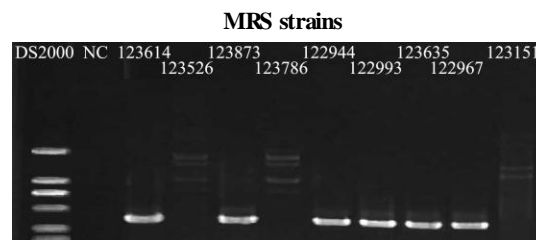


图 3 MRS 菌株多重 PCR 检测 4 型和 5 型 *ccr* 复合物的结果

Fig.3 Multi-PCR detection of type 4 and type 5 *ccr* complex in MRS strains

3.2.2 Mec 复合物分型结果分析

对于携带第 2、3 型 *ccr* 复合物的菌株, 选用引物 mI4 和 mCR3 对基因元件 *mecI-mecR1* 进行扩增, 如扩增出 1800 bp 的特异性产物, 可判断为 A 类 *mec* 复合物, 则 SCCmec 类型分别为 2A (II 型 SCCmec) 和 3A

(III型 *SCCmec*)。如 *ccr* 复合物为 2、4 型, A 类 *mec* 复合物检测为阴性, 则分别选用引物对 IS5 和 *mA6* 扩增 IS1272-*mecA*, 如果扩增出 2000 bp 的特异性产物, 可判断为 B 类 *mec* 复合物, 则 *SCCmec* 类型为 2B (IV 型 *SCCmec*) 和 4B (VI 型 *SCCmec*)。如 *ccr* 复合物为 5 型, 选用引物对 *mA2* 和 IS2 扩增 IS431*mecR-mecA*, 如扩增出 2 kb 特异性产物, 可确认为 C 类 *mec* 复合物, 则 *SCCmec* 类型为 5C (V 型 *SCCmec*), *mec* 复合物检测结果见图 4~6。

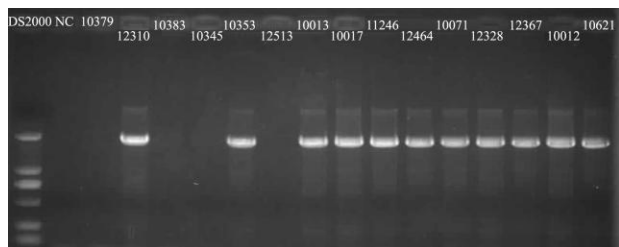


图 4 带有 *ccrAB2* 或 *ccrAB3* 的 MRSA 中 A 类 *mec* 复合物的检测结果

Fig.4 PCR detection of Class-A *mec* complex for MRS strains with *ccrAB2* or *ccrAB3* complex

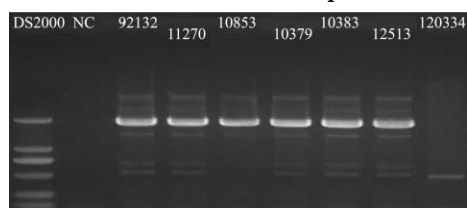


图 5 带有 *ccrAB2* 或 *ccrAB4* 复合物的 MRSA 菌株中 B 类 *mec* 复合物检测结果

Fig.5 PCR detection of Class-B *mec* complex for MRS A strains with *ccrAB2* or *ccrAB4* complex

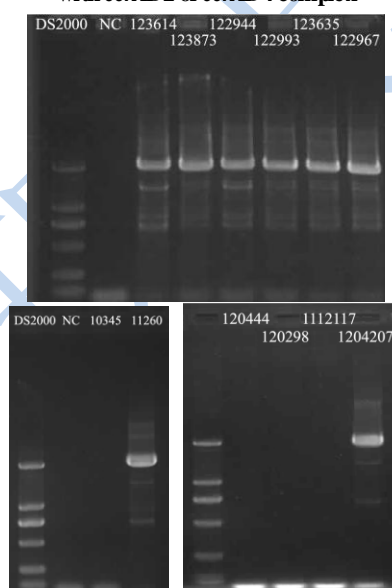


图 6 带有 *ccrC* 的 MRSA 菌株检测 C 类 *mec* 复合物的结果

Fig.6 PCR detection of Class-C *mec* complex for MRS A strains with *ccrC* complex

