

# 金黄色葡萄球菌的耐药性及生物被膜形成能力研究

钱卫东<sup>1</sup>, 沈兰芳<sup>1</sup>, 王婷<sup>1</sup>, 李永东<sup>2</sup>, 刘婵婵<sup>1</sup>, 薛仁政<sup>1</sup>, 杨婵<sup>1</sup>

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西西安 710021) (2. 宁波疾病预防控制中心, 浙江宁波 315000)

**摘要:** 为分析金黄色葡萄球菌的耐药情况及生物被膜形成能力, 以 70 株金黄色葡萄球菌为研究对象。利用纸片扩散法分析其耐药谱, 组合利用刚果红平板测试法和结晶紫染色法分析其生物被膜形成能力。应用 PCR 技术检测生物被膜形成相关基因, 并分析这些菌株耐药谱与其生物被膜形成能力强弱之间的关系。结果表明: 金黄色葡萄球菌菌株耐药情况较为严重, 其中 97.14% 的菌株具有耐药性; 所有菌株均能形成生物被膜, 能形成强、中等与弱粘附生物被膜能力的菌株分别占 71.43%、18.57% 和 10%; 生物被膜相关基因 *fnbA*、*fnbB* 和 *clfB* 的检出率分别为 57.14%、20.00% 和 44.29%; 生物被膜形成能力强的菌株, 其耐药谱更广, 且对利奈唑胺的耐药率差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。临床来源的金黄色葡萄球菌多重耐药性和生物被膜普遍存在, 已成为食品安全中的隐患来源, 研究结果为控制金黄色葡萄球菌感染提供理论依据。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 生物被膜; 生物被膜相关基因; 食品安全

文章编号: 1673-9078(2019)09-132-139

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.016

## Drug Resistance and Biofilm-forming Ability of *Staphylococcus Aureus*

QIAN Wei-dong<sup>1</sup>, SHEN Lan-fang<sup>1</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>, LI Yong-dong<sup>2</sup>, LIU Chan-chan<sup>1</sup>, XUE Ren-zheng<sup>1</sup>,  
YANG Chan<sup>1</sup>

(1.College of Food and Bioengineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

(2.Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315000, China)

**Abstract:** To study the drug resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), 70 strains of *S. aureus* were used as research objects. Their drug resistance spectra were analyzed by the paper diffusion method, while their biofilm-forming ability was examined using the Congo red plate test and crystal violet staining method. The biofilm formation related genes were detected by PCR, and the relationship between the drug resistance spectrum of these strains and their biofilm-forming abilities was analyzed. The results showed that the drug-resistance of *S. aureus* strains was more severe, of which 97.14% were resistant strains. All the strains could form biofilm, and the strains capable of forming biofilms with strong, medium and weak adhesive strength accounted for 71.43%, 18.57% and 10%, respectively. The detection rates of biofilm-related genes, *fnbA*, *fnbB* and *clfB*, were 57.14%, 20.00% and 44.29%, respectively. The strain with strong biofilm-forming ability had a broader spectrum drug resistance, and exhibited statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences in the resistance rate to linezolid. The multi-drug resistance and ubiquitous biofilm of clinically-derived *S. aureus* have become a source of food safety hazards. The research results provide a theoretical basis for controlling *S. aureus* infections.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; drug resistance; biofilm; biofilm-related genes; food safety

金黄色葡萄球菌是造成医院和社区获得性感染的致病性细菌之一<sup>[1]</sup>, 常引起局部皮肤、组织、器官的化脓性感染, 甚至造成菌血症和中毒性休克<sup>[2-4]</sup>。同时, 金黄色葡萄球菌也是一种常见的食源性致病菌, 其常存在于空气、水、灰尘及人和动物的排泄物中, 临床

收稿日期: 2019-02-26

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2019NY-004、2017TSCXL-NY-02-04); 陕西省教育厅科研计划项目 (18JC006、18JK0097); 西安市未央区项目 (201707); 中国富硒产业研究院富硒专项科技计划项目 (2018FXZX03-15)

作者简介: 钱卫东 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子微生物学

通讯作者: 李永东 (1981-), 男, 博士, 研究方向: 分子流行病学

132

来源的金黄色葡萄球菌是食品安全的重要污染源之一。近年来, 致病性细菌引发的食品安全问题备受关注, 其中金黄色葡萄球菌污染食物所导致的食源性疾病也时常报道<sup>[5]</sup>。目前, 抗生素是控制金黄色葡萄球菌感染的有效措施, 但是随着抗生素的过度使用, 临床出现了大量的耐药菌株<sup>[6]</sup>。

生物被膜是细菌及其自身分泌的胞外聚合物组成的细菌聚集膜样物, 研究表明细菌感染及其耐药与生物被膜有明显关系, 细菌形成生物被膜后对抗生素均表现出高水平的耐受性且不易被清除<sup>[7-9]</sup>。金黄色葡萄球菌一旦形成生物被膜, 能有效阻止抗生素进入细胞体内杀灭菌体, 促使耐药性形成, 这一现象备受研究

