

DOI:10.13350/j.cjpb.221216

• 临床研究 •

金黄色葡萄球菌标本分布及耐药情况分析

丁新玲*, 李曼

(赤峰学院基础医学院, 内蒙古赤峰 024000)

【摘要】 **目的** 了解金黄色葡萄球菌对抗菌药物的耐药状况,为临床抗感染治疗提供依据。 **方法** 收集2018年1月至2020年12月某三甲医院门诊及住院患者的痰、分泌物、脓液、血液等临床标本检验分离获取金黄色葡萄球菌,用AST-GP67药敏鉴定卡对其进行14种抗生素的药敏试验。采用头孢西丁纸片K-B琼脂扩散法进行测定MRSA,使用PCR技术耐药基因进行检测并进行分组分析。 **结果** 临床标本分离出金黄色葡萄球菌517株,其中菌株来自痰液标本211株(40.81%),脓液标本90株(17.41%),创面分泌物标本75株(14.51%),血液标本71株(13.73%),阴道分泌物标本16株(3.09%),尿液标本13株(2.51%),引流液标本12株(2.32%),导管尖端标本7株(1.35%),前列腺液标本5株(0.97%),其他部位标本17株(3.30%)。MRSA共计检出257株,占金黄色葡萄球菌的49.71%。其中,2018年度检出率为53.92%(110/204株),2019年度检出率为45.77%(65/142株),2020年度检出率为47.95%(82/171株)。在被检测的14种抗菌药物中,青霉素和红霉素的耐药率最高,万古霉素、利奈唑胺、替考拉宁和喹诺普汀/达福普汀的敏感率最高,均为100%。*mecA*、*tetM*、*aac(6')/aph(2')*、*aph3'-III*和*qacA/B*的携带率在MRSA与MSSA组间比对差异有统计学意义($P<0.05$)。 **结论** 临床分离金黄色葡萄球菌中MRSA菌株检出比较高,3年来检出比浮动较小,临床治疗金黄色葡萄球菌感染应根据药敏试验结果规范使用抗菌药物,同时加强对MRSA的耐药性监测,延缓金黄色葡萄球菌耐药性的产生。

【关键词】 金黄色葡萄球菌;耐药性;耐药基因

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)12-1442-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Dec;17(12):1442-1445.]

Epidemiological study on *Staphylococcus aureus*

DING Xin-ling, LI Man (School of Basic Medical Sciences, Chifeng University, Chifeng 024000, Inner inner Mongolia, China)*

【Abstract】 **Objective** To understand the drug resistance of *Staphylococcus aureus* to antibiotics, so as to provide basis for clinical anti infection treatment. **Method** The sputum, secretion, pus, blood and other clinical samples of outpatients and inpatients in a third class hospital from January 2018 to December 2020 were collected, tested and isolated to obtain *S. aureus*, the drug sensitivity test of 14 antibiotics was carried out with AST-GP67 drug sensitivity identification card. MRSA was determined by cefoxitin disk K-B agar diffusion method, the drug resistance gene of MRSA were detected and analyzed by PCR. **Result** From January 2018 to December 2020, 517 strains of *S. aureus* were isolated from clinical specimens, among them, 211 strains (40.81%) came from sputum specimens, 90 strains (17.41%) came from pus specimens, 75 strains (14.51%) wound secretion specimens, 71 strains (13.73%) came from blood samples, 16 strains (3.09%) came from vaginal secretions, 13 strains (2.51%) came from urine samples, 12 strains (2.32%) came from drainage fluid samples, 7 strains (1.35%) came from catheter tip specimens, 5 strains (0.97%) came from prostatic fluid specimens, 17 strains (3.30%) came from other parts specimens. 257 strains MRSA were detected, accounting for 49.71% of *S. aureus*. The detection rate was 53.92% (110/204 strains) in 2018, 45.77% (65/142 strains) in 2019 and 47.95% (82/171 strains) in 2020. Among the 14 antibiotics tested, the drug resistance rates of penicillin and erythromycin were the highest, and the sensitivity rates of nitrofurantoin, vancomycin, linezolid, teicoplanin and quinoptin / dafuptin were the highest, all of which were 100%. There were significant differences in the carrying rates of *mecA*, *tetM*, *aac(6')/aph(2')*, *aph3'-III* and *qacA/B* between MRSA and MSSA components ($P<0.05$). **Conclusion** The detection of MRSA strains in clinical isolated *S. aureus* is relatively high, and the fluctuation of detection ratio in the past three years is small. In the clinical treatment of *S. aureus* infection, antibiotics should be standardized according to the results of drug sensitivity test, and the drug resistance monitoring of MRSA should be strengthened to delay the emergence of drug resistance of *S. aureus*.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; drug resistance; drug resistance gene

