

• 论 著 •

# 表皮葡萄球菌 *icaADBC* 操纵子检出与细菌耐氨基糖苷类抗菌药物的关系

包裕杰, 张雯雁, 叶杨芹, 奚 婷, 陈芳莹, 范列英

(同济大学附属上海市东方医院检验科 200120)

**摘 要:**目的 分析临床分离表皮葡萄球菌对不同种类氨基糖苷类抗菌药物的耐药特征;分析 *icaADBC* 操纵子在临床分离的表皮葡萄球菌中的检出及与细菌耐药的关系。方法 收集 2013 年 1~10 月上海市东方医院临床分离的表皮葡萄球菌 77 株,采用纸片扩散法检测细菌 4 种氨基糖苷类抗菌药物(庆大霉素、链霉素、奈替米星和阿米卡星)药敏试验特征;构建 *icaADBC* 特异性引物,采用聚合酶链反应扩增技术检测 77 株细菌中 *icaADBC* 的分布状况。结果 结果 77 株表皮葡萄球菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药率较高,分别为庆大霉素:62.3%,链霉素:61.0%,阿米卡星:22.1%,奈替米星:23.4%。*icaADBC* 操纵子的检出率为 20.8%,*ica* 阳性菌株与阴性菌株对氨基糖苷类抗菌药物耐药性比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 临床分离的 *icaADBC* 操纵子阳性表皮葡萄球菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药率较高。

**关键词:** *icaADBC*; 表皮葡萄球菌; 氨基糖苷类抗菌药物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)11-1479-03

## Relationship between *icaADBC* in *Staphylococcus epidermidis* and the resistance to aminoglycosides

BAO Yujie, ZHANG Wenyan, YE Yangqin, XI Ting, CHEN Fangying, FAN Lieying

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai East Hospital Affiliated of Tongji University, Shanghai 200120, China)

**Abstract:** Objective To analyze the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to different kinds of aminoglycoside and to explore the relationship between *icaADBC* in *Staphylococcus epidermidis* and the resistance to aminoglycosides. Methods Antimicrobial susceptibility to different aminoglycosides including gentamicin, streptomycin, netilmicin and amikacin were tested in 77 isolated strains by the agar diffusion method. The *icaADBC* specific primers were constructed. And the *icaADBC* of 77 strains were detected by PCR amplification technology. Results The resistance to aminoglycosides were as following: 23.4%, 61.0%, 22.1% and 62.3% of the 77 strains were resistant to netilmicin, streptomycin, amikacin and gentamicin, respectively. Among the 77 stains, the positive rate of *icaADBC* was 20.8%. The differences of resistance to aminoglycosides between *ica* positive strains and *ica* negative strains had statistic significance ( $P<0.05$ ). Conclusion Clinical *Staphylococcus epidermidis* isolated with *icaADBC* show high percentage of resistance to aminoglycosides.

**Key words:** *icaADBC*; *Staphylococcus epidermidis*; aminoglycosides

表皮葡萄球菌是一种革兰染色阳性、凝固酶阴性的葡萄球菌,一般黏附于人体的皮肤和黏膜,是重要的条件致病菌。随着插管、透析技术、人工心瓣膜、人工关节和人工晶体等医疗材料的广泛应用,人口老年化及免疫低下人群的出现等,表皮葡萄球菌的感染日趋严重。已证实 *icaADBC* 操纵子编码产物是表皮葡萄球菌生物膜的主要成分<sup>[1]</sup>。本研究分析 *icaADBC* 操纵子在临床分离表皮葡萄球菌中的检出率,以及细菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药情况,进而明确分析 *icaADBC* 与细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药的关系,现报道如下。

### 1 材料与与方法

**1.1 菌株来源** 标准菌株:金黄色葡萄球菌(ATCC 25923),由上海市临床检验中心提供,作为本研究的药敏试验质控菌株及阴性对照菌株;临床分离菌株为 2013 年 1~10 月上海市东方医院临床分离表皮葡萄球菌 77 株。

**1.2 抗菌药物和培养基** 抗菌药物:庆大霉素(10  $\mu\text{g/mL}$ ),奈替米星(30  $\mu\text{g/mL}$ ),链霉素(10  $\mu\text{g/mL}$ ),阿米卡星(30  $\mu\text{g/mL}$ ),药敏试验用培养基(MH 琼脂)为英国 Oxoid 公司产品,血琼脂平板为北京赛墨飞世尔有限公司产品。