3.3 基因组岛的生物信息学分析

至今, 金葡菌中 *SCCmec* 分型类型已有 11 种, 大小在 20~60 kb 之间。每一个 *SCCmec* 类型都以它发现时间的先后用罗马数字命名, 且包含一个特有的 *ccr* 复合物、*mec* 复合物或 J 区域 (可变区域)。目前为止, 在 MRSA 中已发现 7 种 *ccr* 基因复合物及 4 种 *mec* 基因复合物。但目前, 国内流行的 MRSA 的 *SCCmec* 类型主要为前述 5 种。本研究中, 根据 *ccr* 复合物和 *mec* 复合物结果, 登录葡萄球菌基因组岛数据库 (<http://www.sccmec.org>), 应用 IWG-SCC 程序, 分别输入相应 *ccr* 复合物和 *mec* 复合物的检测情况, 通过生物信息学分析, 即可获得基因组岛分型结果。本实验受试的 113 株葡萄球菌 (107 株 MRSA 和 6 株 MRCNS) 中, 未发现 I 型的 *SCCmec*, 12 株 (均为 MRSA) 是 II 型的 *SCCmec*, 73 株 (72 株 MRSA 和 1 株 MRCNS) 为 III 型 *SCCmec*, 10 株 (均为 MRSA) 是 IV 型的 *SCCmec*, 11 株 (均为 MRSA) 是 V 型的 *SCCmec*。其中 1 株 MRSA 同时携带 2 型和 3 型 *ccr* 基因复合物, 且既含有 A 类 *mec* 基因复合物又含有 B 类 *mec* 基因复合物, 提示其携带 2~3 种 *SCCmec* 类型 (2A, II 型; 3A, III 型; 4A, IV 型)。另外, 1 株 MRSA 只检测出 4 类 *ccr* 复合物, 未检测出 B 类 *mec* 复合物; 5 株 MRCNS 中, 未检出以上 5 种类型 *ccr* 复合物, 也未检测出以上 3 类 *mec* 复合物, 即该 6 株菌株 (1 株 MRSA 和 5 株 MRCNS) 用以上分型方法无法分型。关于 *SCCmec* 的分型, 随着研究的深入和基因组岛 *SCCmec* 分布的广泛, 近年来 IWG-SCC 等提出一个更为规范的标准, 根据该协议, 基因组岛应该根据 *ccr* 复合物和 *mec* 复合物类型的不同组合进行分型, 其中, *ccr* 复合物用数字表示其类型, *mec* 复合物则用字母表示其类; 对于同一型的 *SCCmec*, 再根据其 J 区域分为不同的亚型, 分别用两个数字表示 J1、J2 和 J3 区域的不同, 两个数字之间以及与字母之间用点隔开。目前, 在金葡菌中发现很多 *SCCmec* 的亚型, 但大部分属于 II 型和 IV 型的 *SCCmec*。目前 5 种主要的社区型 MRSA 克隆已经散布全世界: 在亚洲, 欧洲和美国发现 ST 1 克隆, 在欧洲和美国发现 ST 8 克隆, 在澳大利亚、欧洲和南美洲发现了 ST 30 克隆, 在亚洲和美国发现 ST 59 克隆, 在亚洲、欧洲和 中东有 ST 80 克隆。此外, 已经发现有很多国际交流的国家 (如游客较多的新加坡), 社区型 MRSA 克隆种类最多^[8]。这些社区型 MRSA 克隆包含 *SCCmec* IV 型, ST 1 克隆包含 IV a 变异体, ST 80 克隆包含 *SCCmec* IV c 型。同时 ST 80 克隆通常包含编码夫西

地酸耐药的 *fus B* 基因。根据王蓉等人^[9]的研究,引起广州地区感染的 MRSA 菌株属 CC239 克隆复合体,并且 ST239-MRSA-III 型是引起感染的主要菌型,这与文献^[10]中所报道的北京、上海和南京(小样本)的数据结果一致。同时,也与许多亚洲国家如印度、印度尼西亚、菲律宾、新加坡、泰国和越南等的 MRSA 菌型一致;不过,与其他亚洲国家不同的是,

