

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.18.004

烧伤科患者分离金黄色葡萄球菌耐药性和耐药基因研究^{*}

殷国民, 杨 丹, 顾常梅, 陶 佳, 刘文森[△]

(宁夏医科大学总医院医学实验中心/宁夏临床病原微生物重点实验室, 银川 750004)

摘 要:目的 了解烧伤科住院患者分离的金黄色葡萄球菌的耐药表型和耐药基因分布, 指导临床医生合理使用抗菌药物, 提高患者治愈率。方法 收集 2015 年 1—8 月该院烧伤科住院患者分离的金黄色葡萄球菌, 菌种鉴定及药敏试验采用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 Compact 系统, 通过聚合酶链反应(PCR)方法分析其耐药基因 *mecA*、*TEM*、*ermA*、*ermB*、*ermC*、*tetM*、*tetK*、*ant6* 及 *aac6'/aph2''* 的表达。结果 106 株金黄色葡萄球菌对万古霉素、利奈唑胺、替加环素和替考拉宁的敏感率均为 100.0%, 对青霉素 G 的耐药率为 99.1%, 对环丙沙星、红霉素、庆大霉素、苯唑西林和利福平的耐药率较高, 均大于 60.0%。耐药基因的阳性率分别为 *mecA* 61.3%、*TEM* 30.2%、*ermA* 60.4%、*ermB* 12.3%、*ermC* 56.6%、*tetM* 76.4%、*tetK* 20.7%、*ant6* 10.4%、*aac6'/aph2''* 77.0%。结论 烧伤患者分离的金黄色葡萄球菌对多数抗菌药物的耐药率较高, 对万古霉素、利奈唑胺和替考拉宁高度敏感; 耐药基因以 *mecA*、*ermA*、*ermC*、*tetM* 和 *aac6'/aph2''* 为主。

关键词: 烧伤; 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 耐药基因

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)18-2697-04

Drug resistance and drug resistance genes distribution of *Staphylococcus aureus* isolated from burn ward^{*}

YIN Guomin, YANG Dan, GU Changmei, TAO Jia, LIU Wenmiao[△]

(Center of Medical Laboratory, the General Hospital of Ningxia Medical University/
Ningxia Key Laboratory of Clinical and Pathogenic Microbiology, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance phenotypes and antibiotic-resistant genes distribution of *Staphylococcus aureus* isolated from burn ward so as to guide reasonable use of antibiotics and improve the cure rate. **Methods** *Staphylococcus aureus* isolated from burn ward from Jan. to Aug. 2015 were collected, and VITEK-2 Compact system was adopted to detect strains and drug resistance. Polymerase-chain-reaction was used to analyze the expression of the drug-resistant gene *mecA*, *TEM*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetM*, *tetK*, *ant6*, and *aac6'/aph2''*. **Results** Totally 106 strains of *Staphylococcus aureus* were 100.0% susceptible to vancomycin, linezolid, tigecycline and teicoplanin; the drug resistance rate of the 106 strains of *Staphylococcus aureus* strains to penicillin G were 99.1%; the drug resistance rates of the 106 strains of *Staphylococcus aureus* strains to ciprofloxacin, erythromycin, gentamin, oxacillin and rifampicin were more than 60.0%. The positive rates of the drug resistance genes were as following: *mecA* 61.3%, *TEM* 30.2%, *ermA* 60.4%, *ermB* 12.3%, *ermC* 56.6%, *tetM* 76.4%, *tetK* 20.7%, *ant6* 10.4%, *aac6'/aph2''* 77.0%. **Conclusion** The *Staphylococcus aureus* strains isolated from burn ward are highly resistant to most of the antibiotics and susceptible to vancomycin, linezolid and teicoplanin; the *mecA*, *ermA*, *ermC*, *tetM* and *aac6'/aph2''* are the predominant drug resistance gene.

