

· 论 著 ·

结核合并感染凝固酶阴性葡萄球菌患者的耐药性分析及耐药基因检测*

王锦萍¹, 蔡常辉², 梁连辉¹, 陈述文¹, 杨海辉¹

(广东省中山市第二人民医院:1. 检验科;2. 门诊部 528400)

摘要:目的 了解结核合并感染凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)患者的耐药基因分布情况,为治疗结核合并感染患者提供指导。方法 收集该院已确诊肺结核合并感染的患者,对分离的 54 株 CNS 进行耐药性分析,并采用 PCR 方法检测其耐药基因。结果 54 株 CNS 的药敏结果显示,耐苯唑西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)检出率为 92.3%,青霉素耐药率达 96.2%,红霉素、庆大霉素和四环素耐药率分别为 86.5%、75.0%和 25.9%,发现耐万古霉素中介株;采用 PCR 扩增法检测其耐药基因,检出 mecA 基因 50 株, aac(6')/aph(2') 基因 46 株, aph(3')-III 基因 26 株, ermA 基因 20 株, tetM 基因 15 株, 阳性率分别为 92.5%、85.1%、48.1%、37.0%、27.8%。结论 结核合并感染 CNS 呈多重耐药性,携带多种耐药基因,耐药性严重,临床应给予重视。

关键词:结核; 凝固酶阴性葡萄球菌; 耐药基因; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.23.019 **文章编号:**A 文章编号:1672-9455(2017)23-3478-03

Analysis of drug resistance and drug resistance gene detection of TB co-infected with coagulase negative *Staphylococcus**WANG Jinping¹, CAI Changhui², LIANG Lianhui¹, CHEN Shuwen¹, YANG Haihui¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Outpatient Department, Second People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of drug resistance gene in patients with tuberculosis(TB) co-infected with coagulase negative *Staphylococcus*(CNS), so as to provide guidance to fight TB co-infections. Methods Patients in our hospital who confirmed tuberculosis complicated with infections were collected, and drug resistance of 54 strains of CNS were analyzed, and polymerase chain reaction(PCR) was used to detect the resistance genes. Results Drug susceptibility of 54 strains of CNS showed that, the resistance rate to benzene azole Westwood coagulase negative *Staphylococcus*(MRCNS) detection was 92.3%, the resistant rate of penicillin was 96.2%, which of erythromycin, gentamicin and tetracycline were 86.5%, 75.0% and 86.5%, respectively. Strain which resistant to vancomycin intermediary was also found. PCR amplification showed that the 50 strains had mecA gene, 46 strains had aac(6')/aph(2') gene, 26 strains had aph(3')-III gene, 20 strains had ermA gene, 15 strains had tetM gene, and positive rates were 92.5%, 85.1%, 48.1%, 37.0% and 27.8%, respectively. Conclusion TB associated infections of CNS has showed multidrug resistance, carrying a variety of resistance genes, and drug resistance is serious, resistance genes and resistance are closely related.

Key words: tuberculosis; coagulase negative *Staphylococcus*; resistance genes; drug resistance

近年来由于结核耐药率逐渐增加,且结核患者由于营养状况、经济、依从性较差及合并感染其他慢性疾病等因素,影响结核患者的预后^[1]。而凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)为临床常见革兰阳性球菌,随着医院治疗中各种侵入性操作增多,大量使用激素和免疫抑制剂等因素,CNS已成为世界范围内医院感染的重要致病菌^[2]。因此本研究对结核患者合并感染 CNS 进行耐药基因及耐药性研究,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 11 月至 2016 年 3 月本院确诊结核病患者检出的 54 株 CNS,入选患者均有详细的临床记录情况,包括体征、临床症状和实验室检查情况等。肺结核患者均符合中华医学会制定的《肺结核诊断和治疗指南》中相关的诊断标准^[3]。标本来源于痰液 32 株、血液 7 株、胸腔积液 6 株、分泌物 3 株、尿液 3 株、脑脊液 2 株、大便 1 株,所占比例分别为 59.3%、13.0%、11.1%、5.5%、5.5%、3.7%、1.9%。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.2 仪器与试剂 美国 BD 公司的 PHOENIX-100 型全自动微生物鉴定仪,瑞士罗氏公司的 Cobas Z 480 PCR 扩增仪,济南鑫贝西公司的生物安全柜,北京市六一仪器厂的电泳仪,上

海培清公司的恒温金属浴仪;菌种鉴定药敏板购于美国 BD 公司,蛋白酶 K、EX Taq 聚合酶、琼脂糖凝胶、DL2000 DNA Marker 均由宝生物工程(大连)有限公司购入,PCR 引物序列由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 菌种鉴定及药物敏感性试验 分离纯培养菌落采用美国 BD 公司的 PHOENIX-100 型全自动微生物鉴定仪进行细菌鉴定及药敏分析。结果判定按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2015 年制定的标准执行。药物敏感性检测采用 WHO-NET 5.4 版软件进行统计分析。

