

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.003

感染性心内膜炎患者的主要病原菌耐药基因检测^{*}

王 佳,高 辉[△],徐 益,黄云昆,朱雯梅,姚 瑶,俸 玉

(昆明医科大学附属延安医院/云南心血管病医院检验科,昆明 650051)

摘 要:目的 分析感染性心内膜炎患者耐药表型与耐药基因的关系。方法 收集感染性心内膜炎患者血培养分离的草绿色链球菌和葡萄球菌,提取 DNA,用聚合酶链反应(PCR)法扩增检测耐药基因。结果 草绿色链球菌扩增的基因为 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x,这 3 个基因主导 β -内酰胺类抗菌药物耐药,葡萄球菌扩增基因为 mecA 和 ermB, mecA 基因可引起耐甲氧西林阳性, ermB 基因主导大环内酯类耐药,该实验选取的 5 株草绿色链球菌未检测出 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因,葡萄球菌检测结果显示 6、7、8、10 号菌株 mecA 基因阳性,6、7、8、9 号菌株 ermB 基因阳性。结论 耐药基因检测可以对临床感染性心内膜炎患者早期用药起到指导作用。

关键词:感染性心内膜炎; 草绿色链球菌; 葡萄球菌

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)18-2694-04

Detection of main pathogenic drug resistance genes in infectious endocarditis^{*}

WANG Jia,GAO Hui[△],XU Yi,HUANG Yunkun,ZHU Wenmei,YAO Yao,FENG Yu

(Department of Clinical Laboratory,the Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cardiovascular Hospital,Kunming,Yunnan 650051,China)

Abstract: Objective By detecting the resistance genes of streptococcus pneumoniae and staphylococcus aureus isolated from blood cultures of patients with infective endocarditis, to analyze the relationship between the resistance phenotype and the resistance gene, and to guide clinical rational use of antimicrobial agents. **Methods** The streptococcus pneumoniae and staphylococcus aureus isolated from blood cultures of patients with infective endocarditis were collected. DNA was extracted and amplified by PCR. **Results** Streptococcus viridans were amplified by PBP1a, PBP2b and PBP2x, which dominated β -lactam antibiotics. Staphylococcus aureus amplification gene mecA and ermB, mecA gene caused methicillin-resistant, ermB gene dominant macrocyclic lipid resistance. The PBP1a, PBP2b and PBP2x genes were not detected in 5 strains of streptococcus viridans, the detection results of grape ball showed that 6, 7, 8 and 10 were positive for mecA, and 6, 7, 8 and 9 were positive for ermB gene. **Conclusion** According to the experimental results, it can be seen that the initial conditions of the experiment are mature, can be further collected samples for testing and study the consistency of bacterial resistance and gene to guide the rational use of drugs in the early stage.

Key words: infective endocarditis; streptococcus viridans; aureus

感染性心内膜炎是由病原菌直接感染而引起的心瓣膜、心室壁或邻近大动脉内膜的炎症性疾病,引起感染的病原体以细菌最常见,也可由真菌、病毒、立克次体、衣原体属、螺旋体等其他微生物引起。据目前的文献报道,感染性心内膜炎的病死率高达 20.0%,已成为威胁人类健康的重要疾病,故及早的诊断和治疗对感染性心内膜炎起到重要作用^[1]。本研究对本院感染性心内膜炎分离的主要病原菌进行耐药基因检测,分析耐药表型与耐药基因的关系,为临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 实验菌株来自本院 2016 年 9 月至 2017 年 3 月临床以 Duck 标准确诊为感染性心内膜炎的血培养阳性瓶分离病原菌。

1.2 仪器与试剂 抗菌药物纸片、Omega 公司的 Bacterial DNA Kit D3350-01 细菌 DNA 提取试剂盒、Oligo 公司的引物、琼脂糖、Loading Buffer、DNA Marker、Taq 酶,水浴箱、离心机、电泳仪、PCR 扩增仪、凝胶成像系统。

1.3 方法

^{*} 基金项目:昆明市卫生和计划生育委员会“十百千”项目(2016SWJG010)。

作者简介:王佳,女,主治医师,主要从事医学微生物检验方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:15893854@qq.com。