ST239-MRSA-III 为该地区 MRSA 的主要菌型,而前者为 ST239-MRSA-IIIA 型。但在日本和韩国,MRSA 的菌型为 ST 5 型,提示 MRSA 的分布与地域或人群有关。

3.4 金葡菌基因型与耐药表型的相关性分析

表 2 107 株 MRSA 及 12 株 MSSA 对 26 种抗菌药物的药敏结果

Table 2 Results of the antimicrobial susceptibility test of the 107 MRSA and 12 MSSA strains

药物种类	抗菌药物	MRSA (107 株)				MSSA (12 株) /%
		SCC <i>mec</i> II n=12/%	SCC <i>mec</i> III n=72/%	SCC <i>mec</i> IV n=10/%	SCC <i>mec</i> V n=11/%	
青霉素类	青霉素-G	100	100	100	100	100
	苯唑西林	100	100	100	100	25.0
头孢类	头孢西丁	100	100	100	100	16.7
	头孢克罗	100	100	100	100	16.7
	头孢呋辛钠	100	100	100	100	16.7
	头孢噻肟	100	100	100	100	16.7
	头孢曲松	100	100	100	100	16.7
	碳青霉烯类	亚胺培南	100	100	100	100
β -内酰胺酶抑制类	下卡西林/舒巴坦	100	97.2	80.0	100	0
大环内酯类	克拉霉素	100	91.7	90.0	100	25.0
	红霉素	100	90.3	90.0	100	25.0
	阿奇霉素	100	90.3	90.0	100	25.0
林可酰胺类	克林霉素	100	84.7	90.0	90.9	25.0
	环丙沙星	100	94.4	0	72.7	41.7
氟喹诺酮类	左旋氧氟沙星	100	98.6	10.0	72.7	33.3
	莫西沙星	100	98.6	20.0	81.8	33.3
氨基糖苷类	庆大霉素	100	97.2	10.0	63.6	33.3
四环素类	四环素	100	56.9	40.0	100	25.0
安塞霉素类	利福平	25.0	69.4	30.0	9.09	0
磺胺类	复方新诺明	0	27.8	10.0	0	16.7
咪唑烷酮类	呋喃妥因	0	1.39	0	0	0
链阳霉素类	喹努普丁/达福普汀	0	0	0	0	0
恶唑烷酮类	利奈唑胺	0	0	0	0	0
糖肽类	替考拉宁	8.33	0	0	0	0
	万古霉素	0	0	0	0	0

结合不同 SCC*mec* 类型的 MRSA 菌株的耐药表型数据(表 2),携带 II、III 型 SCC*mec* 的金葡菌耐药较严重,尤其是 SCC*mec* II 型,所有携带该基因组岛的样本菌对青霉素类、头孢类、碳青霉烯类、 β -内酰胺类、大环内酯类、林可酰胺类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类耐药,耐 9 类抗生素的多重耐药现象达 100%。其中有 1 株更呈现对糖肽类抗生素-替考拉

宁耐药。同时,携带 SCC*mec* IV 型的金葡菌耐药状况相对缓和,除对 β -内酰胺类(青霉素类、头孢类、碳青霉烯类、 β -内酰胺类)及大环内酯类抗生素呈现高耐药外,对其它类抗生素的耐药性较小。耐药表型除受 *mecA* 耐药基因调控外,还受到诸如抑制剂 *mecI*、诱导剂 *mecR1* 等一系列调控因子的影响;耐药因子 *mecA* 是由基因组岛介导,研究表明,B 类 *mec* 复合

物会使 *mecA* 的表达受到抑制, 导致葡萄球菌 *mecA* 持续低水平表达, 从而显示低耐药甚至敏感水平, 因此基因组岛为 I、IV 或 V 型的金葡菌易于呈现低耐药性以至不表现耐药性, 此外, 常表现为对利福平、复方新诺明、喹诺妥因、利奈唑胺、链阳霉素类、糖肽类等敏感。

在中国, 具有抗生素使用常识或培训的工作人员严重不足, 对抗生素规范应用知识的缺乏和合理使用规定的无法执行, 再加上监控系统与机制的落后, 因此, 抗生素滥用的现象, 包括在畜牧业和临床医学上均十分严重, 我国每年人均年消费量在 138 克左右,

