

- 情况比较分析[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(1): 31-33.
- [7] 陆庆屯. 宿迁地区无偿献血者梅毒抗体阳性率调查分析[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(4): 341-344.
- [9] 聂冬梅, 邓超干, 叶贤林, 等. 深圳市无偿献血人群梅毒感染现状分析[J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 574-575.
- [10] 陆祝选, 覃水庆. 南宁市 2005—2009 年无偿献血人群梅毒感染情况调查[J]. 临床输血与检验, 2011, 13(2): 151-152.
- [11] 秦奕丽, 潘登, 冯惟萍. 兰州地区无偿献血者梅毒检测双阳性结果分析[J]. 卫生职业教育, 2015, 33(17): 114-115.

- [12] 武建国. 老年人抗梅毒螺旋体抗体测定的假阳性率偏高[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(4): 241-243.
- [13] 周晓真, 江伟梅, 林洪铿, 等. 福州地区无偿献血人群梅毒感染检测情况分析[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(12): 1340-1342.
- [14] 李玲, 刘忠. 初筛反应性献血者确证方案与归队策略分析[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(1): 1-2.

(收稿日期: 2017-09-11 修回日期: 2017-11-12)

• 短篇论著 •

肺结核并发肺部感染凝固酶阴性葡萄球菌的 耐药性及耐药基因 *mecA* 分析*

王锦萍, 蔡常辉, 梁连辉, 梁 栋, 李淑丽

(中山市第二人民医院检验科, 广东中山 528400)

摘要:目的 探讨肺结核并发肺部感染凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)的耐药性及耐药基因 *mecA* 的分布情况, 为抗结核并发感染提供指导。方法 收集该院 2014 年 11 月至 2016 年 3 月肺结核患者痰标本中分离的 CNS 30 株, 经美国 BD 公司的 PHOENIX-100 型全自动微生物鉴定仪对菌落进行菌种鉴定及药物敏感性试验, 同时采用 PCR 方法检测其耐药基因 *mecA*。结果 药物敏感性试验分析结果显示, 30 株肺结核并发肺部感染的 CNS 均为耐苯唑西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS), 检出率 100.0%。青霉素、阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林耐药率 100.0%; 红霉素、环丙沙星、利福平、庆大霉素和复方磺胺甲噁唑的耐药率均在 75.0% 以上; 妥布霉素和克林霉素的耐药率在 50.0% 以上; 耐药率在 30.0% 以下的抗菌药物较少, 只有阿米卡星、呋喃妥因、奎奴普丁/达福普汀、四环素、替考拉宁; 未发现耐万古霉素的 CNS。采用 PCR 扩增法检测 30 株肺结核并发感染 CNS 中检出 *mecA* 基因 30 株, 检出率为 100.0%; 耐药表型与耐药基因型的检出率高度一致。结论 肺结核并发肺部感染的 CNS 具有严重的耐药性, 携带耐药基因 *mecA* 与耐药性相关性密切。

关键词: 肺结核; 凝固酶阴性葡萄球菌; 耐药基因 *mecA*; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.031

中图法分类号: R446.5; R521

文章编号: 1673-4130(2018)05-0623-03

文献标识码: B

结核是一种慢性传染性疾病, 严重危害着人类的健康, 据报道全世界每年新发生结核病 800 万至 1 000 万, 每年约有 100~300 万人死于结核病^[1-3]。根据全国第 5 次结核病流行病学抽样调查报告显示 2010 年全国 15 岁及以上人群活动性肺结核的患病率为 459/100 000, 估算为 499 万例^[4]。肺结核既可导致肺部解剖学结构破坏, 也可造成机体免疫性损伤导致免疫力低下, 并发肺部感染极为常见; 而凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)是条件致病菌, 内部器官感染主要侵犯免疫功能低下者, 其中以呼吸道感染多见。随着医院治疗中各种侵入性操作增多, 大量使用激素和免疫抑制剂等因素, CNS 已成为世界范围内医院感染的重要致病菌^[5]。因此本研究分析肺结核并发肺部感染 CNS 的