**1.3 仪器与试剂** Micro-Scan Walkaway-96 全自动微生物鉴定系统;ABI-7000 荧光定量聚合酶链反应(PCR)分析仪,

Tanon-2500 凝胶成像系统。PCR 所需试剂购自上海闪晶生物科技有限公司。

### 1.4 方法

**1.4.1 药敏试验** 采用纸片扩散法(K-B 法)对所有表皮葡萄球菌临床分离菌株及质控菌株做氨基糖苷类抗菌药物药敏试验,包括庆大霉素、奈替米星、链霉素和阿米卡星。结果按照 CLSI2015 版判断标准执行<sup>[2]</sup>。

**1.4.2 模板 DNA 制备** 将各临床分离菌株及质控菌株接种于血琼脂平板,置 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,取适量菌落加入 300  $\mu\text{L}$  生理盐水,混匀,10 000 r/min 离心 5 min;弃上清,加入 300  $\mu\text{L}$  双蒸水,混匀,煮沸 100  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min;12 000 r/min 离心 2 min;取上清液为 DNA 模板。

**1.4.3 构建引物** *icaADBC* 特异性引物:*icaA* 上游引物为 5'-GAT GGG CTC AAG GCG GGC AT-3';*icaA* 下游引物为 5'-TGC CTC TGT CTG GGC TTG ACC-3'。*icaC* 上游引物为 5'-ACG CAA TAT TTT TAT TTT CGG CAC CCC-3';*icaC* 下游引物为 5'-ACT CTC TTA ACA TCA TTC CGA CGC CT-3'。

**1.4.4 PCR 扩增** 50  $\mu\text{L}$  PCR 扩增体系:  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol), dNTP(10 mmol), Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ), 10 $\times$  PCR Buffer

(25 mmol),上游引物(50 pmol),下游引物(50 pmol),DNA 模板 5  $\mu$ L。PCR 反应扩增条件:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。

**1.4.5 PCR 扩增产物分析** 1.2%琼脂糖凝胶于 1 $\times$ 硼酸缓冲液,用 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙锭染色,150 V 电压下电泳约 30 min,将 PCR 扩增所得特异性片段克隆测序,并在 Mega-Blast 上进行基因序列比对。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计数资料以  $n(\%)$  表示,采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 4 种氨基糖苷类抗菌药物耐药结果** 见表 1。

表 1 77 株表皮葡萄球菌对氨基糖苷类抗菌药物的耐药结果[ $n(\%)$ ]

| 抗菌药物 | 耐药       | 敏感       | 中介       |
|------|----------|----------|----------|
| 庆大霉素 | 48(62.3) | 28(36.4) | 1(1.3)   |
| 阿米卡星 | 17(22.1) | 51(66.2) | 9(11.7)  |
| 链霉素  | 47(61.0) | 15(19.5) | 15(19.5) |
| 奈替米星 | 18(23.4) | 51(66.2) | 8(10.4)  |

## 2.2 PCR 扩增结果

**2.2.1 icaA PCR 扩增结果** 77 株表皮葡萄球菌临床分离菌株中有 16 株检出 icaA,检出率为 20.8%,特异性片段长度在 300~400 bp(图 1),将 PCR 扩增得到特异性片段克隆测序,片段长度为 386 bp。

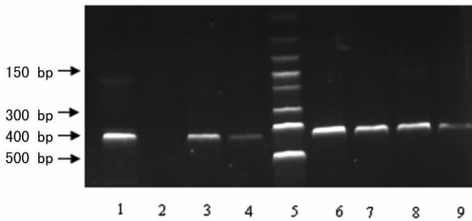
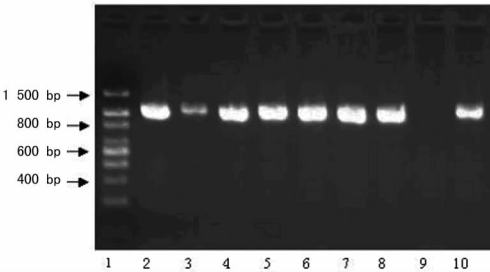


图 1 icaA PCR 扩增结果

注:条带 1、3、4、6~9 为凝固酶阴性葡萄球菌临床分离菌株,条带 5 为 DL500 ladder,条带 2 为 ATCC 25923。

**2.2.2 icaC PCR 扩增结果** 选取之前检测到 icaA 位点的 16 株表皮葡萄球菌,对其进行 icaC 位点检测。其中有 8 株检测到 icaC 位点,检出率为 50.0%,特异性片段长度在 800~1 000 bp(图 2)。将 PCR 扩增得到特异性片段克隆测序,片段长度为 807 bp。



