

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.11.001

· 论 著 ·

## 凝固酶阴性葡萄球菌生物被膜形成及耐药性分析

胡洪华<sup>1,2</sup>, 杨永长<sup>2</sup>, 肖代雯<sup>2</sup>, 姜伟<sup>2</sup>, 周薇<sup>2</sup>, 喻华<sup>2</sup>, 传良敏<sup>2</sup>, 刘华<sup>2</sup>, 黄文芳<sup>2</sup>

(1 西南交通大学材料学院, 四川 成都 610031; 2 四川省医学科学院 四川省人民医院, 四川 成都 610072)

**[摘要]** **目的** 分析临床血培养报阳的凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)生物被膜形成能力及耐药性特征。**方法** 收集某院临床血培养报阳的 CNS 126 株, 采用 96 孔聚苯乙烯培养板分析生物被膜形成能力, 聚合酶链反应(PCR)法检测细菌耐药基因 *mecA*, 并分析菌株的耐药情况。**结果** 126 株 CNS 中, 87 株(占 69.04%)生物被膜阳性, 105 株(83.33%)携带 *mecA* 基因。CNS 对青霉素、苯唑西林及红霉素的耐药率均 >80%, 未发现对利奈唑胺、奎奴普丁/达福普汀、万古霉素和替加环素耐药的菌株; 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)对环丙沙星、庆大霉素、左氧氟沙星、青霉素、利福平和复方磺胺甲噁唑的耐药率均高于甲氧西林敏感凝固酶阴性葡萄球菌(MSCNS)(均  $P < 0.05$ )。对苯唑西林敏感的 CNS 中, 有 2 株 *mecA* 检测阳性。**结论** 临床血液来源的 CNS 具有较高的生物被膜形成能力, 绝大部分为 MRCNS, 且表现为多重耐药; 存在耐药表型与基因型不一致的菌株。

**[关键词]** 葡萄球菌; 凝固酶阴性葡萄球菌; 生物被膜; *mecA*; 抗药性; 微生物; 病原菌

**[中图分类号]** R378.1<sup>†</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)11-0721-05

## Biofilm formation and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococcus

HU Hong-hua<sup>1,2</sup>, YANG Yong-chang<sup>2</sup>, XIAO Dai-wen<sup>2</sup>, JIANG Wei<sup>2</sup>, ZHOU Wei<sup>2</sup>, YU Hua<sup>2</sup>, CHUAN Liang-min<sup>2</sup>, LIU Hua<sup>2</sup>, HUANG Wen-fang<sup>2</sup> (1 School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2 Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the biofilm forming ability and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococcus(CNS)isolated from blood culture. **Methods** 126 strains of CNS from blood culture in a hospital were collected, biofilm formation was analyzed with 96-well polystyrene plates, and polymerase chain reaction (PCR) was applied to detect *mecA* gene, antimicrobial resistance was analyzed. **Results** Among 126 CNS isolates, 87 (69.04%) were positive for biofilm, 105 (83.33%) carried *mecA* gene. The resistant rates of CNS to penicillin, oxacillin, and erythromycin were all > 80%, none of the strains were resistant to linezolid, quinupristin / dalbapristin, vancomycin, and tigecycline; resistant rates of methicillin-resistant CNS (MRCNS) to ciprofloxacin, gentamicin, levofloxacin, penicillin, rifampicin, and compound sulfamethoxazole were all higher than methicillin-susceptible CNS(MSCNS) (all  $P < 0.05$ ). Of MSCNS, 2 carried *mecA* gene. **Conclusion** CNS isolated from blood have strong biofilm forming ability, most are MRCNS and with multidrug resistance; there are strains with inconsistency of drug-resistant phenotype and genotype.

