

血液来源人葡萄球菌生物被膜形成能力及耐药性的研究

陈亮¹, 王晓燕¹, 杨永长², 肖代雯², 胡洪华²

(1. 四川省什邡市人民医院检验科, 四川什邡 618400; 2. 四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 成都 610072)

摘要:目的 探究人葡萄球菌生物被膜能力和耐药性, 为预防与治疗提供理论依据。方法 收集临床分离血液来源人葡萄球菌, 琼脂稀释法检测 16 种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC), 通过耐苯唑西林表型和 *mecA* 基因型以准确区分耐甲氧西林人葡萄球菌(MRSHo)和甲氧西林敏感人葡萄球菌(MSSHo), 比较二者在耐药性上的差异; 体外微孔板黏附实验(TCP)测定生物被膜, 并分析其对耐药性的影响。结果 收集菌株共计 55 株, 药物耐药率由高到低分别为青霉素 92.73%、红霉素 87.27%、苯唑西林 83.64%、克林霉素 67.27%、复方磺胺甲噁唑 65.45%、环丙沙星 47.27%、左氧氟沙星 47.27%、四环素 41.82%、莫西沙星 34.55%、利福平 16.36%和庆大霉素 10.91%及万古霉素、利奈唑胺、普丁/达福、呋喃妥因和替加环素 0.00%, 无耐药株检出。46 株(83.6%)*mecA* 阳性为 MRSHo, 与 MSSHo 相比 MRSHo 更易对青霉素、四环素、奎诺酮类及复方磺胺甲噁唑耐药, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。35 株(63.6%)可产生物被膜, 生物被膜阴阳性菌株组间在 16 种抗菌药物耐药性比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 临床分离血液来源人葡萄球菌易产生物被膜、甲氧西林耐药率高、MRSHo 常为多重耐药。

关键词:人葡萄球菌; 生物被膜; 抗菌药物敏感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.020

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)19-2413-04

文献标识码:A

Study on biofilm formation ability and antibiotic resistance of blood-derived *Staphylococcus hominis*CHEN Liang¹, WANG Xiaoyan¹, YANG Yongchang², XIAO Daiwen², HU Honghua²

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Shifang, Shifang, Sichuan 618400, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Medical Science Academy/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: **Objective** To study the characteristics of biofilm formation ability and drug resistance of *Staphylococcus hominis*, and to provide the basis for prevention and treatment of the infection. **Methods** *Staphylococcus hominis* were isolated from positive blood culture and identified by automatic microbiological identification system. Minimal inhibitory concentration (MIC) of 16 antibiotics were determined by the agar dilution method. The *mecA* gene was detected by PCR for differentiation of Methicillin resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo) and Methicillin susceptible *Staphylococcus hominis* (MSSHo), and differences in antimicrobial susceptibility between MRSHo and MSSHo were analyzed. Microtite Plate Assay (TCP) was used to evaluate biofilm formation capacity of *Staphylococcus hominis*, and the differences in antimicrobial susceptibility between biofilm forming and non-biofilm strains were analyzed. **Results** A total of 55 *Staphylococcus hominis* strains were isolated from positive blood cultures. The antimicrobial resistance rates were penicillin (92.73%), erythromycin (87.27%), oxacillin (83.64%), clindamycin (67.27%), trimethoprim/sulphamethoxazole (65.45%), ciprofloxacin (47.27%), lavofloxacin (47.27%), tetracycline (41.82%), moxifloxacin (34.55%), rifampicin (16.36%) and gentamicin (10.91%), respectively, while the resistance rates of all of vancomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin, nitrofurantoin, and tigecycline were 0.00%. Among these strains, 46 (83.64%) isolates were MRSHo and 9 isolates were MSSHo. There were significant differences in antimicrobial susceptibility between MRSHo and MSSHo. For ciprofloxacin, lavofloxacin, moxifloxacin, penicillin, tetracycline, trimethoprim/sulphamethoxazole, MRSHo had a higher resistance rates than MSSHo ($P < 0.05$). Results indicated that 35 isolates were biofilm producers (63.6%). There was no significant difference in anti-

作者简介:陈亮,男,主管技师,主要从事微生物耐药机制研究。

本文引用格式:陈亮,王晓燕,杨永长,等. 血液来源人葡萄球菌生物被膜形成能力及耐药性的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(19): 2413-2416.

icrobial susceptibility between biofilm forming and non-biofilm strains ($P>0.05$). **Conclusion** The analyzed Staphylococcus hominis isolates have a strong biofilm formation ability and high prevalence of methicillin resistance and multiple resistance.