Key words: burn patients; *Staphylococcus aureus*; drug resistance; drug resistance gene

近年来, 烧伤患者金黄色葡萄球菌感染率越来越高, 严重威胁到患者的生命。由于烧伤导致患者皮肤屏障功能丧失和免疫反应低下, 因此极易发生感染。金黄色葡萄球菌已成为引起烧伤患者感染的重要病原体, 由于抗菌药物的不合理使用, 其耐药性日益严重^[1]。自 1961 年, 第一株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在欧洲被发现以来, 更多的耐药菌株陆续被发现, 其不仅对 β -内酰胺类抗菌药物耐药, 还对其他抗菌药物如氨基糖苷类、大环内酯类耐药。随着金

黄色葡萄球菌的耐药性增加, 以及多重耐药株的出现, 抗菌药物的选择已成为是烧伤患者治疗中的难题^[2]。为了解烧伤患者金黄色葡萄球菌分离株耐药性和耐药相关基因的携带情况, 对 2015 年 1—8 月烧伤科患者分离的 106 株金黄色葡萄球菌进行耐药检测和耐药基因分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1—8 月本院烧伤科住院患者分离的 106 株金黄色葡萄球菌菌株。同一

^{*} 基金项目: 宁夏医科大学校级科研项目(XM2016107)。

作者简介: 殷国民, 男, 初级技师, 主要从事病原微生物方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: liuwenmiao@163.com。

患者重复分离菌株不再计入。金黄色葡萄球菌质控菌株 ATCC25923、ATCC29213, ATCC43300 购自国家卫生和计划生育委员会临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 5415D 微量台式离心机(Eppendorf, Germany); RAD300 电泳仪(Amersham Biosciences, USA); PCT2100 Peltier PCR 扩增仪(Bio-Rad, USA); GIS2210 凝胶成像系统(Bio-Rad, USA)。Premix Taq DNA polymerase 和 100 bp DNA Ladder Marker 购自大连宝生物生物工程公司; 琼脂糖购自西班牙 Biowest 公司; 胶红购自北京金式金生物技术有限公司。耐药基因引物参考文献[3]由上海生物工程公司合成。

1.3 方法

1.3.1 菌种鉴定和药敏试验 采用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 Compact 全自动系统, 结果参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)2014 版药敏标准进行判断。按照 CLSI2002 年标准推荐, 应用 mecA 基因检测 MRSA 和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA), 即 mecA 基因检测阳性为 MRSA, mecA 基因检测阴性为 MSSA。

1.3.2 细菌基因组 DNA 制备 无菌条件下将金黄色葡萄球菌接种在血琼脂平板, 35℃培养箱中培养 18~24 h, 挑取 6~8 个单个菌落, 混悬于 0.5 mL 无菌水中, 95℃煮沸 15 min, 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清即为细菌基因组 DNA 溶液。

表 1 PCR 引物序列与目的产物长度

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
mecA	上游: TGGCATTCGTGTCACAATCG	310
	下游: CTGGAAGTTGTTGAGCAGAG	
TEM	上游: ATGAGTATTCACATTTTCGTG	860
	下游: TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	
ermA	上游: GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	421
	下游: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	
ermB	上游: CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC	359
	下游: GAATCGAGAC1TGAGTGTGC	
ermC	上游: GCTAATATGTGTTAAATGTCATTC	572
	下游: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	
tetM	上游: AGTGGAGCGATTACAGAA	158
	下游: CATATGTCTCTGGCGTGTCTA	
tetK	上游: GTAGCGACAATAGGTAATAGT	360
	下游: GTAGTGACAATAAACCTCCTA	
ant6	上游: ACTGGCTTAATCAATTTGGG	597
	下游: GCCTTTCCGCCACCTCACCG	
aac6'/aph2''	上游: CCAAGAGCAATAAGGGCATA	220
	下游: CACTATCATAACCACTACCG	

1.3.3 PCR 基因扩增 25 μL 反应体系包括 Premix

Taq 酶缓冲液 12.5 μL, 上游、下游引物和 DNA 模板各 1 μL, 双蒸水 9.5 μL。反应参数: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 1 min, 退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环, 循环结束后 72℃延伸 10 min, 耐药基因引物序列及产物长度见表 1。

1.3.4 产物检测 取 5 μL PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 100 bp DNA Ladder Marker 作参照, 紫外凝胶成像系统观察结果并统计。

2 结果

2.1 标本分布 106 株金黄色葡萄球菌中, 标本主要为脓液、创面分泌物及痰液。其中, 脓液 74 株(69.8%), 分泌物 19 株(18.0%), 痰液 7 株(6.6%), 导管尖端 5 株(4.7%), 静脉血 1 株(0.9%)。

