

• 论 著 •

金黄色葡萄球菌耐药性的临床检测及耐药机制分析*

古汉福, 张国雄

(广东省梅州市人民医院检验科, 广东梅州 514000)

摘要:目的 了解本院临床分离的 80 株金黄色葡萄球菌的耐药情况和耐药基因的流行情况, 分析其耐药机制。方法 采用 VITEK 2-compact 全自动细菌鉴定仪及配套鉴定卡、药敏卡对细菌进行鉴定及药敏试验; 头孢西丁纸片扩散法筛选耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA); 应用聚合酶链反应(PCR)检测其可能的耐药基因。结果 80 株金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、庆大霉素的耐药性较强, 分别为 91.25%、85% 和 71.25%, 对利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁、替加环素敏感率为 100%, 共筛选出 MRSA 菌株 22 株, 占 27.5%; D 实验共筛选出 13 株诱导型耐药株; 携带耐药基因者共有 57 株, 占 71.25% (57/80), 共检测出 6 个耐药基因。其中 21 株 (26.25%) 同时携带 ermB 和 aac(6')/aph(2") 2 种耐药基因; 9 株 (11.25%) 同时携带 ermA、mecA、qacA3 种耐药基因, 且该 9 株均为 MRSA; 13 株 (16.25%) 仅携带 ermC1 种耐药基因。结论 金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、庆大霉素耐药率高, 同时携带多种耐药基因, 临床应加强耐药基因检测, 合理选择抗菌药物。

关键词:金黄色葡萄球菌; 耐药性; 耐药机制; 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)14-1967-03

Analysis of the Antimicrobial-Resistant mechanism and clinical test of Staphylococcus Aureus*

Gu Hanfu, Zhang Guoxiong

(Department of Clinical Laboratory, Meizhou City People's Hospital, Guangdong 514000, China)

Abstract: Objective To investigate the antimicrobial-resistant profile and genes carried by 80 staphylococcus aureus and analyze its antimicrobial-resistant mechanism. **Methods** The bacteria identification and the antimicrobial susceptibility test were conducted by VITEK-2 compact automatic system. Methicillin resistant taphylococcus aureus (MRSA) were screened by disk diffusion method with cefoxitin. The polymerase chain reaction(PCR) was used to detect the antimicrobial-resistant genes. **Results** The resistance rates of 80 staphylococcus aureus to penicillin, erythromycin and gentamicin were 91.25%, 85.0% and 71.25%, respectively. All of the isolates were susceptible to linezolid, vancomycin, teicoplanin and tigecycline. Among the 80 isolates, there were 22 MRSA, accounting for 27.5%, and 13 were inducible antimicrobial-resistant. 57 (71.25%) carried antimicrobial-resistant genes, including 6 genes. Of which, 21 (26.25%) carried ermB and aac(6')/aph(2") simultaneously, 9 (11.25%) carried ermA, mecA, qacA3 simultaneously, and all of the 9 were MRSA, 13 (16.25%) only carried ermC. **Conclusion** The resistance rates of staphylococcus aureus were high to penicillin, erythromycin and gentamicin. The various antimicrobial-resistant genes were positive in staphylococcus aureus. We should pay attention to the detection of the antimicrobial-resistant gene and choose antibacterial drug rationally.

Key words: Staphylococcus Aureus; Antimicrobial-Resistance; Antimicrobial-Resistant Mechanism; Gen

金黄色葡萄球菌在自然界和人类皮肤表面分布广泛, 可产生多种毒素以及侵袭性酶等毒力因子, 是临床常见的一种致病菌, 可导致皮肤组织感染、败血症和医院内感染等, 危及患者生命健康^[1]。近年来, 世界各地对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染率和分离率不断增高, 使其对各种抗菌素的耐药性逐渐增强, 对临床用药的选择带来诸多问题, 影响临床治疗效果^[2]。为了进一步了解本院金黄色葡萄球菌的分布情况及其耐药机制, 笔者对临床标本分离的 80 株金黄色葡萄球菌进行了分析和检测, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2010 年 1 月至 2014 年 6 月本院住院患者送检标本分离得到的金黄色葡萄球菌 80 株, 主要来源于痰液、脓液、血液、渗出液、尿液等。菌株科室分布为: ICU 病区 12 株, 感染病区 11 株, 血液病区 7 株, 肾脏病区 7 株, 其他科室来源 23 株。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 25923, 由卫生部临床检验中心提供。