人员的关注<sup>[10]</sup>。以生物被膜状态存在金葡菌能抵抗多种不良的生存环境,导致在食品生产及加工环境中,常规的清洗与消毒根本无法完全清除。更为严重的是,以生物被膜状态存在的金黄色葡萄球菌使得耐药状况在食品领域广泛传播,将引起严重恐慌。

本研究以 70 株临床来源的金黄色葡萄球菌为研究对象,并对这些临床菌株的耐药性、生物被膜形成能力及生物被膜相关基因进行了分析,旨在为金黄色葡萄球菌耐药性与生物被膜之间关系研究奠定基础,也为控制金黄色葡萄球菌感染提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

收集 2013~2014 年宁波某妇儿医院 435 例各科室住院患者的送检标本,将患者送检标本进行金黄色葡萄球菌培养及分离纯化,采用细菌鉴定仪进行鉴定,得到 70 株金黄色葡萄球菌,剔除同一患者同一部位的重复菌株,将分离获得的金黄色葡萄球菌菌株保存在 -80 °C 冰箱中。

### 1.2 主要试剂和仪器

实验所用药敏实验纸片:甲氧苄啶(SXT, 10 µg)、利奈唑胺(LZD, 10 µg)、庆大霉素(CN, 10 µg)、环丙沙星(CIP, 5 µg)、青霉素(P, 10 µg)、头孢唑啉(KZ, 30 µg)、克林霉素(DA, 2 µg)、万古霉素(VA, 30 µg)、苯唑西林(OX, 1 µg)、哌拉西林(TZP, 110 µg)由宁波市疾控中心提供;LB 液体培养基,CMO 337 固体培养基,购自英国 OXOID 公司;脑心浸培养基,购自北京 Solarbio 科技有限公司;PCRMix, 购自北京碧云天生物技术有限公司;DL2000 DNA Marker, 购自中国天根生化有限公司;DNA 提取试剂盒,美国 Sigma 公司产品;PCR 产物回收试剂盒,北京 TransGen 生物公司产品;MgCl<sub>2</sub>、Tris-HCl、ddH<sub>2</sub>O, 上海生工生物工程公司产品;96 孔酶标板、24 孔深孔板、美国 Corning 公司;Multiskan GO 全波长酶标仪,美国 ThermoFisher 公司;恒温摇床,哈尔滨东联电子;PCR 扩增仪,购于美国赛默飞公司;离心机,购于美国 Sigma 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 药敏实验

将临床菌株和 ATCC5923 (参考菌株)进行复苏并经平板划线培养,挑取单菌落接种到含 2.5 mL LB 液体培养基的 24 深孔板中,37 °C、130 r/min 摇床培

养 24 h,随后用 LB 液体培养基将菌液浓度调至 OD<sub>600</sub> 为 0.5,再用棉签蘸取菌液涂布于 CMO337 固体平板(平行重复 3 次),待菌液完全吸收后贴上不同的药敏纸片,37 °C 恒温静置培养 48 h,测定抑菌圈直径,3 次生物学重复后进行数据分析。药敏实验的标准参照 CLSI (2017) 中文版标准。

#### 1.3.2 刚果红平板测试法

将 0.8 g 刚果红溶于 10 mL 的蒸馏水中,121 °C 灭菌 15 min;将 50 g 蔗糖,37 g 脑心浸肉汤,10 g 琼脂混合,加蒸馏水至 990 mL,121 °C 灭菌 15 min 后,待培养基温度降低到 50~55 °C 时,将上述两种溶液混匀,制成刚果红琼脂平板。用接种环挑取培养好的菌株划线于刚果红琼脂平板上,于恒温培养箱内 37 °C 培养 18 h,最后置于室温 72 h 后观察菌落变化特点。

#### 1.3.3 结晶紫染色实验

挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中,37 °C、130 r/min 过夜培养,调整菌液浓度至 OD<sub>600</sub> 为 0.1,在无菌 96 孔细胞培养板中加入菌液 200 µL,阴性对照孔加入等量的 LB 液体培养基,37 °C 培养 24 h;弃去培养液并用无菌 PBS (pH=7.2) 轻轻洗涤 3 次,以洗去浮游菌,然后在各孔中加入 200 µL 甲醇固定,15 min 后弃去甲醇;经自然风干处理后每孔加 200 µL 0.1% 结晶紫染色 30 min,再用无菌 PBS 洗涤 3 次,自然风干;最后每孔加 200 µL 95% 乙醇溶解后,酶标仪测定 OD<sub>595</sub>。平行 3 个重复,计算其平均值。OD 值反映生物被膜与接触表面黏附的牢固程度,依据临界 OD<sub>c</sub> 值(OD<sub>c</sub> 是由空白孔的平均值加上其 3 倍的标准差而得到的 OD 值),可将生物被膜分成以下四类:OD≤OD<sub>c</sub> 为不黏附(0),OD<sub>c</sub><OD≤2OD<sub>c</sub> 为弱黏附(+),2OD<sub>c</sub><OD≤4OD<sub>c</sub> 为中等黏附(++),OD>4OD<sub>c</sub> 为强黏附(+++)。

#### 1.3.4 生物被膜相关基因检测

将 70 株临床菌株在 LB 培养基中过夜培养,分别取 1.5 mL 细菌培养液,8000 r/min 离心 1 min,收集菌体,细菌 DNA 基因组提取严格按基因组提取试剂盒说明书进行。

