

插入式 E 试验监测烧伤创面甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌对万古霉素敏感性的变化

高灵宝 陈亚宝 沙鸭云

由于抗生素的广泛应用,细菌高耐药性问题日益凸显,成为抗生素治疗中的一大困扰。继国外学者报道在甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)中分离出万古霉素中度耐药金黄色葡萄球菌(VISA)以及万古霉素耐药金黄色葡萄球菌(VRSA)后,我国学者亦就 MRSA 对万古霉素的敏感性进行严密监测。2007 年上海瑞金医院报道,烧伤创面 MRSA 的分离率已达 85.1%^[1]。笔者应用插入式 E 试验(E test)试条,检测烧伤患者应用万古霉素治疗前后创面 MRSA 分离株对该药物的敏感性是否发生了改变,以期为临床相关治疗提供参考。

1 材料与方

1.1 主要材料

金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC 25923、ATCC 29213 由江苏省临床检验中心提供,作为质控菌株。MRSA 分离自我院 2009 年 12 月—2011 年 6 月收治的 76 例烧伤住院患者创面分泌物标本,患者年龄 22~68 岁。所有患者经万古霉素治疗(每次 1.0 g,2 次/d,连用 3 d)前后,创面分泌物均检出 MRSA 各 76 株,共 152 株。

插入式万古霉素 E test 试条(梳状)由淮北市宏远药敏试条厂提供,批号 20091219;平贴式万古霉素 E test 试条由瑞典 AB Biomerieux 公司生产,上海祥和生物有限公司提供,批号 BJ3176;MH 琼脂系英国 Oxoid 公司生产,由广州乐通泰生物科技有限公司提供,批号 784397。Vitek-32 型全自动微生物鉴定仪和浊度计均购自法国生物梅里埃公司。

1.2 研究方法

应用插入式试条检测万古霉素对 152 株 MRSA 临床分离株的 MIC,同时置入平贴式试条作为对照。以插入式试条检测万古霉素对标准菌株 ATCC 25923、ATCC 29213 的 MIC 作为质控,参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)制定的标准^[2]判读结果。具体操作如下。

1.2.1 MH 平板要求 培养皿直径为 9 cm,未加盖时皿高 1 cm,加盖后皿高不低于 1 cm。皿内 MH 琼脂的高度为(4.0±0.5)mm,pH 值为 7.30±0.10。

1.2.2 菌液配制及接种 在标准菌株和预先常规分离培养的纯 MRSA 临床分离株悬液中,加入适量生理盐水,用浊度计将菌液调至 0.5 号麦氏单位比浊管浊度。将无菌无毒

的拭子充分浸于菌液后,紧贴试管内壁挤出多余菌液。取出拭子在 MH 平板的琼脂面上画线 3 次,每次画线后将平板旋转 60°再进行下次操作,以使菌液均匀分布于琼脂表面。将平板静置 15~20 min,待琼脂充分吸收菌液。

1.2.3 试条的放置及孵育 待涂有菌液的琼脂表面完全干燥后,用平头镊夹持插入式试条上部无药部分,将试条梳齿垂直插入琼脂培养基内。同时在该平板内按常规方法置入平贴式试条作为对照,2 种试条间保持适度距离不互相干扰。将平板置于(35.0±2.0)℃普通培养箱孵育 16~24 h。

1.2.4 结果判读及质量控制 在规定的培养时间范围内且菌苔已均匀显著生长时,读取抑菌圈边缘与试条相交处的 MIC 刻度值。如果有混合菌生长,则需要将细菌分离纯化后重新测试;菌苔生长过多或过少也需重新检测。

1.3 统计学处理

应用 WHONET 5.2 软件建立药物敏感性检测数据库并进行数据分析,采用 SPSS 11.5 统计软件进行两有序变量之间关联性的对称检验,即 γ 系数检验。

2 结果

插入式和平贴式试条同时检测万古霉素 MIC 的细菌培养结果见图 1。万古霉素治疗前,由 76 例患者创面分离的 76 株 MRSA 万古霉素 MIC 为 0.25~1.75 mg/L;治疗后 MIC 仍为 0.25~1.75 mg/L,均小于万古霉素耐药的折点 2.00 mg/L^[2]。统计学分析显示: $\gamma = 0.936, P = 0.00$,表明用药前后 MIC 值分布一致,差异有统计学意义,即用药前后 MRSA 对万古霉素的敏感性无明显变化。见表 1。



注:左方稍短、垂直插入琼脂者为插入式试条,右方稍长、平铺者为平贴式试条

图 1 插入式和平贴式 E 试验试条检测万古霉素对烧伤创面甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌分离株的 MIC

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.02.010

作者单位:225300 江苏省泰州市人民医院检验科(高灵宝、陈亚宝),感染病科(沙鸭云)

表 1 插入式 E 试验试条检测万古霉素治疗前后烧伤患者创面 MRSA 分离株的万古霉素 MIC 分布(株)