1.3.1 标本采集与细菌分离 收集临床感染性心内膜炎血培养阳性标本分离出来的草绿色链球菌和葡萄球菌。符合要求的草绿色链球菌和葡萄球菌各有 5 株。

1.3.2 药敏及保存 纸片法测分离细菌的药敏,然后把细菌保存在-70℃低温冰箱里。

1.3.3 DNA 模板的制备 用 Omega 公司的 Bacterial DNA Kit D3350-01 细菌 DNA 提取试剂盒,按照说明书步骤提取草绿色链球菌和葡萄球菌 DNA。取 5 μL 提取产物与 1 μL Loading Buffer 混合,点样,1%琼脂糖凝胶 120 V 电泳 40 min,用凝胶成像系统分析并记录结果^[2]。-20℃保存 DNA 待用。

1.3.4 PCR 扩增 1~5 号为草绿色链球菌,对草绿色链球菌检测的 β-内酰胺类耐药基因主要是 PBP1a、PBP2b、PBP2x,选取肺炎链球菌为标准阳性菌株;6~10 号为葡萄球菌,对葡萄球菌检测的耐甲氧西林基因 mecA,耐大环内酯类基因 ermB。委托欧阳科技公司合成引物。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物		
引物	序列	扩增片段 (bp)
PBP1a	5'-CGGCATTCGATTTGATT -3'	2 300
	5'-GATGTCTTCTCAGGCTTTTG-3'	
PBP2b	5'-GATCCTCTAAATGATTCTCAGGTGG -3'	1 500
	5'-CAATTAGCTTAGCAATAGGTGTTGG -3'	
PBP2x	5'-CGTGGGACTATTTATGACCGAAATGG -3'	2 000
	5'-AAATCCAGCACTGATGGAAATAAACATATTA -3'	
mecA	5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC -3'	530
	5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTCG -3'	
ermB	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA -3'	640
	5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC -3'	

PCR 反应体系 30 μL,包括:细菌 DNA 3 μL,引物 1 μL(上下游分别 0.5 μL),Taq 酶 12 μL,剩余超纯水补足。反应温度:96℃预变性 3 min,94℃1 min,52℃1 min,72℃1 min,扩增 40 个循环,最后 72℃延伸 10 min^[3]。取 5 μL 扩增产物与 1 μL Loading Buffer 混合,点样,1%琼脂糖 120 V 电泳 40 min,凝胶成像系统分析并记录结果。

2 结 果

2.1 菌株药敏试验结果 选取的 1~5 号草绿色链球菌药敏试验结果(表 2),显示 5 株细菌均对青霉素敏感,选为标准阳性对照的肺炎链球菌药敏试验结果显示对青霉素耐药。6、7、8、10 号菌株对甲氧西林耐药,6、7、8、9 号菌株对红霉素耐药,见表 3。

2.2 耐药基因检测结果 图 1、2 为草绿色链球菌和

作为标准阳性对照的肺炎链球菌的耐药基因检测结果,可见草绿色链球菌未检测出 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因,肺炎链球菌 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因均被检测出。图 3 为葡萄球菌检测结果,6、7、8、10 号菌株检测出 mecA 基因,6、7、8、9 号菌株检测出 ermB 基因。

表 2 草绿色链球菌对青霉素的药敏试验结果		
编号	细菌	青霉素
1	草绿色链球菌	S
2	草绿色链球菌	S
3	草绿色链球菌	S
4	草绿色链球菌	S
5	草绿色链球菌	S
阳性对照	肺炎链球菌	R

注:S 为敏感;R 为耐药

表 3 葡萄球菌药敏试验结果			
编号	细菌	药敏试验	
		甲氧西林	红霉素
6	表皮葡萄球菌	R	R
7	表皮葡萄球菌	R	R
8	头状葡萄球菌	R	R
9	溶血葡萄球菌	S	R
10	表皮葡萄球菌	R	S

