

• 论 著 •

血流感染金黄色葡萄球菌克林霉素耐药与分子流行病学研究*

周 珊¹, 张 蓓², 徐修礼^{1△}, 冯琳涵¹, 刘家云¹, 马越云¹, 郝晓柯¹

(1. 第四军医大学西京医院全军临床检验医学研究所, 陕西西安 710032;

2. 西安交通大学附属西安市红十字会医院检验科, 陕西西安 710054)

摘要:目的 了解 2014 年全院血流感染金黄色葡萄球菌红霉素对克林霉素诱导耐药基因情况及分子流行病学分析。方法 收集 2014 年全年临床血液标本分离的金黄色葡萄球菌。以双纸片法筛选红霉素对克林霉素诱导耐药的表型。erm 基因检测采用 PCR 方法, 并用 spa 及多位点序列分型 (MLST) 方法了解不同 erm 型分子流行情况。结果 33 株金黄色葡萄球菌中 MRSA 分离率 78.79%。且 MRSA 均携带有 ermA 基因。在 7 株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA) 中, 4 株分别携带 ermB 或 ermC 基因。spa 及 MLST 结果显示, 该院血流感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 以 ST239-t030 型别为主; 而 MSSA 存在较多型别, 如 ST59-t437、ST398-t3625 等。结论 MRSA 有较高分离率, 主要以 ST239-t030 克隆株为主。erm 基因主要以 ermA 检出为主 (86.67%)。菌株对抗菌药物耐药明显, 实验室应加强对克林霉素诱导耐药的检测, 以指导临床合理使用抗菌药物。

关键词:血流感染; 金黄色葡萄球菌; erm 基因; 流行病学; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)24-3517-03

Study on clindamycin resistance and molecular epidemiology of bloodstream infection by *Staphylococcus aureus**Zhou Shan¹, Zhang Bei², Xu Xiuli^{1△}, Feng Linhan¹, Liu Jiayun¹, Ma Yueyun¹, Hao Xiaoke¹

(1. PLA Research Institute of Clinical Laboratory Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical

University, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated

Xi'an Red Cross Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

Abstract: Objective To understand the clindamycin resistance gene and molecular epidemic of *Staphylococcus aureus* in the patients with bloodstream infection in our hospital during 2014. **Methods** The clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in clinical bloodstream infection were collected during 2014. The phenotype of erythromycin to clindamycin induced resistance was assessed by D test. The erm gene was detected by PCR. The different erm types of the molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* were studied by spa and MLST typing. **Results** In 33 strains of *Staphylococcus aureus*, the isolation rate of MRSA strains were 78.79%, moreover all of MRSA strains carried ermA gene. In 7 strains of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), 4 strains respectively carried ermB or ermC gene. The results of MLST and spa results showed that the main type of MRSA in our hospital was ST239-t030. But MSSA had more types, such as ST59-t437, ST398-t3625 and so on. **Conclusion** MRSA has higher isolation rate in our hospital, which is dominated by ST239-t030 type. For the detection of gene erm, ermA (86.67%) is the main type. The strains are obviously resistant to antibacterial drugs. The laboratory should strengthen the detection of clindamycin induced resistance for guiding the clinical rational use of antibacterial drugs.

Key words: bloodstream infection; *Staphylococcus aureus*; erm gene; epidemiology; drug resistance

金黄色葡萄球菌是引起医院和社区化脓性感染的主要病原菌。特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 引起的感染, 已经成为引起医院内感染首要的病原菌^[1], 尤其是 MRSA 引起的血流感染。由于 MRSA 往往呈现多重耐药、治疗困难、病死率高等特点, 更是受到临床及科研的广泛关注。在临床抗感染治疗中, 克林霉素由于其较强组织渗透性及低廉价格等优点, 使其成为治疗金黄色葡萄球菌感染中对青霉素过敏患者的首选药物^[2]。因此, 了解黄色葡萄球菌对克林霉素耐药机制, 正确检测及解读克林霉素体外药敏试验至关重要。

本研究对 2014 年临床分离的血流感染患者 33 株金黄色葡萄球菌进行鉴定及药敏试验, 用头孢西丁纸片扩散法判读 MRSA, 以双纸片法 (D 实验) 筛选红霉素对克林霉素诱导耐药表型, PCR 方法检测克林霉素诱导耐药 erm 基因, 并联合 spa