以基因组总 DNA 为模板,分析金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因 *clfB*、*fmbB*、*fmbA* 的检出情况。扩增基因所用引物见表 1 所示。PCR 反应体系:1.5 µL 模板,10 µL 2×Mix,0.5 µL 上游引物,0.5 µL 下游引物,加 ddH<sub>2</sub>O 到总体积 20 µL。扩增程序为:94 °C 热激 5 min,30 个循环(94 °C 变性,30 s;50 °C 退火,30 s;72 °C 延伸 1~1.5 min),72 °C 10 min。取扩增产物 6 µL 在 1% 的琼脂糖上进行检测。

表 1 生物被膜相关基因引物序列<sup>[11]</sup>

| Table 1 Biofilm-related gene primer sequences |                                |      |
|-----------------------------------------------|--------------------------------|------|
| 基因                                            | 寡核苷酸序列 (5'-3')                 | 基因大小 |
| fmbA                                          | GATACAAACCCAGGTGGTGG           | 191  |
|                                               | TGTGCTTGACCATGCTCTTC           |      |
| fmbB                                          | ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG          | 197  |
|                                               | ACCTTCTGCATGACCTTCTGCACCT      |      |
| clfB                                          | CCGGATCCGTAGCTGCAGATGCACC      | 1000 |
|                                               | GCTCTAGATCACTCATCAGGTTGTTTCAGG |      |

1.3.5 统计分析

数据用 Excel 处理后, 利用 SPSS Statistics 22 软件进行统计学分析, 两组数据比较采用非参数检验中的独立样本检验,  $p<0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 金黄色葡萄球菌的临床信息统计

表 2 临床菌株背景信息

| Table 2 Clinical strain background information |         |    |       |
|------------------------------------------------|---------|----|-------|
| 项目                                             | 分类      | 数量 | 比例/%  |
| 来源部位                                           | 分泌物     | 22 | 31.43 |
|                                                | 脓液      | 22 | 31.43 |
|                                                | 痰       | 26 | 37.14 |
| 性别                                             | 男       | 35 | 50.00 |
|                                                | 女       | 35 | 50.00 |
| 年龄                                             | <1 月    | 25 | 35.71 |
|                                                | 1 月~1 年 | 25 | 35.71 |
|                                                | >1 年    | 20 | 28.57 |
| 病症程度                                           | 普通      | 51 | 72.86 |
|                                                | ICU 重症  | 19 | 27.14 |

70 株临床菌株信息如表 2 所示。按照来源分类, 分泌物来源、脓液来源、痰来源的菌株所占比例分别为 31.43%、31.43%和 37.14%; 按照性别分类, 男性来源和女性来源的菌株所占的比例均为 50%; 按照年龄大小分类, 小于 1 个月的患者来源、在 1 月和 1 岁之间的患者来源、大于 1 岁的患者来源的菌株所占比例分别为 35.71%、35.71%和 28.57%; 按照病症程度分类, 普通病房患者来源和 ICU 重症患者来源的菌株所占比例为 72.86%和 27.14%。