远高于美国人均摄入量, 在全球位于第一, 作为国际上抗生素滥用最严重的国家, 在细菌生存空间中, 抗生素选择压力无疑更为巨大, 因此, 在选择压力下, 金葡菌的进化历程从传统的医院型基因组岛, 发展为社区型基因组岛, 甚至同时带有两种基因组岛 *SCCmec*, 流行性金葡菌的菌株特性随之发生变化。

3.5 金葡菌基因组岛与生物被膜形成能力相关性分析

表 3 MRSA 不同 *SCCmec* 类型生物被膜生成能力

Table 3 Biofilm formation in different *SCCmec* types of MRSA

生物被膜形成能力	II n=12		III n=72		IV n=10		V N=11		未分型 n=1	Informal n=1
	株数	%	株数	%	株数	%	株数	%	株数	株数
强	1	8.33	1	1.39	0	0	0	0	0	0
中	8	66.7	26	36.1	3	30	2	18.2	1	0
弱	3	25.0	45	62.5	7	70	9	81.8	0	1

金葡菌形成生物被膜会增强对抗生素的耐药性, 但耐药型金葡菌是否均具有生物被膜生成能力, 目前仍未有定论, 主要是由于生物被膜生长能力是多种因素决定。众多研究发现, 一些调节葡萄球菌耐药的基因同时也调节菌株的生物被膜生长能力, 因此, 耐药性与生物被膜生长能力同作为微生物的毒力因子。生物被膜的生成受到众多自身基因与环境因子的影响, 一些重要的编码金葡菌生物被膜的基因位于移动基因原件基因组岛 *SCCmec* 上。

的生物被膜分别占到 37.5%、30% 和 18.2%, 该数据显示, *SCCmec* II 型生物被膜生成能力较其他型别强。与此前相关报道进行比较, Lim 等通过研究 93 株 *SCCmec* III 型金葡菌的生物被膜生成能力, 结果显示 91.3% 能生成强粘附生物膜; 而在 151 株 *SCCmec* II 型金葡菌中, 只有 37.1% 能生成强粘附生物膜; 而在 110 株 *SCCmec* IV 型金葡菌中, 49.1% 的菌株能生成强粘附生物膜^[1]。生物被膜的形成是一个动态的过程, 受到多种内在机制与外在因素的影响, 在细菌的粘附及被膜成熟的过程多种机制参与了其调节。因此, 实验出现这种结果的原因可能是由于菌株的采集量较少, 以及细胞本身的其它基因背景存在差异等。Cramton 等发现 *ica* 操纵子在金葡菌生物被膜的形成与发展过程起重要调节作用, 而 *ica* 操纵子的表达在金葡菌中是高度变异的, 此外一些独立于 *ica* 操纵子的机制如生物被膜相关蛋白 Bap 及金葡菌表面蛋白 SasG 也会参与到生物被膜形成的调控中^[12]。目前国内流行性金葡菌是 III 型, 但多数菌株生物被膜生成能力不是很强, 可见当前流行性金葡菌的生物被膜能力相对较弱; 但研究同时发现, 近年来随着 IV 型、V 型金葡菌的不断发现, 社区型金葡菌在流行性菌株中所占比例不断上升, 其生物被膜能力预期也将发生变化。

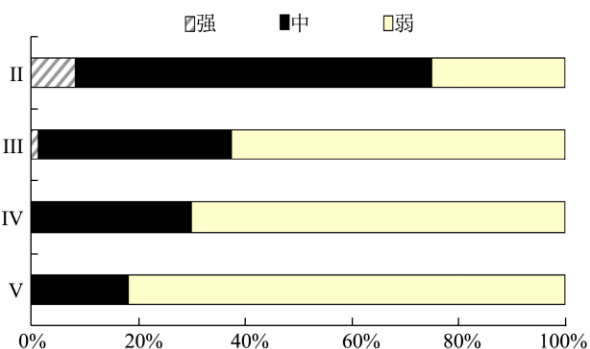


图 7 MRSA 不同 *SCCmec* 类型生物被膜生成能力

Fig.7 Biofilm formation in different *SCCmec* types of MRSA

本研究中, 127 株葡萄球菌均能生成生物被膜, 其中能形成强、中等和弱生物被膜能力菌株分别有 5 (3.9%)、47 (37.0%) 和 75 (59.1%)^[4]。根据 MRSA 不同 *SCCmec* 类型生物被膜生成能力研究 (表 3 和图 7), *SCCmec* II 型生成中等及以上粘附的生物被膜占到 75%, *SCCmec* III、IV 和 V 型生成中等及以上粘附

