

• 临床检验研究论著 •

异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的分离及检测方法的建立*

张 晨¹, 金凤玲^{2△}, 朱海平¹, 姚立琼¹, 陈保锦¹, 元淑巧¹

(兰州大学第一医院: 1. 检验科; 2. 感染管理科 730000)

摘要:目的 了解异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(h-VISA)的分离情况,并筛选简便可行的 h-VISA 的检测方法。方法 采用琼脂稀释法和 E-test 法对分离出的 113 株金黄色葡萄球菌进行检测,筛选出的可疑 h-VISA 用菌谱分析法进行确认,并对文献推荐的几种方法的筛选效果进行比较。结果 检测到 1 株万古霉素的 MIC 为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 株 MIC 为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MRSA,为万古霉素敏感性减低的金黄色葡萄球菌,其中 1 株 MIC 为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MRSA 经菌谱分析法证实为 h-VISA,本次 113 株实验菌株 h-VISA 的检出率为 0.88%。结论 通过实验证实 K-B 法并不是检测 h-VISA 的理想方法,而菌谱分析法则较为有效,分离率为 8.3%,且在本实验中灵敏度可达 10^{-8} 。本院分离的 MRSA 中已出现万古霉素敏感性减低菌株,并分离出 1 株 h-VISA,可见,MRSA 对万古霉素的异质性中介耐药不容忽视,应引起国内医学界的广泛重视。

关键词: 葡萄球菌,金黄色; 万古霉素; 异质性耐药; 菌谱分析法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)13-1551-03

Construction of new methods for the isolation and detection of heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus**

Zhang Chen¹, Jin Fengling^{2△}, Zhu Haiping¹, Yao Liqiong¹, Chen Baojin¹, Yuan Shuqiao¹

(1. Clinical Laboratory; 2. Department of Infection Control, the

1st Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (h-VISA) and develop a new method for the detection of h-VISA. **Methods** 113 strains of *Staphylococcus aureus* (SA) were screened by agar dilution method and E-test method. The resistant strains were confirmed by population analysis. **Results** Three strains of SA were with reduced susceptibility to vancomycin, including one strain with minimal inhibitory concentration (MIC) for 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and two strains with MIC for 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. One strain with MIC for 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was confirmed as h-VISA, and the detection rate was 0.88% (1/113). **Conclusion** Population analysis could be more effective than disc agar diffusion method, and the former might be with high sensitivity to 10^{-8} . More attention should be paid to the emerge of strains with reduced susceptibility to vancomycin and h-VISA.

Key words: *Staphylococcus aureus*; vancomycin; hetero-resistance; population analysis

1996 年 1 月日本 1 位肺癌术后继发甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)肺炎的患者经万古霉素治疗 12 d 后无效且病情不断恶化,随后,医院从该患者的痰液标本中分离出了第 1 株异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(h-VISA)。1997 年日本学者 Hiramatsu 等^[1]首次描述了这株 h-VISA (Mu3, MIC = 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$),发现该菌虽然对万古霉素敏感,但在含 5~9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 万古霉素的培养基上能够生长,从而提出了 h-VISA 的定义。h-VISA 具有潜在的临床重要性是因为发现其与万古霉素治疗失败有关,并且对万古霉素的耐药性会在高浓度万古霉素的作用下增强,致使耐药亚群增加,并认为长期的万古霉素作用会促使 h-VISA 转变为万古霉素中介金黄色葡萄球菌(VISA)^[2]。中国早在 2002 年就有临床实验室分离出 h-VISA^[3],但关于 h-VISA 的流行状况、耐药机制、检测方法以及治疗药物都还不十分明确,本实验目的在于进一步明确 h-VISA 的分离率及检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株 (1)本院 2010~2011 年从住院患者的血、尿、痰以及其他分泌物标本中分离的金黄色葡萄球菌,包括对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)和 MRSA,按照保存菌种顺序编号,染色复查,确定为革兰阳性葡萄球菌,触酶(+),血浆凝固酶(+);(2)金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 购自甘

肃省临床检验中心。

1.2 药物 (1)盐酸万古霉素生产企业为 Eli Lilly Japan K. K, Seishin Laboratories, 有效期内使用,使用前用 ATCC25923 进行质控;(2)万古霉素(30 μg)药敏纸片由英国 OXOID 公司生产。

