

乳源耐甲氧西林葡萄球菌的耐药性、 产毒性与生物膜形成能力检测

周欢欢¹, 刘子琦¹, 李槿年^{1*}, 相翊卿¹, 范亚楠¹, 夏生林², 姚露¹, 王文平¹, 黄影¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 芜湖市动物疾病预防与控制中心, 芜湖 241000)

摘要: 从安徽省合肥地区奶牛隐性乳房炎生乳中分离鉴定 24 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。采用 E-test 方法测定 12 种抗菌药物对乳源 MRSA 合肥分离株的最小抑菌浓度, 微量板半定量法测定乳源 MRSA 合肥分离株形成生物膜的能力, PCR 方法检测这些分离株携带耐药基因、毒力基因和生物膜形成相关基因的情况。结果显示受试 MRSA 分离株对苯唑西林、克林霉素、甲氧苄啶、红霉素、利福平、头孢噻肟、庆大霉素、环丙沙星、四霉素、丁胺卡那、替考拉宁和万古霉素的耐药率依次为 100%、75%、54.2%、50%、45.8%、45.8%、33.3%、29.2%、25%、20.8%、4.2%和 0%, 且 83.3% 分离株呈现多重耐药; 受试 MRSA 分离株携带耐药基因 *mecA*、*blatm-1*、*aac(6')/aph(2'')*、*ErmB*、*tetM* 和 *qacA* 基因的检出率分别为 100%、54.2%、70.8%、33.3%、41.7%和 50%, 而毒力基因 *ClfA*、*FnBPA*、*SEA*、*PVL*、*TSST*、*Hla*、*CaL* 和 *Nuc* 的携带率分别为 33.3%、83.3%、79.2%、37.5%、58.3%、87.5%、100% 和 100%; 受试 MRSA 分离株中生物膜形成能力强、中等、弱以及不能形成生物膜的细菌分别占 37.5% (9/24)、12.5% (3/24)、25% (6/24) 和 25% (6/24), 生物膜形成相关基因 *icaA*、*icaD*、*agr*、*SigB* 和 *SarA* 基因的检出率分别为 50%、50%、50%、91.7%和 83.3%。结果表明, 乳源 MRSA 合肥分离株均为产毒性和多重耐药性 MRSA, 且 75% 分离株具有生物膜形成能力。

关键词: 耐甲氧西林葡萄球菌; 毒力基因; 生物膜

中图分类号: S855.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0529-07

Antimicrobial resistance, toxigenicity and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk

ZHOU Huanhuan¹, LIU Ziqi¹, LI Jinnian¹, Xiang Yiqing¹, FAN Yanan¹,

XIA Senglin², YAO Lu¹, WANG Wenping¹, HUANG Ying¹

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Animal Disease Prevention and Control Center in Wuhu City, Wuhu 241000)

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a main cause of clinical and subclinical mastitis in dairy cows. In our previous studies, 24 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates were identified from the subclinical mastitis milk in a dairy farm in Hefei, Anhui province. Here, the antimicrobial resistance and biofilm formation of MRSA isolates were determined using E-test method and semi-quantitative assay, respectively. The genes for drug resistance, virulence, and biofilm formation in MRSA isolates were detected using PCR assay. The results showed that 83.3% isolates were multiple resistant phenotype (resistance to three or more antimicrobials). The most common resistance observed was oxacillin (100%), followed by clindamycin (75%), trimethoprim (54.2%), erythromycin (50%), rifampicin and cefotaxime (45.8% for each one), gentamycin (33.3%), ciprofloxacin (29.2%), tetracycline (25%), amikacin (20.8%), and teicoplanin (4.2%). No isolates were resistant to vancomycin. The detection rates of the resistance genes *mecA*, *blatm-1*, *aac(6')/aph(2'')*, *ErmB*, *tetM* and *qacA* in all MRSA isolates were 54.2%, 70.8%, 33.3%, 41.7%, and 50%, respectively. The ability of strong, average, weak, and non-biofilm formation of tested isolates accounted for 37.5% (9/24), 12.5% (3/24), 25% (6/24) and 25% (6/24), respectively. Meanwhile,

收稿日期: 2015-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(31272696)和省级大学生创新创业训练计划项目(AH201410364055)共同资助。