Key words: Staphylococcus hominis; biofilm; antibiotic susceptibility

临床上将葡萄球菌分为以金黄色葡萄球菌为代表的凝固酶阳性和以表皮葡萄球菌与人葡萄球菌为代表的凝固酶阴性(CoNS)两大类,后者不产凝固酶、毒素,致病力弱通常被认为是条件致病菌^[1]。随着人工关节、静脉导管、支架等医学侵入操作大量应用,据研究显示,葡萄球菌引起的血流感染中超过 4/5 是由 CoNS 引起,约 1/5 是由人葡萄球菌造成,其引起的感染慢性反复临床治疗十分困难^[2]。然而目前,对临床分离人葡萄球菌的致病性缺乏相关的报道与研究。本文拟从生物被膜和耐药性这两个最为重要的方面进行探究,了解其致病性,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集临床血培养阳性标本,由 VITEK 2 COMPACT 微生物鉴定仪确认人葡萄球菌共计 55 株,无重复菌株。

1.2 仪器与试剂 聚合酶链反应(PCR)试剂与 100 bp DNA 标志物(北京康为世纪),PCR 扩增仪与凝胶成像系统(美国 Bio-Rad),电泳仪(美国 Savant),VITEK 2 COMPACT 微生物鉴定仪(法国 BioMérieux),96 孔无菌培养板(美国 costar),mecA 的引物(上海 invitrogen)。

1.3 方法

1.3.1 细菌 DNA 提取 室温平衡冷冻菌种 30 min,血平板接种,置 37 ℃ 5% CO₂ 孵箱 24 h,收集细菌,10 000 r/min 离心 5 min,沉淀加 40 μL DNA 提取液,100 ℃加热 10 min 后,10 000 r/min 离心 5 min,上清液即为人葡萄球菌 DNA。

1.3.2 药物敏感试验 琼脂稀释法检测 16 种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)。抗菌药物具体为青霉素、苯唑西林、红霉素、克林霉素、庆大霉素、呋喃妥因、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、普丁/达福、万古霉素、复方磺胺甲噁唑、利福平、替加环素、四环素与利奈唑胺。整个过程和结果判定均参照 CLSI 2012^[3] 操作程序进行。

1.3.3 耐甲氧西林人葡萄球菌(MRSHo)的筛选与确认 当人葡萄球菌对苯唑西林的 MIC>0.5 mg/L 判定为 MRSHo, MIC<0.25 mg/L 则判定为甲氧西林敏感人葡萄球菌(MSSHo)。采用 PCR 检测 mecA 基因以验证其基因型。mecA 基因扩增引物序 F:5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3', R:5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG-3', 产物大小为 527 bp。反应体系:2×Taq Master Mix 5 μL、上下游引物各 0.25 μL、DNA 1.5 μL、DH₂O 3 μL。反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,50 ℃退火

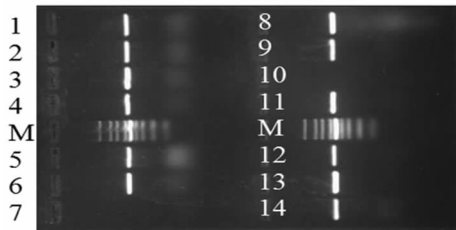
30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。

1.3.4 半定量黏附实验(TCP)^[4-5] 首先取单克隆人葡萄球菌接种于 5 mL 溶菌肉汤,220 r/min 震荡增菌过夜。然后菌液用胰蛋白胨大豆肉汤(0.25%葡萄糖)1:200 稀释,每孔 200 μL,每个样本加样 8 孔。5% CO₂ 培养箱 37 ℃培养 72 h 后,用蒸馏水洗板 4 次,干燥。0.1%结晶紫染色 10 min,同上一步洗板 4 次,干燥。最后 5%乙酸每孔 200 μL 加样,570 nm 波长测定吸光光度值。阳性判定标准,以大于阴性对照的平均 OD 值加 3 倍为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件统计分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MRSHo 的筛查与确认 46 株细菌苯唑西林 MIC>0.5 mg/L,同时 mecA 基因阳性,即 MRSHo 的检出率为 83.6%(46/55)。mecA 检测结果见图 1。