* **【通讯作者(简介)】** 丁新玲(1982-),女,内蒙古赤峰人,硕士,讲师,研究方向:基础医学,公共卫生。E-mail:fofl8361@21cn.com

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)隶属于革兰阳性菌,是医院感染最常见的病原菌之一,容易引发皮肤和软组织感染^[1],也可引起肺炎、心内膜炎、伪膜性肠炎、骨髓炎等。当其侵入血流后甚至可引起败血症、脓毒症等全身感染,对人类的健康造成了严重危害^[2]。近年来,由于侵入性治疗措施的频繁操作和多部位静脉通道的开放,以及抗菌药物的广泛应用,金黄色葡萄球菌的耐药性呈上升趋势。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)呈现出多重耐药性,具有传播途径广、致病性强及高病死率的特点^[3]。MRSA菌株特有的 *mecA* 基因使金黄色葡萄球菌产生青霉素结合蛋白 PBP2a。当正常的 PBP_s(青霉素结合蛋白)与 β -内酰胺类抗菌药物共价结合从而失去活性时,PBP2a 可以代替其功能,维持 MRSA 的生长,从而呈现出高度耐药性^[4]。将金黄色葡萄球菌的耐药性差异成为本研究的重点,以期控制金黄色葡萄球菌的治疗提供科学依据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株来源 收集 2018 年 1 月至 2020 年 12 月某三甲医院各门诊及住院患者的痰、分泌物、脓液、血液等临床标本检验分离得到的金黄色葡萄球菌。本研究均已获得患者或家属的同意。同一患者同一部位去首株,去重后共计 517 株金黄色葡萄球菌,其中 MRSA 菌株 257 株。

1.2 仪器与试剂 VITEK[®] 2COMPACT 30/60 细菌鉴定仪及 AST-GP67 药敏鉴定卡,法国梅里埃;Nanodrop2000 微量紫外可见分光光度计,美国 Nano-Drop 公司;PCR 扩增仪,德国 T-gradient Biometra 公司;DYY-10C 凝胶电泳仪,中国三恒公司;-20 °C 冰箱,中国海尔集团;-80 °C 低温冰箱,日本三洋;生物安全柜,美国 NUAIRE 公司;OLYMPUS BX51 显微镜,日本 OLYMPUS 公司;TGL-20M 高速台式离心机,中国湘仪集团。哥伦比亚血琼脂平板,英国 OXOID 公司;PCR 试剂,宝日医生物技术(北京)有限公司;药敏纸片,英国 OXOID 公司。质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC29213,MRSA 标准菌株为 ATCC43300,北京百欧博伟生物技术有限公司。

2 方 法

2.1 细菌鉴定 收集标本、细菌接种并对细菌进行培养,革兰染色处理及触酶试验,并对细菌实施初筛;采用全自动微生物分析仪对临床分离菌株进行鉴定。

2.2 药敏试验 采用 VITEK[®] 2COMPACT 30/60 全自动微生物分析仪及配套 AST-GP67 药敏鉴定卡检测金黄色葡萄球菌对 14 种抗生素的耐受性,操作依

据 VITEK[®] 2COMPACT 30/60 使用说明书。判读依据:美国临床实验室标准化委员会 2020 版(CLSI-2020)。

2.3 MRSA 判定 采用头孢西丁纸片 K-B 琼脂扩散法进行测定,将新鲜培养的菌悬液 2 ml 用生理盐水稀释到在 0.5 麦氏浊度,33~35 °C 培养 16~18 h 后的抑菌圈直径 \leq 21 mm,则判定为 MRSA 菌株,使用细菌冻存管将其冷冻于-80 °C 的冰箱内保存。质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC29213,MRSA 标准菌株 ATCC43300

