

• 论 著 •

无菌体液标本中异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的流行病学研究

占志平, 童俊[△]

(黄冈市黄州区人民医院检验科, 湖北黄冈 438000)

摘要:目的 研究黄冈市黄州区人民医院 2009~2013 年分离自无菌体液标本的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株中异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(hVISA)的流行性及分子生物学特征。方法 采用琼脂稀释法检测金黄色葡萄球菌对抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC), 菌群谱型分析/曲线下面积(PAP/AUC)法检测 hVISA, 聚合酶链反应(PCR)对 hVISA 菌株进行葡萄球菌染色体 mec 盒(SCCmec)、多位点序列分析(MLST)、附属基因调节子(agr)和金黄色葡萄球菌 A 蛋白(spa)分型。结果 285 株 MRSA 中共检测出 hVISA 32 株, 检出率为 11.2%, 2009~2013 年 hVISA 的检出率分别为 0.0%, 6.4%, 9.0%, 14.3% 和 18.8%, 呈逐年上升趋势; hVISA 菌株的主要流行克隆为 ST239-SCCmecIII-t030-agrI 型, 共 28 株, 占 87.5%。结论 该地区 5 年来 hVISA 的检出率呈逐年上升的趋势, 应引起临床高度重视, 需严格控制糖肽类药物的使用。

关键词: 异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌; 菌群谱型分析/曲线下面积法; 多位点序列分析

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.047

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)08-1117-03

Epidemiology of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus from sterile body fluid specimens

Zhan Zhiping, Tong Jun[△]

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Huangzhou District, Huanggang, Hubei 438000, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence and molecular characteristic of heterogeneous- vancomycin intermediate Staphylococcus aureus(hVISA) among methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains isolated from sterile body fluid specimens from 2009 to 2013 in Huangzhou District People's Hospital in Huanggang City. **Methods** The minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics was determined by agar dilution method. The hVISA strains were detected by population analysis profile/area under the curve method (PAP/AUC). The staphylococcal cassette chromosome mec(SCCmec), multilocus-sequence typing (MLST), accessory gene regulator (agr) and Staphylococcus aureus protein A(spa) typing of hVISA strains were detected using PCR method. **Results** 32 hVISA strains were detected among 285 MRSA strains, the prevalence rate of hVISA was 11.2%, and the detection rates of hVISA from 2009 to 2013 were 0.0%, 6.4%, 9.0%, 14.3% and 18.8%, respectively, showed an increasing trend. The main hVISA epidemic clone was ST239-SCCmecIII-t030-agrI type(28 strains, accounting for 87.5%). **Conclusion** The detection rate of hVISA showed an increasing trend in the past 5 years, should be paid attention to strictly control the utilization of glycopeptide drugs.

Key words: heterogeneous- vancomycin intermediate Staphylococcus aureus; population analysis profile/area under the curve method; multilocus sequence typing

自从 1958 年万古霉素问世以来, 作为治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的常用抗菌药物已将近 50 年, 然而近年来由于 MRSA 感染的急剧上升和万古霉素的大量使用, 目前已出现万古霉素敏感性降低的 MRSA。自 1997 年日本报道检出异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(hVISA)和万古霉素中介金黄色葡萄球菌(VISA)并且引起万古霉素治疗失败以来^[1], 全球范围内均有检出 hVISA 的报道, 包括美国、澳大利亚、法国、巴西、韩国、中国香港、以色列等, 并且检出率逐年上升, 患者在足量的糖肽类药物治疗下死亡率仍较高, 这给临床治疗带来了极大的困难。研究发现与万古霉素敏感的金黄色葡萄球菌(VSSA)相比, hVISA 感染可导致患者菌血症、骨髓炎、心内膜炎等持续时间延长, 住院时间延长, 万古霉素治疗失败等^[2-4]。由此可见, hVISA 是潜在的重要致病菌, 应引起临床关注, 加强 hVISA 的监测。本研究旨在了解黄冈市黄州区人民医院近 5 年 hVISA 的流行情况及其分子生物学特点, 为临床合理使用抗菌药物提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株 收集黄冈市黄州区人民医院 2009 年 1 月 1 日至 2013 年 12 月 31 日连续 5 年分离自无菌体液标本中的 MRSA

菌株 285 株(剔除同一患者相同部位的重复分离株), 标本来源包括: 血液 184 株(64.6%), 腹水 33 株(11.6%), 脑脊液 26 株(9.1%), 胸水 23 株(8.1%), 穿刺液 11 株(3.9%), 关节液 8 株(2.8%)。