注:1~14 泳道为样本;M 为 100 bp DNA 标志物

图 1 mecA 基因检测电泳图

表 1 MRSHo 与 MSSHo 在耐药谱上的差异

抗菌药物	MRSHo(n=46)		MSSHo(n=9)		χ^2	P
	株数 (n)	耐药率 (%)	株数 (n)	耐药率 (%)		
环丙沙星	26	56.52	0	0.00	7.513	0.006
庆大霉素	6	13.04	0	0.00	0.317	0.573
左旋氧氟沙星	26	56.52	0	0.00	7.513	0.006
莫西沙星	19	41.30	0	0.00	4.000	0.046
青霉素	45	97.83	6	66.67	6.709	0.010
利福平	9	19.57	0	0.00	0.918	0.338
四环素	23	50.00	0	0.00	5.816	0.016
复方磺胺甲噁唑	34	73.91	2	22.22	6.756	0.009
红霉素	42	91.30	6	66.67	1.155	0.282
克林霉素	33	71.74	4	44.44	1.458	0.227

注:中介划归耐药

2.2 药敏试验结果 药物耐药率由高到低分别为青霉素 92.73%、红霉素 87.27%、苯唑西林 83.64%、克林霉素 67.27%、复方磺胺甲噁唑 65.45%、环丙沙星

47.27%、左氧氟沙星 47.27%、四环素 41.82%、莫西沙星 34.55%、利福平 16.36%和庆大霉素 10.91%及万古霉素、利奈唑胺、普丁/达福、呋喃妥因和替加环素 0.00%，无耐药株检出。

2.3 MRSHo 与 MSSHo 在耐药谱上的差异 二者在对奎诺酮类、青霉素、四环素与复方磺胺甲噁唑的耐药率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.4 生物被膜形成能力 TCP 显示,55 株细菌中 35 株呈肉眼可见淡紫色,且在 570 nm 波长测定吸光度时其 OD 值达到阳性判断标准,即人葡萄球菌生物被膜的检出率为 63.6%。

2.5 生物被膜对耐药性的影响 分析比较产与未产生物被膜组间的耐药性,结果两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 2。

表 2 产与未产生物被膜组菌株在耐药性上的差异						
抗菌药物	生物被膜阴性 (<i>n</i> =20)		生物被膜阳性 (<i>n</i> =35)		χ^2	<i>P</i>
	株数	耐药率	株数	耐药率		
	(<i>n</i>)	(%)	(<i>n</i>)	(%)		
环丙沙星	9	45.00	17	48.57	0.07	0.80
庆大霉素	3	15.00	3	8.57	0.08	0.77
左旋氧氟沙星	9	45.00	17	48.57	0.07	0.80
莫西沙星	6	30.00	13	37.14	0.29	0.59
苯唑西林	16	80.00	30	85.71	0.22	0.64
青霉素	19	95.00	32	91.43	0.00	0.96
利福平	5	25.00	4	11.43	0.86	0.35
四环素	7	35.00	16	45.71	0.60	0.44
复方磺胺甲噁唑	12	60.00	24	68.57	0.41	0.52
红霉素	17	85.00	31	88.57	0.00	0.97
克林霉素	12	60.00	25	71.43	0.76	0.38

3 讨 论

人葡萄球菌是重要的血流感染病原菌,日益受到学界关注,国内外学者证实临床约 1/5 的葡萄球菌相关血流感染由其引起^[1-3,6]。作为典型的 CoNS 人葡萄球菌致病力弱,无侵袭性毒素与酶,然而一旦其感染则十分顽固,抗菌药物疗效差、治疗易反复。