用药前 MIC	用药后 MIC						合计
	0.25 mg/L	0.50 mg/L	0.75 mg/L	1.00 mg/L	1.50 mg/L	1.75 mg/L	
0.25 mg/L	5	2	0	0	0	0	7
0.50 mg/L	0	30	3	0	0	0	33
0.75 mg/L	0	0	20	2	1	1	24
1.00 mg/L	0	0	1	5	0	0	6
1.50 mg/L	0	0	0	0	5	0	5
1.75 mg/L	0	0	0	0	0	1	1
合计	5	32	24	7	6	2	76

注:MRSA 为甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌

插入式与平贴式试条分别检测 152 株 MRSA 的万古霉素 MIC 分布,检测结果符合程度如下:11 株 MRSA 用 2 种方法均测得 MIC 为 0.25 mg/L,64 株用 2 种方法均测得 MIC 为 0.50 mg/L,46 株用 2 种方法均测得 MIC 为 0.75 mg/L,10 株用 2 种方法均测得 MIC 为 1.00 mg/L,11 株用 2 种方法均测得 MIC 为 1.50 mg/L,2 株用 2 种方法均测得 MIC 为 1.75 mg/L。2 种试条检测结果符合率为 94.7% (144/152)。

3 讨论

体表烧伤后形成开放创面,易发生感染,金黄色葡萄球菌是主要病原菌之一。理论上讲,应用万古霉素治疗后,所有对该药敏感的细菌均会被抑杀。但由于临床治疗时通过静脉给药后,药物在各组织器官的分布及浓度均不同,使得暴露创面的细菌不能及时被完全抑杀,故在应用万古霉素治疗 3 d 后仍有可能从创面检出 MRSA。

CLSI-2010 标准中,已弃用 K-B 纸片扩散法检测万古霉素耐药性,认为其可靠性难以保证,均需检测 MIC。临床常用的 MIC 检测方法有琼脂稀释法、液体稀释法和 E test 法。琼脂稀释法、液体稀释法操作繁琐,E test 法简便快捷、结果直观,已被广泛应用,但其价格高昂。近年我们应用国产插入式与进口平贴式 E test 药物试条,对比检测抗菌药物对多种细菌的 MIC,结果显示 2 种方法的一致性极高 ($\kappa = 0.917$)^[3]。本研究亦显示,国产插入式与进口平贴式万古霉素 E test 试条检测结果有极高的符合率(94.7%)。国产插入式试条不仅具有进口平贴式试条药物浓度连续分布的优点,而且在如下方面更具优势:(1)平贴式试条平放于琼脂表面后,容易因局部贴附不够紧密而使琼脂产生气泡。插入式试条使用时因垂直插入琼脂中,不易产生气泡。(2)使用平贴式试条后,形成的抑菌圈边缘与试条两侧均会出现交点,这 2 个交点所对应的试条刻度值可能不一致,导致结果难以准确读取。使用插入式试条后,抑菌圈边缘与试条相交处近似 1 个点,便于准确读取。(3)与进口平贴式试条比较,国产插入式试条价格更为低廉,便于推广。

本研究结果显示,短期应用高浓度万古霉素治疗烧伤创面 MRSA 感染,用药前后 MRSA 对万古霉素的敏感性未发生

显著改变,在监测过程中亦未检出 VRSA 和 VISA。虽然如此,仍需认清万古霉素大量使用可能造成细菌耐药性变异和抗生素选择性压力。有学者认为,由于尚无证据证实 VISA 中携带有类似肠球菌万古霉素高度耐药基因——VanA 样基因,因此 MRSA 的耐药机制可能与金黄色葡萄球菌对糖肽类抗生素耐药无直接相关性^[4]。但也有学者认为,万古霉素在临床上的广泛使用逐渐造成 MRSA 对万古霉素敏感性降低^[5]。McAleese 等^[6]则认为细菌基因表达异常与耐药有关。因此,研究金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药前后某些基因序列的改变,或许能发现与耐药密切相关的基因。表型检测虽然不能阐释耐药机制,但监测用药前后 MIC 变化可以及时发现可疑细菌,为研究耐药基因提供帮助。插入式 E test 药物试条的应用,有望成为这类研究工作中简便、快捷、准确的细菌筛选方法。

参考文献

- [1] 王文奎,韩立中,杨莉,等.瑞金医院烧伤中心甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌同源性分析.中华烧伤杂志,2007,23(2):97-99.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- [3] 高灵宝,陈亚宝.一种插入式 E-test 药敏试条的临床应用.现代检验医学杂志,2010,25(6):108-109,112.
- [4] François J, Monique C, Michèle W, et al. 抗菌药物临床应用——从抗菌谱到临床处方.倪语星,韩立中,译.上海:上海科学技术出版社,2006:47-49.
- [5] Paterson DL, Muto CA, Ndirangu M, et al. Acquisition of rectal colonization by vancomycin-resistant Enterococcus among intensive care unit patients treated with piperacillin-tazobactam versus those receiving cefepime-containing antibiotic regimens. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(2):465-469.
- [6] McAleese F, Wu SW, Sieradzki K, et al. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of Staphylococcus aureus exhibiting vancomycin-intermediate-S. aureus-type resistance to vancomycin. J Bacteriol, 2006, 188(3):1120-1133.

(收稿日期:2011-07-18)

(本文编辑:罗勤)

欢迎浏览《中华烧伤杂志》网站 <http://www.zhsszz.org>