1.2 仪器与试剂 苯唑西林、头孢西丁、万古霉素和替考拉宁药粉均购自中国食品药品鉴定研究院, 脑心浸液琼脂(BHIA)基础和 MH 琼脂基础均购自英国 Oxoid 公司, 脱纤维羊血购自郑州农达生物制品有限公司。聚合酶链反应(PCR)体系购自深圳 Fermentas 有限公司, 细菌基因组提取试剂盒 Puregene Yeast/Bact. 试剂盒购自德国 Qiagen 公司, PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, PCR 扩增仪、电泳仪及凝胶成像分析系统均为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 抗菌药物敏感性检测 采用琼脂稀释法检测苯唑西林、头孢西丁、万古霉素和替考拉宁的最小抑菌浓度(MIC), 按美国临床实验室标准化委员会(CLSI M100-S22)推荐的方法进行操作, 质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC29213。

1.3.2 hVISA 初筛 按照 Howden 等^[5]报道的方法进行操作, 即挑取哥伦比亚血琼脂平板上过夜培养的单克隆菌落, 用

0.85% 的无菌盐水配制成浊度为 2.0 麦氏单位的菌悬液,吸取 10 μ L 菌液接种于含有替考拉宁 5 μ g/mL 的 MH 琼脂上,室温晾干后于 35 $^{\circ}$ C 培养,于 24、48 h 时各观察 1 次,以 48 h 时筛选平皿菌落大于或等于 1 个为阳性。

1.3.3 hVISA 确证 hVISA 初筛阳性的标本再使用菌群谱型分析/曲线下面积(PAP/AUC)法^[6]进行确证,即挑取哥伦比亚血琼脂平板上过夜培养的单克隆菌落,接种于胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)中,35 $^{\circ}$ C 振荡过夜后将菌液取出并调至 10⁸ CFU/mL。用 0.85% 的无菌盐水将原液分别稀释至 10⁵ CFU/mL 和 10² CFU/mL。将每株菌 3 种浓度(10⁸ CFU/mL、10⁵ CFU/mL 和 10² CFU/mL)的菌液分别接种至含有 0.0、0.5、1.0、2.0、2.5、4.0 和 8.0 μ g/mL 万古霉素的 BHI 琼脂平皿上,35 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后菌落计数并乘以相应稀释度,即为该菌株在特定万古霉素浓度下的实际菌落数。利用 Graphpad Prism5.0 软件绘制菌落数 Log 对数值 vs. 万古霉素浓度的曲线,并计算 AUC。以 ATCC700698(Mu3, hVISA)为标准,将待测菌株的 AUC 值与 Mu3 的 AUC 值进行比较,判定标准:比值小于 0.9 为 VSSA;比值 0.9~1.29 为 hVISA;比值大于或等于 1.3 为 VISA。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 700698 (Mu3, hVISA)和 ATCC 29213(VSSA)。

1.3.4 基因组 DNA 的提取 使用 Puregene Yeast/Bact. 试剂盒提取金黄色葡萄球菌 DNA,具体按照试剂盒推荐的革兰阳性菌 DNA 提取步骤进行。

1.3.5 多重 PCR 方法检测 mecA 基因及 SCCmec 分型检测 根据文献^[7]报道合成引物,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.3.6 多位点序列分析(MLST) 按照文献^[8]报道合成引物,扩增 7 个管家基因(arcC、aroE、glpF、gmk、pta、tpi 和 yqiL),具体条件按照文献报道进行,扩增结果送至英骏(上海)有限公司进行测序,测序结果在 <http://www.mlst.net/dbqry/saureus/htm> 网站上进行比对分析。

1.3.7 金黄色葡萄球菌 A 蛋白(spa)分型检测 参照文献^[9]合成引物:1095F:5'-AGA CGA TCC TTC GGT GAG C-3';1517R:5'-GCT TTT GCA ATG TCA TTT ACT G-3'。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,进行 30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,阳性标本进一步纯化测序分析,并将测序结果在 <http://www.ridom.de/spaserver> 网站上分析,得出具体 spa 型别。