2.2 药敏实验结果分析

以金黄色葡萄球菌 ATCC5923 为参考菌株, 对 70 株金黄色葡萄球菌进行了耐药性检测, 分析了菌株对不同抗生素的耐药性 (图 1)。

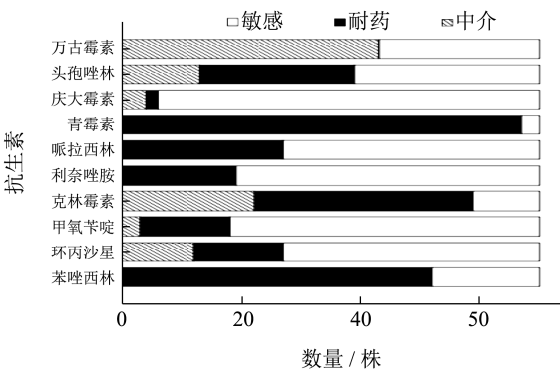


图 1 金黄色葡萄球菌对不同抗生素的耐药性

Fig.1 Resistance of Staphylococcus aureus to different antibiotics

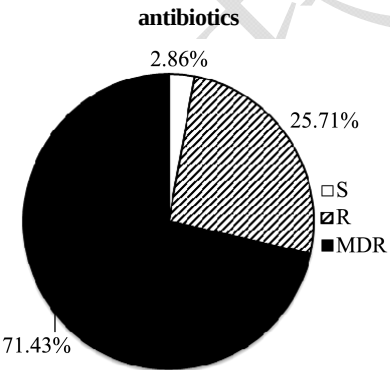


图 2 金黄色葡萄球菌对不同抗生素的抗性百分比

Fig.2 Percentage of resistance of Staphylococcus aureus to different antibiotics

注: S: 敏感菌株; R: 抗性菌株; MDR: 多重耐药菌株。

这些菌株除了对万古霉素未产生耐药外, 对甲氧苄啶、利奈唑胺、庆大霉素、环丙沙星、青霉素、头孢唑林、克林霉素、苯唑西林、哌拉西林都产生了一定程度的耐药, 这可能与这些抗菌药物的临床使用情况存在直接关系。其中对青霉素的耐药率为 95.71%, 对同为青霉素类药物的苯唑西林耐药率为 74.29%, 对大环内酯类药物克林霉素的耐药率为 52.86%, 对利奈唑胺、甲氧苄啶、庆大霉素、环丙沙星、头孢唑林和哌拉西林耐药率均较低, 分别为 27.14%、21.43%、2.86%、21.43%、37.14%和 38.57%。所有分离菌株对万古霉素均敏感, 表明万古霉素仍是治疗多重耐药金黄色葡萄球菌的有效药物, 在治疗由金黄色葡萄球菌感染诱发的疾病时可以优先考虑万古霉素, 但值得注意的是长期大量使用万古霉素, 细菌对万古霉素的耐药性将会出现并有所增加。

将本实验结果与其他报道对比, 发现与刘杰<sup>[12]</sup>和朱厚军<sup>[13]</sup>等人报道的金黄色葡萄球菌对利奈唑胺、头孢唑林和苯唑西林的耐药率低于 0%、5.41%和 57.4%。本实验所研究的金黄色葡萄球菌对这些抗生素耐药率较高, 分别为 27.1%、37.1%和 74.3%。

这可能归因于长期使用这三种抗生素, 促使细菌

对这些抗生素的耐药能力快速提高。特别需要注意的是这些菌株对利奈唑胺的耐药率达 27.1%，这启示医生在选择抗生素治疗时，需要将利奈唑胺与其他抗生素协同使用。左祥等人<sup>[14]</sup>报道金黄色葡萄球菌对甲氧苄啶和庆大霉素的耐药率为 70.27%和 24.32%，而本实验结果显示金黄色葡萄球菌对这两种抗生素的耐药率较低，为 21.4%和 2.9%，这可能是由于菌株来源地区差异造成的。

根据菌株对抗生素的抗性情况，菌株可分为易感

菌株（S，对所有抗生素敏感）、抗性菌株（R，耐 1~2 种抗生素）和多重耐药菌株（MDR，对 3 种或更多抗生素有抵抗力）<sup>[15]</sup>。如图 2 所示，菌株中 2.86%为敏感菌株，25.71%为耐药菌株，71.43%为多重耐药菌株，金黄色葡萄球菌多重耐药情况严重。

### 2.3 不同临床特征金黄色葡萄球菌的耐药性

分析

表 3 不同来源部位的金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药情况

Table 3 Resistance of antibiotics to *Staphylococcus aureus* from different source sites

| 抗生素种类        | 抗生素  | 来源部位 | 耐药率/% | 中介率/% | 敏感率/% | p 值   |
|--------------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 恶唑烷酮         | 利奈唑胺 | 脓液   | 8.57  | 0.00  | 22.86 | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 8.57  | 0.00  | 22.86 |       |
|              |      | 痰    | 10.00 | 0.00  | 27.14 |       |
| 磺胺类          | 甲氧苄啶 | 脓液   | 8.57  | 0.00  | 22.86 | <0.05 |
|              |      | 分泌物  | 4.29  | 0.00  | 27.14 |       |
|              |      | 痰    | 8.57  | 3.00  | 24.29 |       |
| 氨基糖苷         | 庆大霉素 | 脓液   | 1.43  | 1.00  | 28.57 | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 1.43  | 1.00  | 28.57 |       |
|              |      | 痰    | 0.00  | 2.00  | 34.29 |       |
| 喹诺酮类         | 环丙沙星 | 脓液   | 5.71  | 1.00  | 24.29 | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 7.14  | 5.00  | 17.14 |       |
|              |      | 痰    | 8.57  | 6.00  | 20.00 |       |
| 头孢类          | 头孢唑啉 | 脓液   | 12.86 | 3.00  | 14.29 | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 10.00 | 6.00  | 12.86 |       |
|              |      | 痰    | 14.29 | 4.00  | 17.14 |       |
| 大环内酯类        | 克林霉素 | 脓液   | 18.57 | 3.00  | 8.57  | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 15.71 | 9.00  | 2.86  |       |
|              |      | 痰    | 18.57 | 10.00 | 4.29  |       |
| 青霉素类         | 青霉素  | 脓液   | 30.00 | 0.00  | 1.43  | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 30.00 | 0.00  | 1.43  |       |
|              |      | 痰    | 35.71 | 0.00  | 1.43  |       |
|              | 苯唑西林 | 脓液   | 21.43 | 0.00  | 10.00 | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 24.29 | 0.00  | 7.14  |       |
|              |      | 痰    | 28.57 | 0.00  | 8.57  |       |
| $\beta$ -内酰胺 | 哌拉西林 | 脓液   | 10.00 | 0.00  | 21.43 | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 10.00 | 0.00  | 21.43 |       |
|              |      | 痰    | 18.57 | 0.00  | 18.57 |       |
| 糖肽类          | 万古霉素 | 脓液   | 0.00  | 0.00  | 27.15 | >0.05 |
|              |      | 分泌物  | 0.00  | 4.00  | 25.71 |       |
|              |      | 痰    | 0.00  | 10.00 | 26.00 |       |