2.4 耐药基因扩增 (1)菌株 DNA 的提取。将临床分离获取的金黄色葡萄球菌菌株分为 MRSA 和 MSSA 两组,各 100 株。将菌株转接至血液增菌培养基,静置于 36 °C 恒温培养箱 24 h,使用灭菌接种环挑取少量的菌悬液四区划线接种于哥伦比亚血琼脂平板,获得待实验菌株的单菌落,挑取 3~5 个金黄色葡萄球菌菌株的饱满菌落溶于含溶菌酶的核酸溶解液中,混匀后 36 °C 消化 35 min,100 °C 加热 20 min,13 000 r/min(离心半径 8.7 cm)离心 12 min,取上清液即为细菌 DNA 基因组,提好的 DNA 利用 Nanodrop2000 检测浓度后,保存于-20 °C 冰箱中,待用。(2)基因扩增体系与条件。 β -内酰胺酶类耐药基因 *mecA*、四环素耐药基因 *tetM*、氨基糖苷类耐药基因 *aac(6')*/*aph(2')*和 *aph3'*-III、大环内酯类耐药基因 *ermA* 和 *ermC* 以及消毒剂耐药基因 *qacA/B* 引物设计参照 GenBank。PCR 反应体系 25.0 μ L,Taq 酶 12.5 μ L,正反引物各 1.0 μ L,细菌 DNA 模版 4.0 μ L,10 \times PCR buffer 2.5 μ L,dNTPs 混合液 2 μ L,灭菌的去离子水补足总体积。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 35 s,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 35 s,循环 35 次;72 °C 终延伸 8 min,4 °C 保存。取扩增后产物在 1.5%的琼脂凝胶中进行电泳,电泳条件为 110 V,35 min,通过紫外成像系统拍照并记录结果。

2.4 统计学方法 采用 SPSS25.0 软件对 MRSA 和甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)两组耐药基因数据进行处理和统计分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1 金黄色葡萄球菌标本分布

2018 年 1 月至 2020 年 12 月临床标本检验分离获取的金黄色葡萄球菌共 517 株,其中菌株来自痰液标本 211 株(40.81%),脓液标本 90 株(17.41%),创面分泌物标本 75 株(14.51%),血液标本 71 株(13.73%),阴道分泌物标本 16 株(3.09%),尿液标本 13 株(2.51%),引流液标本 12 株(2.32%),导管尖端

标本 7 株(1.35%),前列腺液标本 5 株(0.97%),其他部位标本 17 株(3.30%)。

2 MRSA 检出率

分离出的 517 株金黄色葡萄球菌,其中 MRSA 共计 257 株,MRSA 在金黄色葡萄球菌中的检出率为 49.71%,其中,2018 年度检出率为 53.92%(110/204 株),2019 年度检出率为 45.77%(65/142 株),2020 年度检出率为 47.95%(82/171 株)。

3 金黄色葡萄球菌耐药性分析

在被检测的 14 种抗菌药物中,青霉素和红霉素的耐药率最高。金黄色葡萄球菌未产生对替考拉宁、利奈唑胺、万古霉素和喹诺普汀/达福普汀产生耐药性。金黄色葡萄球菌的耐药情况见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌对临床常用抗菌药物的耐药率
Table 1 Drug resistance rate of *S. aureus* to commonly used antibiotics in clinic

药物 Drugs	2018 年		2019 年		2020 年	
	株数 Strains	耐药率 (%) Drug resistance rate	株数 Strains	耐药率 (%) Drug resistance rate	株数 Strains	耐药率 (%) Drug resistance rate
克林霉素	125	61.27	73	51.41	103	60.25
青霉素	200	98.04	139	97.89	169	98.83
苯唑西林	89	43.62	75	52.82	88	51.46
红霉素	162	79.41	116	81.69	144	84.21
四环素	122	59.80	72	50.70	72	42.11
庆大霉素	106	51.96	61	42.96	91	53.22
复方新诺明	28	13.73	33	23.24	42	24.56
利福平	85	41.67	69	48.59	90	52.63
环丙沙星	96	47.06	79	55.63	77	45.03
替考拉宁	0	0.00	0	0.00	0	0.00
磺胺甲噁唑	34	16.67	25	17.61	35	20.47
利奈唑胺	0	0.00	0	0.00	0	0.00
万古霉素	0	0.00	0	0.00	0	0.00
喹诺普汀/达福普汀	0	0.00	0	0.00	0	0.00