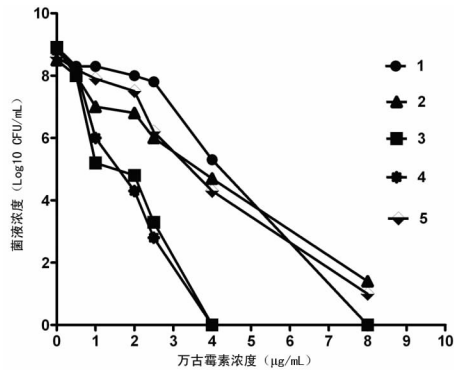
1.3.8 附属基因调节子(agr)分型检测 参照文献^[10]采用多重 PCR 方法进行 agr 分型检测。

2 结 果

2.1 285 株 MRSA 中 hVISA 的流行率 MHA5T 筛选法检测出阳性株 122 株,阳性率为 42.8%。初筛阳性的标本再用 PAP/AUC 法进行确证(见图 1),共检测出 hVISA 32 株,流行率为 11.2%,2009~2013 年 5 年间 hVISA 的检出率分别为 0.0%、6.4%、9.0%、14.3%和 18.8%,呈逐年上升趋势,见表 1。

2.2 hVISA 菌株分子流行病学特征 32 株 hVISA 的 MLST 分型主要为 ST239 型,共 29 株,占 90.6%,另外检出 ST5 型 2 株;ST188 型 1 株。SCCmec 分型以 III 型居多,共 28 株,占 87.5%;II 型 2 株,占 6.2%;I 型 1 株,占 3.1%;IV 型 1 株,占 3.1%。spa 分型分别为 t030 型 29 株,占 90.6%;t002 型 2 株,占 6.2%;t286 型 1 株,占 3.1%。agr 分型主要为 agr-I 型,共 30 株,占 93.8%;其次为 agr-II 型 2 株,占 6.2%。本地区 hVISA

的主要流行克隆为 ST239-SCCmecIII-t030-agrI 型,共 28 株,占 87.5%。



1、2 号为 hVISA;3 号为 VSSA;4 号为 ATCC29213;5 号为 Mu3。

图 1 PAP/AUC 法检测 hVISA 结果

表 1 hVISA 检出率

年份(年)	MRSA(n)	hVISA(n)	hVISA 检出率(%)
2009	32	0	0.0
2010	47	3	6.4
2011	67	6	9.0
2012	70	10	14.3
2013	69	13	18.8
合计	285	32	11.2

3 讨 论

从 20 世纪 80 年代起,万古霉素就已经成为治疗 MRSA 引起的严重感染的常用药物,但是 VISA 和 hVISA 的出现可导致万古霉素治疗失败,引起了医学界的普遍关注。hVISA 存在于 VISA 的前期,它们的原代菌对万古霉素敏感,而子代菌却含有 VISA 亚群。虽然 hVISA 原代菌对万古霉素的敏感性下降,但并不呈现耐药,随着不断存在的万古霉素选择性压力,最终可形成均质性的 VISA 株,进而导致万古霉素治疗失败。本研究结果显示该地区近 5 年来分离自无菌体液标本的 285 株 MRSA 中共检出 hVISA 32 株,检出率为 11.2%,略高于陈宏斌等^[11]监测 2007 年中国 14 个城市 315 株 MRSA 中 9.5% 的 hVISA 检出率,并高于欧美等发达国家的 hVISA 检出率^[12-13],但低于 Sun 等报道^[14]的 2009 年中国 15.7% 的 hVISA 检出率。5 年来该地区 hVISA 的检出率呈逐年上升趋势,2009 年末检出 hVISA,但 2013 年 hVISA 的检出率高达 18.8%,应引起临床重视。hVISA 表型的出现主要是由于糖肽类药物的选择性压力,有文献报道近年来由于万古霉素和替考拉宁的大量使用,hVISA 呈逐年上升的趋势^[15],因此临床应加强 hVISA 的监测,并严格控制糖肽类药物的使用。

agr 是一个群体感应系统,可调节大量毒力因子的表达,约 3 kb,受 P2 和 P3 两个激活子调节,由 4 部分基因组成,即 agrB、D、C、A, DNA 序列多态性分析显示 agr 分为 4 型,即: I、II、III、IV^[16],多个研究表明 agr 功能减低与 hVISA 和 VISA 万古霉素耐药有关^[17],在美国和日本,VISA 和 hVISA 主要为 agr-I 型或 agr-II 性。本地区 32 株 hVISA 主要为 agr-I 型,共 30 株,占 93.8%,另外 2 株为 agr-II 型。本次监测结果显示 32 株 hVISA 的主要流行克隆为 ST239-SCCmecIII-t030-agrI 型,共 28 株,占 87.5%,与台湾、日本等地区^[12,18]的主要流行株一致,亦表明该地区存在耐药株的传播,医疗部门应采取有效的措施控制耐药克隆的传播,如加强手部卫生、隔离患者、严格注意无菌操作、加强医院环境卫生等。