表 4 不同年龄来源的金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药情况

Table 4 Resistance of antibiotics to *Staphylococcus aureus* from different ages

| 抗生素种类        | 抗生素  | 年龄      | 耐药率/% | 中介率/% | 敏感率/% | <i>p</i> 值 |
|--------------|------|---------|-------|-------|-------|------------|
| 恶唑烷酮         | 利奈唑胺 | <1 月    | 8.57  | 0.00  | 27.14 | >0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 12.86 | 0.00  | 22.86 |            |
|              |      | >1 年    | 5.71  | 0.00  | 22.86 |            |
| 磺胺类          | 甲氧苄啶 | <1 月    | 10.00 | 0.00  | 25.71 | >0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 7.14  | 2.86  | 25.71 |            |
|              |      | >1 年    | 2.86  | 1.43  | 24.29 |            |
| 氨基糖苷         | 庆大霉素 | <1 月    | 0.00  | 2.86  | 32.86 | <0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 1.43  | 2.86  | 31.43 |            |
|              |      | >1 年    | 1.43  | 0.00  | 27.14 |            |
| 喹诺酮类         | 环丙沙星 | <1 月    | 10.00 | 7.14  | 18.57 | >0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 2.86  | 7.14  | 25.71 |            |
|              |      | >1 年    | 8.57  | 2.86  | 17.14 |            |
| 头孢类          | 头孢唑啉 | <1 月    | 8.57  | 7.14  | 20.00 | >0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 18.57 | 5.71  | 11.43 |            |
|              |      | >1 年    | 10.00 | 5.71  | 12.86 |            |
| 大环内酯类        | 克林霉素 | <1 月    | 17.14 | 12.86 | 5.71  | >0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 20.00 | 10.00 | 5.71  |            |
|              |      | >1 年    | 15.71 | 8.57  | 4.29  |            |
| 青霉素类         | 青霉素  | <1 月    | 34.29 | 0.00  | 1.43  | >0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 35.71 | 0.00  | 0.00  |            |
|              |      | >1 年    | 2.86  | 0.00  | 25.71 |            |
|              | 苯唑西林 | <1 月    | 24.29 | 0.00  | 11.43 | >0.05      |
|              |      | 1 月~1 年 | 28.57 | 0.00  | 7.14  |            |
| $\beta$ -内酰胺 | 哌拉西林 | >1 年    | 21.43 | 0.00  | 7.14  | >0.05      |
|              |      | <1 月    | 11.43 | 0.00  | 24.29 |            |
|              |      | 1 月~1 年 | 18.57 | 0.00  | 17.14 |            |
| 糖肽类          | 万古霉素 | >1 年    | 8.57  | 0.00  | 20.00 | >0.05      |
|              |      | <1 月    | 0.00  | 4.29  | 31.43 |            |
|              |      | 1 月~1 年 | 0.00  | 14.29 | 22.86 |            |
|              |      | >1 年    | 0.00  | 5.71  | 22.86 |            |

根据样本来源（分泌物、脓液、痰）分析金黄色葡萄球菌对不同抗生素的耐药情况，结果如表 3 所示。来源于痰的菌株对利奈唑胺、环丙沙星、头孢唑啉、苯唑西林、哌拉西林的耐药率最高，而对于克林霉素、甲氧苄啶这三种抗生素表现出和脓液相同的耐药率。其中，来源于脓液（8.57%）和痰（8.57%）的菌株对磺胺类药物甲氧苄啶的耐药率显著高于来源于分泌物（4.29%）的菌株，差异有统计学意义（ $p<0.05$ ）。基于此，在治疗分泌物感染金黄色葡萄球菌时，该地区可优先考虑使用甲氧苄啶。

根据患者年龄（<1 月、1 月~1 年、>1 年）分析金黄色葡萄球菌对不同抗生素的耐药情况，结果如表

3、4 所示，来源于年龄 1 月~1 年儿童的金黄色葡萄球菌对利奈唑胺、头孢唑啉、克林霉素、青霉素、苯唑西林、哌拉西林这些抗生素的耐药率高于其它组。其中，来源于新生儿（<1 月）的金黄色葡萄球菌对庆大霉素的耐药率（0.00%）显著低于来源于年龄在 1 月到 1 岁之间（1.43%）和年龄大于 1 岁（1.43%）来源的金黄色葡萄球菌（ $p<0.05$ ）。因此，在治疗新生儿金黄色葡萄球菌感染时，可优先考虑庆大霉素作为治疗新生儿感染金黄色葡萄球菌的首选药物。

## 2.4 金黄色葡萄球菌生物被膜形成分析

以金黄色葡萄球菌 ATCC 12228（图 3a）为阴性

对照,判定在刚果红平板上形成红色、湿润菌落的菌株不能形成生物被膜,以金黄色葡萄球菌 ATCC 33591 (图 3b)为阳性对照,判定在刚果红平板上形成粗糙、干燥、黑色菌落的菌株能形成生物被膜。结果显示所有菌株都能在刚果红平板上形成黑心状、干燥菌落,表明所有菌株均能形成生物被膜。