注:S 为敏感;R 为耐药

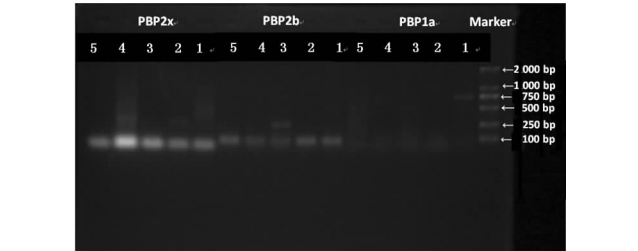


图 1 草绿色链球菌检测结果

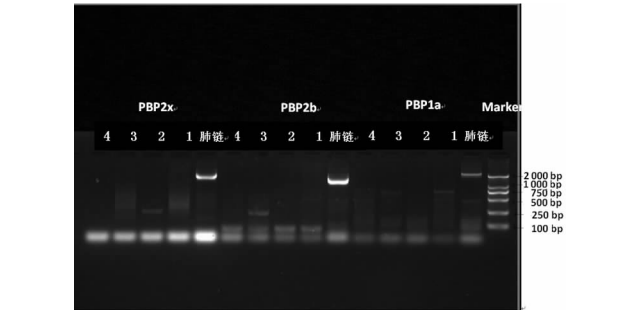


图 2 草绿色链球菌和肺炎链球菌检测结果

2.3 药敏试验及基因检测结果 5 株草绿色链球菌均对青霉素敏感,肺炎链球菌对青霉素耐药,对草绿色链球菌和肺炎链球菌进行 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因检测,草绿色链球菌未检测到这 3 个基因,肺炎链球菌 3 个基因均为阳性,药敏结果和基因检测结果见表 4,基因型与耐药表型一致。5 株葡萄球菌中,6、

7、8 号葡萄球菌对红霉素耐药且耐甲氧西林阳性,3 例菌株均检测出 *mecA* 和 *ermB* 基因。9 号溶血葡萄球菌对红霉素耐药,耐甲氧西林阴性,10 号表皮葡萄球菌则相反,对红霉素敏感,耐甲氧西林阳性,对 9、10 号进行耐药基因检测中,笔者发现 9 号溶血葡萄球菌检测到 *ermB* 基因而没有检测到 *mecA* 基因,10 号表皮葡萄球菌检测到 *mecA* 基因而没有检测到 *ermB* 基因,基因型与耐药表型一致,药敏试验结果和基因检测结果,见表 4、5。

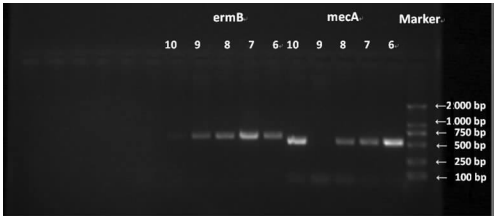


图 3 葡萄球菌检测结果

表 4 草绿色链球菌和肺炎链球菌耐药基因检测结果			
编号	细菌	青霉素	耐药基因检测结果
1	草绿色链球菌	S	PBP1a(−)、PBP2b(−)、PBP2x(−)
2	草绿色链球菌	S	PBP1a(−)、PBP2b(−)、PBP2x(−)
3	草绿色链球菌	S	PBP1a(−)、PBP2b(−)、PBP2x(−)
4	草绿色链球菌	S	PBP1a(−)、PBP2b(−)、PBP2x(−)
5	草绿色链球菌	S	PBP1a(−)、PBP2b(−)、PBP2x(−)
阳性对照	肺炎链球菌	R	PBP1a(+)、PBP2b(+)、PBP2x(+)

注:S 为敏感;R 为耐药

表 5 葡萄球菌耐药基因扩增结果				
编号	细菌	药敏试验		扩增结果
		甲氧西林	红霉素	
6	表皮葡萄球菌	R	R	<i>mecA</i> (+) <i>ermB</i> (+)
7	表皮葡萄球菌	R	R	<i>mecA</i> (+) <i>ermB</i> (+)
8	头状葡萄球菌	R	R	<i>mecA</i> (+) <i>ermB</i> (+)
9	溶血葡萄球菌	S	R	<i>mecA</i> (−) <i>ermB</i> (+)
10	表皮葡萄球菌	R	S	<i>mecA</i> (+) <i>ermB</i> (−)

注:S 为敏感;R 为耐药

3 讨 论

感染性心内膜炎是指由细菌、真菌和其他微生物直接感染而产生心瓣膜或心室壁内膜的炎症^[2-3]。随着医疗技术地不断进步,人工瓣膜植入常用于治疗心脏病,以及各种侵入性操作的广泛应用,细菌性血症病例也渐渐增多^[4]。常见的病原菌分布较为广泛,以草绿色链球菌、葡萄球菌等条件致病菌相对多见,感染性心内膜炎临床表现多样,如发热、心脏杂音、心力衰竭和脾肿大等,是心脏内外科较常见而且难以处理的一种严重疾病,其症状可以单独出现也可以伴随其他疾病,如自身免疫性疾病,给临床诊断带来干扰^[5-6]。