4 MRSA 与 MSSA 携带耐药基因比较

MRSA 中 *mecA*、*tetM*、*aac(6')/aph(2')*、*aph3'-III*、*ermA*、*ermC* 和 *qacA/B* 基因携带率分别为 100.00%、45.00%、43.00%、33.00%、61.00%、42.00%和 56.00%。MSSA 中 *mecA*、*tetM*、*aac(6')/aph(2')*、*aph3'-III*、*ermA*、*ermC* 和 *qacA/B* 基因携带率分别为 0.00%、31.00%、28.00%、17.00%、48.00%、36.00%和 41.00%。其中 *mecA*、*tetM*、*aac(6')/aph(2')*、*aph3'-III* 和 *qacA/B* 的携带率在 MRSA 与 MSSA 组间比对差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨论

金黄色葡萄球菌广泛存在于自然界也是重要的条件致病菌,在社区和医院均可造成感染^[5]。自 1961 年

第一株 MRSA 出现以来,随着其感染性和耐药性的不断发展,交叉耐药现象严重^[6],导致较高的致病率和致死率,对医疗资源和患者来说都是极大的负担,加强耐药基因方面的监测显得迫切而必要。

表 2 MRSA 与 MSSA 耐药基因检出情况
Table 2 Detection of MRSA and MSSA resistance genes

耐药基因 Drug resistance gene	SA(n=200)		MRSA(n=100)		MSSA(n=100)		P
	携带菌株 (n) Strains	携带率 (%) Carrying rate	携带菌株 (n) Strains	携带率 (%) Carrying rate	携带菌株 (n) Strains	携带率 (%) Carrying rate	
<i>mecA</i>	100	50.00	100	100.00	0	0.00	0.00
<i>tetM</i>	76	38.00	45	45.00	31	31.00	0.04
<i>aac(6')/aph(2')</i>	71	35.50	43	43.00	28	28.00	0.03
<i>aph3'-III</i>	50	25.00	33	33.00	17	17.00	0.01
<i>ermA</i>	109	54.50	61	61.00	48	48.00	0.07
<i>ermC</i>	78	39.00	42	42.00	36	36.00	0.38
<i>qacA/B</i>	97	48.50	56	56.00	41	41.00	0.03

崔家旗等^[7]研究中四川某医院 2018 年收集的 539 株金黄色葡萄球菌中检出 142 株 MRSA,MRSA 的检出率为 26.35%。142 株 MRSA 标本主要来源于痰液(35%)、分泌物(19%)、皮肤组织(16%)、前列腺液(8%)、组织坏死物(6%)、创伤分泌物(6%)、肺泡灌洗液(4%)、其他(4%)及血液(2%)。李丽民等^[8]研究中 3 年内共分离金黄色葡萄球菌 759 株,主要来自痰液占 43.48%,其次是创面分泌物占 16.00%;759 株金黄色葡萄球菌中检出 388 株 MRSA,MRSA 的检出率为 51.12%。徐晨蕾等^[9]对 2016 年-2018 年宁波大学医学院附属医院收集到的 751 株金黄色葡萄球菌中 301 株 MRSA,检出率为 40.08%,且 MRSA 检出率呈下降趋势。本研究收集分离获取的 517 株金黄色葡萄球菌中,菌株来自痰液标本 211 株(40.81%),脓液标本 90 株(17.41%),创面分泌物标本 75 株(14.51%),血液标本 71 株(13.73%),阴道分泌物标本 16 株(3.09%),尿液标本 13 株(2.51%),引流液标本 12 株(2.32%),导管尖端标本 7 株(1.35%),前列腺液标本 5 株(0.97%),其他部位标本 17 株(3.30%)。菌标本主要分布于痰液中,其次是分泌物,这与崔家旗等^[7-8]的研究结果一致。MRSA 共计 257 株,MRSA 的检出率为 49.71%,其中,2018 年度检出率为 53.92%(110/204 株),2019 年度检出率为 45.77%(65/142 株),2020 年度检出率为 47.95%(82/171 株)。根据 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测网数据显示,MRSA 检出率由 2017 年的 35.3%下降至 34.0%^[10]。近 3 年来,本研究 MRSA 检出值高于全国平均水平医院,MRSA 的分离率整体下降,其中 2019 年略低,但 2020 年又出现增长趋势,应当引起临床重视。对比发现不同地区不同医院的 MRSA 检出率差异较大,造成

检出率差异性的原因可能与各医院的专业设置、收治病种、用药习惯及医院对于抗菌药物的管理等有关^[11]。

本研究显示,在被检测的14种抗菌药物中,青霉素、红霉素、克林霉素的耐药率较高,临床需避免继续使用这几类抗菌药物治疗金黄色葡萄球菌感染。金黄色葡萄球菌对复方新诺明和磺胺甲噁唑的耐药率较低,临床可酌情考虑应用。其中金黄色葡萄球菌未对万古霉素、利奈唑胺、替考拉宁和喹诺普汀/达福普汀产生耐药性,在治疗棘手的MRSA感染时,可以考虑使用。

