

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.007

烧伤科患者分离金黄色葡萄球菌耐药性和耐药基因分析^{*}

付晓蕊, 康蓓佩, 徐修礼, 马越云, 周 磊[△]

空军军医大学西京医院检验科/全军临床检验医学研究所, 陕西西安 710032

摘要:目的 了解该院烧伤科患者创面分离的金黄色葡萄球菌的耐药性和耐药基因分布, 为金黄色葡萄球菌在烧伤感染方面的研究提供实验室依据。方法 收集 2018 年 9 月至 2019 年 5 月该院烧伤科分离的 135 株金黄色葡萄球菌, 采用 VITEK-2 Compact 系统和纸片扩散法进行菌种鉴定和药敏试验, 同时检测其耐药基因。结果 135 株金黄色葡萄球菌对利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁、奎奴普汀/达福普利和替加环素的敏感率均为 100.0%。对青霉素 G 的耐药率为 97.0%, 对庆大霉素、红霉素、克林霉素和四环素耐药率均超过 60.0%; ermA、ermB、ermC 的阳性率分别是 51.9%、28.1% 和 62.2%; mecA、TEM、ant6、aac6'/aph2' 基因的阳性率为 54.1%、32.6%、17.0% 和 62.2%。结论 烧伤科患者分离的金黄色葡萄球菌对多数抗菌药物都有比较高的耐药性, 对利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁、奎奴普汀/达福普利和替加环素高度敏感, 耐药基因以 mecA、ermA、ermC 和 aac6'/aph2' 为主。

关键词: 烧伤科; 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 耐药基因

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)12-1655-04

Drug resistance and resistance gene analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from patients in the department of burns^{*}

FU Xiaorui, KANG Beipei, XU Xiuli, MA Yueyun, ZHOU Lei[△]

Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital of Air Force Medical University/Institute of Clinical Laboratory Medicine of the PLA, Xi'an Shaanxi, 710032, China

Abstract: Objective To understand the distribution of drug resistance and resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of patients in the department of burns of our hospital, so as to provide laboratory basis for the study of *Staphylococcus aureus* in burn infection. **Methods** Totally 135 strains *Staphylococcus aureus* isolated from patients in the Department of Burns of our hospital from September 2018 to May 2019 were collected. The strain identification and drug susceptibility test were conducted by using the VITEK-2 Compact system and the disk diffusion method. The drug-resistant genes were expressed by PCR amplification, and the drug resistance and drug resistance genes were statistically analyzed. **Results** The sensitivity of 135 strains *Staphylococcus aureus* to linezolid, vancomycin, ticoplanin, quinupristin/dafopril and tegacycline were 100.0%. The drug resistance rate to penicillin G was 97.0%, and the drug resistance rate to gentamicin, clindamycin, erythromycin and tetracycline were more than 60.0%. The positive rates of ermA, ermB and ermC were 51.9%, 28.1% and 62.2%, respectively. The positive rates of mecA, TEM, ant6, aac6'/aph2' genes were 54.1%, 32.6%, 17.0% and 62.2%, respectively. **Conclusion** *Staphylococcus aureus* isolated from patients in the department of burns has a high drug resistance rate to most antimicrobial agents, and it is highly sensitive to linezolid, vancomycin, ticoplanin, quinupristin/dafopril and tegacycline. Drug resistance genes are mainly mecA, ermA, ermC and aac6'/aph2'.

Key words: department of burns; *Staphylococcus aureus*; drug resistance; drug resistance genes

烧伤在人们的生活中时有发生。烧伤创面由于存在大量的坏死与变性组织, 使得皮肤作为人体抵御微生物入侵的天然屏障被破坏, 容易引起细菌定植, 当细菌入侵到皮肤表面的渗出液或者坏死组织并且

达到一定数量时, 就会出现化脓性感染、脓毒症等全身症状^[1]。常见的感染病原体为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、弗氏枸橼酸杆菌及其他肠道阴性杆菌, 尤其是当烧伤患者受到金黄色葡萄球