耐药情况, 并检查其耐药基因 *mecA*, 对探讨肺结核并发感染 CNS 的耐药性, 减少其多重耐药发生尤为重要。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集本院 2014 年 11 月至 2016 年 3 月肺结核患者痰标本中分离的 CNS 30 株, 同一患者无重复株。根据中华医学会制定的《肺结核诊断和治疗指南》中相关的诊断标准挑选肺结核患者^[6]。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 购于卫生部临检中心。

1.2 仪器与试剂 PHOENIX-100 型全自动微生物鉴定仪、菌种鉴定药敏板、鉴定调菌液、药敏调菌液和荧光指示剂均购于美国 BD 公司, Cobas z 480 PCR 扩

* 基金项目: 中山市医学科研项目(2015A020226)。

增仪购于瑞士罗氏公司,生物安全柜购于济南鑫贝西公司,电泳仪购于北京市六一仪器厂,恒温金属浴仪购于上海培清公司;PCR 引物序列、蛋白酶 K、EX Taq 聚合酶、琼脂糖凝胶、DL2000 DNA Marker 均为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 CNS 鉴定及抗菌药物敏感性试验 所有肺结核患者在抗感染治疗前采集痰液或肺泡灌洗液,挑取黏稠标本涂片检查,经革兰染色后若上皮细胞小于 25 个/低倍视野、白细胞大于 10 个/低倍视野为合格标本。合格标本接种于血平板,麦康凯平板和巧克力平板,经 37 °C 18~24 h 分离培养后获得单个菌落,经美国 BD 公司的 PHOENIX-100 型全自动微生物鉴定仪对菌落进行菌种鉴定及药物敏感性试验,按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2015 年公布的抗菌药物敏感性标准判断结果。

1.3.2 mecA 基因检测 (1)提取 DNA 模板:挑选纯培养物单个菌落于含有蛋白酶 K 溶液的离心管里,55 °C 金属浴消化 1 h,95 °C 金属浴灭活 10 min,最后以 12 000 r/min 离心 5 min,留取上清液存于 -20 °C 冰箱待用^[7]。(2)引物设计:参照文献[8],mecA 基因,序列长度为 533 bp:P1:5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3';P2:5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'。(3)PCR 扩增反应体系:DNA 模板 1 μL、上下游引物各 1 μL、EX Taq 聚合酶 12.5 μL 和灭菌纯水 9.5 μL,共 25 μL。热循环参数为 94 °C 预变性 10 min,94 °C 变性 30 s,52 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。产物在 4 °C 保存^[9]。(4)电泳:PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后凝胶成像仪检测。

1.4 统计学处理 采用 WHONET5.4 版软件进行统计分析,多次阳性者仅将首次结果纳入统计。

2 结果

2.1 CNS 对抗菌药物的耐药率 药物敏感性分析结果显示,30 株肺结核并发肺部感染的 CNS 均为耐苯唑西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS),检出率 100.0%。青霉素、阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林耐药率 100.0%;红霉素、环丙沙星、利福平、庆大霉素和复方磺胺甲噁唑的耐药率均在 75.0%以上;妥布霉素和克林霉素的耐药率在 50.0%以上;耐药率在 30.0% 以下的抗菌药物较少,只有阿米卡星、呋喃妥因、奎奴普丁/达福普汀、四环素、替考拉宁;未发现耐万古霉素的 CNS。见表 1。

2.2 mecA 基因 PCR 法检测 运用 PCR 扩增法检测 30 株 CNS 的 mecA 基因,其基因大小为 533 bp,30 株肺结核并发肺部感染的 CNS 中检出 mecA 基因 30