1.3 仪器与试剂 仪器为法国 Bio-Merieux 公司生产的 VITEK32 细菌鉴定系统及配套鉴定试卡、美国 Thermo Fisher 公司的二氧化碳培养箱等。脑心浸液肉汤(BHI)产于法国 Bio-Merieux 公司;琼脂粉为英国 OXOID 产品;API 细菌鉴定板条来自法国 Bio-Merieux 公司。

1.4 方法

1.4.1 细菌的分离与鉴定 按常规方法分离出革兰阳性球菌,呈短链、成簇或葡萄状排列,触酶(+),血浆凝固酶(+),经 API 板条或 VITEK32 全自动微生物分析仪鉴定为金黄色葡萄球菌。

1.4.2 万古霉素选择性培养基的制备 称取 14.8 g BHI 粉末加入 400 mL 蒸馏水中,再加入 4 g 琼脂粉,充分溶解,调节 pH 在 7.2~7.4,经高压蒸汽(102.9 kPa,温度 121~126 $^{\circ}\text{C}$)灭菌 20 min,冷却至 45~50 $^{\circ}\text{C}$,用分析天平称取 0.000 8 g 盐酸万古霉素溶解其中,充分混合后倾注平皿,琼脂厚度控制在 4 mm 左右,即制备成 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的万古霉素选择性培养基。同

* 基金项目:甘肃省科技支撑计划项目(1011FKCA086)。△ 通讯作者,E-mail:jfljkh@163.com。

法制备 3、4、6、8、16、32、64 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素选择性培养基，待琼脂凝固后，放入密闭的塑料袋中，于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存，5 d 内使用。

1.4.3 万古霉素耐药金黄色葡萄球菌(VRSA)、VISA 及 h-VISA 的筛选 采用琼脂稀释法对金黄色葡萄球菌进行初筛，使用美国国家临床实验室标准化研究所(CLSI)规定的点种法进行实验。根据 CLSI 的规定：金黄色葡萄球菌对万古霉素 $\text{MIC} < 4 \mu\text{g/mL}$ 为敏感(VSSA)， $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 为耐药(VRSA)，4~8 $\mu\text{g/mL}$ 为中介(VISA)。万古霉素选择性培养基的浓度为 2~6 $\mu\text{g/mL}$ 。若在 2 $\mu\text{g/mL}$ 及以下的培养基上有菌落生长，则用 E-test 法复查该菌落的 MIC，再与琼脂稀释法得到的结果进行比较，从而判断两种方法的符合率。若出现 $\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/mL}$ 的菌株则保存菌株，等待进一步确认。

1.4.4 h-VISA 的检出 (1)按照 CLSI 推荐的 K-B 法进行药敏实验，采用 MH 培养基，30 μg 万古霉素药敏纸片，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 18~24 h，测量抑菌环直径，并观察抑菌环内有无菌落出现，有菌落出现则为可疑 h-VISA；(2)在琼脂稀释法中，若发现有被检测菌在 BHI-万古霉素选择性培养基上有 1 个以上菌落生长，经重新鉴定确定为纯培养的金黄色葡萄球菌菌株，也可初步认定为可疑 h-VISA；(3)对可疑菌落进行菌谱分析^[4]：取标准菌株 ATCC25923、在血平板上经 24 h 培养的实验菌株菌落，用无菌生理盐水配制为适当的浓度(如 1 010 CFU/mL)，再连续进行 10 倍稀释，配制成 102~1 010 CFU/mL 的菌悬液。再取每个浓度的菌液 10 μL ，分别点种到含万古霉素 4~64 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素选择性培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育，分别于 24 和 48 h 进行菌落计数，并计算其相应的变异频率。变异频率=每块平板上生长的菌落数(CFU)/该平板所接种的细菌总量(CFU)；(4)耐药稳定性实验：取万古霉素选择性培养基上分离

到的菌株，革兰染色确定为革兰阳性葡萄球菌，触酶(+)，血浆凝固酶(+)，再经 VITEK32 细菌鉴定仪确认。以常规方法接种于不含任何抗菌剂的 MH 琼脂平板，持续传代 9 代以上，再采用琼脂稀释法及 E-test 法检测该菌株的 MIC；(5)质量控制：为防止假阳性的出现，每次实验均使用金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 作为对照，严格无菌操作，并用比浊仪准确控制菌悬液的浊度。