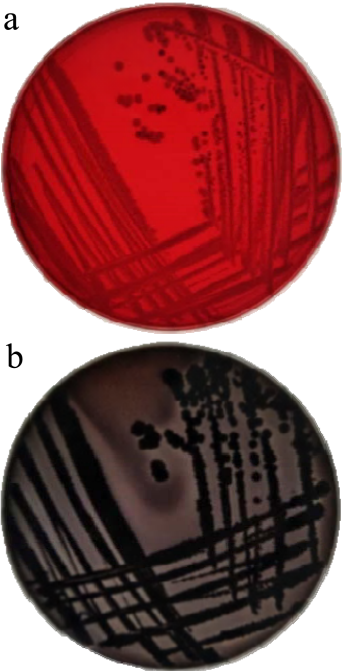


图3 刚果红试验结果  
Fig.3 Congo red test results

注: a: ATCC 12228 (生物被膜阴性); b: ATCC 33591 (生物被膜阳性)。

2.5 金黄色葡萄球菌耐药性和生物膜形成能力关系分析

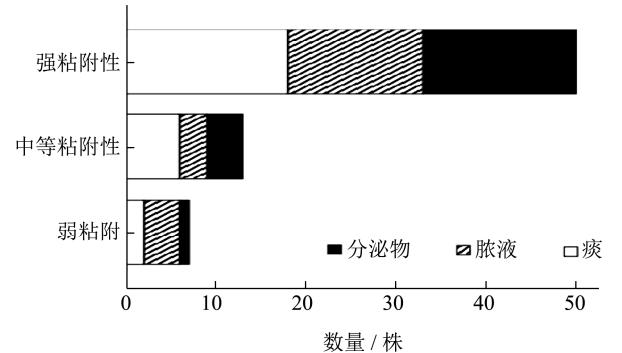


图4 金黄色葡萄球菌来源与形成生物被膜能力的关系  
Fig.4 Relationship between the source of *Staphylococcus aureus* and the ability to form biofilm

根据结晶紫实验结果,将 70 株金黄色葡萄球菌形成生物被膜的能力分为强(+++)、中等(++)、弱(+)三组,其中强生物被膜菌株、中等强度生物被

膜菌株和弱生物被膜菌株所占比例分别为 71.43%、18.57%、10.00%。不同来源的菌株形成生物被膜能力如图 4 所示,形成强生物被膜的菌株 30%来源于脓液、34%来源于分泌物、36%来源于痰,不同来源的菌株形成生物被膜的比例差异无统计学意义( $p>0.05$ )。

表5 金黄色葡萄球菌耐药性与生物膜形成能力之间的关系  
Table 5 Relationship between drug resistance of *Staphylococcus aureus* and biofilm formation ability

| 抗菌药物 | 生物被膜形成能力 | 耐药率/% | 中介率/% | 敏感率/% | p 值   |
|------|----------|-------|-------|-------|-------|
| 甲氧苄啶 | +++      | 17.14 | 4.29  | 50.00 | >0.05 |
|      | ++       | 2.86  | 0.00  | 15.71 |       |
|      | +        | 1.43  | 0.00  | 8.57  |       |
| 利奈唑胺 | +++      | 24.29 | 0.00  | 47.14 | <0.05 |
|      | ++       | 0.00  | 0.00  | 18.57 |       |
|      | +        | 1.43  | 0.00  | 8.57  |       |
| 庆大霉素 | +++      | 1.43  | 4.29  | 70.00 | <0.05 |
|      | ++       | 1.43  | 0.00  | 17.14 |       |
|      | +        | 0.00  | 1.43  | 8.57  |       |
| 环丙沙星 | +++      | 17.14 | 15.71 | 38.57 | >0.05 |
|      | ++       | 2.86  | 1.43  | 14.29 |       |
|      | +        | 0.00  | 0.00  | 10.00 |       |
| 青霉素  | +++      | 67.14 | 0.00  | 4.29  | >0.05 |
|      | ++       | 18.57 | 0.00  | 0.00  |       |
|      | +        | 10.00 | 0.00  | 0.00  |       |
| 头孢唑啉 | +++      | 30.00 | 11.43 | 30.00 | >0.05 |
|      | ++       | 4.29  | 7.14  | 7.14  |       |
|      | +        | 2.86  | 0.00  | 7.14  |       |
| 克林霉素 | +++      | 38.57 | 25.71 | 7.14  | >0.05 |
|      | ++       | 7.14  | 5.71  | 5.71  |       |
|      | +        | 7.14  | 0.00  | 2.86  |       |
| 万古霉素 | +++      | 0.00  | 21.43 | 50.00 | >0.05 |
|      | ++       | 0.00  | 4.29  | 14.29 |       |
|      | +        | 0.00  | 2.86  | 7.14  |       |
| 苯唑西林 | +++      | 52.86 | 0.00  | 18.57 | >0.05 |
|      | ++       | 15.71 | 0.00  | 2.86  |       |
|      | +        | 5.71  | 0.00  | 4.29  |       |
| 哌拉西林 | +++      | 30.00 | 0.00  | 41.43 | >0.05 |
|      | ++       | 5.71  | 0.00  | 12.86 |       |
|      | +        | 2.86  | 0.00  | 7.14  |       |