**[Key words]** *Staphylococcus*; coagulase-negative staphylococcus; biofilm; *mecA*; drug resistance, microbial; pathogen

[Chin Infect Control, 2015, 14(11): 721-725]

[收稿日期] 2015-05-18

[基金项目] 四川省卫生厅科研课题(140077;120072)

[作者简介] 胡洪华(1989-),男(汉族),四川省中江县人,临床检验技师,主要从事微生物耐药研究。

[通信作者] 黄文芳 E-mail: huangwf2002@qq.com

根据 2011—2012 年度卫生部全国细菌耐药监测网(MOHNARIN)血流感染细菌耐药监测数据显示,凝固酶阴性葡萄球菌(*coagulase-negative staphylococcus*, CNS)是革兰阳性菌中引起血流感染的最常见细菌<sup>[1]</sup>。国外研究数据显示, CNS 是引起美国医院导管相关血流感染(*catheter-related bloodstream infection*, CRBSI)最常见的细菌<sup>[2-3]</sup>。CNS 主要致病因素是形成生物被膜,生物被膜的形成能力与细菌的致病能力相关<sup>[4]</sup>。此外, Abdi 等<sup>[5]</sup>研究结果显示,细菌生物被膜的形成可使细菌对抗菌药物的抑菌浓度上升 10~1 000 倍。生物被膜形成提高了细菌的耐药能力,给临床相关感染的治疗带来巨大挑战。本研究以分离自临床血培养报阳的 CNS 为研究对象,分析细菌生物被膜形成能力及耐药特征。对进一步深入研究生物被膜形成机制,探讨 CNS 的致病能力,以及相关感染的治疗具有重要意义。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 2013 年 11 月—2014 年 10 月四川省医学科学院·四川省人民医院住院患者血培养分离的 126 株 CNS,无重复菌株,表皮葡萄球菌 ATCC 12228 为生物被膜阴性对照株。

1.2 仪器与试剂 聚合酶链反应(PCR)试剂为康为世纪公司产品,100 bp DNA Marker 购自北京康为世纪公司,DNA 提取液为中山大学达安基因股份有限公司产品,PCR 扩增仪、电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司,高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司,酶标仪为 Thermo 公司产品,96 孔无菌培养板购自美国 Costar 公司,结晶紫为 Baso 公司产品,大豆蛋白胨、胰蛋白胨、脑心浸液肉汤为青岛海博生物技术公司产品,其余试剂均为国产分析纯试剂。所有引物均由上海英骏公司合成。

1.3 细菌 DNA 提取 复苏低温保存的表皮葡萄球菌,接种至血平板,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,挑起细菌单克隆,收集细菌,10 000 r/min 离心 5 min,去上清,重悬于 30 μL 的 DNA 提取液中,100℃煮沸 10 min 后,10 000 r/min 离心 5 min,上清液即为 CNS 的 DNA。

1.4 生物被膜表型分析 根据文献<sup>[6]</sup>报道的半定量生物被膜检测法,将临床分离的 CNS 及 ATCC 12228 标准菌株接种于 LB 液体培养基,37℃,220 r/min 振荡过夜,用 TSB(含 0.25% 葡萄糖)1:200 稀释加入 96 孔培养板(200 μL/孔),每个样本重复

8 孔,以 TSB 为空白对照,37℃静置培养 72 h;弃去菌液,用超纯水洗 3 次,60℃干燥 1 h,每孔加入 200 μL 0.1% 的结晶紫染色 10 min;用超纯水洗 3 次去除未结合的染料,60℃干燥 1 h,每孔加入 200 μL 5% 的乙酸溶液溶解染料。通过酶标仪测定 570 nm 波长吸光度(A<sub>570 nm</sub>)。生物被膜阳性菌株的筛选条件为:阴性对照 ATCC 12228 标准菌株平均 A 值+3 倍标准差为界定值,以标本的平均 A 值大于界定值为生物被膜形成株。