2 结 果

2.1 细菌分离结果 本实验阶段共分离到 113 株金黄色葡萄球菌，其中 49 株为 MSSA，其余 64 株为 MRSA。MRSA 的检出率为 56.64%。

2.2 MIC 测定结果

2.2.1 琼脂稀释法初筛结果 在 2 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素选择性培养基上生长的菌株共 34 株，34 株菌中有 12 株在含 3 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素选择性培养基上能够生长，需用菌谱分析法进行确证。其中 10 株菌(包括 M1284)在含 3 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素选择性培养基上能够生长，2 株菌(M1275 和 M1278)在含 4 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素选择性培养基上能够生长。

2.2.2 E-test 法复查 MIC 用 E-test 法对 MIC 进行复查，其中 31 株菌 MIC 结果低于 2.0。M1284 的 MIC 为 3 $\mu\text{g/mL}$ ，而 M1275 和 M1278 的 MIC 均为 4 $\mu\text{g/mL}$ ，疑为万古霉素敏感性降低的金黄色葡萄球菌。

2.3 h-VISA 检测结果

2.3.1 K-B 药敏实验 未发现抑菌环内有菌落生长。

2.3.2 菌谱分析法确证结果 对琼脂稀释法筛出的 12 株能够在含 3 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素选择性培养基上生长的可疑菌株进行菌谱分析，只有 2 株在万古霉素选择性培养基上有生长现象，结果见表 1。

表 1 2 株可疑菌株菌谱分析结果

编号	菌种	MRSA/MSSA	原代菌 MIC ($\mu\text{g/mL}$)	万古霉素选择性培养基					
				4	6	8	16	32	64
ATCC25923	<i>S. aureus</i>	MSSA	1	—	—	—	—	—	—
M1275	<i>S. aureus</i>	MRSA	4	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	—	—
M1278	<i>S. aureus</i>	MRSA	4	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	—	—	—

—：无数据。

根据 Hiramatsu 等^[1]的研究，h-VISA 的判断标准为：(1)金黄色葡萄球菌原代菌的 MIC 1~4 $\mu\text{g/mL}$ ，而子代亚克隆大于或等于 8 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素选择性培养基上生长，且变异率大于或等于 10⁻⁶；(2)或是接种 1 010 CFU/mL 菌悬液 10 μL 于含 4 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素-BHI 选择性培养基，孵育 48 h，出现 1~30 个菌落则可能为 h-VISA；(3)该亚克隆在不含万古霉素的培养基上连续传 9 代耐药性不丢失^[1,5-6]。通常 h-VISA 的判断标准为(1)、(3)，但是由于操作繁琐，工作量大，很难在临床实验室开展工作，因此，Hiramatsu 等重新设计了 h-VISA 的筛选方法，即(2)、(3)。由于本实验采用的是改良前的实验方去，所以要根据 h-VISA 的判断标准(1)、(3)来判定筛出菌株是否是 h-VISA，2 株菌 M1275 和 M1278 的原代 MIC 都为 4 $\mu\text{g/mL}$ ，其子代也在大于或等于 8 $\mu\text{g/mL}$ 的万古霉素选择性培养基上能够生长，但是 M1278 的变异率只有 10⁻⁸，达不到 10⁻⁶，所以，可认为只有 M1275 符合判断标准(1)、(3)，可判定为 h-VISA。菌谱分析法从 12 株可疑 h-VISA 中筛出 1 株 h-

VISA，该方法的分离率为 8.3%；而本实验从 113 株金黄色葡萄球菌中分离出 1 株异质性耐万古霉素金黄色葡萄球菌，h-VISA 的分离率为 0.88%。该菌株 h-VISA 是从 MRSA 中分离出来的，64 株 MRSA 中 h-VISA 的分离率为 1.56%。

