

耐甲氧西林葡萄球菌及异质性万古霉素中介的检测与分析

刘 强,肖 鑫,张蕾蕾,许培仁

(河南大学淮河医院,河南 开封 475000)

[摘要] **目的** 了解某院住院患者耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)感染状况和异质性万古霉素中介葡萄球菌(h-VIS)分离率。**方法** 选择住院感染患者标本分离的葡萄球菌,采用 BDphoenix¹⁰⁰ 微生物自动分析系统进行鉴定及药敏试验,并以头孢西丁纸片扩散法检测 MRS,肉汤稀释法测定无菌体液及分泌物标本分离的 41 株 MRS 对万古霉素的敏感性;脑心浸液琼脂诱导异质性万古霉素中介株,进一步用 E-test 试条检测万古霉素敏感性。**结果** 239 株葡萄球菌中有 160 株 MRS,痰液、脓液、血液及胸腹腔积液标本是其主要来源,耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌均呈多重耐药性,但对利奈唑胺、呋喃妥因敏感率为 100.00%,未发现对万古霉素高度耐药株。患者无菌体液及分泌物 h-VIS 检出率为 14.63%(6/41),其中金黄色葡萄球菌的分离率为 7.14%(1/14),血浆凝固酶阴性葡萄球菌分离率为 18.52%(5/27)。**结论** 准确检测出 MRS 和 h-VIS,对临床有效控制感染极为重要。

[关键词] 葡萄球菌属;MRS;MRSA;MRCNS;异质性万古霉素中介葡萄球菌;抗药性,微生物;万古霉素

[中图分类号] R378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)02-0089-04

Detection and analysis on methicillin resistant *Staphylococcus* and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus*

LIU Qiang, XIAO Xin, ZHANG Lei-lei, XU Pei-ren (Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng, 475000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the infection with methicillin resistant *Staphylococcus* (MRS) and isolation rate of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus*(h-VIS) in hospitalized patients. **Methods** *Staphylococcus* strains isolated from samples of infected inpatients were selected, bacteria were identified and performed antimicrobial susceptibility test by BDphoenix¹⁰⁰ microbial auto-analysis system, MRS were detected by cefoxitin disk diffusion method, 41 strains of MRS isolated from aseptic body fluids and secretions were selected for detecting the susceptibility to vancomycin by the broth dilution; The h-VIS strains induced on the brain heart infusion (BHI) agar plate were studied by E-test method to investigate their sensitivity to vancomycin. **Results** There were 160 strains of MRS in 239 isolated *Staphylococcus* strains. MRS were mainly isolated from patients' sputum, pus, blood, pleural effusion, and hydrops abdominis. Both methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) and coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) were multidrug-resistant, but the sensitive rates to linezolid and furadantin were 100.00%, no highly vancomycin-resistant strains was found. The detection rate of h-VIS in aseptic body fluid and secretion was 14.63%(6/41), the isolation rate of *Staphylococcus aureus* and CNS was 7.14%(1/14) and 18.52%(5/27) respectively. **Conclusion** Accurate detection of MRS and h-VIS is important to control clinical infection efficiently.

[Key words] *Staphylococcus spp.*; MRS;MRSA;MRCNS; heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus*; drug resistance, microbial; vancomycin

[Chin Infect Control,2010,9(2):89-92]

近年来,随着抗菌药物的广泛大量使用及侵入性诊疗操作的实施,葡萄球菌尤其是耐甲氧西林葡

[收稿日期] 2009-05-26

[作者简介] 刘强(1974-),男(汉族),河南省开封市人,主管检验师,主要从事临床微生物检验研究。

[通讯作者] 刘强 E-mail:qiangliuhh@126.com

萄球菌(MRS)的检出率和耐药率逐年增加,成为医院感染的主要病原菌,并且由于这类感染的治疗往往长期使用万古霉素,易筛选出对万古霉素敏感性下降的葡萄球菌。笔者对分离自本院住院患者的 239 株葡萄球菌进行了 MRS 表型检测,并对无菌体液及分泌物标本中分离的 41 株 MRS 进行了异质性万古霉素中介葡萄球菌(h-VIS)检测与分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 2008 年 1 月—2009 年 3 月分离自本院住院患者的葡萄球菌 239 株,其中金黄色葡萄球菌(SA)118 株,凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)121 株。质控菌株为 SA ATCC 29213(甲氧西林敏感株),SA ATCC 43300(甲氧西林耐药株),粪肠球菌 ATCC 51299,购于中国药品生物制品检定所。

1.1.2 试剂与用品 头孢西丁纸片(30 μg)和脑心浸液琼脂(BHIA)购自英国 OXOID 公司;M-H 琼脂和 M-H 肉汤由杭州微生物试剂厂生产;盐酸万古霉素由美国礼来公司生产(批号为 WM 18362,标示量 98%),万古霉素 E-test 试纸条购自瑞典 AB Biodisk 公司。

