

## 下呼吸道分离葡萄球菌对万古霉素异质性耐药

吴本权, 唐英春, 张扣兴, 张天托, 朱家馨, 谈淑卿

(中山大学附属第三医院内科, 广东 广州 510630)

**摘要:** **【目的】**探讨万古霉素体外敏感, 体内治疗失败的原因。**【方法】**选择本实验室 1997 年至 1999 年下呼吸道分离的 115 株耐甲氧西林葡萄球菌, 用美国临床实验室标准委员会推荐的 M-H 琼脂板稀释法测定对万古霉素的敏感性; 脑心浸液琼脂诱导对万古霉素异质性耐药株, 用生物梅里埃公司 APIStaph 系统鉴定菌型; 进一步用 E-Test 试条检测万古霉素敏感性。**【结果】**115 株耐甲氧西林葡萄球菌对万古霉素敏感性下降 34 株 (MIC > 4 mg/L): 金黄色葡萄球菌 13 株, 溶血葡萄球菌 7 株, 松鼠葡萄球菌 7 株, 表皮葡萄球菌 3 株, 人葡萄球菌 3 株, 产色葡萄球菌 1 株。万古霉素高度异质性耐药 9 株: 金黄色葡萄球菌 3 株, 溶血葡萄球菌 6 株; E-Test 试条在脑心浸液琼脂板中万古霉素异质性耐药葡萄球菌显示双重抑菌环。**【结论】**对万古霉素异质性耐药可能是万古霉素治疗医院内耐甲氧西林葡萄球菌感染失败的重要原因之一。

**关键词:** 万古霉素抗药性; 葡萄球菌/药物作用; 下呼吸道感染; 耐药, 异质性

中图分类号: R378.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)05-0474-04

## Heterogeneous Resistance Staphylococcus to Vancomycin Isolated from the Lower Respiratory Tract

WU Ben-quan, TANG Ying-chun, ZHANG Kou-xing, ZHANG Tian-tuo, ZHU Jia-xing, TAN Shu-qing  
(Department of Internal Medicine, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** **【Objective】**To isolate heterogeneous resistance staphylococcus to vancomycin from the lower respiratory tract to probe what contribute to the failure of vancomycin *in vivo*, even though sensitivity *in vitro*, in treating methicillin resistant staphylococcus infections. **【Methods】**A total of 115 strains of methicillin resistant staphylococci isolated from the lower respiratory tract from 1997 to 1999 in our laboratory were selected for detecting the susceptibility to vancomycin by the Mullen Hinton agar plate dilution reference to National Committee for Clinical Laboratory Standards. The heterogeneous resistance of staphylococci reduced the susceptibility to vancomycin were induced on the brain heart infusion (BHI) agar plate. Heterogeneous resistance staphylococci were identified and typed by means of API Staph system and their resistance were further tested by E-Test. **【Results】**Thirty-four methicillin resistant staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin (MIC > 4 mg/L) had 13 staphylococcus aureus, 7 staphylococcus haemolyticus, 7 staphylococcus sciuri, 3 staphylococcus epidermidis, 3 staphylococcus hominis, 1 staphylococcus chomogenes and 9 high heterogeneous resistant staphylococci to vancomycin with 3 staphylococcus aureus and 6 staphylococcus haemolyticus. MIC of vancomycin to staphylococcus on the BHI were 2 ~ 4 times as high as that of the M-H. It showed that BHI easily induced the heterogeneously resistant staphylococcus. **【Conclusions】**The heterogeneously resistant staphylococci to vancomycin may be a significant cause of the failure of vancomycin in the treatment of methicillin-resistant staphylococcus infections.

收稿日期 2004-08-27

基金项目: 罗氏感染研究青年医师基金资助项目 (2001)

作者简介: 吴本权 (1964 - ), 男, 安徽舒城人, 博士, 副主任医师, 硕士生导师. E-mail: wbenquan@yahoo.com.cn

**Key words:** vancomycin resistance; staphylococcus/drug effects; lower respiratory tract infection; resistance, heterogeneity

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5): 474 - 477]

耐甲氧西林葡萄球菌对万古霉素敏感性下降菌株逐年增加。日本 1996 年首次报告万古霉素中等度耐药金黄色葡萄球菌株 Mu50<sup>[1]</sup>, 引起医学界的广泛注意, 意味着可能会出现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA) 对万古霉素广泛耐药, 目前仅发现 1 株对万古霉素高度耐药<sup>[2]</sup>, 但万古霉素治疗的失败率却较高。Hiramatsu 随后发现金黄色葡萄球菌株 Mu3 对万古霉素呈现不均一性即异质性耐药, 体外敏感, 因此人们容易忽视, 但随着万古霉素的使用将产生严重耐药, 导致治疗失败<sup>[3]</sup>。异质耐药株的研究对耐甲氧西林葡萄球菌感染选择万古霉素治疗指征具有重要意义。本研究应用脑心浸液体外诱导 115 株 MRS 对万古霉素异质性耐药情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