作者简介: 周欢欢, 硕士研究生。

* 通信作者: 李槿年, 教授。E-mail: lijinnian2000@163.com

the detection rates of the biofilm-associated genes *icaA*, *icaD*, *agr*, *SigB* and *SarA* were 50%, 50%, 50%, 91.7% and 83.3%, respectively. The results indicated that all milk-acquired MRSA isolates in Hefei area possess toxigenicity and multi-drug resistance and 75% strains showed the ability to form biofilm.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; antibiotics resistance; virulence genes; biofilm

对甲氧西林(或苯唑西林)耐药或 *mec* 基因阳性的金黄色葡萄球菌统称为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)^[1]。自 1961 年 Jevons^[2]首先报道人源 MRSA 以来, 世界各地相继发现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 特别是进入 20 世纪 80 年代以后, 医源性 MRSA 感染呈现上升趋势, 甚至引起暴发流行。随着医学临床对 MRSA 感染的不断报道, 动物源 MRSA 也日益受到关注。1972 年 Devriese 等^[3]首次从乳房炎奶牛奶样中分离到了动物源 MRSA。随后, 在患病禽和宠物体内也检测到 MRSA, 且检出率逐年上升, MRSA 已成为当今困扰医学和动物医学热点问题^[4]。

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌是引起奶牛乳房炎的常见重要病原菌^[5-6], 由于其感染率高, 且呈现多重耐药性, 使得临床治疗变得相当困难, 给奶牛养殖业造成严重的经济损失, 同时产毒性 MRSA 在生鲜乳中可产生耐热性肠毒素, 可引起人类细菌毒素性食物中毒^[7]。我国奶牛临床型乳房炎的发病率在 30% 左右, 隐性乳房炎的发病率更是高达 50%~70%(多数由金黄色葡萄球菌引起), 而且隐性乳房炎乳多未废弃而仍进入乳品加工和流通环节, 因此监测不同地区生乳中 MRSA 的污染状况, 对保障奶牛养殖业的健康发展及人类公共卫生安全具有重要意义。

在前期研究中作者从合肥地区不同规模化奶牛场隐性乳房炎乳样中分离到 56 株金黄色葡萄球菌, 经初步鉴定发现其中 24 株(24/56, 42.9%)为 MRSA。本试验在确证这些分离株为 MRSA 的基础上, 对其耐药性、产毒性以及生物膜形成能力进行检测, 探讨相互间关系, 旨在为预防和控制 MRSA 引起的奶牛乳房炎和食物中毒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923、ATCC43300、ATCC29213 以及表皮葡萄球菌标准株 ATCC12228、ATCC35984 均购自中国菌种保藏中心; 24 株金黄色葡萄球菌(M1~M24)从安徽合肥地区奶牛场隐性乳房炎乳样中分离鉴定, 经苯唑西林纸片扩散法初步确定其为 MRSA 分离株。

1.1.2 培养基、抗生素纸条与主要试剂 胰蛋白酶

大豆肉汤培养基、水解酪蛋白培养基和 Luria-Bertani(LB)培养基均购自杭州微生物试剂有限公司; *E-test* 试条(包括苯唑西林 OXA、庆大霉素 GEN、丁胺卡那 AMI、环丙沙星 CIP、头孢噻肟 CTX、克林霉素 CLI、红霉素 ERY、四环素 TET、甲氧苄啶 TMP、利福平 RIF、替考拉宁 TEC、万古霉素 VAN)为法国生物梅里埃公司产品; PCR 反应试剂、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA Marker 等购于北京天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MRSA 的确证试验 使用 *E-test* 试条测定苯唑西林对初筛 MRSA 分离株的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC), 同时采用 PCR 方法检测这些分离株是否携带甲氧西林耐药决定基因 *mecA*, 特异性引物及退火温度件见表 1, 其余参数按常规进行。

1.2.2 抗菌药物对 MRSA 分离株的 MIC 测定 分别将 24 个 MRSA 分离株接种水解酪蛋白液体培养基, 37℃ 过夜培养, 将菌液浓度调整为 1×10^8 CFU/mL。用灭菌棉签将菌液均匀涂抹于水解酪蛋白琼脂平板培养基, 然后将 12 种不同抗菌药物 *E-test* 试条按要求贴于培养基表面, 37℃ 培养 24 h, 围绕试条可形成一个椭圆形的抑菌圈, 在抑菌圈和试条的横切相交处试条上的读数刻度即是抗菌药物对受试菌的 MIC 值。根据美国临床实验室标准委员会手册中的标准判定细菌对药物的敏感性(2012 年版)^[8]。试验中以金葡菌 ATCC25923 做质控菌株。