3 讨 论

万古霉素应用于临床 40 余年，到目前仍然是治疗对其他抗菌剂耐药或疗效差的 MRSA 所致感染的最后一道防线，也是为数不多的对多重耐药金黄色葡萄球菌有活性的药物之一。但是随着抗菌剂在临床上的广泛应用，MRSA 对万古霉素敏感性从稍减低，到中介耐药，直至完全耐药的逐渐显露，在这个转变过程中 h-VISA 的出现起到了重要的作用，也引起了医学界的极大关注。

依据 Hiramatsu 等^[1]提出的 BHI-万古霉素选择性培养基筛选 h-VISA 的方法，本实验在临床实验室成功地建立了 h-VISA 的分离方法及其菌谱分析方法。h-VISA 的检测通常可使用 K-B 法、菌谱分析法、万古霉素联合 β -内酰胺类抗菌剂快

速筛选法等。其中,万古霉素联合 β -内酰胺类抗菌剂快速筛选法早已被证实是检测 h-VISA 的有效方法,但不足之处是无法预测所筛选出的 h-VISA 中是否含有高耐药的亚克隆^[7]。本次实验中,K-B 法没有检测出 h-VISA,说明这种方法并不是检测 h-VISA 的可靠方法,可能是因为本实验中菌株的变异频率较低,在 10^{-8} 左右,且异质性耐药的菌株生长较慢,不易观察。从实验看来,菌谱分析法可有效、快速分离出 h-VISA,灵敏度和特异性都较高,并可通过公式计算出菌株的变异频率,但存在操作步骤繁琐、费时费力、需要配制大量的万古霉素选择性培养基的缺点,难以在临床实验室展开。

当前的许多研究报告和病例分析都表明,大多 h-VISA 都发生在长期接受万古霉素治疗的 MRSA 感染患者,只有 Bobin-Dubreux 等^[2]的研究报道,从 469 株万古霉素敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)中分离出 1 株 h-VISA。本实验室检出的 1 株 h-VISA(M1275)也是由 MRSA 发展而来的,这与许多文献报道的 h-VISA 源自 MRSA 结论相似。

h-VISA 在不同国家的发生率有很大差别,即使是在同一个国家也有可能不同。2010 年的文献报道^[8],其他国家 h-VISA 从 MRSA 中的分离率差别很大,从比利时 0.1%、台湾 0.7%、法国 11%到土耳其 18%等。本实验 h-VISA 从金黄色葡萄球菌中的分离率为 0.88%,从 MRSA 中分离出 h-VISA 的分离率为 1.56%,处于文献普遍记载分离率的中等水平,但是并未筛选出 VRSA 和 VISA,可能原因为国内金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药率较低,也可能是由于技术原因,部分 VRSA、VISA 及 h-VISA 未筛出。本次实验是针对金黄色葡萄球菌(MSSA 及 MRSA),但有研究表明金黄色葡萄球菌对万古霉素出现耐药后,其生物学性状会发生一定改变,如菌落大小由均匀变为大小不均、在血平板上的溶血环由清晰、宽大变为窄小甚至消失,菌落色素由金黄色变为灰白,血浆凝固酶由阳性转变为阴性以及甘露醇、甘露糖等实验转为阴性等^[9]。后三种性状是临床实验室鉴定金黄色葡萄球菌的重要指征,VRSA 一旦出现上述性状变化,在临床鉴定中则极易被常规鉴定方法如 VITEK 仪器等错鉴定为是表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌或模仿葡萄球菌,只有通过 PCR 实验检测金黄色葡萄球菌的种属特异性基因,如 nuc 基因,才能准确鉴定^[10]。所以不排除有部分耐药金黄色葡萄球菌被误鉴定为是表皮葡萄球菌或其他血浆凝固酶阴性的葡萄球菌的可能。