1.1.2 主要试剂 血平皿培养基购自珠海迪尔生物有限公

司; 水解酪蛋白(M-H)平板由广东江门凯林公司生产; 药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司; PCR 引物由上海 invitrogen 生物技术公司合成; 琼脂糖购自碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定 根据《全国临床检验操作规程》第三版常规方法操作步骤鉴定菌株。根据形成的菌落形态、革兰染色和凝固酶等试验方法, 使用 Vitek-2 compact 全自动细菌鉴定系统进行鉴定^[3]。

1.2.2 药物敏感试验 采用琼脂纸片扩散法(K-B法)进行体外药物敏感试验, 根据美国临床实验室标准委员会(CLSI) 2010 年版操作指南对结果进行判定^[4]。

1.2.3 MRSA 筛查 将浓度为 0.5 麦氏单位的待测样本菌液和质控菌液分别涂布于 M-H 平板, 贴苯唑西林和头孢西丁纸片, 35℃ 孵育 24 h。根据 CLSI 指南 2010 年版标准判断结果: 头孢西丁抑菌环直径 < 21 mm 为耐药, > 22 mm 为敏感; 苯唑西林抑菌环直径 < 10 mm 为耐药, > 13 mm 为敏感, 两者中只要有一株为耐药即为 MRSA。

* 基金项目: 2013 年梅州市科技计划项目(2013B121)。 作者简介: 古汉福, 男, 主管检验师, 主要从事临床微生物学检验研究。

1.2.4 D 试验 根据 CLSI 指南 2010 年版操作方法,将浓度为 0.5 麦氏单位的菌液均匀涂布于 4 mm 厚 M-H 平板上,间隔 15~25 mm 分别贴上红霉素纸片和克林霉素纸片,35 °C 培养 16~18 h。结果判定:当克林霉素纸片在靠近红霉素纸片一侧呈现大写“D”现象时,即为 D 试验阳性,表示诱导型克林霉素耐药试验阳性;若克林霉素纸片呈圆形,即为 D 试验阴性。用质控菌株 ATCC 25923 进行验证,克林霉素和红霉素对质控菌株的抑菌环均在 CLSI 允许范围内。

1.2.5 基因检测 采用煮沸法提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA,PCR 扩增反应体系终体积为 25 μ L。循环参数为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共循环 30 次,72 °C 终延伸 9 min。PCR 扩增产物送上海 invitrogen 公司纯化并测序,序列比对应应用 GenBank 在线数据库比对工具 BLASTn。

2 结 果

2.1 药敏试验结果 本组的 80 株金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、庆大霉素的耐药性较强,耐药率超过 70%,对利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁、替加环素敏感率为 100%,具体药敏试验结果见表 1。

表 1 80 株金黄色葡萄球菌的药敏试验结果[n(%)]

抗菌素名称	敏感	中介	耐药
青霉素	2(2.50)	5(6.25)	73(91.25)
苯唑西林	14(17.50)	24(30.00)	42(52.50)
红霉素	3(3.75)	9(11.25)	68(85.00)
庆大霉素	18(22.50)	5(6.25)	57(71.25)
四环素	55(68.75)	0(0.00)	25(31.25)
复方磺胺甲噁唑	56(70.00)	0(0.00)	24(30.00)
头孢西丁	60(75.00)	2(2.50)	18(22.50)
莫西沙星	62(77.50)	9(11.25)	9(11.25)
利福平	65(81.25)	2(2.50)	13(16.25)
左氧氟沙星	63(78.75)	0(0.00)	17(21.25)
环丙沙星	53(66.25)	5(6.25)	22(27.50)
克林霉素	27(33.75)	0(0.00)	53(66.25)
氨苄西林	53(66.25)	2(2.50)	25(31.25)
利奈唑胺	80(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
万古霉素	80(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
替考拉宁	80(100.00)	0(0.00)	0(0.00)
替加环素	80(100.00)	0(0.00)	0(0.00)