4 结论

本文对流行性金葡菌的耐药表型、基因组岛分型与生物被膜生长能力进行研究和分析, 结果显示, 多

重耐药性正逐渐成为流行性金葡菌最显著的特征,包括医院型与社区型菌株;其耐药谱进一步扩大,多重耐药性进一步增强;113株葡萄球菌 SCCmec 分型结果为: I 型 0 株, II 型 12 株, III 型 73 株, IV 型 10 株, V 型 11 株, 5 株为无法分型;目前流行性金葡菌中, III 型基因组岛仍占主导,但与 2001~2006 年的前期研究相比(100% 流行性金葡菌为医院型),近年来(2007~2012 年)流行性金葡菌中社区型金葡菌所占的比率在上升,该发现与全球范围内多个国家和地区的报道相符^[13]。127 株葡萄球菌均能生成生物被膜,其中能形成强、中等和弱生物被膜能力菌株分别有 5 (3.9%)、47 (37.0%) 和 75 (59.1%)。通过对基因组岛进行分型,可进一步掌握流行性金葡菌的克隆来源与进化途径;探讨基因组岛与耐药性和生物被膜能力的相关性可见, SCCmec III、IV 和 V 型生成中等及以上粘附的生物被膜分别占到 37.5%、30% 和 18.2%, SCCmec II 型生物被膜生成能力较其他型别强,其耐药状况较其它型别严重。基因组岛是金葡菌分子进化与基因变迁的关键基因元件,其类型和功能与耐药性、生物被膜能力等微生物行为的分子关联和内在相关性,仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Xu Z, Li L, Shi L, et al. Class 1 integron in staphylococci [J]. Mol. Biol. Rep., 2011, 38: 5261-5279
- [2] Xu Z, Shi L, Zhang C, et al. Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China [J]. Clin. Microbiol. Infect., 2007, 13: 980-984
- [3] Xu Z, Li L, Shirtliff M, et al. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Southern China, 2001-2006 [J]. Clin. Microbiol. Infect., 2011, 17: 714-717
- [4] 桂中玉,李琳,李冰,等.金黄色葡萄球菌耐药性与生物被膜能力的鉴定[J].现代食品科技,2014,30(3):69-75
GUI Zhong-yu, LI Lin, LI Bing, et al. Investigation of antibiotic resistance and biofilm-forming ability in *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 69-75
- [5] Xu Z, Shi L, Alam M, et al. Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001-2004 [J]. Fems. Microbiol. Lett., 2008, 278: 223-230
- [6] Xu Z, Li L, Alam M, et al. First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Curr. Microbiol., 2008, 57: 264-268
- [7] Datta P, Gulati N, Singha N. Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and their susceptibility pattern [J]. J. Med. Microbiol., 2011, 60: 1613-1616
- [8] Ruud H, Deurenberg, Ellene, et al. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Current Molecular Medicine, 2009, 9: 100-115
- [9] 王蓉,马为,徐邦牢,等.广州地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学研究[J].现代检验医学杂志,2009,24(4): 71-73
WANG Rong, MA Wei, XU Bang-lao, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Guangzhou area [J]. Modern Laboratory Medicine, 2009, 24(4): 71-73
- [10] Boden G, Cheung P, Stein TP, et al. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 283(1): 12-19
- [11] Lim K, Hanifah Y, Yusof M, et al. Comparison of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 2003 and 2008 with an emergence of multidrug resistant ST22: SCCmec IV clone in a tertiary hospital, Malaysia [J]. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 2013, 46: 224-233
- [12] Cramton S, Gerke C, Schnell N, et al. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation [J]. Infect. Immun., 1999, 67: 5427-5433
- [13] Enright M, Robinson D, Randle G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99(11): 7687-7692