有文献提出,一部分金黄色葡萄球菌虽然对万古霉素的 MIC 在敏感范围内(在 $1\sim 4\ \mu\text{g/mL}$),但是万古霉素对这些菌株却缺乏杀菌活力,严重的患者甚至会引起治疗失败。研究者将这种菌株称为万古霉素耐受菌^[11]。美国 CDC 专家也证实,即使是 MIC 为 $4\ \mu\text{g/mL}$ 的金黄色葡萄球菌,单独使用万古霉素治疗也不能取得良好的效果。因此,若是 VISA、h-VISA 或是上述的万古霉素耐受菌未被检出,而在临床上又大量应用万古霉素治疗以上菌株引起的感染,很容易诱导这些菌株转变为 VRSA,因此临床实验室在常规测定万古霉素抑菌环的同时还应应对可疑菌株测定万古霉素 MIC,以防漏检 VISA、h-VISA 以及万古霉素耐受菌,并为此类细菌感染的及时、正确治疗提供依据。CDC 还建议:一旦发现 $\text{MIC}\geq 4\ \mu\text{g/mL}$ 的金黄色葡萄球菌菌株都应立即在无菌环境下对菌株进行保存,并送公共实验室或 CDC 进行确证,以防止 VRSA 或 VISA 造成医院内感染。在本次实验过程中,筛选出 1 株菌(M1284)MIC 为 $3\ \mu\text{g/mL}$,2 株菌(M1275 和 M1278)MIC 为 $4\ \mu\text{g/mL}$ 。这 3 株菌极有可能为上述万古霉素耐受菌,所以应当严格按照无菌要求保

存菌株,以待进一步分析研究。

目前全世界 h-VISA 的检出率都有日渐增高的趋势。有研究学者通过实验证明^[12],h-VISA 是金黄色葡萄球菌在万古霉素、 β -内酰胺类抗菌剂等的作用下诱导突变的结果,比较稳定,而 h-VISA 又可以在万古霉素压力下选择性突变为 VISA,但并不稳定,一旦万古霉素选择性压力去除,VISA 可恢复为 h-VISA。研究者推测正是由于 VISA 不稳定,VISA 不会在患者间相互传播;而 h-VISA 有稳定的耐药性,很容易在患者间相互传播,则更有引起医院感染的危险。h-VISA 的高检出率和多重耐药率的增加都提示在运用抗菌剂治疗的时候要根据抗菌剂的药代动力学特点,减少低剂量抗菌剂对细菌的长时间无效作用,同时,要随时监测金黄色葡萄球菌耐药性的变化,以用于指导临床用药、缓解细菌耐药的压力以及防止多重耐药菌株的产生,并积极寻找检测 VRSA、VISA 和 h-VISA 的最有效方法,防止对万古霉素耐药菌株的漏检。

参考文献

- [1] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin[J]. *Lancet*, 1997, 350(12): 1670-1673.
- [2] Bobin-Dubreux S, Reverdy ME, Nervi C, et al. Clinical isolate of vancomycin-herero-intermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(1): 349-352.
- [3] 吴本权,唐英春,张扣兴,等. 万古霉素异质性耐药葡萄球菌的分离及其药物敏感性分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2002, 27(2): 116-120.
- [4] 王敬华,马筱玲,濮跃晨,等. Hetero-VRS 检测方法的建立及其临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2003, 18(5): 3-6.
- [5] Fridkin SK. Vancomycin intermediate and-resistant *Staphylococcus aureus*; what the infectious disease specialist needs to know[J]. *Clin Inf Dis*, 2001, 32(1): 108-115.
- [6] Tallent SM, Bischoff T, Climo M, et al. Vancomycin susceptibility of Oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing nosocomial bloodstream infections[J]. *Clin Microbiol*, 2002, 40(6): 2249-2250.
- [7] Hiramatsu K, Kondo N, Ito T. Genetic basis for molecular epidemiology of methicillin-resistant *staphylococcus aureus*[J]. *Infect Chemother*, 1996, 52(2): 117-129.
- [8] Hsueh PR, Lee SY, Perng CL, et al. Clonal dissemination of methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital[J]. *Antimicrob Agents*, 2010, 36(4): 307-312.
- [9] 代洪,范学工. 金黄色葡萄球菌万古霉素耐药与凝固酶活性[J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(1): 19-22.
- [10] 张涛,马筱玲,戴媛媛,等. 万古霉素耐药金黄色葡萄球菌生物学特性[J]. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(1): 50-53.
- [11] Thomas R, Paul R, Helio S, et al. In vitro activity of omiganan pentahydrochloride tested against vancomycin-tolerant, -intermediate, and-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(4): 399-403.
- [12] Cui LZ, Ma XX, Sato K, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Clin Microbiol*, 2003, 41(1): 5-14.