2.2 MRSA 筛查结果 根据判定标准,共筛查出 MRSA 菌株 22 株,占 27.5%(22/80)。

2.3 D 试验结果 对红霉素耐药的 68 株金黄色葡萄球菌中 D 试验阳性者 13 株,为诱导型耐药金黄色葡萄球菌。

2.4 耐药基因检测结果 采用 PCR 检测所有菌株的耐药基因,结果显示携带耐药基因者共有 57 株,占 71.25%(57/80),另 23 株未检测出耐药基因,占 28.75%(23/80),共检测出 6 个耐药基因。其中 21 株(26.25%)同时携带 2 种耐药基因,分别是 ermB 和 aac(6')/aph(2");9 株(11.25%)同时携带 3 种耐药基因,分别是 ermA、mecA、qacA,且该 9 株均为 MRSA;13 株(16.25%)仅携带 ermC1 种耐药基因。

3 讨 论

金黄色葡萄球菌可导致多种感染性疾病,是临床中最常见的一种病原体,尤其是 MRSA 的耐药性日趋严重,引起了临床的广泛重视。本组研究药敏分析显示,80 株金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、庆大霉素的耐药性较强,耐药率超过 70%,对利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁、替加环素敏感率为 100%,

与国内报道的其他研究结果基本一致。共筛查出 MRSA 菌株 22 株(27.5%),低于李丽民等^[5]报道的 51.11%,但高于王立新等报道的 21.7%,可能存在地区差异或标本来源不同。

万古霉素对于格兰阳性球菌尤其是 MRSA 引起严重的感染具有较好的疗效,但近年来采用万古霉素治疗失败的临床报道逐渐增多,有报道显示选用万古霉素治疗 MRSA 引起的败血症,当 MIC 值超过 1 μ g/mL 时可导致治疗失败率和死亡率增加。当出现这种现象时,建议临床更换其他抗菌药物^[6]。

由于金黄色葡萄球菌耐药程度日渐加重,尤其是 MRSA 可对 β -内酰胺类、酶抑制剂复合抗菌素及碳青霉稀类多种抗菌药物同时耐药,临床常选用大环内酯类、林克酰胺类以及链阳霉素 B 类药物。而近年来报道显示金黄色葡萄球菌对红霉素和克林霉素的耐药率也较高,且红霉素可诱导克林霉素耐药^[7],本组研究中发现对两者的耐药率分别高达 85% 和 66.25%,通过 D 试验检测发现,对红霉素耐药的 68 株金黄色葡萄球菌中有 13 株(19.1%)为诱导型耐药,与国内相关报告结果基本一致^[8]。

近年来研究发现,金黄色葡萄球菌具有多种耐药机制,常携带多个耐药基因,引起多重耐药现象。本组研究检测了 80 株金黄色葡萄球菌的耐药基因,结果显示携带耐药基因者共有 57 株,占 71.25%,共检测出 6 个耐药基因,另 23 株未检测出耐药基因,占 28.75%。其中 21 株(26.25%)同时携带两种耐药基因,分别是 ermB 和 aac(6')/aph(2");9 株(11.25%)同时携带 3 种耐药基因,分别是 ermA、mecA、qacA,且该 9 株均为 MRSA;13 株(16.25%)仅携带 ermC 一种耐药基因,基本与王立新等^[9]研究结果一致。研究显示,金黄色葡萄球菌对红霉素耐药与 erm 基因密切相关,该基因编码的红霉素核糖体甲基化酶可以降低大环内酯类、林克酰胺类以及链阳霉素 B 类药物与核糖体结合能力,从而产生耐药^[10]。本组检测出含耐药基因的菌株均携带有 erm 基因,9 株含 ermA 的均为 MRSA,ermB 基因与结构性耐药密切相关,本组中 18 株含该基因的菌株均为 MSSA;13 株红霉素对克林霉素诱导耐药全部携带 ermC 基因,高于王立新等^[9]研究报道的 75%。Saderi 等^[11]研究发现 126 株红霉素耐药的金黄色葡萄球菌中,携带 ermA 基因者占 60.3%,携带 ermC 基因者占 54.8%,同时携带 2 种 erm 基因者占 48.4%,笔者认为这种差异可能与地域或标本来源有关。