1.2.3 MRSA 分离株携带耐药基因的检测 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 MRSA 分离株的基因组。参照 GenBank 中登录的金葡菌耐药基因序列, 设计 6 对引物, 分别用于扩增甲氧西林耐药决定基因 *mecA*、 β -内酰胺类耐药基因 *blat_m-1*、四环素类耐药基因 *tetM*、氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')/aph(2'')*、红霉素类耐药基因 *ErmB* 和喹诺酮类耐药基因 *qacA*。6 对引物及 PCR 关键循环参数(退火温度)见表 1, 其余参数按常规进行。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。试验中设置金葡菌阳性和阴性对照。

1.2.4 MRSA 分离株携带毒力基因的检测 根据 GenBank 中登录的金葡菌毒力基因序列, 设计 8 对

引物(表 1), 采用 PCR 方法检测 24 株 MRSA 分离株是否携带凝集因子 A 基因 (*ClfA*)、纤连素结合蛋白 A 基因(*FnBPA*)、肠毒素 A 基因(*SEA*)、杀白细胞素基因(*PVL*)、中毒休克毒素基因(*TSST*)、 α -溶血素

基因(*Hla*)、血浆凝固酶基因(*CaL*)和耐热核酸酶基因(*Nuc*)8 种毒力基因。用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。试验中设置金葡菌阳性和阴性对照。

表 1 研究中所用的 PCR 引物
Table 1 PCR primers in this study

目的基因 Target gene	登录号 Accession No.	引物序列 (5' → 3') Sequence of primers (5' → 3')	ORF 中位置 Location within ORF	产物长度/bp Product length
<i>mecA</i> ^a	KC243783.1	<i>mecA</i> F: GCGACTTCACATCTATTAGG <i>mecA</i> R: CTTTCGTTACTCATGCCATAC	742 → 1135bp	394
<i>blat</i> ^a	KP724851	<i>blat</i> ^a -1 F: AGGAGGAGTATGATTGAACA <i>blat</i> ^a -1R: CTCGTCGTTTGGTATGGC	--6 → 528bp	535
<i>aac(6')/aph(2'')</i> ^a	AB568461.1	<i>aac(6')/aph(2'')</i> F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA <i>aac(6')/aph(2'')</i> R: CACTATCATAACCACTACCG	423 → 643bp	220
<i>TetM</i> ^a	CP009681.1	<i>TetM</i> F: GTGTGACGAACTTACCAGAA <i>TetM</i> R: TCTAACAATTCTGTTCCAGC	509 → 1625bp	1117
<i>ErmB</i> ^a	Y13600.1	<i>ErmB</i> F: TCTATTGTGAGTTATTAGTGG <i>ErmB</i> R: GCGCTAGGGACCTCTTTA	97 → 1475bp	1379
<i>qacA</i> ^a	HE579074.1	<i>qacA</i> F: GCTGCATTTATGACAATGTTTG <i>qacA</i> R: AATCCCACCTACTAAAGCAG	814 → 1443bp	630
<i>ClfA</i> ^b	CP009361.1	<i>ClfA</i> F: CGGAAGAATCAGTGAATCAAAC <i>ClfA</i> R: TTAATCCCATGACATTGATCGC	413 → 1575bp	1163
<i>FnBPA</i> ^b	J04151	<i>FnBPA</i> F: TCAGAACAAAAGACAACACTACAGTAG <i>FnBPA</i> R: GCTGTGTGGTAATCAATGTCAAG	112 → 1676bp	1565
<i>SEA</i> ^b	CP010526.1	<i>SEA</i> F: GCAGGGAACAGCTTTAGGC <i>SEA</i> R: GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG	126 → 646bp	521
<i>PVL</i> ^b	KF773712.1	<i>PVL</i> F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA <i>PVL</i> R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAAGC	579 → 1011bp	433
<i>TSST</i> ^b	AB084255.1	<i>TSST</i> F: ACCCCTGTTCCCTTATCATC <i>TSST</i> R: TTTTCAGTATTTGTAACGCC	73 → 398bp	326
<i>Hla</i> ^b	HQ592344.1	<i>Hla</i> F: GCCTCTAACTAAAAACCTAC <i>Hla</i> R: GAATATTGCAGTTGAGAC	1 → 526bp	526
<i>Cal</i> ^b	AJ306908.1	<i>Cal</i> F: GAGATACAGACAATCCACATAA <i>Cal</i> R: CTACCTCAAGACCTTCTAAAA	668 → 1268bp	601
<i>Nuc</i> ^b	CP010952.1	<i>Nuc</i> F: GGGCAATACGCAAAGAGG <i>Nuc</i> R: AGCCAAGCCTTGACGAAC	88 → 564bp	477
<i>icaA</i> ^c	AF086783.1	<i>IcaA</i> F: ATGTCTATTTACTGGATTGTCG <i>IcaA</i> R: TTAGCGTTGGGTATTCCCT	1 → 1200bp	1200
<i>SarA</i> ^c	JQ066318.1	<i>SarA</i> F: CAATGATTGCTTTGAGTTG <i>SarA</i> R: GTTCAATTCGTTGTTTGC	18 → 370bp	353
<i>icaD</i> ^c	AF086783.1	<i>icaD</i> F: ATGGTCAAGCCCAGGCA <i>icaD</i> R: TCACGATTCTCTTCCT	1 → 306bp	306
<i>SigB</i> ^c	JQ066314.1	<i>SigB</i> F: GATCCGGTGTGACAATCAGTAT <i>SigB</i> R: GGAATTCGCGACATTTATGTGG	--194 → 793bp	988
<i>Agr</i> ^c	JQ066322.1	<i>Agr</i> F: GCCATGGGAAATCACTCCTT <i>Agr</i> R: GGTACCTCAACTTCATCCATTA	-239 → 733bp	973