115 株耐甲氧西林葡萄球菌为本实验室 1997 - 1999 年从住院病人下呼吸道痰标本中分离。万古霉素 (美国 sigma 公司), 万古霉素 E-test 拭条 (0.16 ~ 256  $\mu\text{g}$ , 瑞典 AB BIODISK 公司), Mullen-Hinton 琼脂、脑心浸琼脂 (英国 OXOID 公司) API Staph 鉴定系统 (法国 Bio Merieux)。

### 1.2 万古霉素最低抑菌浓度测定

琼脂板稀释法测定 115 株耐甲氧西林葡萄球菌对万古霉素的敏感性: 对倍稀释的万古霉素药液 1 mL 加入 90 mm 直径的平板中, 灭菌 Mullen Hinton 琼脂或脑心浸琼脂 (brain heart infusion agar, BHIA) 19 mL 倒入平板摇匀。无菌生理盐水调制细菌悬液麦氏 0.5 管 (约  $10^8\text{CFU/mL}$ ) 加入样板孔中, 多点接种仪取样接种, 35  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 观察结果。在含万古霉素 BHIA 平板中传代发生耐药性增加者为异质耐药株。确诊条件为: ①万古霉素选择性培养基细菌亚克隆的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)  $\geq 8\text{ mg/L}$ ; ②细菌在无万古霉素培养基中持续生长 9 d 以上耐药性不变<sup>[3]</sup>。美国临床实验室标准委员会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 推荐在 Mueller Hinton 琼脂 (MHA) 中万古霉素 MIC  $\leq 4$

mg/L 敏感; MIC = 8 ~ 16 mg/L 中介; MIC  $\geq 32\text{ mg/L}$  耐药。以标准菌株 ATCC29213 行质控。

### 1.3 E-test 筛选敏感株和异质耐药亚群

棉拭子蘸取上述细菌悬液均匀涂布, 35  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 观察结果, 按 E-test 指南判读, 万古霉素异质耐药株和敏感株产生不同的抑菌环。

### 1.4 葡萄球菌鉴定和分型

依据梅里埃 API Staph 说明配制菌液加入生化反应管, 根据显色反应的不同, 记录结果, 输入判读软件。

### 1.5 脉冲场凝胶电泳

为确认万古霉素异质性耐药葡萄球菌是其亲本株衍生的, 需要对亲本株和衍生株进行基因型分析。溶葡萄球菌素和溶菌酶联合裂解葡萄球菌提取完整的 DNA, 低熔点琼脂糖包埋制成小凝胶块, *Sma* I 限制性内切酶原位消化, 酶切产物行脉冲场电泳, ATCC29213 对照  $\lambda$  标志物分子量参照。当酶切 DNA 片断差异带不超过 3 条, 具有良好基因同源性, 可认为万古霉素异质性耐药株由亲本株衍生而来, 并非新的耐药菌株。

## 2 结果

### 2.1 耐甲氧西林葡萄球菌对万古霉素的敏感性

115 株耐甲氧西林葡萄球菌中 34 株对万古霉素敏感性下降, 其中 9 株为高度异质性耐万古霉素葡萄球菌, 占 34 株万古霉素低敏葡萄球菌的 26.5% (9/34), 占 115 株耐甲氧西林葡萄球菌的 7.8% (9/115)。用 API Staph 对 34 株万古霉素敏感性下降葡萄球菌鉴定分型结果为: 金黄色葡萄球菌 13 株, 其次为溶血葡萄球菌 7 株, 松鼠葡萄球菌 7 株, 表皮葡萄球菌 3 株, 人葡萄球菌 3 株, 产色葡萄球菌 1 株。接种至 BHI 琼脂板测得对万古霉素的 MIC 范围、MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub>, 见表 1。

### 2.2 不同营养条件对异质耐万古霉素葡萄球菌耐药性影响

异质性耐万古霉素葡萄球菌生长缓慢, 营养条件需求高, 实验显示不论亲本株还是耐药亚群在 BHIA 琼脂较 MHA 上的万古霉素 MIC 高约 1 ~ 4 倍, 且传代培养第 10 代时亚克隆耐药性明显增加,