及多位点序列分型 (MLST) 方法以了解不同 erm 型分子流行情况。为临床合理使用抗菌药物及院内控制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2014 年全年血培养标本分离的金黄色葡萄球菌 33 株; 质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.2 仪器与试剂 培养基及药敏纸片购于英国 OXOID 公司, PCR 反应试剂和溶葡萄球菌酶购于上海生工生物公司, DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 全自动细菌药敏鉴定分析仪 phoenix-100、基因扩增仪、电泳仪等购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验方法 采用 K-B 纸片法和 phoenix-100 全自动细菌鉴定分析仪, 按 CLSI2014 规定的标准进行^[3]。

* 基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2014JM4188)。 作者简介: 周珊, 女, 主管检验技师, 主要从事微生物诊断及耐药机制研究。

△ 通讯作者, Email: xxlxxl@fmmu.edu.cn。

1.3.2 耐甲氧西林葡萄球菌确定 以头孢西丁纸片法及 phoenix-100 全自动细菌鉴定分析仪联合检测,参照 CLSI2014 规定的判定标准进行^[3]。

1.3.3 红霉素对克林霉素诱导耐药表型确定 根据 CLSI2014 推荐标准,在距离红霉素纸片(15 μg/片)20 mm 处贴含有克林霉素的纸片(2 μg/片),35 °C 孵育 16~18 h,克林霉素抑菌环在近红霉素一侧缩小或出现截平现象,即呈“D”形,则说明存在诱导性克林霉素耐药,D 试验阳性。

1.3.4 金黄色葡萄球菌全基因组 DNA 提取 依据德国 Qia-gen 公司的基因提取试剂盒进行细菌全基因组提取,最后用 100 μL Elution Buffer 将 DNA 洗脱。用 eppendorf 的 Biophotometer plus 测定基因组 DNA 纯度及浓度后放 -80 °C 冰箱备用。

1.3.5 erm 基因检测 根据金黄色葡萄球菌 erm 基因序列分别设计 ermA、ermB 及 ermC 引物,并由上海生工公司合成。以提取的金黄色葡萄球菌基因组为模板在退火温度 55 °C 下进行 PCR,产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

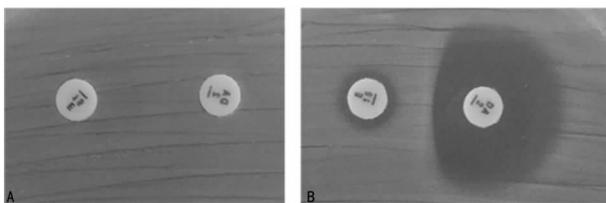
1.3.6 spa 分型 基于金黄色葡萄球菌 A 蛋白基因 X 区呈现多态性,建立 spa 分型方法^[4]。在退火温度为 60 °C 的条件下进行 PCR 操作。产物送上海生物工程公司测序,测序后结果在该网站进行比对分析。

1.3.7 MLST 分型 依据金黄色葡萄球菌 7 个管家基因(arcC、aroE、glpF、gmk、pta、tpi、yqiI)不同,对细菌进行分型。PCR 反应引物及反应体系参考文献^[5]。PCR 产物测序后,进行比对确定 ST 型别。

1.4 统计学处理 耐药数据采用 WHONET5.6 软件进行数据分析。

2 结 果

2.1 药敏及表型确认试验 33 株金黄色葡萄球菌,头孢西丁耐药菌株 26 株,故 MRSA 为 26 株,占 78.79%。33 株细菌中有 3 株为红霉素和克林霉素全敏感菌株,其他 30 株金黄色葡萄球菌均对红霉素和克林霉素同时耐药。对克林霉素耐药形式存在诱导型耐药(即 D 实验阳性)和结构型耐药(见图 1),诱导耐药为 13 株,占克林霉素耐药菌的 43.33%,结构耐药 17 株,占 56.67%。

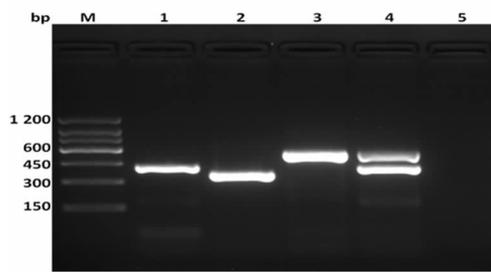


A: 结构型耐药; B: 诱导型耐药。

图 1 金黄色葡萄球菌对克林霉素耐药表型

2.2 erm 基因检测结果 33 株金黄色葡萄球菌中,30 株细菌均携带有 erm 基因,携带率为 90.91%(30/33)。携带 ermA 基因的为 26 株,占检出 erm 基因的 86.67%(26/30),仅 3 株菌