注: a 表示耐药基因; b 表示毒力基因; c 表示生物膜形成相关基因。

Note: "a" for resistant genes; "b" for virulence genes; "c" for biofilm formation associated genes.

1.2.5 MRSA 分离株生物膜形成能力的检测 根据文献[9]方法,将所有测试的MRSA分离株接种3 mL胰蛋白胨大豆肉汤培养基,37℃,150 r·min⁻¹振荡培养12 h。吸取菌液按1:100比例转至2 mL胰蛋白胨大豆肉汤培养基,37℃振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 值在0.5~0.6之间,吸取100 μL菌液加入96孔细胞培养板中,同时设置表皮葡萄球菌标准株(阳性菌株ATCC35984,阴性菌株ATCC12228)对照和TSB培养液空白对照。每株菌做3个平行试验,实验共重复3次。将上述加有菌液的96孔细胞培养板置37℃温箱中静置培养24~48 h,弃上清,生理盐水漂洗3遍,60℃固定1 h,0.5%结晶紫染色5 min,生理盐水反复漂洗至流出的水无色,晾干。向孔加入200 μL 33%冰醋酸溶液溶解结晶紫,用酶标仪测定溶解液的 $D_{492\text{ nm}}$ 值。以阴性对照的平均 $D_{492\text{ nm}}$ 加其3倍的标准差定义为 D_c ,将待检菌 $D_{492\text{ nm}}$ 与 D_c 比较,若待检菌 $D_{492\text{ nm}} \leq D_c$,表示待检菌不能形成生物膜; $D_c < \text{待检菌 } D_{492\text{ nm}} \leq 2D_c$,生物膜形成能力弱; $2D_c < \text{待检菌 } D_{492\text{ nm}} \leq 4D_c$,生物膜形成能力中等;待检菌 $D_{492\text{ nm}} > 4D_c$,生物膜形成能力强。

1.2.6 MRSA 分离株生物膜形成相关基因的检测 选取对金黄色葡萄球菌形成生物膜影响较大的5种相关基因(多糖胞间黏附素操纵子 $icaA$ 和 $icaD$,葡萄球菌属附属调节子 $SarA$,附属基因调节子 agr 和转录调控子 $SigA$),通过PCR方法检测不同MRSA分离株携带生物膜形成相关基因的情况。6对引物见表1,PCR扩增按常规进行。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳后,观察结果。试验中设置金黄色葡萄球菌阳性和阴性对照。