1.5 *mecA* 基因检测 采用 PCR 法进行 CNS 耐药基因 *mecA* 检测,引物序列为 *mecA*-F:5'-TCCA-GATTACAACCTCACCAGG-3'; *mecA*-R:5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3',产物大小为 527 bp。基因检测配制 20 μL 反应体系:2×Taq Master Mix 10 μL,上下游引物各 1 μL,DNA 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 6 μL。PCR 反应条件为 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。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后 Bio-Rad 凝胶成像仪检测。

1.6 菌株鉴定及药敏试验 采用全自动微生物药敏及鉴定系统 VITEK 2 Compact 进行分析,细菌接种于血平板,37℃过夜培养,挑起单克隆,调整细菌浓度,通过对应的鉴定板,直接上机检测。抗菌药物包括环丙沙星、庆大霉素、左氧氟沙星、利奈唑胺、莫西沙星、呋喃妥因、苯唑西林、青霉素、奎奴普丁/达福普汀、利福平、四环素、复方磺胺甲噁唑、万古霉素、红霉素、克林霉素、替加环素共 16 种。

1.7 统计方法 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,率的比较采用双侧 Fisher 检验及双侧  $\chi^2$  分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CNS 来源科室分布 临床分离血培养报阳的 126 株 CNS 标本主要来源于重症监护病房(ICU)、老年内科和儿科。见表 1。

2.2 CNS 生物被膜形成及菌种分布 标准菌株 ATCC 12228 为阴性对照,其 A 值为  $0.28 \pm 0.02$ ,以 A 值  $> 0.33$  为生物被膜阳性判定标准。126 株 CNS 中,87 株(69.04%)生物被膜阳性,其中 10 株临床分离的 CNS 生物被膜形成能力的检测结果见图 1。126 株 CNS 中有 65 株为表皮葡萄球菌,占 51.59%,其中生物被膜阳性 44 株,占 67.69%。见表 2。

2.3 *mecA* 基因检测结果 以 ATCC 12228 标准菌株为阳性对照,126 株 CNS 中,105 株(83.33%)携带 *mecA* 基因,对应的阳性菌株在目标区带均出现明亮的电泳条带。见图 2。

2.4 药敏试验结果 CNS 对青霉素的耐药率最高,为 92.86%;未发现对利奈唑胺、奎奴普丁/达福普汀、万古霉素和替加环素耐药的菌株。见图 3。

2.5 甲氧西林敏感凝固酶阴性葡萄球菌(MSCNS)与耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)耐药率比较 126 株 CNS,其中 MRCNS 105 株、MSCNS 21 株。MRCNS 对环丙沙星、庆大霉素、左氧氟沙星、青霉素、利福平和复方磺胺甲噁唑的耐药率均高于 MSCNS(均  $P < 0.05$ )。见表 3。2 株 CNS 对苯唑西林敏感,但 *mecA* 检测阳性。

表 1 126 株 CNS 临床科室分布

Table 1 Department distribution of 126 CNS isolates

科室	株数	构成比(%)
ICU	33	26.19
老年内科	19	15.08
儿科	14	11.11
肾内科	11	8.73
普通外科	8	6.35
血液内科	7	5.56
骨科	6	4.76
呼吸内科	6	4.76
感染科	5	3.97
神经内科	5	3.97
妇产科	4	3.17
风湿内科	3	2.38
其他科	5	3.97
合计	126	100.00