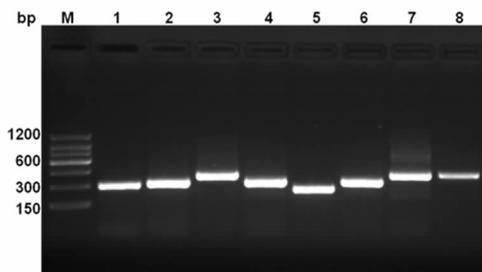
携带 ermB 基因,占 10%(3/30),7 株菌携带 ermC 基因,占 23.33%(7/30)。同时携带 ermA 和 ermC 基因有 6 株细菌,占 20%(6/30),仅有 1 株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)只携带 ermC 基因。菌株 erm 基因分型结果见图 1。



M: DNA 标志物; 1: ermA (共 20 株); 2: ermB (共 3 株); 3: ermC (共 1 株); 4: ermA+ermC (共 6 株); 5: 未检出 erm 基因 (共 3 株)。

图 2 33 株菌 erm 基因分型结果

2.3 菌株 spa 及 MLST 分型结果 spa 分型结果显示,33 株金黄色葡萄球菌共存在 8 个 spa 型别,spa 分型 PCR 产物见图 2,相对分子质量在 300 bp 左右。其中 t030 为 24 株占 72.73%,为主要型别。其他型别还有 t437(2 株占 6.06%)、t037(2 株占 6.06%)、t002、t3625、t2092、t091、t1793 各 1 株。对 7 个管家基因(gmk、glpF、aroE、tpi、yqiI、arcC、pta)进行 PCR,产物测序比对后显示,共存在 6 个 ST 型别:ST239(26 株占 78.79%);ST59、ST398 均为 2 株(占 6.06%);ST121、ST7、ST5 均为 1 株。并且所有的 MRSA 均为 MST-ST239 型别。



M: DNA 标志物; 1: spa-t030; 2: spa-t2092; 3: spa-t1793; 4: spa-t037; 5: spa-t3625; 6: spa-t437; 7: spa-t091; 8: spa-t002。

图 3 不同 spa 型别 PCR 反应产物

2.4 erm 基因在不同型别菌株中分布 菌株分子型别与 erm 基因携带及耐药数据分析见表 1。从数据中可以看出,在 33 株血流感染金黄色葡萄球菌中,MRSA 菌株 26 株,同时所有 MRSA 菌株均为 ST239 型别。依据 spa 和 MLST 联合分型来看,MRSA 菌株除 2 株细菌为 ST239-t037,其他 24 株菌均为 ST239-t030。ermA 基因只在 MRSA 菌株中检出。且红霉素诱导克林霉素耐药表型共 13 株,均携带 ermA 基因。结构性耐药表型携带 erm 基因种类较多。其中有 6 株结构性耐药菌同时携带 ermA 和 ermC 基因。

表 1 erm 基因在不同型别菌株中的分布情况

型别	菌株数	红霉素	克林霉素	耐药表型	erm 基因型别
MRSA	ST239-t030	13	R	D 试验阳性	诱导型耐药 ermA
	ST239-t030	7	R	R	结构型耐药 ermA

续表 1 erm 基因在不同型别菌株中的分布情况

型别	菌株数	红霉素	克林霉素	耐药表型	erm 基因型别	
MSSA	ST239-t030	4	R	R	结构型耐药	ermA+ermC
	ST239-t037	2	R	R	结构型耐药	ermA+ermC
	ST59-t437	2	R	R	结构型耐药	ermB
	ST398-t3625	1	S	S	/	/
	ST398-t1793	1	S	S	/	/
	ST121-t2092	1	S	S	/	/
	ST7-t091	1	R	R	结构型耐药	ermC
	ST5-t002	1	R	R	结构型耐药	ermB

3 讨论

金黄色葡萄球菌是引起各种重症感染的主要病原菌之一^[6],近年来由于抗菌药物的不合理使用,使 MRSA 的检出率逐年增加并呈现多药耐药的趋势^[7]。并且统计数据显示 MRSA 耐药率明显高于 MSSA^[7]。MRSA 不仅仅对 β-内酰胺类、酶抑制剂复合抗菌药物及碳青霉烯类耐药,大部分同时对大环内酯类,林可霉素类,喹诺酮类等均有较高耐药率^[7]。众所周知,金黄色葡萄球菌引起的血流感染,患者病情凶险,治疗难度大^[8]。所以 MRSA 血流感染的治疗相当棘手。并且数据资料显示临床分离自血流感染的金黄色葡萄球菌对红霉素和克林霉素的耐药率均大于 50%^[8]。因此,了解金黄色葡萄球菌对红霉素和克林霉素耐药产生机制,对感染预防治疗极其重要。