2 结果与分析

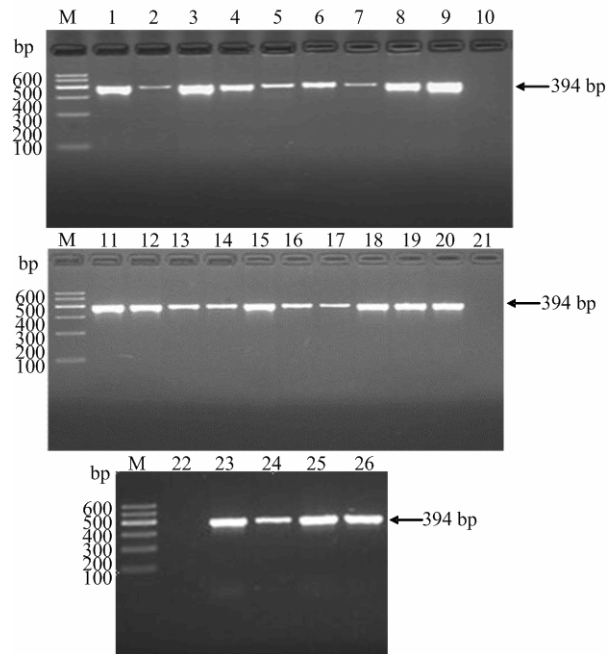
2.1 MRSA 分离株的 $mecA$ 基因检测

如图1所示,初筛试验对苯唑西林耐药的24株金黄色葡萄球菌分离株中,除M12和M15菌株外,其余22株分离株携带 $mecA$ 基因。按美国临床实验室标准委员会推荐标准(CLSI 2012年版)[8],凡是携带 $mecA$ 基因或对苯唑西林的最小抑菌浓度 $\geq 4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 或对头孢西丁的最小抑菌浓度 $\geq 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的金黄色葡萄球菌为MRSA,说明这些金黄色葡萄球菌分离株均为MRSA。

2.2 MRSA 分离株的耐药性

采用E-test法定测定24株MRSA分离株对12种常用抗菌药物的敏感性。在试验过程中,质控菌株

MIC值均在CLSI2012规定的质控范围内,保证了药物敏感性试验的可信度。结果显示,受试分离株除对万古霉素敏感外,对其余11种抗菌药物均有不同程度耐药,对苯唑西林、克林霉素、甲氧苄啶嘧啶、红霉素、利福平、头孢噻肟、庆大霉素、环丙沙星、四霉素、丁胺卡那和替考拉宁的耐药率依次为100%、75%、54.2%、50%、45.8%、33.3%、29.2%、25%、20.8%和4.2%(表2)。24株受试分离株中20株(83.3%)为多重耐药菌株(≥ 3 种),其中3耐、4耐、5耐、6耐、7耐及8耐的菌株数分别为2、5、5、3、3和2,但不同分离株的耐药谱有异同之处。24株MRSA至少携带1种所调查的耐药基因,并且 $mecA$ 、 $aac(6'')/aph(2'')$ 、 $blatem-1$ 、 $qacA$ 、 $tetM$ 和 $ErmB$ 基因的携带率分别为100%、70.8%、54.2%、50%、41.7%和33.3%(表3)。



M. DNA Marker; 1-8. M1-M8 分离株的 PCR 产物; 9. ATCC43300 阳性对照; 10. ATCC25923 阴性对照; 11-12. M13-M14 分离株的 PCR 产物; 13-17. M16-M20 分离株的 PCR 产物; 18-21. M9-M12 分离株的 PCR 产物; 22. M15 分离株的 PCR 产物; 23-26. M21-M24 分离株的 PCR 产物

M. DNA Marker; 1-8. PCR product of M1-M8 isolates; 9. ATCC43300 positive control; 10. ATCC25923 negative control; 11-12. PCR product of M13-M14 isolates; 13-17. PCR product of M16-M20 isolates; 18-21. PCR product of M9-M12 isolates; 22. PCR product of M15 isolates; 23-26. PCR product of M21-M24 isolates

图1 MRSA分离株 $mecA$ 基因的PCR扩增

Figure 1 PCR amplification of $mecA$ gene for MRSA isolates

2.3 毒力基因的检测结果

每一受试的MRSA分离株至少携带4种所调查

的毒力基因, *ClfA*、*FnBPA*、*SEA*、*PVL*、*TSST*、*Hla*、*CaL* 和 *Nuc* 基因的检出率分别为 33.3%、83.3%、79.2%、37.5%、58.3%、87.5%、100% 和 100% (表 3), 说明受试菌均为产毒性 MRSA 分离株。