综上所述,细菌耐药现象越来越普遍,严重影响临床疗效,增大患者负担。因此临床抗感染治疗应根据药敏结果,合理选择抗菌药物,尽量避免或延缓细菌产生耐药性。金黄色葡萄球菌可能携带多种耐药基因,尤其是 MRSA 可能同时携带多种耐药基因,引起多重耐药,临床因加强耐药基因的检测。

参考文献

[1] 范虹,李彦锋. 中医医院耐药葡萄球菌属检测分析[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(15):3267-3268.
 [2] 孙建文,方晓云,代龙,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2008,5(3):154-155.
 [3] 杨乐和,余方友,何苏苏,等. 血感染金黄色葡萄球菌的耐药谱分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,18(20):2869-2871.
 [4] 韩清. 2006~2010 年耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的测定与耐药性变迁[J]. 中华医院感染学杂志,2012,15(22):3365-3367.
 [5] 李丽民,吴先华,徐礼锋. 金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(4):787-789.
 [6] 黄燕新,姜朝新,王陈龙,等. 某院 2010~2012 年金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2013,10(8):931-935. (转第 1970 页)

2.1 均匀性检验结果 自制 1 号质控物测量结果(0.122±0.003)μg/L, CV 为 2.62%, 单因素方差分析 $P=0.79$; 2 号质控物测量结果(4.533±0.084)μg/L, CV 为 1.85%, $P=0.15$ 。样本均匀性符合要求, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 恒温加速试验结果 将 25、37、45 °C、降解速率常数 k 按公式拟合出线性回归方程 $Y = -5.6697/T + 15.52$, 见图 1。据此推测 4 °C 贮存有效期为 7 d, -20 °C 下贮存有效期 19 个月。

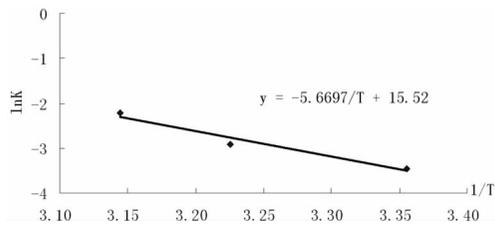


图 1 根据 k 值拟合线性回归方程

2.3 长期稳定性验证 将 -20 °C 贮存的质控物分别于 3、6、9 月检测并与 0 个月比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。质控物的百分偏差均在 ±10% 以内, 小于 cTnI 生物学变异的质量规范最低标准(10%)^[9]。监测质控物 9 个月, 与恒温加速试验结果一致。

3 讨 论

国内外学者在 cTnI 标准化和质控物研究方面做了大量的探索, 起初认为天然人心脏 cTnI 复合物可作为 cTnI 一级参考物质。近年发现 SRM2921 样品存在基质效应, 可能与从心肌组织中提取 cTnI 或重组纯化过程中蛋白质发生修饰有关。血液 cTnI 的主要存在形式是 cTnI-cTnC 复合物, 优于重组蛋白及心肌提取物。美国临床化学学会标准化组织用血清混合液及单一患者标本评价候选参考物质, 发现不同检测系统结果更为一致, 表明基质效应可忽略^[5]。

实验室制备控制物应重视生物安全及避免内源性物质干扰被检测成分。本研究 cTnI 质控血清来源实验室体检者及患者检测后剩余血清, 为保证混合血清质控物不存在感染因素, 选择乙型肝炎病毒感染标志物、HCV、HIV 及梅毒抗体阴性血清。为避免内源性物质干扰, 收集血清均无溶血、黄疸、乳糜。此外, 选择 RF 阴性标本, 避免 RF 阳性物质的干扰^[10]。本研究自制 cTnI 控制物为液体, -20 °C 贮存, 复融后外观清澈, 无絮状颗粒, 均匀性良好, 符合 CNAS-GL03 文件要求。恒温加速试验结果显示, 血清 cTnI 的降解随时间变化符合化学动力学一级反应。以 cTnI 生物学变异的质量规范最低标准 10% 为依据。推测样品 4 °C 稳定期为 7 d, 厂商声明 4 °C 稳定 1 周, 结果一致; -20 °C 下贮存稳定期 19 个月, 目前, 实验室长期稳定性监测 9 个月, 质控物稳定。本研究发现不同检测系统稳定性不完全相同, 其差异可能与 cTnI 独特的生物学特性及不同