1.4 耐药基因检测

1.4.1 DNA 模板的提取 挑选纯培养物单个菌落于含有蛋白酶 K 溶液的离心管里,55℃金属浴消化 1 h,95℃金属浴灭活 10 min,最后以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液存于 -20℃冰箱待用^[4]。

1.4.2 引物设计 参照文献^[5],见表 1。

1.4.3 PCR 扩增及电泳 PCR 扩增反应体系总体积为 25 μL,包括 DNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL,EX Taq 聚合酶 12.5 μL,其余用灭菌纯水补足。PCR 反应参数:94℃预变性 10 min,94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,共 30

* 基金项目:广东省中山市医学科研项目(2015A020226)。

作者简介:王锦萍,女,主管技师,主要从事微生物学检验方面的研究。

个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。产物在 4 °C 保存^[6]。将 PCR 产物与溴甲酚蓝指示剂混合后点样,进行 2% 琼脂糖凝胶电

泳,凝胶成像仪成像并拍照。

表 1 耐药基因引物序列

目的基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	产物长度(bp)
mecA	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533
aac(6')/aph(2')	CCAAGAGCAATAAGGGCATA	CACTATCATAAACCCTACCG	220
aph(3')-III	GCCGATGTGGATTGCGAAAA	GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	292
tetM	GTGTGACGAACTTTACCGAA	GCTTTGTATCTCCAAGAACAC	501
ermA	TCAGTAAACAAGACAACG	TGTTCCCTTCGATAGTTTA	610

2 结 果

2.1 CNS 对抗菌药物的耐药率 药敏结果显示,耐苯唑西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)检出率为 92.3%,青霉素耐药率达 96.2%,红霉素、庆大霉素和四环素耐药率分别为 86.5%、75.0% 和 25.9%,发现耐万古霉素中介株,对其他抗菌药物耐药情况见表 2。

表 2 CNS 对抗菌药物的耐药情况[n(%)]

抗菌药物	敏感	中介	耐药
阿米卡星	41(75.9)	4(7.4)	9(16.7)
阿莫西林/克拉维酸	14(25.9)	0(0.0)	40(74.1)
氨苄西林	10(18.5)	0(0.0)	44(81.5)
苯唑西林	4(7.7)	0(0.0)	50(92.3)
呋喃妥因	53(98.1)	1(1.9)	0(0.0)
红霉素	5(9.6)	2(3.8)	46(86.5)
环丙沙星	10(17.3)	1(1.9)	43(80.8)
奎奴普汀/达福普汀	46(84.6)	4(7.7)	4(7.7)
利福平	18(32.7)	0(0.0)	36(67.3)
青霉素 G	1(1.9)	1(1.9)	52(96.2)
庆大霉素	11(21.2)	2(3.8)	41(75.0)
四环素	37(68.5)	3(5.6)	14(25.9)
替考拉宁	49(90.2)	0(0.0)	5(9.8)
妥布霉素	14(25.9)	3(5.6)	37(68.5)
万古霉素	53(98.0)	1(2.0)	0(0.0)
复方磺胺甲噁唑	18(33.3)	0(0.0)	36(66.7)
克林霉素	15(28.6)	0(0.0)	39(71.4)

2.2 耐药基因 PCR 检测结果 采用 PCR 扩增法检测 54 株 CNS 的耐药基因,其中检出 50 株 mecA 基因阳性菌株,其可见片段大小为 533 bp;46 株 aac(6')/aph(2') 基因阳性菌株,其可见片段大小为 220 bp;26 株 aph(3')-III 基因阳性菌株,其可见片段大小为 293 bp;20 株 ermA 基因阳性菌株,其可见片段大小为 610 bp;15 株 tetM 基因阳性菌株,其可见片段大小为 501 bp。

2.3 耐药基因分布情况 54 株 CNS 中,检出 mecA 基因 50 株,aac(6')/aph(2') 基因 46 株,aph(3')-III 基因 26 株,ermA 基因 20 株,tetM 基因 15 株,阳性率分别为 92.5%、85.1%、48.1%、37.0%、27.8%。

3 讨 论

结核是一种慢性传染性疾病,严重危害着人类健康,据报道全世界每年新发生结核病 800 万至 1 000 万,每年约有 100 万至 300 万人死于结核病^[7-9]。根据全国第五次结核病流行病学抽样调查报告显示,2010 年全国 15 岁及以上人群活动性肺结核的患病率为 459/10 万^[10]。而结核合并感染的革兰阳性球菌中,以葡萄球菌为首位,其中又以 CNS 为主,一直以来凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌被认为是致病菌受到广泛关注,CNS 则被认为是一种非致病菌,因此临床对此类菌的感染并