表 2 MRSA 分离株的耐药率及其 MIC 值分布

Table 2 The resistance rate of MRSA isolates to antibiotics and distributions of MIC

抗菌药物 Antibiotics	MRSA 分离株的 MIC 及耐药率 MIC and resistance rate of MRSA isolates		
	敏感 Sensitive	中介 Intermediate	耐药 Resistance
OXA	≤2 0	- 0	≥4 24(100%)
CTX	≤8 12(50%)	16~32 1(4.2%)	≥64 11(45.8%)
GEN	≤4 13(54.2%)	8 3(12.5%)	≥16 8(33.3%)
AMI	≤16 16(66.7%)	32 3(12.5%)	≥64 5(20.8%)
CLI	≤0.5 3(12.5%)	1~2 3(12.5%)	≥4 18(75%)
ERY	≤2 3(12.5%)	4 9(37.5%)	≥8 12(50%)
TET	≤4 18(75%)	8 0	≥16 6(25%)
TMP	≤8 7(29.2%)	- 4(16.7%)	≥16 13(54.2%)
CIP	≤1 11(58.3%)	2 6(25%)	≥4 7(29.2%)
RIF	≤1 11(58.3%)	2 2(8.3%)	≥4 11(45.8%)
TEC	≤4 23(95.8%)	8~16 0	≥32 1(4.2%)
VAN	≤4 24(100%)	8~16 0	≥32 0

注: OXA 表示苯唑西林; CTX 表示头孢噻肟; GEN 表示庆大霉素; AMI 表示丁胺卡那; CLI 表示克林霉素; ERY 表示红霉素; TET 表示四环素; TMP 表示甲氧苄胺嘧啶; CIP 表示环丙沙星; RIF 表示利福平; TEC 表示替考拉宁; VAN 表示万古霉素 Oxacillin。

Note: "OXA" for Oxacillin; "CTX" for Cefotaxime; "GEN" for Gentamycin; "AMI" for Amikacin; "CLI" for Clindamycin; "ERY" for Erythromycin; "TET" for Tetracycline; "TMP" for Trimethoprim; "CIP" for Ciprofloxacin; "RIF" for Rifampicin; "TEC" for Teicoplanin; "VAN" for Vancomycin.

2.4 MRSA 分离株的生物膜形成能力

采用微量板半定量法对 MRSA 分离株进行生物膜形成能力进行测定 (如表 4)。结果显示, 24 株受试 MRSA 中 75% (18/24) 的菌株能形成生物被膜, 生物膜形成能力强、中等、弱以及不能形成生物被膜的菌株分别占 37.5% (9/24)、12.5% (3/24)、25% (6/24) 和 25% (6/24)。受试的 MRSA 分离株携带 5 个生物膜形成相关基因 *icaA*、*icaD*、*agr*、*SigB* 和 *SarA* 基因的检出率分别为 50%、50%、50%、91.7%

和 83.3%。其中, 9 株生物被膜形成能力强的 MRSA 分离株携带 5 个所调查的生物膜形成相关基因; 3 株生物被膜形成能力中等的 MRSA 分离株均不携带 *agr* 基因; 生物被膜形成能力弱的菌株和不能形成生物被膜的菌株均不携带 *icaA*、*icaD* 和 *agr* 基因。

3 讨论

本研究对分离自合肥地区隐性乳房炎生牛乳的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的耐药性、产毒性以及生物膜形成能力进行系统检测。结果发现所有试验菌株均为产毒性 MRSA, 受试 MRSA 分离株的耐药和多重耐药现象极为严重, 83.3% 分离株呈现对 3 种以上抗菌药物的多重耐药性, 且 75% 分离株具有生物膜形成能力。这些结果为合肥地区 MRSA 引起的奶牛乳房炎的控制和合理使用抗菌药物提供了理论依据。