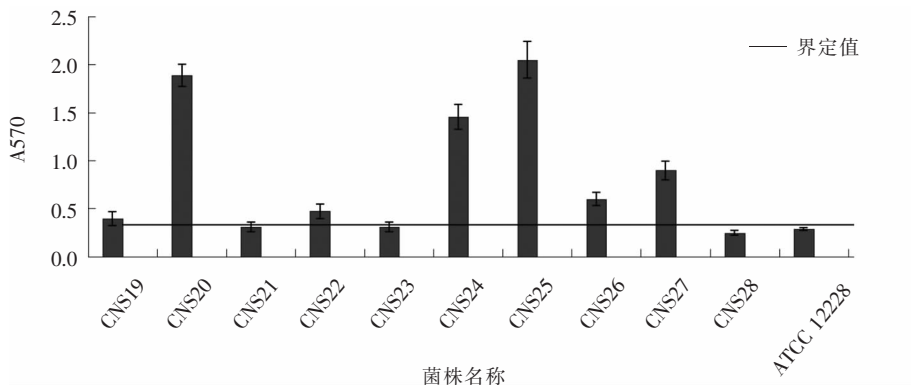


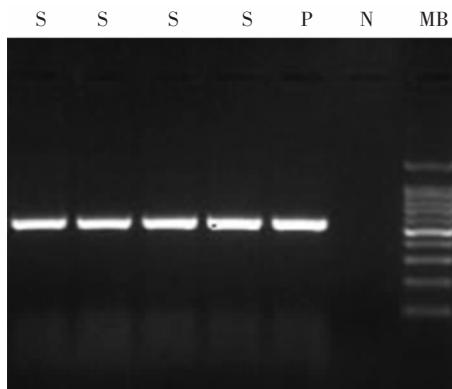
图 1 CNS 生物被膜形成能力检测结果

Figure 1 Detection results of biofilm forming ability of CNS isolates

表 2 126 株 CNS 菌种分布及生物被膜形成情况

Table 2 Species distribution and biofilm formation of 126 CNS isolates

CNS 菌种	菌株数	构成比(%)	生物被膜阳性(株,%)
表皮葡萄球菌	65	51.59	44(67.69)
人葡萄球菌	27	21.43	21(77.78)
头状葡萄球菌	14	11.11	11(78.57)
溶血葡萄球菌	10	7.94	3(30.00)
科氏葡萄球菌	4	3.18	2(50.00)
缓慢葡萄球菌	2	1.59	2(100.00)
腐生葡萄球菌	1	0.79	1(100.00)
木糖葡萄球菌	1	0.79	1(100.00)
沃氏葡萄球菌	1	0.79	1(100.00)
鸡葡萄球菌	1	0.79	1(100.00)



S: CNS; P: 阳性对照; N: 阴性对照; MB: 100 bp DNA Marker

图 2 CNS *mecA* 基因 PCR 产物电泳图

Figure 2 PCR electrophoresis map of *mecA* gene in CNS isolates

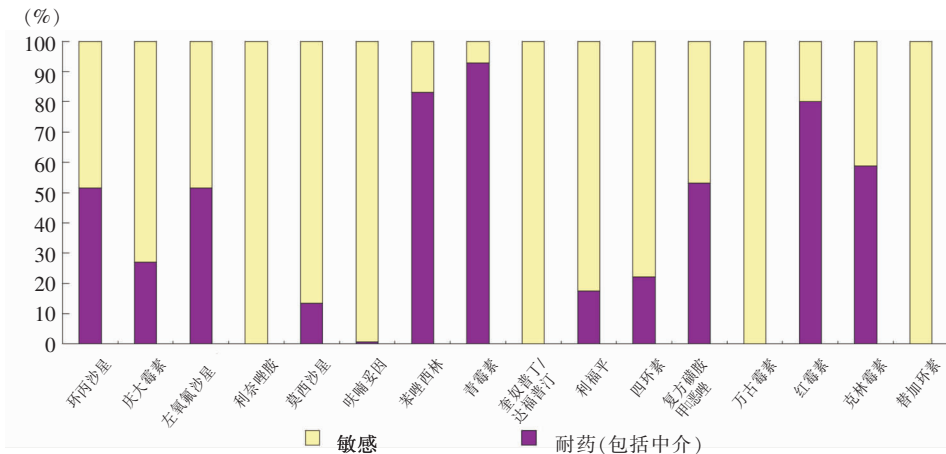


图 3 126 株 CNS 对 16 种抗菌药物的耐药率

Figure 3 Antimicrobial resistant rates of 126 CNS isolates to 16 kinds of antimicrobial agents