见表 2。提示 BHA 对诱导异质性耐药是非常重要的。

表 1 34 株葡萄球菌 API 分型及对万古霉素的敏感性

Strains	n (%)	MIC	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3 (9)	4~8	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 (3)	4~32	16	32
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7 (21)	16~32	32	32
<i>Staphylococcus sciuri</i>	7 (21)	4~16	16	16
<i>Staphylococcus hominis</i>	3 (9)	8~16	8	16
<i>Staphylococcus chomogenes</i>	1 (3)	16		

表 2 MHI 和 BHIA 对 9 株异质耐万古霉素葡萄球菌耐药性影响

Table 2 Effects of MHA and BHIA on resistance of staphylococcus heterogeneously resistant to vancomycin (MIC) (mg/L)

Strains	MHA		BHIA	
	Parents	Subclone	Parents	Subclone
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	16	16	32
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	16	16	64
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	8	16	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	16	32	64
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	16	32	32	64
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	16	16	64
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	16	16	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	8	16	32
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	16	32	64

### 2.3 万古霉素 E-test 拭条筛选异质耐药株和敏感株及葡萄球菌核型分析

经比较 MRSA97 不同抑菌环内的细菌, API Staph 鉴定以及基因酶切分析均为同一细菌, 其生化反应相同, 核型一致。传代培养可以达到高度耐药水平 (96 mg/L)。见图 1 2。

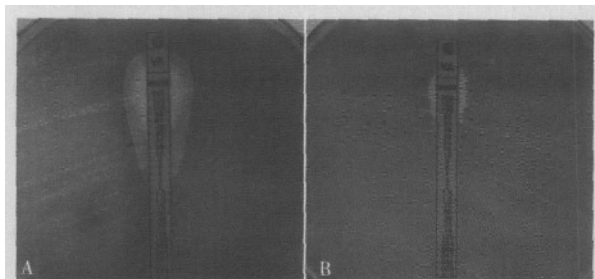


图 1 万古霉素异质性耐药葡萄球菌传代培养

Fig. 1 The subculture of the heterogeneously resistant staphylococcus to vancomycin

Vancomycin E-test strip showed the double inhibitory zone against

MRSA97 growing for 48 h on the BHIA. *Staphylococcus* within the internal cycle was heterogeneously resistant to vancomycin with MIC of 48 mg per liter and that of extra-cycle sensitive to vancomycin with MIC of 3 mg per liter, but initial staphylococcus screened on the Mullen Hinton agar had MIC of 4~8 mg per liter. These strains developed high resistance to vancomycin when subcultured on the BHIA (A). MRSA97 heterogeneously resistant to vancomycin subcultured on BHIA with high resistance to vancomycin. Subclones of MRSA97 showed high resistance to vancomycin with MIC of 96 mg per liter (B)

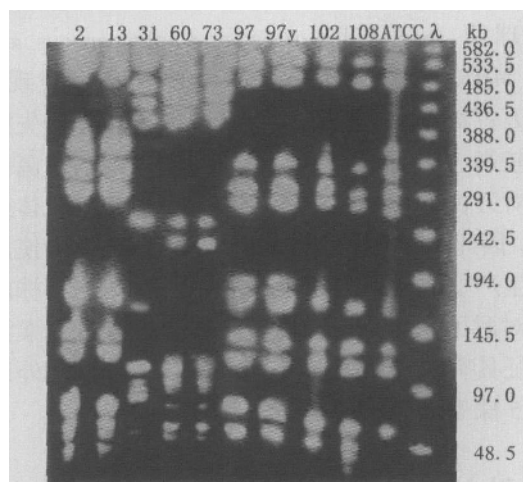


图 2 万古霉素异质性耐药葡萄球菌脉冲场电泳核型分析  
Fig. 2 The analysis of the genotype of heterogeneous resistance staphylococcus to vancomycin

The representative parent strain MRSA97 had the gene profile digested by endonuclease SmaI similar to its subclone MRS 97y with high hetero-resistance to vancomycin. It indicated that the high hetero-resistant MRSA97 to vancomycin derived from its parent strain MRSA97

No. 2 13, 31, 60, 73, 97, 97y, 102, 108 were staphylococcus strains heterogeneously resistance to vancomycin. ATCC as the quality control strain

## 3 讨论

万古霉素治疗 MRSA 较高失败率的确切原因尚不清楚。日本学者花木秀明发现综合性教学医院存在相当比例万古霉素不能清除的下呼吸道 MRSA 感染患者, 失败率 35.8%, 1992 年上海、石家庄和北京地区报告去甲万古霉素清除呼吸道耐药葡萄球菌感染失败率 33%。我们的研究发现失败率 44%<sup>[3-5]</sup>, 万古霉素低敏葡萄球菌清除率为 76.5%<sup>[6]</sup>。1996 年 1 月日本从 1 例肺癌术后并发肺炎的痰标本分离 1 株万古霉素敏感的 MRSA (MIC 3 μg/mL, 命名 Mu3), 该株细菌传代培养耐药性明显增加<sup>[3]</sup>。美国 1998 年报告 41 株凝固酶阴性葡萄球菌 28 株对万古霉素呈现异质性耐药<sup>[7]</sup>。我们分析近 3 年下呼吸道分离的 115 株耐甲氧西林葡萄球