本研究体外药敏试验便直观地展示了人葡萄球菌抗菌药物疗效差的特点。16 种抗菌药物,根据其耐药率可分为 5 个等级,第 1 级万古霉素、利奈唑胺、呋喃妥因、普丁/达福和替加环素耐药率 0%,临床治疗 MRSHo 时首选万古霉素,当万古霉素体外敏感但疗效不佳时应考虑生物被膜的存在,改用渗透性更好的利奈唑胺或进行联合用药^[7];第 2 级是庆大霉素和利福平耐药率约 15%,这与 LEITE 等^[8]研究相符,表明二者可用于人葡萄球菌感染的有效控制;第 3 级包括喹诺酮类与四环素,耐药率在 40%左右均展现出较高的抗性,与 MENDOZA 等^[9]与 BOUCHAMI 等^[10]研

究相符而与 FAJARDO 等^[11]报道相反,提示临床应用应慎重;而第 4 级包括复方磺胺甲噁唑和克林霉素耐药率约 65%与第 5 级苯唑西林、红霉素和青霉素耐药率超过 80%,说明临床在经验用药时应避免。

介导人葡萄球菌的耐药机理既包括特异性途径也包含非特异性过程。其一,特异性耐药,主要由 mecA 介导。葡萄球菌属具有一个菌属特异性可移动性盒子 mec(SCCmec),mecA 基因便是由 SCCmec 所携带,编码亲和力极低的青霉素结合蛋白 2a,导致耐药甲氧西林。本研究中,MRSHo 的检出率为 83.64%,这与 FINKS 等^[7]报道 81%相一致,远高于 MRSA 的 54.5%左右检出率^[6],这说明人葡萄球菌耐甲氧西林率高是其中一个显著特点。具有 mecA 基因的 MRSHo 能通过 SCCmec 更加快速、有效地积累耐药基团,本研究发现 MRSHo 在对喹诺酮类、青霉素、四环素和复方磺胺甲噁唑的耐药率上高于 MSSHo,差异有统计学意义($P<0.05$),显示血液来源 MRSHo 常为多重耐药。

其二,非特异性耐药,由生物被膜介导。生物被膜是病原菌在面对选择压力时,附着在物表或病变组织表面后,通过分泌聚合基质而形成的一种特殊存在形式^[12]。生物被膜的形成能有效隔离定植细菌与内环境,造成抗菌药物难以渗透,同时使免疫细胞与因子难以触及细菌。临床上人葡萄球菌引起的血流感染常常伴有生物被膜的存在,所以十分顽固,难以治疗^[13]。体外评估细菌生物被膜的方式主要有 TCP 法和刚果红培养基显色法。而 TCP 具有半定量、重复性好与临床更加吻合的特点,因此本研究采用 TCP 法评估人葡萄球菌生物被膜。本研究显示,63.4%(35/55)的菌株为生物被膜阳性,这与 MENDOZA 等^[9]的报道相仿而略低于 CHRISTENSEN 等^[4]报道。研究表明,生物被膜可使耐药性增强多达百倍^[12-13],然而本研究中,生物被膜却未对耐药性“产生影响”,即无论有无生物被膜,菌株在耐药性比较,差异无统计学意义($P>0.05$),这与理论不符。与本文结果一致的报道也见于国外学者 WOJTYCZKA 等^[14]和国内学者朱娟^[15]的研究中,即实验室常规琼脂稀释法不能区分产与未产生物被膜菌组在耐药性上的差异。另外在治疗人葡萄球菌引起的感染时,临床时有抗菌药物药敏报告敏感但疗效不佳的情况,这让临床医生十分困惑。究其根源笔者认为在于现行实验室体外药物敏感试验仅能反应浮游状态微生物的耐药性而无法对能形成生物被膜细菌体内生物被膜形式下耐药性作出有效模拟。朱娟^[15]与 CLUTTERBUCK 等^[16]研究证实了笔者的推断,他们发现泊洛沙姆培养基能有效模拟生物被膜形成更好的反映产生物被膜细菌在体内的药物耐受真实情况,而水解酪蛋白培养基不能提供生物被膜形成的必要条件,因而无法真实反映其体内药物耐受能力。临床实验

室急需建立更有效的体外药物敏感试验以满足生物被膜细菌体外药物敏感试验的需求。

4 结 论

临床分离血液来源人葡萄球菌具有高耐甲氧西林、易多重耐药和产生物被膜的特征。临床在治疗其引起的反复感染或者“敏感药物”疗效不佳时应意识到生物被膜存在的可能性,选用渗透性更好的利奈唑胺或则进行联合用药。

参考文献

[1] CHAVES F, GARCIA-ALVAREZ M, SANZ F, et al. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (9): 4877-4879.