表 3 MSCNS、MRCNS 耐药率比较

Table 3 Comparison of antimicrobial resistant rates of MSCNS and MRCNS

抗菌药物	MSCNS (%)	MRCNS (%)	$\chi^2$	P
环丙沙星	26.32	56.07	5.72	0.02
庆大霉素	5.26	30.84	5.39	0.02
左氧氟沙星	26.32	56.07	5.72	0.02
莫西沙星	5.26	14.95	1.30	0.47
苯唑西林	0.00	98.10	112.85	<0.001
青霉素	78.95	95.33	6.53	0.03
利福平	0.00	20.56	4.73	0.03
四环素	15.79	23.36	0.54	0.46
复方磺胺甲噁唑	21.05	58.88	9.27	0.003
红霉素	68.42	82.24	1.94	0.21
克林霉素	31.58	59.81	2.55	0.13

### 3 讨论

CNS 是人体皮肤及黏膜组织的正常菌群,因其长期以来被考虑为污染菌,对人类感染性疾病缺乏系统性的研究资料<sup>[7]</sup>。然而近年研究<sup>[8-9]</sup>发现,CNS 导致相关感染性疾病的报道越来越多,逐渐被重视。研究<sup>[10]</sup>发现,CNS 所导致的相关感染可能威胁免疫缺陷患者生命。CNS 主要致病因素是形成生物被膜,生物被膜的形成能力与细菌的致病能力相关<sup>[4]</sup>。此外,May 等<sup>[7]</sup>通过分析 1999—2012 年美国 CNS 耐药性情况变化,发现 CNS 可以视为监测其他致病菌耐药情况的“哨兵”,也是其他致病菌耐药基因的“库房”。我国血流感染发病率及病死率逐年上升,但 CNS 导致的相关感染资料及流行病学资料较少<sup>[7,11]</sup>。因此,系统分析临床分离的 CNS 耐药性特征及生物被膜形成能力十分有意义。

收集临床血培养 CNS 126 株,分离自 ICU 的菌

株最多(33 株,占 26.19%),其次为老年内科(19 株,占 15.08%),儿科(14 株,占 11.11%),肾脏内科(11 株,占 8.73%),这可能与 ICU 科室介入性操作较多,老年内科患者和儿科患者住院时间长,免疫功能普遍较低等有关,提示 CNS 感染与患者免疫力的强弱相关。肾脏内科患者长期血液透析和腹膜透析,可能导致 CNS 感染风险增高。生物被膜形成是 CNS 的主要致病机制,生物被膜相关感染具有持续性和反复性,难以根治<sup>[12-13]</sup>。

126 株 CNS 中,表皮葡萄球菌占 51.59% (65 株),该结果与 Bouchami 等<sup>[14]</sup>报道的数据接近。其次人葡萄球菌、头状葡萄球菌和溶血葡萄球菌,分别为 27、14 和 10 株;科氏葡萄球菌 4 株,缓慢葡萄球菌 2 株,腐生葡萄球菌、木糖葡萄球菌和沃氏葡萄球菌各 1 株。提示临床分离的 CNS 种类广泛,分析其生物被膜形成能力及耐药特征十分有意义。126 株 CNS 中,87 株(69.05%)生物被膜阳性,提示临床分离的 CNS 具有较强的生物被膜形成能力。10 株溶血葡萄球菌仅 3 株为生物被膜阳性菌株,较其他 CNS 形成生物被膜的能力偏低。溶血葡萄球菌是常见 CNS,连双庆等<sup>[15]</sup>发现,溶血性葡萄球菌是导致 ICU 相关感染的重要病原菌。增加标本数量,进一步分析溶血葡萄球菌的生物被膜形成能力是下一步的研究方向。

青霉素的广泛使用,导致了对其耐药的葡萄球菌不断攀升。甲氧西林及其衍生类抗生素被用于治疗葡萄球菌所致的感染,其后,不断有耐甲氧西林葡萄球菌的报道。本研究中,126 株 CNS 中,MRCNS 105 株,占 83.33%。CNS 对青霉素的耐药最高,为 92.86%;其次为苯唑西林和红霉素,耐药率分别为