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81601816)。

作者简介: 付晓蕊, 女, 技师, 主要从事细菌耐药机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: iamwolf-snzq@163.com。

菌感染时,更易引发全身化脓性感染或者毒素性疾病。20 世纪 60 年代欧洲确认了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)后,各种各样的耐药菌株相继出现,且其耐药范围日益扩大,耐药程度日益严重。20 世纪 90 年代后期又出现了耐万古霉素的金黄色葡萄球菌(VRSA)^[2]及万古霉素中介金黄色葡萄球菌(VISA)^[3]。本文着重分析本院烧伤科患者创面分泌物分离的金黄色葡萄球菌的耐药性和耐药基因分布,旨在为临床医生挑选有效抗菌药物、促进患者恢复健康提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 10 月至 2019 年 4 月本院烧伤科分离的 135 株金黄色葡萄球菌,标本均为烧伤创面分泌物,剔除同一患者的重复标本。质控菌株 ATCC25923、ATCC29213、ATCC43300 由国家卫生健康委员会临床检验中心提供,于本室保存。

1.2 方法

1.2.1 菌种鉴定和药敏试验 采用法国生物梅里埃 VITEK-II Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统,药敏试验的解释标准、结果判读参照 2018 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)标准。

1.2.2 细菌基因组 DNA 制备 无菌条件下将收集的金黄色葡萄球菌接种在血琼脂平板上,35℃培养箱中培养 18~24 h,挑取 6~8 个单个菌落置于 0.5 mL 无菌生理盐水中,充分震荡混匀,95℃煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液即为所需粗提细菌基因组 DNA 溶液。

1.2.3 PCR 基因扩增 反应体系共 25 μL,包括 Premix Tap 缓冲液 12.5 μL,上、下游引物各 1 μL,DNA 模板 2 μL,蒸馏水 9.5 μL。反应过程:95℃预变性 5 min,95℃变性 1 min,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共循环 35 次,结束后 72℃延伸 7 min,4℃保存。耐药基因引物序列及扩增片段长度^[1]见表 1。

表 1 PCR 引物序列和产物长度

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
ermA	上游:GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	421
	下游:GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	
ermB	上游:CCGTTTACGAAATTGGAACAGGT	359
	AAAGGGC	
ermC	下游:GAATCGAGACTGAGTGTGC	572
	上游:GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC	
TEM	下游:GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	860
	上游:ATGAGTATTCAACATTTTCGTG	
mecA	下游:TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	310
	上游:TGGCATTCGTGTCACAATCG	

续表 1 PCR 引物序列和产物长度

目的基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
ant6	下游:CTGGAACCTTGTTGAGCAGAG	597
	上游:ACTGGCTTAATCAATTTGGG	
aac6'/aph2'	下游:GCCTTTCCGCCACCTCACCG	220
	上游:CCAAGAGCAATAAGGCATA	
下游:CACTATCATAACCACTACCG		

1.2.4 产物检测 取 5 μL 扩增产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,采用紫外凝胶成像系统观察结果。

1.3 统计学处理 应用 WHONET5.6 统计学软件进行数据分析,统计金黄色葡萄球菌的耐药率、中介率和敏感率。

2 结果

2.1 金黄色葡萄球菌耐药率 分析 135 株烧伤患者分泌物标本金黄色葡萄球菌药敏检测结果,其对多种抗菌药物耐药,只对少数药物敏感。其中对青霉素的耐药率为 97.0%,对利福平耐药率为 72.6%,对庆大霉素、红霉素、克林霉素和四环素耐药率均超过 60.0%;对利奈唑胺、万古霉素、替考拉宁、奎奴普汀/达福普利和替加环素都高度敏感,敏感率均为 100.0%,对复方磺胺甲噁唑和莫西沙星的敏感率分别高达 92.6%和 85.9%,对左氧氟沙星的敏感率为 65.9%,具有较好的抗菌活性。见表 2。

表 2 135 株金黄色葡萄球菌对抗菌药物的耐药率、中介率和敏感率(%)