1.1.3 仪器 美国 BD 公司 phoenix¹⁰⁰全自动微生物鉴定/药敏系统,BD 公司 BACTEC 9050 血培养系统。

1.2 实验方法

1.2.1 葡萄球菌的鉴定及药敏试验 采用 phoenix¹⁰⁰ 鉴定 239 株葡萄球菌,并检测庆大霉素(GEN)、头孢唑林(CFZ)、氨苄西林(AMP)、青霉素(PEN)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、万古霉素(VAN)、克林霉素(CLI)、红霉素(ERY)、奎奴普汀/达夫普汀(Q-D)、氯霉素(CHL)、利奈唑胺(LZD)、呋喃妥因(NIT)、加替沙星(GAT)、左氧氟沙星(LVX)、利福平(RIF)对葡萄球菌的最低抑菌浓度(MIC)。

1.2.2 MRS 的检测 采用头孢西丁纸片扩散法检测 MRS,操作参考 2006 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准^[1];SA 抑菌圈直径 ≥ 20 mm 判为 MSSA, ≤ 19 mm 为 MRSA;CNS 抑菌圈直径 ≥ 25 mm 判为 MSCNS, ≤ 24 mm 为 MRCNS。

1.2.3 异质性万古霉素中介检测方法^[2]

1.2.3.1 菌液准备 菌株为无菌体液及分泌物标

本分离的 41 株 MRS,其中 SA14 株,溶血葡萄球菌 11 株,表皮葡萄球菌 9 株,人葡萄球菌 6 株,科氏葡萄球菌 1 株。采用直接菌悬液法配制成 0.5 麦氏单位,筛选平板采用含 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 万古霉素的 BHIA。接种菌液量 10 μL ,35 $^{\circ}\text{C}$ 温育,24 h 内有菌落生长为可疑 VIS,24~48 h 有细菌生长为可疑 h-VIS。挑取可疑菌落,进一步检测细菌的 MIC 以证实。

1.2.3.2 MIC 测定方法 采用微量肉汤稀释法,以 M-H 肉汤进行检测,孵育时间 48 h,同时用 E-test 方法对 MIC 结果进行验证。按 CLSI 推荐的肉汤稀释法,万古霉素对 SA 的 MIC ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为敏感,MIC 4~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可报告为 VISA,MIC ≥ 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可报告为 VRSA。

1.2.3.3 h-VIS 判断标准 在含万古霉素 BHIA 平板上传代发生耐药性增加者为异质中介株。确诊条件为:(1)运用 CLSI 推荐的肉汤稀释法检测,原代菌株对万古霉素的 MIC < 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(2)原代菌中包含一部分细菌亚群对更高浓度的万古霉素中介或耐药;(3)对万古霉素 MIC ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的变异株可以通过万古霉素选择性培养基从原代菌株中选择出来,其出现的频率是 10^{-6} 或更高^[3]。

1.2.4 E-test 法 将待检菌以直接菌悬液法配制成 0.5 麦氏单位,均匀涂布接种于 BHIA 平板,用镊子将 E-test 试条置于已经接种细菌的平板表面,并使试条全长与琼脂平板紧密接触,试条 MIC 刻面向上,35 $^{\circ}\text{C}$ 温育 SA 24 h,CNS 48 h,按 E-test 指南判断结果。

2 结果

2.1 MRS 的检出率 118 株 SA 中共检出 MRSA 57 株,检出率 48.31%;121 株 CNS 中共检出 MRCNS 103 株,检出率 85.12%。

2.2 CNS 菌种的组成 121 株 CNS 分布于 10 种菌,各菌种耐甲氧西林株检出比率分别为:溶血葡萄球菌 98.08%(51/52),表皮葡萄球菌 76.32%(29/38),人葡萄球菌 85.71%(12/14),沃氏葡萄球菌 50.00%(2/4),腐生葡萄球菌 75.00%(3/4),松鼠葡萄球菌 100.00%(3/3),头葡萄球菌 0.00%(0/2),里昂葡萄球菌 100.00%(2/2),科氏葡萄球菌 100.00%(1/1),慢葡萄球菌 0.00%(0/1)。

2.3 各标本 MRS 检出率 见表 1。

表 1 各类标本 MRS 检出情况

Table 1 Isolation of MRS from samples

标本	SA(株)	MRSA(株)	MRSA 检出率(%)	CNS(株)	MRCNS(株)	MRCNS 检出率(%)
痰液	66	42	63.64	64	58	90.63
脓液	38	6	15.79	17	12	70.59
血液	2	2	100.00	16	13	81.25
胸腹腔积液	8	6	75.00	3	2	66.67
尿液	4	1	25.00	10	9	90.00
前列腺液	0	0	0.00	9	7	77.78
支气管分泌物	0	0	0.00	2	2	100.00
合计	118	57	48.31	121	103	85.12