通过对MRSA与MSSA携带耐药基因进行比较发现,MRSA中mecA、tetM、aac(6')/aph(2')、aph3'-III、qacA/B基因携带率为100.00%、45.00%、43.00%、33.00%、56.00%;MSSA中mecA、tetM、aac(6')/aph(2')、aph3'-III、qacA/B基因携带率为0.00%、31.00%、28.00%、17.00%和41.00%,两组比对差异有统计学意义($P < 0.05$)。MRSA的耐药性来源是由于mecA基因编码的PBP2a的耐药性,qacA基因表达多种化合物外排泵蛋白,细菌获得qacA基因可表现为对胺类(如苯扎溴铵)、胍类(如氯己定)胍类消毒剂耐药^[12]。近年来,MRSA不断上升的感染率为医院治疗和预防其感染敲响了警钟,MRSA的控制和预防很大程度上依赖于及时和恰当的抗生素使用。面对MRSA的发展趋势,我们应加强对医护人员的培训与指导,采取多方面的措施来应对。要根据药敏试验的结果合理选择抗菌药物,规范微生物操作流程,提高菌株分离技术,加强医务人员的洗手制度等,使之掌握MRSA感染消毒、隔离、防护管理^[13]。MRSA在环境中存活的时间长,各种环境消毒剂没有显著的效果^[14],因此我们需要选用有效的消毒剂进行消毒灭菌,同时保持病房空气新鲜,对于MRSA感染的高危科室和易感人群要进行细菌检测,做到早发现、早隔离、早治疗,严格地遵守无菌操作原则,还要加强对体质虚弱病人的营养支持。同时患者在住院治疗时,存在许多侵入式操作,容易发生院内感染,这些因素会导致外源性MRSA感染的发生^[15],院感监测部门和临床医务人员应当予以高度关注。

【参考文献】

- [1] Trilla A, Miro JM. Identifying high risk patients for *Staphylococcus aureus* infections: skin and soft tissue infections [J]. Chemother, 1995, 7(Suppl. 3): 37-43.
- [2] Jensen AG, Esersen F, Skinhoj P, et al. *Staphylococcus aureus* meningitis. A review of 104 nationwide, consecutive cases [J]. Arch Intern Med, 1993, 153(8): 1902.
- [3] David MZ. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(3): 616-687.
- [4] Dai YX, Liu J L, Guo W, et al. Decreasing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections is attributable to the disappearance of predominant MRSA ST239 clones, Shanghai, 2008-2017 [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 471-478.
- [5] Delate T, Albrecht G. Ambulatory - treated *Clostridium difficile* infection: a comparison of community acquired vs. nosocomial infection [J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(6): 1225-1235.
- [6] Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, et al. Bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 18(3): 268-281.
- [7] 崔家旗, 许颖, 阮子静, 等. 某院金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性分析 [J]. 南京理工大学学报, 2019, 43(6): 793-799.
- [8] 李丽民, 吴先华, 徐礼锋. 金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药性分析 [J]. 中国医院感染学杂志, 2014, 24(4): 787-789.
- [9] 徐晨蕾, 郑琳, 赵枫. 金黄色葡萄球菌临床感染分布及耐药性变迁的探讨 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(12): 1447-1449.
- [10] 复旦大学附属华山医院抗生素研究所. 中国细菌耐药监测网 [EB/OL]. <http://www.Chinets.Com/Chinet>, 2019.
- [11] 朱葵向, 应华永. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的药敏性变化分析 [J]. 中华全科医学, 2016, 14(4): 635-638.
- [12] Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, et al. Reemergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone [J]. Lancet, 2005, 365(9466): 1256-1258.
- [13] Ellington MJ, Hope R, Livermore DM, et al. Decline of EMRSA-16 amongst methicillin resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemias in the UK between 2001 and 2007 [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(3): 446-448.
- [14] Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in Staphylococci: genes on the move [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 46(1): 8-20.
- [15] 许晓枫, 耿先龙, 周丽珍. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PFGE 分型与医院感染暴发的分子流行病学研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(3): 488-533.

【收稿日期】 2022-07-24 【修回日期】 2022-10-11