抗菌药物	耐药率	中介率	敏感率
青霉素 G	97.0	0.0	3.0
苯唑西林	54.1	0.0	45.9
庆大霉素	68.9	0.7	30.4
利福平	72.6	0.0	27.4
莫西沙星	14.1	0.0	85.9
左氧氟沙星	34.1	0.0	65.9
环丙沙星	57.8	5.9	36.3
复方磺胺甲噁唑	7.4	0.0	92.6
克林霉素	60.7	0.0	39.3
红霉素	63.7	0.0	36.3
利奈唑胺	0.0	0.0	100.0
万古霉素	0.0	0.0	100.0
替考拉宁	0.0	0.0	100.0
奎奴普汀/达福普利	0.0	0.0	100.0
替加环素	0.0	0.0	100.0
四环素	67.4	0.0	32.6

2.2 MRSA 和 MSSA 相关抗菌药物的耐药率及耐

药基因检测情况 基因检测 mecA 基因阳性可以判断为 MRSA,本试验检测中有 73 株金黄色葡萄球菌为 MRSA,62 株金黄色葡萄球菌为对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)。在 135 株金黄色葡萄球菌中,耐药基因以 mecA、ermA、ermC 和 aac6'/aph2' 为主。 β -内酰胺类抗菌药物相关耐药基因 mecA、TEM 检测阳性率分别是 54.1%和 32.6%,大环内酯类相关耐药基因 ermA、ermB、ermC 检测阳性率分别为 51.9%、28.1%、62.2%,氨基糖苷类相关耐药基因 ant6、aac6'/aph2' 基因检测阳性率分别为 17.0%、62.2%,见表 3。在 135 株金黄色葡萄球菌中 73 株为 MRSA,62 株为 MSSA。MRSA 和 MSSA 对 β -内酰胺类抗菌药物苯唑西林耐药率分别为 100.0%、0.0%,对大环内酯类抗菌药物代表药物红霉素的耐药率分别为 78.1%、46.8%,对氨基糖苷类抗菌药物代表药物庆大霉素的耐药率分别为 93.2%、40.3%,与相关耐药基因比较基本一致,主要还是以 mecA、ermA、ermC 和 aac6'/aph2' 为主,见表 4。

表 3 MRSA 和 MSSA 的耐药基因阳性率					
目的基因	MRSA		MSSA		总阳性率 (%)
	阳性株数 (n)	阳性率 (%)	阳性株数 (n)	阳性率 (%)	
mecA	73	100.0	0	0.0	54.1
TEM	26	35.6	18	29.0	32.6
ermA	57	78.1	13	21.0	51.9
ermB	29	39.7	9	14.5	28.1
ermC	41	56.2	43	69.4	62.2
ant6	12	16.4	11	17.7	17.0
aac6'/aph2'	65	89.0	19	30.6	62.2

表 4 MRSA 和 MSSA 相关抗菌药物的耐药情况						
抗菌药物	MRSA(n=73)			MSSA(n=62)		
	耐药 (n)	敏感 (n)	耐药率 (%)	耐药 (n)	敏感 (n)	耐药率 (%)
β -内酰胺类(苯唑西林)	73	0	100.0	0	62	0.0
大环内酯类(红霉素)	57	16	78.1	29	33	46.8
氨基糖苷类(庆大霉素)	68	4	93.2	25	37	40.3

3 讨 论

烧伤患者创面存在大量的坏死与变性组织,创面周围常有红肿、出血点或坏死斑,当机体全身营养支持疗法不当、蛋白质摄入不足致使机体长期消耗容易引起细菌感染。近些年抗菌药物的大量使用使得金黄色葡萄球菌对抗菌药物耐药率持续增加,烧伤创面感染越难以恢复^[4],甚至于在 MRSA 出现以后,已经严重威胁到患者生命。MRSA 同时对多种抗菌药