菌,34株对万古霉素的敏感性下降,未发现高度耐药株,但传代培养及在BHIA培养基上诱导出对万古霉素高度耐药的葡萄球菌,MIC最高达64 mg/L以上,用连续梯度E-test较容易筛选出异质耐药株呈现不同抑菌圈,经基因核型分析比较内外抑菌圈内生长的菌株,证实内圈耐药株由外圈敏感株衍生而来。我们比较了NCCLS推荐的MHA和BHIA两种培养基诱导葡萄球菌对万古霉素异质性耐药,提示良好营养条件对万古霉素异质性耐药的诱导非常重要。葡萄球菌对万古霉素耐药性在营养好的BHIA培养基比MHA培养基提高2~4倍以上。万古霉素异质性耐药葡萄球菌中以溶血葡萄球菌为主,溶血葡萄球菌更容易产生对万古霉素异质性耐药,和Biavasco的结论一致。由于异质性耐万古霉素的葡萄球菌存在,单纯依据体外药敏未必是万古霉素的应用指征<sup>[8]</sup>。目前尚无统一的鉴定方法,若发现万古霉素疗效不好或体外敏感性下降则要考虑异质性耐药的可能,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,因此在药敏鉴定时,可选用高营养培养基BHIA及万古霉素E-test拭条,观察时间应延长至48 h。临床治疗选择新型有效抗生素或现有的抗生素联合用药,如万古霉素或替考拉林与 $\beta$ -内酰胺抗生素合用可能有效<sup>[6,9]</sup>。众所周知,耐甲氧西林葡萄球菌对 $\beta$ -内酰胺抗生素耐药具有异质性,上世纪80年代亚胺培南敏感性较好,传代培养约 $10^{-6}$ 菌株的MIC达到64 mg/L的高度耐药水平,至90年代迅速出现对亚胺培南同质性耐药<sup>[10]</sup>。异质性耐万古霉素葡萄球菌一旦转变为同质性耐药后,万古霉素将不能作为有效的治疗药物。为了减少万古霉素耐药葡萄球菌的产生和传播,除合理有效地使用万古霉素外,必须严格监测和隔离耐药菌感染的病人,所有接触过耐药菌的病人和医护人员均要彻底洗手、消毒外衣防止传播和扩散,针对耐万古霉素葡萄球菌的出现,美国疾病控制中心提出了系列防治指南以避免和延缓万古霉素耐药的发展<sup>[11]</sup>。

#### 参考文献:

[1] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al. Methicillin-resistant

*staphylococcus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility[J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 40(1): 135-6.

- [2] Chang S, Sievert D M, Hageman J C, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA resistance gene[J]. N Engl J Med, 2003, 348(14): 1342-7.
- [3] 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(9092): 1670-3.
- [4] 朱峰,张永信,张婴元,等. 去甲万古霉素治疗耐药葡萄球菌严重感染的临床评价[J]. 中华医学杂志, 1992, 72(6): 562-4.
- [5] 吴本权,唐英春,朱家馨. 医院内甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌肺部感染高危因素分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(7): 413-6.
- [6] Wu B Q, Tang Y C, Zhang K X, et al. *Staphylococcus* heterogeneously resistant to vancomycin in China and antimicrobial activities of imipenem and vancomycin in combination against it[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 1109-12.
- [7] Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibility to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of *staphylococci*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(1): 100-7.
- [8] Biavasco F, Vignaroli C, Lazzarini R, et al. Glycopeptide susceptibility profiles of *staphylococcus haemolyticus* bloodstream isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(11): 3122-6.
- [9] Hanaki H, Hiramatsu K. Combination effect of teicoplanin and various antibiotics against hetero-VRSA and VRSA[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1999, 73(10): 1048-53.
- [10] Tanaka T, Okuzumi K, Iwamoto A, et al. A retrospective study of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* strains in Tokyo University Hospital[J]. J Infect Chemother, 1995, 1(1): 40-9.
- [11] Gilliland K K, Flores P A, Gordon S M, et al. Vancomycin-resistant staph: epidemiology and therapeutic options[J]. Infect Med, 2000, 17(4): 289-98.

(编辑 黄小延)