株,检出率为 100.0%,见图 1。

表 1 30CNS 对抗菌药物耐药情况

抗菌药物	耐药株	耐药率	中介株	中介率	敏感株	敏感率
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
阿米卡星	6	20	4	13.3	20	66.7
阿莫西林/克拉维酸	30	100	0	0	0	0
氨苄西林	30	100	0	0	0	0
苯唑西林	30	100	0	0	0	0
呋喃妥因	0	0	1	3.3	29	96.7
红霉素	26	86.7	1	3.3	3	10
环丙沙星	28	93.4	1	3.3	1	3.3
奎奴普丁/达福普汀	3	10	3	10	24	80
利福平	24	80	0	0	6	20
青霉素 G	30	100	0	0	0	0
庆大霉素	26	86.7	1	3.3	3	10
四环素	7	23.3	3	10	20	66.7
替考拉宁	4	13.3	0	0	26	86.7
妥布霉素	22	73.4	4	13.3	4	13.3
万古霉素	0	0	0	0	30	100
复方磺胺甲噁唑	23	76.7	0	0	7	23.3
克林霉素	18	60	3	10	9	30

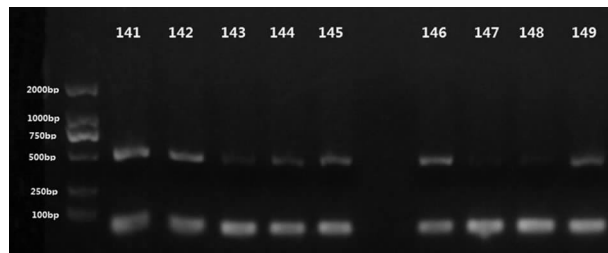


图 1 mecA 基因 PCR 扩增产物电泳图

3 讨论

近年来由于结核耐药率逐渐增加,且结核患者由于营养状况、经济、依从性以及合并感染其他慢性疾病等因素,影响结核患者的预后^[10]。而 CNS 因不产生血浆凝固酶、溶血素等毒素物质常被当做非致病菌,但是近来发现曾不被重视的 CNS 引起的感染增多,在肺结核并发肺部感染的革兰阳性球菌中,CNS 感染占首位,有广泛耐药性,本研究通过对其进行多种抗菌药物耐药性分析及耐药基因 mecA 检测,分析其耐药表型与耐药基因型的相符性,发现结果具有高度的一致性。

肺结核并发肺部感染的 30 株 CNS 中,对药物的耐药率从高到低为青霉素、氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、环丙沙星、庆大霉素、红霉素、利福平、复方磺胺甲噁唑、妥布霉素、克林霉素、四环素、替考拉宁、阿米卡星、奎奴普丁/达福普汀、万古霉素、呋喃妥因;敏感率从大到小为万古霉素、呋喃妥因、替考拉宁、奎奴普丁/达福普汀、四环素、阿米卡星、克林霉素、复方磺胺

甲噁唑、利福平、妥布霉素、红霉素、庆大霉素、环丙沙星、氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、青霉素。由于苯唑西林耐药,β-内酰胺类药物无论体外药敏试验是否敏感都应报告为耐药,因为 MRCNS 已经产生了耐药基因 *mecA*。药物敏感性试验显示,检出的 30 株 CNS 对多种抗菌药物耐药,而且具有较高的耐药性,β-内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类和大环内酯类的耐药率都很高,只有糖肽类敏感率比较高,显示出广泛的耐药性。