不重视。有研究发现,CNS 导致的相关感染性疾病增加,可能威胁免疫缺陷患者的生命^[11-12]。目前关于葡萄球菌耐药基因研究已有相关报道,但国内有关结核病合并感染 CNS 耐药基因鲜见报道。因此本研究对结核病合并感染的 CNS 作耐药基因检测。

3.1 β-内酰胺类药物耐药机制 获得性基因 mecA 和 TEM 基因、突变性基因 fem 基因、编码失常的 sar、arg、mgr 基因等,都是导致葡萄球菌对 β-内酰胺类药物耐药的原因。产生耐药的葡萄球菌分为两种,一种是产青霉素酶葡萄球菌,另一种是耐苯唑西林葡萄球菌(MRS);前者通过破坏 β-内酰胺环从而对青霉素耐药,后者则多携带 mecA 基因,其编码低亲和力青霉素结合蛋白 2α(PBP2α),PBP2α 为葡萄球菌青霉素结合蛋白 2(PBP2)的异构体,同样具有转肽酶活性,当 PBP2 被 β-内酰胺药物强力抑制时,PBP2α 替代 PBP2 完成肽聚糖和细胞壁的合成,细菌得以生存与繁殖。本研究中从结核合并感染患者中分离的 CNS 中,mecA 基因的检出率为 92.5%,而通过 MIC 法检测苯唑西林的耐药率为 92.3%,50 株 MRCNS 均检出了 mecA 基因,两者的相符程度达 100%,因而可以推断结核合并感染 MRCNS 多携带 mecA 基因,耐药性严重。

3.2 氨基糖苷类药物耐药机制 目前已知,葡萄球菌对氨基糖苷类耐药机制分为两种^[13]:一是氨基糖苷类药物作用靶位 16S rRNA 基因突变,二是获得氨基糖苷类修饰酶基因。氨基糖苷类修饰酶基因可通过转座子、整合子、质粒等可移动的遗传元件介导,具有易于传播的特点。国内外学者已检出的氨基糖苷类修饰酶基因有 aac(6')/aph(2') 基因、aph(3')-III 基因和 aph(6')-I 基因等。aac(6')/aph(2') 基因可表达 6' 位乙胺转移酶或 2' 位磷酸转移酶的双功能酶,修饰庆大霉素等氨基糖苷类药物,使其药效失活^[14]。本研究中 aac(6')/aph(2') 基因和 aph(3')-III 基因的检出率分别为 85.1% 和 48.1%,而庆大霉素和妥布霉素的耐药率为 75.0% 和 68.5%,相比较与 aac(6')/aph(2') 基因检出率较为一致,考虑导致庆大霉素和妥布霉素耐药的主要基因为 aac(6')/aph(2') 基因。aph(3')-III 基因检出率偏低可能原因为菌株对其耐药基因部分表达或是需要辅助才能表达,检出结果与陈瑞珊等^[5]报道一致。

3.3 大环内酯类药物耐药机制 红霉素是治疗青霉素过敏或严重葡萄球菌感染的首选替代药物,主要耐药机制为 erm 基因介导的核糖体靶位改变和 msrA 基因介导的主动外排机制,从而对大环内酯类药物耐药。erm 基因家族共 30 多种,临床感染中以 ermA、ermB、ermC 多见。本研究中,ermA 基因的检出率为 37.0%,而红霉素耐药率则达 86.5%,两种检测结果差异较大,可能原因为:(1)由于只检测一种 ermA 基因,未对 ermB 和 ermC 基因检测,其可能是由这两种基因介导;(2)虽然临床以 erm 基因介导红霉素耐药多见,但不排除由 msrA 基因介导的主动外排机制导致耐药;(3)值得一提的是,mecA 基因多位于葡萄球菌染色体 mec 基因盒(SCCmec)中,SCCmec

为一段超过 30 000 bp 的染色体 DNA 片段,类似于毒力岛,除携带 mecA 基因复合物外,还可携带转座子和整合质粒,导致各种非 β-内酰胺类药物耐药^[15]。因此,MRCNS 除了对 β-内酰胺类药物耐药外,还可对大环内酯类和氟喹诺酮类药物耐药。

3.4 四环素类药物耐药机制 四环素类药物耐药机制分两类,一类为产核糖体保护蛋白,另一类为产四环素外排泵蛋白。前者编码的基因包括 tetM、tetO、tetQ、tetS 等 23 种耐药基因^[16],后者编码 tetK 基因^[17]。本研究中,tetM 基因检出率为 27.8%,而四环素类药物的耐药率为 25.9%,两者检出率一致,表明结核合并感染的 CNS 均由 tetM 基因介导产生的四环素耐药。