2.2 金黄色葡萄球菌耐药率 106 株金黄色葡萄球菌除对糖肽类抗菌药物替考拉宁和万古霉素均高度敏感, 敏感率为 100.0% 外, 对利奈唑胺和替加环素的敏感率均为 100.0%。对苯唑西林的敏感率为 67.0%。对莫西沙星、复方磺胺甲噁唑、奎奴普汀/达福普利和呋喃妥因的敏感率均达到 80% 以上, 见表 2。

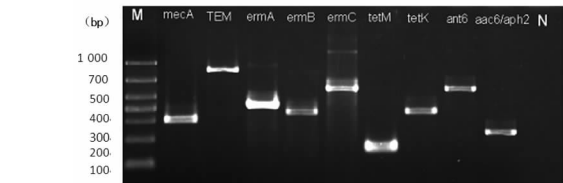
表 2 106 株金黄色葡萄球菌对抗菌药物的敏感率(%)

抗菌药物	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
环丙沙星	63.2	0.0	36.8
替考拉宁	0.0	0.0	100.0
克林霉素	82.1	0.0	17.9
红霉素	81.1	1.9	17.0
呋喃妥因	0.9	0.0	99.1
庆大霉素	67.0	0.9	32.1
左氧氟沙星	34.9	32.1	33.0
利奈唑胺	0.0	0.0	100.0
莫西沙星	3.8	13.2	83.0
苯唑西林	67.0	0.0	33.0
青霉素 G	99.1	0.0	0.9
奎奴普汀/达福普利	1.9	0.0	98.1
利福平	61.3	0.0	387.0
复方磺胺甲噁唑	11.3	0.0	88.7
四环素	59.4	0.0	40.6
替加环素	0.0	0.0	100.0
万古霉素	0.0	0.0	100.0

2.3 耐药基因检测阳性率 通常 mecA 基因阳性可判断为 MRSA, 本组中 65 株金黄色葡萄球菌均为 MRSA。MRSA 和 MSSA 携带的耐药基因存在差异, 在 65 株 MRSA 菌株中检出 59 株携带有氨基糖苷类、大环内酯类和四环素耐药基因, 在 41 株 MSSA 菌株中检出 6 株携带有氨基糖苷类、大环内酯类和四环素耐药基因。106 株金黄色葡萄球菌中, β-内酰胺类抗菌药物耐药基因 mecA、TEM 基因检测阳性率分别

为 61.3%和 30.2%;大环内酯类耐药基因 *ermA*、*ermB*、*ermC* 基因检测阳性率分别为 60.4%、12.3%、56.6%;四环素类耐药基因 *tetM*、*tetK* 和氨基糖苷类耐药基因阳性检测率见表 3。金黄色葡萄球菌耐药基因 PCR 扩增结果见图 1。

表 3 MRSA 和 MSSA 耐药基因阳性率					
靶基因	MRSA		MSSA		总阳性率 (%)
	阳性株数 (n)	阳性率 (%)	阳性株数 (n)	阳性率 (%)	
<i>mecA</i>	65	100.0	0	0.0	61.3
TEM	20	62.5	12	37.5	30.2
<i>ermA</i>	57	89.1	7	10.9	60.4
<i>ermB</i>	10	76.9	3	23.1	12.3
<i>ermC</i>	29	48.3	31	51.7	56.6
<i>tetM</i>	63	77.8	18	22.2	76.4
<i>tetK</i>	9	40.9	13	59.1	20.7
<i>ant6</i>	5	45.5	6	54.5	10.4
<i>aac6'/aph2''</i>	63	88.7	8	11.3	77.0



注:M 为 DNA Marker DL100;N 为阴性对照

图 1 金黄色葡萄球菌耐药基因 PCR 扩增结果电泳图

3 讨 论

金黄色葡萄球菌在自然界中分布广泛,是医院感染及社区感染的常见病原体,可导致多种感染性疾病。烧伤患者由于免疫系统受损,极易受到此菌的感染,皮肤和软组织感染最常见^[4-5]。近年来,随着金黄色葡萄球菌对抗菌药物耐药性的不断增加,尤其是 MRSA 的出现,其已成为威胁生命的病原体。MRSA 对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类及链阳霉素类等多种抗菌药物同时耐药,是医院感染暴发流行的常见病原体,成为临床抗感染治疗的一大难题^[6]。