PCR 扩增法检测 30 株 CNS 的耐药基因 *mecA*, 了解肺结核并发肺部感染的 CNS 中 β-内酰胺类抗菌药物相关的耐药机制。葡萄球菌对其耐药的原因是多方面的,既可通过细菌编码失常基因 *sar*、*arg*、*mgr* 等产生,也可获得突变基因 *fem*、耐药基因 *mecA* 和 TEM 导致。目前临床分离的 CNS,绝大部分是产青霉素酶 CNS,通过破坏 β-内酰胺环从而对青霉素耐药,但对 β-内酰胺酶抑制剂复合药等敏感;而 MRCNS 的产生主要是敏感的 CNS 染色体上携带 *mec* 片段,包括编码青霉素结合蛋白 2α(PBP2α)的 *mecA* 基因和控制转录的调节因子 *mec I* 基因和 *mecR I* 基因。PBP2α 为葡萄球菌青霉素结合蛋白 2(PBP2)的异构体,可以发挥几种青霉素结合蛋白(PBPs)的功能,但与 β-内酰胺类抗生素亲和力低,当高亲和力的 PBP2 和 β-内酰胺药物强力结合时,亲和力低的 PBP2α 替代 PBP2 参与 CNS 的增殖过程,β-内酰胺类药物耐药;调节因子 *mec I* 基因本是起抑制 *mecA* 基因表达的作用,但 *mecR I* 基因被抗生素活化后抑制 *mec I* 的作用,*mecA* 基因得以顺利表达,β-内酰胺类药物耐药。本研究肺结核并发感染患者痰标本分离的 CNS 中,*mecA* 基因的检出率与苯唑西林的耐药率均为 100.0%,30 株 MRCNS 均检出了 *mecA* 基因。MRCNS 的耐药性及耐药基因检出率相符。因而可以推断肺结核并发肺部感染 MRCNS 均多携带 *mecA* 基因,而且携带率高,耐药性广泛。此外 MRCNS 若对 β-内酰胺类药物耐药,对大环内酯类、喹诺酮类药物和氨基糖苷类抗菌药物多呈交叉耐药。原因可能与葡萄球菌 *mec* 基因盒(SCC*mec*)有关,SCC*mec* 是一种可移动的遗传元件,该元件还携带除 *mecA* 基因以外的其他抗菌药物耐药基因,造成多重耐药^[11]。研究表明,CNS 的感染与其特异或非特异黏附于生物材料有关,并由此产生的生物膜使 CNS 耐药性得以累积^[12]。

综上所述,肺结核并发肺部感染的 CNS,以 MRCNS 感染为主,多重交叉耐药严重,*mecA* 基因为葡萄球菌所特有,是 MRCNS 的金标准。肺结核并发肺部感染常见,临床治疗肺结核需要长期联合使用抗

结核药物,对于结核毒性严重者还需要使用糖皮质激素治疗,咯血严重时需气管插管或支气管镜吸引,各种因素为 CNS 的感染创造了条件。因而临床应重视肺结核并发 CNS 肺部感染,了解其感染传播及耐药特征,达到预期的治疗目的。

参考文献

- [1] ORCAU, CAYL J A, MARTINEZ J A. Present epidemiology of tuberculosis prevention and control programs[J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2011, 29(1): 2-7.
- [2] BATES M, OGRADY J, MWABA P, et al. Evaluation of the burden of unsuspected pulmonary tuberculosis and comorbidity with non-communicable diseases in sputum producing adult inpatients[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40774.
- [3] MOR Z, PINSKER G, CEDAR N, et al. Adult tuberculosis in Israel and migration: trends and challenges between 1999 and 2010[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2012, 16(12): 1613-1618.
- [4] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国肺结核患病率现状调查[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 60(9): 665-668.
- [5] RAHMAN A, HOSSAIN M, PAUL S K, et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) by disk diffusion method[J]. *Mymansingh Med J*, 2013, 22(2): 229-231.
- [6] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. *中国实用乡村医生杂志*, 2013, 20(2): 7-11.
- [7] 杨志杰. 861 株住院患者革兰阳性菌的分布与耐药性分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2012, 7(12): 939-941.
- [8] 慕海峰, 燕占甫, 王春, 等. 外科患者感染耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌耐药基因检测及耐药性分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(5): 461-465.
- [9] RODRIGUEZ-NORIEGA E, SEAS C. The changing pattern of methicillin-resistant staphylococcus aureus clones in Latin America: implications for clinical practice in the region[J]. *Rev Chilena Infectol*, 2010, 27(Suppl 2): S59-69.
- [10] GLER M T, SKRIPCONOKA V, SANCHEZ-GARAVITO E, et al. Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2151-2160.
- [11] 战晓微, 郑秋月. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及 SCC*mec* 基因分型研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(18): 2512-2514.
- [12] 胡洪华, 杨永长, 肖代雯, 等. 凝固酶阴性葡萄球菌生物膜形成及耐药性分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2015, 14(11): 721-725.