综上所述,结核合并感染的 CNS,特别是 MRCNS 耐药性严重,并呈多重耐药趋势,耐药率高的抗菌药物均可检测相关的耐药基因,并且已经出现耐万古霉素的中介株。虽然本研究没有对耐万古霉素基因进行检测,但并不难预见 CNS 可能已产生了相应的耐药基因。结核合并感染的 MRCNS 携带多种耐药基因,而且携带率高,耐药基因可在同种或不同种类细菌间传播,必须引起广大医务工作者的关注。在结核病治疗过程中,由于治疗时间长,患者免疫力低下,长期使用免疫抑制剂等因素,合并细菌感染情况常见,因而临床治疗结核合并感染 CNS 时更应科学、合理使用抗菌药物,加强耐药基因的检测与研究,强化感染控制措施,避免细菌耐药性的发生及耐药基因的传播。

参考文献

[1] Gler MT, Skripconoka V, Sanchez-Garavito E, et al. Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23): 2151-2160.

[2] Rahman A, Hossain MA, Paul SK, et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) by disk diffusion method[J]. Mymansingh Med J, 2013, 22(2): 229-231.

[3] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2013, 20(2): 7-11.

[4] 杨志杰. 861 株住院患者革兰氏阳性菌的分布与耐药性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(12): 939-941.

[5] 陈瑞珊, 王岩, 海东, 等. 唐山地区医院儿科患者感染耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌耐药基因检测及耐药性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(5): 454-458.

[6] Rodriguez-Noriega E, Seas C. The changing pattern of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in Lat-

in America; implications for clinical practice in the region [J]. Braz J Infect Dis, 2010, 14(Suppl 2): S87-S96.

[7] Orcau A, Cayla JA, Martinez JA. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2011, 29(Suppl 1): 2-7.

[8] Bates M, O'grady J, Mwaba P, et al. Evaluation of the burden of unsuspected pulmonary tuberculosis and Co-Morbidity with Non-Communicable diseases in sputum producing adult inpatients[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40774.

[9] Mor Z, Pinsker G, Cedar N, et al. Epidemiology of extra-pulmonary tuberculosis in Israel, 1999 - 2010 [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2013, 17(2): 229-233.

[10] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次肺结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.

[11] 胡洪华, 杨永长, 肖代雯, 等. 凝固酶阴性葡萄球菌生物被膜形成及耐药性分析[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(11): 721-725.

[12] Bizzarro MJ, Shabanova V, Baltimore RS, et al. Neonatal sepsis 2004-2013: the rise and fall of coagulase-negative staphylococci[J]. J Pediatr, 2015, 166(5): 1193-1199.

[13] Zhu W, Clark NC, McDougal LK, et al. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2): 452-457.

[14] 晏玲, 薛媛, 何念海, 等. 儿科临床分离病原菌构成及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(11): 1616-1617.

[15] 战晓微, 郑秋月. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及 SCCmec 基因分型研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(18): 2512-2514.

[16] 刘芳, 虞涛, 鲍连生, 等. 儿童血培养中凝固酶阴性葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(2): 416-417.

[17] Martins MA, Santos Sde L, Leao LS, et al. Prevalence of resistance phenotypes in Staphylococcus aureus and coagulase-negative isolates of venous ulcers of primary health-care patients[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2012, 45(6): 717-722.

(收稿日期: 2017-05-02 修回日期: 2017-08-02)

(上接第 3477 页)

[6] Zeng Q, Liu M, Zhou N, et al. Serum human epididymis protein 4 (HE4) may be a better tumor marker in early lung cancer[J]. Clin Chim Acta, 2016, 455: 102-106.

[7] Nagy B Jr, Bhattoa HP, Steiber Z, et al. Serum human epididymis protein 4 (HE4) as a tumor marker in men with lung cancer[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(11): 1639-1648.

[8] Jiang Y, Wang C, Lv B, et al. Expression level of serum human epididymis 4 and its prognostic significance in human non-small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 5568-5572.

[9] Lamy PJ, Plassot C, Pujol JL. Serum HE4: An Independ-

ent Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e128836.

[10] Iwahori K, Suzuki H, Kishi Y, et al. Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer [J]. Tumour Biol, 2012, 33(4): 1141-1149.

[11] Lan WG, Hao YZ, Xu DH, et al. Serum human epididymis protein 4 is associated with the treatment response of concurrent chemoradiotherapy and prognosis in patients with locally advanced non-small cell lung cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18(4): 375-380.

(收稿日期: 2017-05-02 修回日期: 2017-08-02)