分析金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药性与形成生物被膜能力之间的关系,发现生物被膜形成能力强的菌株对甲氧苄啶、利奈唑胺、庆大霉素、环丙沙星、青霉素、头孢唑啉、克林霉素、苯唑西林、哌拉西林的耐药率远高于生物被膜形成能力较弱的菌株(表

5), 相对于生物被膜形成能力弱的金黄色葡萄球菌, 生物被膜形成能力强的金黄色葡萄球菌对抗生素表现出高的耐药率, 这在一定程度上反映了金黄色葡萄球菌对抗生素耐药性与其形成强生物被膜相关。值得注意的是, 生物被膜形成能力强的菌株对利奈唑胺耐药率显著高于生物被膜形成能力弱的菌株, 差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。利奈唑胺近年来已被广泛用于治疗葡萄球菌皮肤和软组织感染, 肺炎等<sup>[16,17]</sup>, Hao Chen<sup>[18]</sup>等人的研究表明利奈唑胺联合磷霉素对金黄色葡萄球菌具有良好的抗菌作用, 而本实验结果表明金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力越强, 其耐利奈唑胺能力越强, 意味着以后利用利奈唑胺治疗宁波地区儿童的金黄色葡萄球菌感染, 需要组合使用破坏生物被膜的药物。

## 2.6 生物被膜相关基因检测结果分析

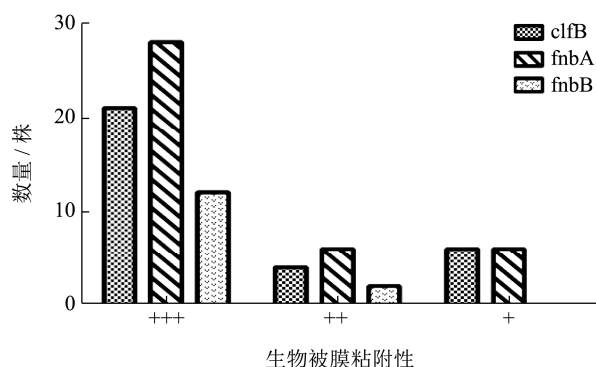


图5 生物被膜相关基因与其形成生物被膜能力之间的关系

Fig.5 Relationship between biofilm-related genes and their ability to form biofilms

对金黄色葡萄球菌生物被膜相关基因 *fnbA*、*fnbB*、*clfB* 进行了 PCR 扩增, 结果显示在 70 株金黄色葡萄球菌中, *fnbA*、*fnbB*、*clfB* 的检出率分别为 57.14%、20.00%和 44.29%。*fnbA*、*fnbB*、*clfB* 基因在不同生物被膜形成能力(强、中、弱)的金黄色葡萄球菌的分布情况如图 5 所示, 在生物被膜形成能力强的金黄色葡萄球菌中, *fnbA*、*fnbB* 和 *clfB* 的检出率最高, 分别占各自检出总数的 45.00%、92.86%和 58.06%。本研究结果显示存在 *fnbA* 和 *fnbB* 基因的比例分别为 20.00%和 44.29%, 与陈程<sup>[19]</sup>等人报道的 *fnbA*、*fnbB* 的存在为 100%不同, 这可能与菌株来源地区的差异有关<sup>[20]</sup>。此外, 共同携带 *fnbB* 和 *clfB* 基因的有 7 株, 强生物被膜菌株占 4 株 (57.14%); 共同携带 *fnbA* 和 *clfB* 基因的有 22 株, 强生物被膜菌株占 14 (63.64%) 株; 共同携带 *fnbB* 和 *fnbA* 基因的有 9 株, 强生物被膜菌株占 5 株 (55.56%)。以上结果表明生物被膜相关基因的存在一定程度上反应了金

色葡萄球菌生物被膜的形成, 提示在对金黄色葡萄球菌生物被膜形成能力进行鉴定时, 可以参考相关生物被膜基因的检测 results。

## 3 结论

本研究对 70 株金黄色葡萄球菌进行了药敏实验、生物被膜的形成能力鉴定及生物被膜相关基因检测, 并对这些菌株耐药谱与其生物被膜形成能力强弱之间的关系进行了分析。结果表明临床来源的金黄色葡萄球菌耐药情况严重, 生物被膜普遍存在, 其形成生物被膜可能会增强菌株对利奈唑胺的耐药性。开展金黄色葡萄球菌特性分析是食品安全与临床医学领域中的热点之一, 作为细菌性食物中毒的重要病原菌, 临床来源的耐药菌与食品来源的金黄色葡萄球菌相比易形成生物被膜和肠毒素, 其具有逃逸常规消毒和杀菌手段的能力, 一旦污染食品, 将成为食品安全中的巨大隐患。尽管含生物被膜相关基因的菌株可能形成生物被膜的能力更强, 但是差异无统计学意义, 表明生物被膜形成机制与耐药机制复杂。这可能也是目前有效治疗金黄色葡萄球菌感染依然存在一定难度的原因, 因此对金黄色葡萄球菌耐药性和生物被膜有待进一步的深入研究。