据统计,2011 — 2015 年本院感染性心内膜炎患者病原菌中共分离出草绿色链球菌 104 例,占 37.1%,为主要病原菌;表皮葡萄球菌 30 例,占 10.7%。草绿色链球菌对红霉素、克林霉素耐药率较高,均为 54.5%;对头孢噻肟的耐药率为 9.1%,头孢曲松为 2.3%,目前没有检测到耐青霉素的草绿色链球菌。葡萄球菌对青霉素的耐药率为 100.0%,对红霉素和四环素的耐药率分别为 57.1% 和 61.9%^[7]。草绿色链球菌主要对红霉素和克林霉素的耐药率较高,葡萄球菌普遍对青霉素 G、苯唑西林、红霉素、克林霉素等耐药。青霉素结合蛋白(PBPs)作为 β -内酰胺类抗菌药物作用于细菌的必需蛋白,当细菌编码 PBPs 的基因发生变异,可以导致 PBPs 的数量、种类或与抗菌药物的亲和力发生变化,造成细菌结合 β -内酰胺类抗菌药物的能力降低,进而导致细菌耐药性的产生^[8]。*ermB* 基因介导靶位点修饰。*ermB* 基因编码核糖体甲基化酶,可使细菌 23S rRNA A2058 位点的腺嘌呤残基 N-6 位二甲基化。其耐药表型为大环内酯类-林可酰胺类-链阳菌素 B (MLS),即对大环内酯类、林可酰胺类抗菌药物和链阳性菌素 B 交叉耐药,可被分为固有型 MLS 耐药(cMLS)和诱导型 MLS 耐药(iMLS),后者表现为仅对大环内酯类抗菌药物耐药,当耐药基因被完全诱导时,则表现为结构型耐药。*mecA* 基因编码 PBP2a,PBP2a 具有其他高亲和力 PBPs 的功能,当高亲和力的 PBPs 被 β -内酰胺类抗菌药物结合而失去功能时,PBP2a 的存在仍能维持细菌生长与存活,使其成为耐药菌株。因此对感染性心内膜炎患者进行主要病原菌耐药基因检测是非常有必要的。

本实验选取了 5 株草绿色链球菌和 5 株葡萄球菌进行基因检测,所有细菌 DNA 均提取成功。对草绿色链球菌进行 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因检测(图 1),选肺炎链球菌为标准阳性菌株进行 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因检测(图 2)。从图中可以看出草绿色链球菌基因扩增结果均为阴性,肺炎链球菌基因扩增结果为阳性,结合药敏结果(表 2)中草绿色链球菌对青霉素敏感和肺炎链球菌对青霉素耐药可见耐药基因基因检测结果与药敏结果一致。同时,本实验还选取了 5 株葡萄球菌进行 *mecA* 和 *ermB* 基因检测(图 3),结合葡萄球菌药敏结果表 3 可见对甲氧西林耐药菌株均检测出 *mecA* 基因,对红霉素耐药菌株均检测出 *ermB* 基因,耐药表型和基因型相对应。

据文献报道,草绿色链球菌对青霉素耐药是因为携带 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因编码导致的,葡萄球菌对甲氧西林和大环内酯类耐药,也是由于其携带 *mecA* 和 *ermB* 基因^[9-10]。本实验选取 5 株对青霉素敏感的草绿色链球菌,并未检测出(下转第 2700 页)