81.75%和 80.16%;复方磺胺甲噁唑、克林霉素、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率分别为 53.17%、58.73%、51.59%和 51.59%;未发现对利奈唑胺、奎奴普丁/达福普汀、万古霉素和替加环素耐药的菌株,与陈重等<sup>[16]</sup>报道的深圳南山医院细菌耐药情况接近。2006 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)明确指出,MRCNS 对青霉素、碳青霉烯、头孢烯、 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药,不应该被用于 MRCNS 相关感染的治疗。近年很多研究<sup>[17-19]</sup>结果表明,耐甲氧西林葡萄球菌已经开始对更多的抗菌药物耐药,如喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类、复方磺胺甲噁唑和庆大霉素。本研究,MRCNS 对环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素、青霉素、利福平和复方磺胺甲噁唑的耐药率高于 MSCNS。此外,从苯唑西林敏感的 CNS 中,检测 2 株 *mecA* 阳性株。基因型和表型差异可能与 SCC*mec* 中与苯唑西林结合位点的缺失相关<sup>[20]</sup>。

综上所述,研究结果显示临床血液来源的 CNS 具有科室差异,且具有较高的生物被膜形成能力,绝大部分为 MRCNS。MRCNS 表现为多重耐药,如对环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素、青霉素、利福平和复方磺胺甲噁唑等耐药。存在 *mecA* 阳性,但对苯唑西林敏感的 CNS,可能与 SCC*mec* 相关,有待下一步研究。

#### [参 考 文 献]

[1] 吕媛,李耘,薛峰,等. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín) 2011-2012 年度血流感染细菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3):278-288.

[2] Wisplinghoff H, Seifert H, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2003, 22(8):686-691.

[3] Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with health-care-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007 [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29(11):996-1011.

[4] Grice EA, Segre JA. The skin microbiome [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(4):244-253.

[5] Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27(3):196-200.

[6] 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.

[7] May L, Klein EY, Rothman RE, et al. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci in the United States, 1999 to 2012 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(3):1404-1409.

[8] 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.

[9] 李俐,林玲,裴迎新,等. 医疗环境凝固酶阴性葡萄球菌耐药性监测及耐药基因研究 [J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(2):97-103.

[10] Ahlstrand E, Persson L, Tidefelt U, et al. Alteration of the colonization pattern of coagulase-negative staphylococci in patients undergoing treatment for hematological malignancy [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(7):1679-1687.

[11] 张丽丽,刘梅,陈明. 血流感染研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(4):589-592.

[12] Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2015, 5:14.

[13] 袁展望,李武平,刘冰,等. 生物被膜预防与治疗进展 [J]. 中国感染控制杂志, 2014, 16(9):571-574.

[14] Bouchami O, Achour W, Mekni MA, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from bacteremic patients in oncohematology [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2011, 56(2):122-130.

[15] 连双庆,陈榆生,许能奎,等. 重症监护室溶血性葡萄球菌医院感染危险因素病例对照研究 [J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10(5):357-360.

[16] 陈重,廉婕,潘伟光,等. 深圳南山医院 2010 年细菌耐药性监测 [J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(2):128-133.

[17] Huang SY, Tang RB, Chen SJ, et al. Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in critically ill children: risk factors and antimicrobial susceptibility [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2003, 36(1):51-55.

[18] Lerbech AM, Opintan JA, Bekoe SO, et al. Antibiotic exposure in a low-income country: screening urine samples for presence of antibiotics and antibiotic resistance in coagulase negative staphylococcal contaminants [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):e113055.

[19] Knauer A, Fladerer P, Strempl C, et al. Effect of hospitalization and antimicrobial therapy on antimicrobial resistance of colonizing *Staphylococcus epidermidis* [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2004, 116(14):489-494.

[20] Forbes BA, Bombicino K, Plata K, et al. Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 61(4):387-395.