细菌耐药性与其本身特性、耐药性基因传播和药物的使用情况等因素有关^[10]。本研究探讨了 MRSA 合肥分离株的耐药表型、耐药基因型及其相关性。结果发现试验所用的 MRSA 分离菌株不仅对多种抗菌药物耐药, 而且携带多种耐药基因。受试 MRSA 分离菌株对苯唑西林的耐药率为 100%, *mecA* 基因携带率为 91.7%, 两者间存在良好的相关性, 但仍有 2 株 MRSA 分离菌不携带 *mecA* 基因。已有文献报道^[11]这些表型耐甲氧西林但 *mecA* 基因阴性的 MRSA 可能是通过产生超广谱 β-内酰胺酶或新型甲氧西林酶而导致多重耐药的。受试 MRSA 分离菌株对庆大霉素、丁胺卡那、环丙沙星和四霉素的表型耐药率分别为 33.3%、20.8%、29.2% 和 25%, 而相应的氨基糖苷类耐药基因、喹诺酮类耐药基因和四环素类耐药基因的携带率较高, 分别为 70.8%、50% 和 41.7%, 说明这些携带耐药基因而表型不耐药的分离菌株尚未表达耐药基因, 在一定条件下表达耐药基因则可转化为耐药菌株。金黄色葡萄球菌红霉素耐药基因有 *ErmA*、*B*、*C* 3 种, *ErmA* 表达红霉素核糖体甲基化酶, 使细菌核糖体红霉素作用靶位点发生甲基化, 从而导致细菌对红霉素耐药。本研究发现受试 MRSA 分离菌株对红霉素的耐药率为 50%, 而 *ErmA* 基因的携带率仅为 33.3%, 这种表型与基因型不一致可能是表型耐药分离菌株携带其他 *ErmA* 耐药基因所致。上述结果提示我们应将药物敏感试验检测耐药表型与 PCR 法检测耐药基因结合起来, 才能对 MRSA 分离菌株的耐药水平作出准确的评价。

表 3 MRSA 分离株的耐药基因和毒力基因检测

Table 3 The detection of resistant genes and virulence genes from MRSA isolates

耐药基因 Resistant gene	基因阳性检出率 Positive rate	毒力基因 Virulence gene	基因阳性检出率 Positive rate
<i>mecA</i>	22/24(91.7%)	<i>Cal</i>	24/24(100%)
<i>aac(6'')/aph(2'')</i>	17/24(70.8%)	<i>Nuc</i>	24/24(100%)
<i>blat_{em-1}</i>	13/24(54.2%)	<i>Hla</i>	21/24(87.5%)
<i>qacA</i>	12/24(50%)	<i>FnBPA</i>	20/24(83.3%)
<i>tetM</i>	10/24(41.7)	<i>SEA</i>	19/24(79.2%)
<i>ErmB</i>	8/24(33.3%)	<i>TSST</i>	14/24(58.3%)
		<i>PVL</i>	9/24(37.5%)
		<i>ClfA</i>	8/24(33.3%)

表 4 MRSA 分离株的生物膜形成能力及其携带的生物膜相关基因

Table 4 The capacity of MRSA isolates to the formation and distribution of biofilm formation associated genes in different strains

分离株 Isolates	生物膜形成能力 Capacity of different isolates to form biofilms	生物膜相关基因 Biofilm formation associated gene				
		<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>agr</i>	<i>SijB</i>	<i>SarA</i>
M1	强 Strong	+	+	+	+	+
M4	强 Strong	+	+	+	+	+
M5	强 Strong	+	+	+	+	+
M19	强 Strong	+	+	+	+	+
M20	强 Strong	+	+	+	+	+
M21	强 Strong	+	+	+	+	+
M22	强 Strong	+	+	+	+	+
M23	强 Strong	+	+	+	+	+
M24	强 Strong	+	+	+	+	+
M2	中等 Moderate	+	+	-	+	+
M6	中等 Moderate	+	+	-	+	+
M18	中等 Moderate	+	+	-	+	+
M3	弱 Weak	-	-	-	+	+
M7	弱 Weak	-	-	-	+	+
M8	弱 Weak	-	-	-	+	-
M11	弱 Weak	-	-	-	+	+
M13	弱 Weak	-	-	-	+	+
M14	弱 Weak	-	-	-	+	+
M9	不能形成 Not formed	-	-	-	-	+
M10	不能形成 Not	-	-	-	+	-
M12	不能形成 Not	-	-	-	+	+
M15	不能形成 Not	-	-	-	+	-
M16	不能形成 Not	-	-	-	-	+
M17	不能形成 Not	-	-	-	+	-
	基因阳性检出率 Positive rate of genes detected by PCR	12/24 (50%)	12/24 (50%)	12/24 (50%)	22/24 (91.7%)	20/24 (83.3%)