2.4 耐药率 MRSA 和 MRCNS 的耐药率比较见表 2。

表 2 MRSA 与 MRCNS 对 15 种抗菌药物的耐药率比较

Table 2 Antimicrobial resistant rates of MRSA and MRCNS to 15 kinds of antimicrobial agents

抗菌药物	MRSA(n=57)		MRCNS(n=103)		χ^2	P
	耐药 (株)	耐药率 (%)	耐药 (株)	耐药率 (%)		
GEN	53	92.98	69	66.99	13.69	<0.01
CFZ	57	100.00	77	74.76*	17.18	<0.01
AMP	57	100.00	97	94.17	3.45	>0.05
PEN	57	100.00	103	100.00	-	-
SXT	21	36.84	82	79.61	29.27	<0.01
VAN	0	0.00	0	0.00	-	-
CLI	51	89.47	77	74.76	4.97	<0.05
ERY	54	94.74	87	84.47	3.70	>0.05
Q-D	0	0.00	2	1.94	0.01	>0.05
CHL	8	14.04	36	34.95	0.05	<0.01
LZD	0	0.00	0	0.00	-	-
NIT	0	0.00	0	0.00	-	-
GAT	48	84.21	54	52.43	16.04	<0.01
LVX	51	89.47	77	74.76	4.97	<0.05
RIF	21	36.84	15	14.56	10.45	<0.01

* 为实际检测值,报告均为“耐药”

2.5 异质性万古霉素中介筛选试验结果 41 株试验菌株中有 12 株在 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的万古霉素选择培养基上生长,阳性率为 29.27%。

2.6 确证结果 12 株被筛选出的菌株,根据 h-VIS 判断标准,其中 6 株为 h-VIS,分离率为 14.63%(6/41)。14 株 MRSA 中检出 h-VISA 1 株(7.14%,1/14);27 株 MRCNS 中检出 h-VICNS 5 株(18.52%,5/27),其中 4 株溶血葡萄球菌和 1 株表皮葡萄球菌。

2.7 MIC 测定 采用微量肉汤稀释法和 E-test 方法测得 6 株 h-VIS 的 MIC 结果基本相同,见表 3。

表 3 6 株 h-VIS 的 MIC 结果($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Table 3 MIC of 6 strains of h-VIS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

菌种	亲代菌株 MIC 值	子代菌株 MIC 值	
		肉汤稀释法	E-test
金黄色葡萄球菌	2	8	8
溶血葡萄球菌 1	2	16	24
溶血葡萄球菌 2	2	16	24
溶血葡萄球菌 3	1	16	24
溶血葡萄球菌 4	2	16	16
表皮葡萄球菌	2	8	16

3 讨论

MRS 是医院感染的重要病原菌之一,而且由于存在多重耐药性,感染者死亡率很高。随着抗菌药物和介入治疗、器官移植等治疗项目的开展,MRS 的检出有上升趋势。我们的研究结果中,MRCNS 检出率达 85.12%,而 MRSA 检出率为 48.31%,与朱以军等^[4]的报道相近。MRCNS 的高检出率与 CNS 不产生血浆凝固酶和 α 溶血素等物质,致病性低,长期 β -抗生索的选择性压力有关。MRS 产生的耐药主要是以 *MecA* 基因编码产生的 PBP2a 所致对青霉素类药物耐药类型。检测 MRS 的方法很多,有苯唑西林纸片扩散法、头孢西丁纸片扩散法、稀释法、乳胶凝集筛选试验、PCR 检测 *MecA* 基因法。头孢西丁纸片扩散法用于 MRS 表型筛选具有较高的敏感性和特异性^[5],且不需特殊要求,在实际工作中,结果更易读取,适合临床微生物室开展,但在检测过程中,应加强室内质量的监测工作。

本资料结果显示,痰液、脓液、血液及胸腹腔积液是 MRS 株的主要标本来源,MRS 菌株耐药已相当严重。CLSI 规定,MRS 往往对 β -内酰胺类、酶抑制剂复合抗菌药物及碳青霉烯类耐药。本组药敏结果显示,MRS 对 β -内酰胺类、GEN、CLI、ERY、LVX 均有较高的耐药率($\geq 66.99\%$),对 CHL、RIF 表现一定程度耐药($\leq 36.84\%$);与 MRCNS 相比,MR-

SA 对 GEN、GAT、RIF 有较高的耐药率；二者对 VAN、Q-D、LZD、NIT 敏感率高，然而链阳霉素类 Q-D、唑烷酮类 LZD 国内市场上难以购得，NIT 主要用于泌尿系感染治疗，VAN 仍然是治疗 MRS 全身感染的首选药物之一。