- [2] RASHID A, SOLOMON L K, LEWIS H G, et al. Outbreak of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a regional burns unit: management and implications[J]. *Burns*, 2006, 32(4): 452-457.
- [3] XU J, SHI C, SONG M, et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates from Shanghai[J]. *J Food Sci*, 2014, 79(4): M635-M642.
- [4] YU F Y, LIU Y L, LV J N, et al. Antimicrobial susceptibility, virulence determinant carriage and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates associated with skin and soft tissue infections[J]. *Braz J Infect Dis*, 2015, 19(6): 614-622.
- [5] ALAM S M, KALAM M A, MUNNA M S, et al. Isolation of pathogenic microorganisms from burn patients admitted in Dhaka Medical College and Hospital and demonstration of their drug-resistant traits[J]. *Asian Pac J Trop Dis*, 2014(4): 402-407.
- [6] ABBASI-MONTAZERI E, KHOSRAVI A D, FEIZABADI M M, et al. The prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates with high-level mupirocin resistance from patients and personnel in a burn center[J]. *Burns*, 2013, 39(4): 650-654.
- [7] 宗自卫, 梁树才, 朱宝安, 等. 金黄色葡萄球菌的耐药性与耐药基因检测[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(2): 268-271.
- [8] 黄辉, 周建党, 聂新民, 等. *MecA* 基因在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对 β -内酰胺类抗生素耐药中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2012, 37(6): 567-571.
- [9] 赵彩芸, 吕媛, 李耘, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SC-Cmec 分型与耐药性研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(15): 3102-3105.
- [10] ARDIC N, OZYURT M, SAREYYUPOGLU B, et al. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, 26(3): 213-218.
- [11] MOOSAVIAN M, SHOJA S, ROSTAMI S, et al. Inducible clindamycin resistance in clinical isolations of *Staphylococcus aureus* due to *erm* genes[J]. *Iran J Microbiol*, 2014, 6(6): 421-427.
- [12] GHANBARI F, GHAJAVAND H, HAVAEI R, et al. Distribution of *erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan[J]. *Adv Biomed Res*, 2016, 22(5): 62-70.
- [13] JONES R N, SADER H S, GJ M, et al. Declining antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1998-2009)[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 68(3): 334-336.

(收稿日期: 2018-01-13 修回日期: 2018-03-30)

(上接第 2696 页)

其携带 PBP1a、PBP2b 和 PBP2x 基因, 而 5 例葡萄球菌中, 对大环内酯类耐药菌株均检测出 *ermB*, 耐甲氧西林阳性菌株均检测出 *mecA* 基因, 结果与文献报道相符合。

综上所述, 本研究发现可以通过耐药基因检测, 对临床感染性心内膜炎患者早期用药起到指导作用。本次检测耐药基因实验为一个预实验, 根据实验结果, 可以看出该实验初步条件已成熟, 之后可以收集更多病原菌, 继续开展后续实验。完成后续实验, 将结果进行统计学分析, 最终掌握本地区草绿色链球菌和葡萄球菌流行的耐药表型及其相应的耐药基因, 促进临床合理选择抗菌药物, 提高感染性心内膜炎患者的治愈率及生存率。

参考文献

- [1] 吴梓芳, 鲍翠玉, 高萍萍, 等. 感染性心内膜炎常见病原菌分布与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(17): 3872-3874.
- [2] 陆笑, 刘少娟, 章锦才, 等. 多药耐药草绿色链球菌 16S rDNA 序列同源性分析[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(23): 2317-2319.
- [3] ERGIN A, ESERÖ K, HASÇELİK G. Erythromycin and

penicillin resistance mechanisms among viridans group streptococci isolated from blood cultures of adult patients with underlying diseases[J]. *New Microbiologica*, 2011, 34(2): 187-193.

- [4] 方文宾, 王文标, 梁亚非. 感染性心内膜炎患者病原菌分布与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(10): 157-160.
- [5] 金宇婷, 杨颖, 华春珍. 儿童感染性心内膜炎 35 例分析[J]. *临床儿科杂志*, 2016, 34(1): 10-12.
- [6] 邱宗利. 感染性心内膜炎患者血培养病原菌及其耐药性分析[J]. *中国医学创新*, 2014, 11(17): 115-118.
- [7] 王佳, 王杨, 张胜, 等. 感染性心内膜炎病原菌分布及耐药变迁[J]. *中国实验诊断学*, 2016, 20(12): 214-216.
- [8] 解晓双, 赵玉军, 张德显, 等. PBP_s 介导革兰氏阴性菌对 β -内酰胺类抗生素的耐药机制[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(2): 169-172.
- [9] 林志航, 明德松, 郭如意. 213 株草绿色链球菌的分布和耐药性分析[J/OL]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(11): 989-992.
- [10] 张志军, 曹海燕, 刘延媛, 等. 医院感染金黄色葡萄球菌耐药表型与耐药基因研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(9): 1924-1926.

(收稿日期: 2018-01-12 修回日期: 2018-03-28)