金黄色葡萄球菌的致病性是由多种毒力因子共同作用的结果,并且不同地域和环境分离株携带的毒力基因存在着一定差异。为了明确合肥地区乳源 MRSA 分离株主要毒力基因的分布情况,本研究对奶牛隐性乳房炎性 MRSA 携带 8 种主要毒力基因进行调查。调查发现,受试分离株至少携带 4 种

所调查的毒力基因,血浆凝固酶基因(*Cal*)、耐热核酸酶基因(*Nuc*)、纤连素结合蛋白 A 基因(*FnBPA*)、肠毒素 A 基因(*SEA*)或 α -溶血素基因(*Hla*)连锁流行现象较为普遍,这种多个毒力基因连锁流行的机制有待进一步阐明。已有研究报道^[12]甲氧西林敏感金葡菌(MSSA)在获得耐药性转变

为耐甲氧西林金葡菌 (MRSA) 的同时伴随着毒力基因整体携带率下降, 但本研究结果与这一观点并不一致, 24 株受试 MRSA 分离株的毒力基因 *CaL*、*Nuc*、*Hla*、*FnBPA* 和 *SEA* 的携带率较高, 分别为 100%、100%、87.5%、83.3% 和 79.2%。

已有研究表明金黄色葡萄球菌生物膜形成机制复杂, 多种基因参与生物膜形成过程, 并依赖于细菌培养条件^[13]。为筛选 MRSA 分离株生物被膜形成过程中的关键基因, 本研究采用 PCR 检测了多糖胞间黏附素操纵子 *icaA* 和 *icaD*、葡萄球菌属附属调节子 *SarA*, 附属基因调节子 *agr*、转录调控子 *SigA* 5 个生物被膜形成相关基因在生物被膜形成强、中等、弱和不形成生物被膜的 MRSA 分离株中的分布。结果显示生物被膜形成能力弱的菌株和不形成生物被膜的菌株均不携带 *icaA*、*icaD* 和 *agr* 基因, 提示这 3 个基因可能在 MRSA 分离株生物被膜形成过程中起着重要的作用。另外, 绝大部分 MRSA 分离株携带 *SigB* 和 *SarA* 基因, 这表明这 2 个基因在 MRSA 分离株中较为保守, 将可能成为潜在的药物靶标。

参考文献:

- [1] Enright M C, Robinson DA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. PNAS, 2002, 99: 7687-7692.
- [2] Jevons M P. Celbenin-resistant *Staphylococci* [J]. BMJ, 1961(1): 124-125.
- [3] Devriese L A, Van Damme L R, Fameree L. Methicillin-(cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases[J]. Zentralbl Veterinarmed, 1972, 19 (7): 598-605.
- [4] Mulders M N, Haenen A P, Geenen P L, et al. Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in the Netherlands[J]. Epidemiol Infect, 2010, 138: 743-755.
- [5] Forough A, Ebrahim R, Amir S, et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine, sheep and goat raw milk[J]. Global Veterinaria, 2012, 8(2): 111-114.
- [6] Chiang Y C, Liao W W, Fan C M, et al. PCR detection of *Staphylococcal enterotoxins* (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 121(1): 66-73.
- [7] Le L Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning[J]. Genet Mo. Res, 2003(2): 63-76.
- [8] Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22th informational supplement, M100-S22[S]//Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.
- [9] Celine C, Carmen T, Hajer R, et al. Molecular detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from dogs in Portugal [J]. Microbial Drug Resistance, 2011, 17: 333-337.
- [10] Major J C, Engelbert M, Flynn H W, et al. *Staphylococcus aureus* endophthalmitis: antibiotic susceptibilities, methicillin resistance, and clinical outcomes [J]. Am J Ophthalmol, 2010, 149: 278-283.
- [11] Lee, J H, Jeong J, Park Y, et al. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 2780-2782.
- [12] 王俊瑞, 杜小莉, 塔拉, 等. 甲氧西林耐药/敏感金黄色葡萄球菌基因分型和毒力基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(1): 70-75.
- [13] Kaplan J B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses[J]. J Dent Res, 2010, 89: 205-218.