## 参考文献

- [1] Vasundhra Bhandari, Shalini Chakraborty Umarani Brahma, Paresh Sharma. Identification of anti-staphylococcal and anti-biofilm compounds by repurposing the medicines for malaria venture pathogen box [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 365
- [2] Mitchell D H, Howden B P. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia [J]. Internal Medicine, 2005, 35: S17-24
- [3] Murdoch D R, Corey G R, Hoen B, et al. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century. the international collaboration on endocarditis- prospective cohort study [J]. Arch Intern, 2009, 169(5): 463-473
- [4] 回丽媛,李军,朱明星,等.抗菌肽 17BIPHE2 对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用[J].微生物通报,2017,44(4):872-880
- [5] HUI Li-yuan, LI Jun, ZHU Ming-xing, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by antimicrobial peptide 17BIPHE2 [J]. Microbiology China, 2017, 44(4): 872-880
- [5] 桂中玉,李琳,李冰,等.金黄色葡萄球菌耐药性与生物被膜能力的鉴定 [J].现代食品科技,2014,30(3):69-75

- GUI Zhong-yu, LI Lin, LI Bing, et al. Investigation of antibiotic resistance and biofilm-forming ability in *Staphylococcus aureus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 69-75
- [6] 姚冬婷,胡骏,张雪清,等.黄连对金黄色葡萄球菌体外抑菌活性的分析[J].检验医学,2017,32(7):577-581
- YAO Dong-ting, HU Jun, ZHANG Xue-qing, et al. Inhibitory activity of Chinese medicine *coptis chinensis* franch against *Staphylococcus aureus* in vitro [J]. Laboratory Medicine, 2017, 32(7): 577-581
- [7] 刘露露,徐溢,王人杰,等.生物被膜的形成及其电化学阻抗检测[J].生物工程学报,2018,34(3):320-333
- LIU Lu-lu, XU Yi, WANG Ren-jie, et al. Detection of biofilms formation by electrochemical impedance spectroscopy [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(3): 320-333
- [8] Iii R W H, Garrison A T. Eradicating bacterial biofilms with natural products and their inspired analogues that operate through unique mechanisms [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2017, 17(14):1-8
- [9] Wood T K. Combating bacterial persister cells [J]. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(3): 476-483
- [10] Robert W Huigens III. The path to new halogenated quinolines with enhanced activities against *Staphylococcus epidermidis* [J]. Microbiology Insights, 2018, 11: 1-4
- [11] Wei W, Xiao-hui L, Tao J, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:1123
- [12] 刘杰,韩嘉静,康熙雄,等.2010-2016 年临床分离金黄色葡萄球菌的耐药性分析 [J].检验医学与临床,2017,14:3430
- LIU Jie, HANG Jia-jing, KANG Xi-xiong, et al. Analysis on drug resistance of *Staphylococcus aureus* between 2010 and 2016 [J]. Lab Med Clin, 2017, 14: 3430
- [13] 朱厚军.儿童皮肤软组织金黄色葡萄球菌感染的耐药分析 [J].社区医学志,2015,13(16):78-79
- ZHU Hou-jun. Drug resistance analysis of children's skin soft tissue *Staphylococcus aureus* infection [J]. Community Medical Journal, 2015, 13(16): 78-79
- [14] 左祥,查艳景,王征.金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药基因研究[J].中国病原生物学杂志,2017,6:88-91
- ZUO Xiang, ZHA Yan-jing, WANG Zheng. A study on the clinical distribution of *Staphylococcus aureus* its drug resistance genes [J]. Journal of Pathogen Biology, 2017, 6: 88-91
- [15] Virginio Cepas, Yuly Lo'pez, Estela Munoz et al. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria [J]. Microbial Drug Resistance, 2019, 25(1): 72-79
- [16] Li J, Zhao Q H, Huang K C, et al. Linezolid vs. vancomycin in treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A meta-analysis [J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2017, 21(17): 3974
- [17] Álvarez-Lerma F, Muñoz-Bermúdez R, Samper-Sánchez M A, et al. Successful treatment of panton-valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia with high doses of linezolid administered in continuous infusion [J]. Medicina Intensiva, 2017, 41(1): 56-59
- [18] Hao Chen, Lan Li, Yanyan liu, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of linezolid in combination with fosfomycin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. Infection and Drug Resistance, 2018, 11: 2107-2115
- [19] 陈程,张锐,姜兴佳,等.牛乳源金黄色葡萄球菌生物被膜形成与耐药性的研究[J].中国兽医科学,2018,48(6):774-781
- CHEN Cheng, ZHANG Rui, JIANG Xing-jia, et al. Biofilm formation and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk [J]. Chinese Veterinary Science, 2018, 48(6): 774-781
- [20] Szczuka E, Katarzyna Urbańska, Pietryka M, et al. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains [J]. Folia Microbiologica, 2013, 58(1): 47-52

(上接第 175 页)

- [17] 耿丽晶,周围,王佳,等.贮藏期间芦荟果胶含量变化及影响果胶粘度因素的研究[J].食品工业科技,2012,33(19):117-120,123
- GENG Li-jing, ZHOU Wei, WANG Jia, et al. Study on the change of aloe pectin content during storage and the factors affecting the viscosity of pectin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(19): 117-120, 123
- [18] Mccue P P, Shetty K. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(5): 1791-1797