由于 MRS 菌株多重耐药，且其治疗往往长期使用 VAN 糖肽类药物，在细菌耐药性变异的生态环境和抗生素压力下，MRS 可转变为对 VAN 的敏感性下降，导致出现 h-VIS，进一步发展为 VIS，最终发展成同源性耐药(VRS)^[6]。检测葡萄球菌对糖肽类药敏感性下降的情况有 2 类，一类是异质性中介(h-VIS)，指在含 4~6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VAN 的筛选平板上次代培养后，选择出对 VAN 敏感性下降的菌株，其亲代菌株对 VAN 的 MIC 仅为 1~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而子代菌株的 MIC 要比亲代菌株高 2~8 倍，h-VIS 检测的是耐药子代的 MIC，而非亲代菌的 MIC，这是 h-VIS 与 VRS 的主要区别；另一类是对糖肽类药物中度耐药的葡萄球菌，其对糖肽类药物表现为一定程度的耐药性。由于纸片扩散法和仪器法不能检出葡萄球菌对 VAN 中度以下耐药株^[2]，且现阶段，VRS 的出现率较低，对所有临床葡萄球菌进行 VRS 检测是没有必要的。所以，本实验室对分离自临床无菌体液和脓液标本的 41 株 MRS 进行重点筛选，再对筛选阳性菌株做 MIC 测定。异质性耐药葡萄球菌具有生长缓慢和对营养需求较高的特点，因此在做药敏试验时，实验室增加了含 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VAN 的 BHIA 选择性培养基，观察时间延长至 48 h。研究结果显示，41 株 MRS 菌株中分离出 6 株 h-VIS，分离率为 14.63%。其中 h-VISA 的分离率为 7.14%；h-VICNS 分离率为 18.52%，与国外 Nunes 等^[7]报道的 h-VRCNS 分离率为 32.5% 相比偏低，这与 VAN 使用时间及时域有关。检出对 VAN 异质性耐药的葡萄球菌，应及时调整抗生素，避免发展成为 VIS。本组 5 株 h-VICNS 中，有 4 株溶血葡萄球菌，1 株为表皮葡萄球菌。据有关资料报道^[8]，溶血葡萄球菌感染的增多与其出现耐 VAN 菌株有关。h-VIS 的耐药机制尚不清楚，比较肯定

的机制是细胞壁成分合成增加，导致细胞壁增厚，增厚的细胞壁交联减少，使游离的 D-丙氨酰-D-丙氨酸侧链含量增加，在细胞壁外与万古霉素结合，致使进入细胞内能与靶分子结合的万古霉素减少而产生耐药作用^[9]。

临床实验室有针对地开展 h-VIS 的筛选检测是必要的，对既往感染 MRS 菌株和长期使用糖肽类抗生素且疗效不好的患者进行 h-VIS 检测，对预防和控制 VRS 的产生和传播有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S]. Sixteenth informational supplement. M100-S16. NCCLS, 2006;39.
- [2] 马筱玲, 张涛, 戴媛媛, 等. 金黄色葡萄球菌对万古霉素敏感性试验方法评价[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(3): 185-187.
- [3] Aritaka N, Hanaki H, Cui L, *et al.* Combination effect of Vancomycin and beta-lactams against a *Staphylococcus aureus* strain, Mu3, with heterogeneous resistance to vancomycin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4): 1292-1294.
- [4] 朱以军, 徐瑞龙, 单小云, 等. 医院感染葡萄球菌属的分布特点与耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(5): 599-601.
- [5] 赵瑞玲, 陈乾, 刘彬, 等. 头孢西丁纸片法检测 MecA 基因介导的 MRS[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(7): 839-840.
- [6] Moore M R, Perdreau-Remington F, Chambers H F. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(4): 1262-1266.
- [7] Nunes A P, Schuenck R P, Bastos C C, *et al.* Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin among *Staphylococcus SPP.* isolated from bacteremia [J]. *Braz J infect Dis*, 2007, 11(3): 345-350.
- [8] 王敬华, 刘励军, 姚辉华. 异质性耐万古霉素溶血葡萄球菌的抗生素后效应研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(9): 532, 562.
- [9] 周晓英, 张书海. 耐万古霉素金黄色葡萄球菌耐药机制及检测方法研究进展[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(7): 422-424.

欢迎登录“中国医院感染网(www.yygr.cn)”

中国医院感染网 www.yygr.cn 于 2008 年 5 月由全国医院感染监控管理培训基地和深圳宁远科技有限公司共同创办，以“扎根基层，服务基层”为理念，宣传、推广医院感染预防与控制知识，为广大医院感染专职人员和各临床科室人员服务。欢迎登录并期待您的关注与参与！