物耐药,有氨基糖苷类、 β -内酰胺类、利福霉素类、喹诺酮类、大环内酯类、林可胺类等,这也是临床抗感染治疗的一大难题^[5-6]。

本研究药敏结果显示,135 株金黄色葡萄球菌对多数抗菌药物耐药率较高,只对少数药物敏感,对青霉素的耐药率为 97.0%,几乎完全耐药。对替考拉宁、利奈唑胺、奎普奴丁/达福普利、替加环素和万古霉素高度敏感,敏感率均为 100.0%。试验结果表明,糖肽类抗菌药物对金黄色葡萄球菌感染效果最好,这也就出现了近些年临床上金黄色葡萄球菌感染常规使用万古霉素,有文献报道已经出现了 MRSA 及 VISA^[2-3]。

金黄色葡萄球菌 mecA 基因编码一种特殊的青霉素结合蛋白 PBP2a(或 PBP2'),此蛋白极大地降低了与 β -内酰胺类抗菌药物的亲和力从而产生耐药性,CLSI 指出在金黄色葡萄球菌菌体中检测到 mecA 基因或者 PBP2 α 蛋白即可判定为 MRSA^[7]。本研究中有 73 株菌株判定为 MRSA,检出阳性率为 54.1%,与近年 CHINET 细菌耐药监测网报道 MRSA 平均检出率相当^[8]。mecA 基因阳性率为 54.1%,苯唑西林耐药率为 54.8%,耐药表型与耐药基因略有差异,推断是可能存在其他耐药机制,比如可能是获得性 PBP2 α 以外的其他 PBPs 的修饰,由质粒介导后产生水解青霉素类药物的 β -内酰胺酶^[9],或者苯唑西林临界耐药金黄色葡萄球菌(BORSA)高产 β -内酰胺酶等。TEM 基因是另外一个 β -内酰胺酶基因,总阳性率为 32.6%。

有研究报道,MSSA 相对 MRSA 毒力基因携带率更高,提示关注 MRSA 的同时,不能轻视 MSSA 感染^[10]。本研究中 MRSA 和 MSSA 氨基糖苷类相关耐药基因主要为 ant6 和 aac6'/aph2',文献报道的 MRSA 主要携带 aac6'/aph2' 基因^[10],MSSA 主要携带 ant6 基因^[11]。MRSA 菌株庆大霉素耐药率为 93.2%,aac6'/aph2' 基因的阳性率为 62.2%,耐药基因阳性率低于耐药表型,不排除可能存在其他耐药相关基因或者其他耐药机制,比如 aph(3)-III 基因、ant4' 基因等^[12]。一般认为,90%以上对氨基糖苷类耐药的葡萄球菌至少包含一个编码氨基糖苷类抗菌药物修饰酶的基因^[13]。MSSA 庆大霉素耐药率(40.3%)高于 ant6 基因的阳性率(17.0%),同样也不排除可能存在其他耐药相关基因或者其他耐药机制。

近年来,大量大环内酯类药物在临床中应用,导致红霉素的耐药性也在逐年提升。erm 家族耐药基因主要有 ermA、ermB、ermC 和 ermF,其编码的 RNA 甲基化酶对 23S rRNA 特定核苷酸残基甲基化,erm 基因上游的启动子发生突变而使 erm 基因持续、稳定地表达导致大环内酯类药物耐药。文献显

示,葡萄球菌主要以 *ermA* 和 *ermC* 基因为主^[14]。在本研究中,*ermA*、*ermB* 和 *ermC* 基因阳性检出率分别为 61.9%、28.1% 和 62.2%。MRSA 耐药基因以 *ermA* 和 *ermC* 基因为主,与 JONES 等^[15]的报道一致,该结果较红霉素耐药率(78.1%)低,也就是说部分菌株同时存在 2 种或者 2 种以上耐药基因,或者还有其他耐药相关基因,比如文献报道的 *msrA* 基因^[16]和 *mphC* 基因^[17]等;MSSA 以 *ermC* 为主,耐药基因阳性率高于红霉素耐药率,也就是说 *ermC* 基因可能不止与红霉素耐药相关,可能同时在其他非红霉素的大环内酯类药物导致的耐药中也存在。