注:条带 1 为 100 bp ladder,条带 2~8、10 为表皮葡萄球菌临床分离菌株,条带 9 为金黄色葡萄球菌质控菌株(阴性对照)。

图 2 icaC PCR 扩增结果

## 2.3 氨基糖苷类抗菌药物药敏试验结果与 ica 检出结果分析

77 株表皮葡萄球菌临床分离株中 ica 阳性菌有 16 株,占 20.8%;ica 阴性菌有 61 株,占 79.2%。16 株阳性菌对庆大霉素耐药的有 15 株,占 93.8%,还有 1 株敏感,占 6.2%;对阿米卡星耐药的有 10 株,占 62.5%,中介有 2 株,占 12.5%,敏感有 4 株,占 25.0%;对链霉素耐药的有 15 株,占 93.8%,还有 1 株中介,占 6.2%;对奈替米星耐药的有 10 株,占 62.5%,中介有 2 株,占 12.5%,敏感有 4 株,占 25.0%(表 2)。

表 2 16 株 ica 阳性菌株细菌耐药性结果[ $n(\%)$ ]

| 抗菌药物 | 耐药       | 敏感      | 中介      |
|------|----------|---------|---------|
| 庆大霉素 | 15(93.8) | 1(6.2)  | 0(0.0)  |
| 阿米卡星 | 10(62.5) | 4(25.0) | 2(12.5) |
| 链霉素  | 15(93.8) | 0(0.0)  | 1(6.2)  |
| 奈替米星 | 10(62.5) | 4(25.0) | 2(12.5) |

## 2.4 icaADBC 检出结果与细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药性关系

见表 3。

表 3 表皮葡萄球菌 ica 检出与细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药相关性

| 抗菌药物 | ica 阳性 | ica 阴性 | $P$   | $\chi^2$ |
|------|--------|--------|-------|----------|
| 庆大霉素 |        |        |       |          |
| R    | 15     | 35     | 0.016 | 5.845    |
| NR   | 1      | 26     |       |          |
| 阿米卡星 |        |        |       |          |
| R    | 10     | 7      | 0.000 | 16.331   |
| NR   | 6      | 54     |       |          |
| 链霉素  |        |        |       |          |
| R    | 15     | 32     | 0.040 | 4.208    |
| NR   | 1      | 19     |       |          |
| 奈替米星 |        |        |       |          |
| R    | 10     | 8      | 0.000 | 14.612   |
| NR   | 6      | 53     |       |          |

注:R 表示细菌对抗菌药物耐药;NR 表示细菌对抗菌药物非耐药(敏感或中介)。

## 3 讨 论

表皮葡萄球菌是一种常见的条件感染病原菌<sup>[3]</sup>。由于表皮葡萄球菌分泌的毒性因子较金黄色葡萄球菌少,导致其致病的主要因素是伴随“异物”(高分子材料如塑料等)进入人体,并通过黏附形成生物膜<sup>[4-5]</sup>。它不仅使宿主体内的免疫反应呈抑制状态,促使表皮葡萄球菌增殖,而且其黏液阻碍了亲水性的抗菌药物进入菌体发挥杀菌作用,引起表皮葡萄球菌对抗菌药物的多重耐药<sup>[6]</sup>。

氨基糖苷类抗菌药物是一类重要的抗感染药物,具有水溶性好、化学性质稳定、抗菌谱广、抗菌能力强和吸收排泄良好等特点。因其具有浓度依赖性快速杀菌作用、与  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物产生协同作用、细菌耐药性低、临床有效和价廉等优点,是目前临床常用药物<sup>[7-8]</sup>。

本研究以庆大霉素、阿米卡星、链霉素和奈替米星作为代表药物检测表皮葡萄球菌的耐药特征,结果显示,对庆大霉素

耐药率为 62.3%,对阿米卡星耐药率为 22.1%,对链霉素耐药率为 61.0%,对奈替米星耐药率为 23.4%。由此说明试验菌株对氨基糖苷类抗菌药物有不同程度耐药,其中对半人工合成的阿米卡星及奈替米星耐药率较直接由微生物产生的链霉素和庆大霉素低。

icaA 编码是 412 个氨基酸组成的跨膜蛋白, *Staphylococcus carnosus* 体外多糖胞间黏附素 (PIA) 合成试验表明, icaA 单独呈现低的 N-乙酰葡萄糖胺转移酶活性, icaC 编码是 355 个氨基酸组成的疏水蛋白, icaC 与外排作用有关, 可有效抵挡抗菌药物侵入<sup>[9-10]</sup>。