本研究结果显示,106 株金黄色葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺和替加环素的敏感率均为 100.0%,对其他抗菌药物的耐药率较高,与宗自卫等^[7]的研究结果一致。*mecA* 基因编码一种新的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a),其与 β -内酰胺类抗菌药物亲和力和极低从而产生耐药性,是目前鉴定 MRSA 的金标准。本组共检出 MRSA 65 株,检出率为 61.3%。苯唑西林耐药率为 67.0%,*mecA* 基因阳性率为 61.3%,耐药表型与耐药基因不一致,推测可能存在其他的耐药机制,如其他亚型的青霉素结合蛋白的改变或产 β -内酰胺酶^[8]。TEM 基因为常见的 β -内酰胺

酶基因,在球菌和杆菌中广泛存在,本研究中有 32 株携带 TEM 基因。

106 株金黄色葡萄球菌对庆大霉素耐药率为 67.0%,氨基糖苷类耐药基因 *aac6'/aph2''* 阳性率 77.0%,耐药基因检出率高于耐药表型,可能与某些菌携带该耐药基因但该基因未表达有关。MRSA 和 MSSA 均携带有 2 种氨基糖苷类药物耐药基因(*aac6'/aph2''*、*ant6*),但 MRSA 以 *aac6'/aph2''* 为主, MSSA 以 *ant6* 为主。106 株金黄色葡萄球菌对红霉素的耐药率较高,但红霉素耐药基因检出率较低,推测可能存在其他的耐药机制^[9]。106 株金黄色葡萄球菌对四环素的耐药机制主要有两种:(1)*tetK* 和 *tetL* 基因编码的膜蛋白的主动外排作用;(2)*tetM* 基因编码的细菌核糖体保护蛋白,阻止了四环素类抗菌药物与细菌核糖体的结合。金黄色葡萄球菌四环素耐药与 *tetK* 及 *tetM* 基因密切相关^[10]。本研究中,四环素耐药基因 *tetM* 和 *tetK* 基因的阳性率分别为 76.4%、20.7%,以 *tetM* 基因为主。在 *tetM* 阳性菌株中,同时检测到 10 株携带 *tetK* 基因。*tetM*、*tetk* 在 MRSA 和 MSSA 中均有检出,MRSA 以 *tetM* 为主, MSSA 以 *tetk* 为主。

葡萄球菌对大环内酯类抗菌药物,林可酰胺和链霉素(MLS)耐药的机制主要包括:(1)*msrA* 基因编码主动外排泵,可对大环内酯类抗菌药物和 B 型链霉素耐药;(2)产生酶灭活抗菌药物;(3)抗菌药物作用靶位的改变,即 *erm* 基因编码的 RNA 甲基化酶对细菌核糖体 23S rRNA 基因甲基化,导致对大环内酯类抗菌药物、林可酰胺和链阳菌素 B 耐药^[11]。*erm* 类基因包括 *ermA*、*ermB*、*ermC* 和 *ermF*,葡萄球菌中以 *ermA* 和 *ermC* 基因为主,有研究报道 MRSA 中 *ermA*、*ermC* 基因最常见^[12-13]。本研究中,*erm* 基因以 *ermA* 和 *ermC* 基因为主,阳性检出率分别为 60.4%和 56.6%。MRSA 以 *ermA*、*ermB* 为主, MSSA 以 *ermC* 为主。

综上所述,烧伤科患者感染金黄色葡萄球菌对多数抗菌药物耐药率较高,对万古霉素和替考拉宁高度敏感,耐药基因以 *mecA*、*ermA*、*ermC*、*tetM* 和 *aac6'/aph2''* 为主。MRSA 耐药基因阳性率高于 MSSA, MRSA 的氨基糖苷类药物耐药基因(*aac6'/aph2''*)、大环内酯类药物耐药基因(*ermA*、*ermB*)、四环素类药物耐药基因(*tetM*)均高于 MSSA。对于 MRSA 感染烧伤患者,需将抗菌药物合理使用和外科手术相结合,正确处理烧伤创面,及时治疗 MRSA 感染控制其传播流行。

参考文献

[1] NAMVAR A E, AFSHAR M, ASGHARI B, et al. Characterisation of SCCmec elements in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients [J]. Burns, 2014, 40(4): 708-712.

- [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)