表位 cTnI 的降解速度不同有关^[11]。Kenis 等^[12]研究 IL-6、IL-6 受体、IL-10 及 CC16 细胞因子的稳定性报道相似情况。此外, 血清 cTnI 含量的变化受到环境温度、湿度、血清中其他成分等因素的影响, 预测结果和实际测量结果之间可能存在偏差。因此, 恒温加速稳定性试验预测样品稳定性只能作为参考依据, 不能完全取代长期稳定性试验。

IFCC WG-TNI 工作组正研究 cTnI 的参考方法和参考物质, 目的使不同 cTnI 检测系统结果尽量一致。本结果为研究血清 cTnI 参考物质和质控物提供参考。

参考文献

- [1] Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Standardization of cardiac troponin I assays; round Robin of ten candidate reference materials[J]. Clin Chem, 2001, 47(3): 431-437.
- [2] Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Toward standardization of cardiac troponin I measurements part II: assessing commutability of candidate reference materials and harmonization of cardiac troponin I assays[J]. Clin Chem, 2006, 52(9): 1685-1692.
- [3] Bunk DM, Welch MJ. Characterization of a new certified reference material for human cardiac troponin I[J]. Clin Chem, 2006, 52(2): 212-219.
- [4] 才蕾, 武建伟, 邓秋. 人心肌肌钙蛋白 I 冻干质控品的制备及评价[J]临床检验杂志, 2014, 32(8): 615-617.
- [5] Tate JR, Bunk DM, Christenson RH, et al. Standardisation of cardiac troponin I measurement: past and present[J]. Pathology, 2010, 42(5): 402-408.
- [6] Zhang S, Zeng J, Zhang C, et al. Commutability of possible external quality assessment materials for cardiac troponin measurement[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102046.
- [7] 中国合格评定委员会. CNAS-GL03《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》[S]. 2006.
- [8] Peleg M, Norrnan MD, cooradini MG, et al. The arrhenius equation revisited[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012, 52(9): 830-851.
- [9] 杨雪, 张传宝, 王薇, 等. 我国心肌损伤标志物不同检测系统质量水平调查[J]. 临床检验杂志, 2013, 33(1): 65-67.
- [10] 周涛, 王晓云, 杨红. 类风湿性关节炎类风湿因子对检测 cTnI 的影响研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1130.
- [11] Guy MJ, Chen YC, Clinton L, et al. The impact of antibody selection on the detection of cardiac troponin I[J]. Clin Chim Acta, 2013, 4(1): 82-88.
- [12] Kenis G, Teunissen C, De Jongh R, et al. Stability of interleukin6, Soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum[J]. Cytokine, 2002, 9(2): 228-235.

(收稿日期: 2015-03-12)

(上接第 1968 页)

- [7] 韦柳华, 周定, 程红革, 等. 综合医院金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 8(22): 1712-1713.
- [8] 李璐, 陈金云, 范国萍. 2009-2011 年浙江省富阳市人民医院金黄色葡萄球菌的感染分布和耐药性调查[J]. 疾病监测, 2013, 28(12): 992-995.
- [9] 齐子芳, 李恩杰, 田立华. 临床分离金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 临床输血与检验, 2011, 13(1): 30-33.
- [10] 王立新, 胡伟明, 胡志东, 等. 2006~2011 年 60 株血感染金黄色

葡萄球菌毒素及耐药基因分析[J]. 天津医药, 2013, 41(4): 334-336.

- [11] Saderi H, Emadi B, Owlia R. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus in Tehran, Iran[J]. Med Sci Monit, 2011, 17(2): 48-53.

(收稿日期: 2015-02-28)