本研究先检测了 icaA 位点及其与表皮葡萄球菌临床分离菌株对庆大霉素、阿米卡星、链霉素和奈替米星这 4 种氨基糖苷类抗菌药物耐药的关系。结果 77 株表皮葡萄球菌临床分离菌株中 icaA 阳性菌有 16 株, 占 20.8%, 这 16 株阳性菌对庆大霉素和链霉素均耐药有 15 株, 占 93.8%; 对阿米卡星和奈替米星均耐药有 10 株, 占 62.5%。经统计学分析发现, 细菌检出 ica 与细菌耐氨基糖苷类抗菌药物差异有统计学意义。

已证实细菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药的主要原因是细菌产生氨基糖苷类钝化酶 AAC(6')-APH(2''), 编码此酶的耐药基因可由复合型转座子 Tn4001 转入并整合到染色体中。插入序列 IS256 是复合转座子 Tn4001 的组成部分, IS256 可参与 icaADBC 的表达调控。葡萄球菌生物膜的形成主要是由操纵子 icaADBC 的表达所主导, 它能编码产生多糖细胞间外源凝集素的酶 PIA, 经过相变异产生 PIA, 这个过程受 IS256 在操纵子 ica 插入热点上交替的插入和切除影响<sup>[11]</sup>。通过上述关联可以在一定程度解释为何产生生物膜的表皮葡萄球菌对氨基糖苷类抗菌药物耐药<sup>[12]</sup>。

综上所述, 表皮葡萄球菌临床分离菌株对氨基糖苷类抗菌药物耐药率较高, 对半合成类抗菌药物耐药率相对较低, 因此临床用药应优先考虑此类药物。含有 icaADBC 的细菌往往对氨基糖苷类抗菌药物表现出更高的耐药性, 或与细菌生物膜形成有关, 应增加细菌对抗菌药物的抵抗力, 值得临床进一步研究。

## 参考文献

- [1] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 17(1): 5-14.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA, 2008.

- [3] Solati SM, Tajbakhsh E, Khamesipour F, et al. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran[J]. *AMB Express*, 2015, 5(1): 134-137.
- [4] Yu D, Zhao L, Xue T, et al. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an icaR-dependent manner[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 5(12): 288-291.
- [5] Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices[J]. *J Clin Microbiol*, 1985, 22(6): 996-1006.
- [6] Luther MK, Bilida S, Mermel LA, et al. Ethanol and isopropyl alcohol exposure increases biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Infect Dis Ther*, 2015, 4(2): 219-226.
- [7] Wojtyczka RD, Orlewska K, Kepa M, et al. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(5): 4619-4633.
- [8] Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 10(2): 5-7.
- [9] Salaberry SR, Saidenberg AB, Zuniga E, et al. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis[J]. *Microb Pathog*, 2015, 85(8): 35-39.
- [10] Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2(38): 1-13.
- [11] 邢铭友, 刘莉娜, 宋世会, 等. 表皮葡萄球菌 ica 操纵子与细胞间多糖黏附素及生物膜表型的相关性[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2008, 37(4): 449-452.
- [12] Ziebuhr W, Dietrich K, Trautmann M, et al. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis[J]. *Int J Med Microbiol*, 2000, 290(1): 115-120.

(收稿日期: 2015-12-21 修回日期: 2016-03-13)

(上接第 1478 页)

- [7] 刘慧英. 围生期孕妇常规凝血功能检测指标参考区间[J]. *河北医科大学学报*, 2012, 33(7): 793-795.
- [8] 毕燕. 临产孕妇凝血四项指标的临床检测分析[J]. *当代医学*, 2014, 20(30): 12-13.
- [9] 杨桂琼, 赖必发, 刘春林, 等. 血浆 D-二聚体在临产孕妇分娩前后及分娩方式中的应用研究[J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(16): 1988-1989.
- [10] 薛冰, 许爱霞, 吉丽. 凝血四项和 D-二聚体在妊娠期的变化及临床意义[J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(3): 277-

278.

- [11] 王莉, 李耀军. 临产孕妇凝血功能检测的临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(14): 1581-1583.
- [12] 林文源. 230 例临产孕妇凝血指标检测结果分析[J]. *中国医药导刊*, 2012, 14(2): 290-292.
- [13] 李雪宏, 张淑贞, 黄海燕, 等. 临产孕妇凝血及血细胞常规分析结果的意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(8): 695-696.

(收稿日期: 2015-12-28 修回日期: 2016-03-15)