金黄色葡萄球菌对红霉素和克林霉素的耐药机制主要有两种,一种是能量依赖的主动泵出机制,一种是由 erm 基因编码导致 23SrRNA 甲基化,通过降低药物对核糖体的结合而产生的耐药。erm 基因介导的耐药,在表型上分为两种,即诱导型耐药和结构型耐药^[9]。

本研究数据显示,本院 2014 年临床分离血流感染金黄色葡萄球菌患者共 33 株,MRSA 分离率为 78.79%,且所有 MRSA 菌株均为 ST239 并检出 ermA 基因。说明 ermA 基因主要存在于 MRSA 中。与文献报道不同^[8-9],ermB 仅在 3 株 MSSA 结构型耐药菌株中检出,同时只有 1 株 MSSA 菌株检出只携带 ermC 基因,单独携带 ermB 或者 ermC 基因检出率较低。在诱导型耐药菌株中,只检出 ermA 基因。这些现象可能与地域分布存在密切关系^[10]。

从红霉素和克林霉素耐药上来看,33 株金黄色葡萄球菌中 30 株细菌存在耐药,耐药率高达 90.91%,且诱导型耐药表型占相当比例(43.33%)。证明本院红霉素和克林霉素耐药现象比较严重。但由于目前微生物自动化鉴定及药敏仪器的逐步普及,大部分三甲医院已不再用克林霉素纸片法检测药敏,而是直接通过自动化仪器的微量稀释法报告 MIC 结果。这使得诱导型克林霉素耐药菌株出现漏检现象,可能会导致临床治疗的失败。所以,提倡实验室在自动化仪器鉴定药敏时,能够采用 D 试验检测诱导型耐药表型。该方法简单易行,适合临床实验室推广。

从分子表型上来看,13 株诱导型耐药菌均为 ST239-t030 型 MRSA 菌株,并且全部携带 ermA 一种耐药基因。而 17 株结构型耐药菌株携带的 erm 基因型别较多。此数据说明,在本院红霉素克林霉素诱导型耐药主要由 ermA 基因所致,且该菌株型别为 ST239-t030 型 MRSA。同时证明该型别菌株存在克隆传播现象,因此,临床感染工作人员应加强生物安全观念,提高耐药菌株检出率,及时采取有效的控制措施,有效防止耐药菌株产生及传播。

参考文献

- [1] 姚蕾,徐元宏.金黄色葡萄球菌致病毒素的研究进展[J].国际检验医学杂志,2014,35(22):3080-3082.
- [2] 乔响,陈君灏,罗云桃,等.146 例金黄色葡萄球菌中红霉素对克林霉素诱导耐药分析[J].检验医学,2012,27(2):114-117.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fourth informational supplement [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [4] 占志平,童俊.无菌体液标本中异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的流行病学研究[J].国际检验医学杂志,2015(8):1117-1119.
- [5] 吴财铭,栗俊杰,廖奇峰,等.重症监护病房患者金黄色葡萄球菌感染的分子流行病学研究[J].国际检验医学杂志,2015,36(9):1253-1254.
- [6] 沈定霞,罗燕萍,徐雅萍,等.葡萄球菌对红霉素和克林霉素的诱导耐药性研究[J].中华检验医学杂志,2005,28(4):400-402.
- [7] 李耘,吕媛,薛峰,等.卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarlin) 2011-2012 年革兰阳性菌耐药监测报告[J].中国临床药理学杂志,2014,30(3):251-259.
- [8] 王立新,胡伟明,胡志东,等.血流感染患者金黄色葡萄球菌 erm 基因检测及流行病学研究[J].检验医学,2013,28(3):189-193.
- [9] 宋娟.220 株金黄色葡萄球菌中红霉素对克林霉素诱导耐药分析[J].国际检验医学杂志,2014,35(17):2384-2385.
- [10] 孙茜,贾曦,王聪.金黄色葡萄球菌耐药表型及基因型研究[J].国际检验医学杂志,2014,35(4):424-425.

(收稿日期:2015-08-02)

本刊声明

《国际检验医学杂志》2015 年 36 卷第 8 期刊发文章《胰岛素泵联合诺和灵 30R 治疗糖尿病合并肺部感染的疗效及检验指标分析》一文,通讯作者为王莹,电子邮箱:150476755@qq.com。

《国际检验医学杂志》编辑部

2015-12-30