[2] ROGERS K L, FEY P D, RUPP M E. Coagulase-negative staphylococcal infections [J]. Infect Dis Clin North Am, 2009, 23(1): 73-98.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M 100-S22 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

[4] CHRISTENSEN G D, SIMPSON W A, YOUNGER J J, 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.

[5] FREDHEIM E G, KLINGENBERG C, ROHDE H, et al. Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus* [J]. Clin Microbiol, 2009, 47(4): 1172-1180.

[6] LV Y, LI Y. Mohnarin report of 2011-2012: surveillance for resistance of bacteria causing bloodstream infections [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2014, 30(3): 278-288.

[7] FINKS J, WELLS E, DYKE T L, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007 [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(6): 943-945.

[8] LEITE B, GOMES F, TEIXEIRA P, et al. In vitro activity

of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms [J]. Curr Microbiol, 2011, 63(3): 313-317.

[9] MENDOZA O S, MORFIN O R, RODRIGUEZ N E, et al. Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood [J]. PLoS One, 2013, 8 (4): e61161.

[10] BOUCHAMI O, BEN HASSEN A, DE LENCASTRE H, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21940.

[11] FAJARDO O M, HIDALGO O R, RODRIGUEZ G S, et al. Activity of vancomycin, ciprofloxacin, daptomycin, and linezolid against coagulase-negative staphylococci bacteremia [J]. Rev Esp Quimioter, 2011, 24(2): 74-78.

[12] OTTO M. Staphylococcal biofilms [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 322(1): 207-228.

[13] CHRISTNER M, FRANKE G C, SCHOMMER N N, et al. The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin [J]. Mol Microbiol, 2010, 75 (1): 187-207.

[14] WOJTYCZKA R D, 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.

[15] 朱娟. 细菌生物被膜耐药及形成相关基因调控机制的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2011.

[16] CLUTTERBUCK A L, COCHRANE C A, DOLMAN J, et al. Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2007, 15(6): 2.

(收稿日期: 2018-01-24 修回日期: 2018-03-19)

(上接第 2412 页)

[14] BIRCAN A, GOKIRMAK M, KILIC O, et al. C-reactive protein levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease: role of infection [J]. Med Princ Pract, 2008, 17(3): 202-208.

[15] 孙世民, 张珠, 王云雀. COPD 急性加重期和稳定期血清炎症因子水平及其与肺功能的关系 [J]. 中国全科医学, 2014, 12(24): 2790-2793.

[16] 李亚娜, 李亚莉, 刘厚颖, 等. CD64 感染指数与 PCT 对 COPD 患者急性加重期细菌感染的临床诊疗研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(19): 4413-4415.

[17] LI S, HUANG X M, CHEN Z P, et al. Neutrophil CD64 expression as a biomarker in the early diagnosis of bacterial infection: a meta-analysis [J]. Int J Infect Dis, 2013, 17 (1): 12-23.

[18] 李永红. 血清 C-反应蛋白 (CRP) 和前白蛋白 (PA) 变化在新生儿感染性疾病的应用价值 [J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(13): 63-65.

[19] 黄种杰, 洪丽月, 李渺苗, 等. 检测 CysC, hs-CRP 和前白蛋白对老年 AECOPD 的临床意义 [J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(1): 7-10.

[20] 赵秀清, 王昌生, 杜春书, 等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期并发感染患者血清 PCT, hs-CRP 和 PA 的水平变化分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(13): 2945-2947.

[21] 丁锋, 张清会, 徐慧, 等. PCT 与 CRP 和 CD64 指数对细菌感染慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者诊断及指导治疗的意义 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(10): 2198-2201.

(收稿日期: 2018-02-04 修回日期: 2018-05-07)