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,耐药基因以 *mecA*、*ermA*、*ermC* 和 *aac6'/aph2'* 为主,MRSA 耐药基因阳性率一般高于 MSSA,MRSA 防控形势不容乐观。对于感染金黄色葡萄球菌的烧伤患者,临床医生应及时处理烧伤创面,并结合降钙素原(PCT)和白细胞介素 6(IL-6)水平监测患者预后,一般 PCT 和 IL-6 同时升高是预后不良的危险因子^[18],及时挑选合理、有效的抗菌药物并控制药量,减少抗菌药物的滥用,治疗 MRSA 感染并且预防高耐药、高毒力的 MRSA 交叉传播,尽早休克平稳或其他并发症基本控制后行植皮术,有效减少烧伤患者感染和创面愈合不良。从医院内感染的角度,烧伤患者分离的金黄色葡萄球菌中 *mecA* 基因检出率较高,提示其对季胺类消毒剂消毒皮肤效果可能欠佳^[11],医院感染控制部门应加强细菌的耐药性监测,有效控制多重耐药菌的感染^[19]。

参考文献

- [1] 殷国民,杨丹,顾常梅,等.烧伤科患者分离金黄色葡萄球菌耐药性和耐药基因研究[J]. 检验医学与临床,2018,15(18):2697-2700.
- [2] 李家泰,齐慧敏,李耘,等.2002—2003 年中国医院和社区获得性感染革兰阳性细菌耐药监测研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(3):34-45.
- [3] BONECA I G, XU N, GAGE D A, et al. Structural characterization of an abnormally cross-linked mucopeptide dimer that is accumulated in the peptidoglycan of methicillin and cefotaxime-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*[J]. J Biol Chem, 1997, 272(46):29053-29059.
- [4] 黄德斌,胡泽华,余昭芬,等.马桑水提取物对烧伤创面感染常见 3 种耐药菌的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(10):1388-1394.
- [5] 刘玉强,王黎,李晓玲,等.烧伤病房金黄色葡萄球菌分离株的分子分型及其耐药性[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(37):5567-5572.
- [6] 陈志威.2017 年第四季度我院住院病人常见细菌分布及耐药情况分析[J]. 海峡药学, 2019, 31(1):255-257.
- [7] 冯建科,李新江,甄晓红,等.烧伤患者创面感染金黄色葡萄球菌分离株耐药性及流行病学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(4):376-380.
- [8] 胡付品.“CHINET 在线”网站正式上线[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(2):197.
- [9] 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.
- [10] RAHIMI F. Characterization of resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran[J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9(1):e29237.
- [11] 杨雅芸,许小敏,范友芬,等.烧伤患者分离金黄色葡萄球菌耐药性与耐药基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(3):516-518.
- [12] 张利,孙林春.南京某医院成人耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检出情况及耐药基因分析[J]. 检验医学, 2019, 34(3):215-220.
- [13] SHOKRAVI Z, MEHRAD L, RAMAZANI A. Detecting the frequency of aminoglycoside modifying enzyme encoding genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Bioimpacts, 2015, 5(2):87-91.
- [14] GHANBARI F, GHAJAVAND H, HAVAEI R, et al. Distribution of *Erm* genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran[J]. Adv Biomed Res, 2016, 5:62.
- [15] JONES R N, SADER H S, MOET G J, 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.
- [16] 黄烈,夏成静,张银辉,等.金黄色葡萄球菌常见大环内酯类耐药基因快速检测和分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11):1299-1301.
- [17] 谈华,徐嘉昌,刘雪梅,等.婴幼儿感染金黄色葡萄球菌耐药性与耐药基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(24):5981-5983.
- [18] 陈熔,王旭,钟册俊,等.金黄色葡萄球菌血流感染 112 例临床特征及预后分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2019, 19(3):233-236.
- [19] 汪加朋,徐化强,汪文国.肺部感染患者多重耐药菌的耐药性分析[J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(3):44-46.

(收稿日期:2019-09-26 修回日期:2020-03-17)