综上所述,本研究结果表明该地区 5 年来 hVISA 的检出率呈逐年上升趋势,因 hVISA 是糖肽类药物不断选择性压力条件下的产物,最终可导致万古霉素治疗失败,应引起临床高度重视,并严格控制糖肽类药物的使用。该地区 hVISA 菌株主要流行克隆为 ST239-SCCmecIII-t030-agrI 型,医疗卫生部门应采取有效措施控制 hVISA 的传播。

参考文献

[1] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility[J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 40: 135-136.

[2] Lodise TP, Miller CD, Graves J, et al. Predictors of high vancomycin MIC values among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia[J]. J Antimicrob Chemther, 2008, 62(5): 1138-1141.

[3] Maor Y, Hagin M, Belasov N, et al. Clinical features of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia versus those of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia[J]. J Infect Dis, 2009, 199(5): 619-624.

[4] Ariza J, Pujol M, Cabo J, et al. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin[J]. The Lancet, 1999, 353(9164): 1587-1588.

[5] Howden BP, Davies JK, Johnson PD, et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 99-139.

[6] Wootton M, Howe RA, Hillman R, et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero. resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 47(4): 399-403.

[7] Milheirico C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(9): 3374-3377.

[8] Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1008-1015.

(上接第 1116 页)

参考文献

[1] 胡树珍, 廖明, 钟结兴. 血清前白蛋白预测原发性肝癌患者肝储备功能的价值[J]. 现代医院, 2013, 13(11): 31-33.

[2] 徐春娥. AFP 与 AFU 联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J]. 中国保健营养, 2013, 23(2): 989-990.

[3] 袁林, 徐又先, 刘振. 血清 AFP、CG、SF 在原发性肝癌早期诊断和预后中的价值[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(1): 3-5.

[4] 张苏坚, 潘雨晖. 血清细胞间黏附分子-1 和甲胎蛋白检测在原发性肝癌诊断中的临床价值[J]. 现代医院, 2007, 7(5): 38-39.

[5] 晁鹏丽, 刘莉莉, 张忠英. 原发性肝癌癌细胞 DNA 倍体类型对预后的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2006, 9(6): 340-342.

[6] 张爱军, 许琳, 李文利, 等. DNA 倍体分析与癌胚抗原检测对良、恶性腹水鉴别诊断的意义[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 17(7): 724-728.

[7] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 195-200.

[9] Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5442-5448.

[10] Wang WY, Lee SY, Chiueh TS, et al. Molecular and phenotypic characteristics of methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates from patients with septic arthritis[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(11): 3617-3623.

[11] 宏宏斌, 王辉, 孙闻嘉, 等. 2007 年中国 14 个城市异质性万古霉素中介耐药的金黄色葡萄球菌分子特征[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(11): 1223-1227.

[12] Lin SY, Chen TC, Chen FJ, et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hetero-resistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a Taiwan Medical Center[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2012, 45(6): 435-441.

[13] Khatib R, Jose J, Musta A, et al. Relevance of vancomycin-intermediate susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49: 269-274.

[14] Sun W, Chen H, Liu Y, et al. Prevalence and Characterization of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates from 14 Cities in China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(9): 3642-3649.

[15] Sakoulas G, Moellering RC Jr. Increasing antibiotic resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(Suppl 5): S360- S367.

[16] Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence[J]. Mol. Microbiol, 2003, 48(6): 1429-1449.

[17] Howden BP, Johnson PD, Ward PB, et al. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2006, 50(9): 3039-3047.

[18] Ko KS, Lee JY, Suh JY, et al. Distribution of Major Genotypes among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Asian Countries[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 421-426.

(收稿日期: 2015-01-02)

[8] 王强, 谢跃文, 夏洁. 血清 TK1、AFP、CEA 联合检测在原发性肝癌诊断中的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9): 1101-1102.

[9] 侯振江, 王秀文, 张丽华, 等. 原发性肝癌患者血清 VEGF 和 AFP 检测及其相关性分析[J]. 现代预防医学, 2007, 34(5): 975-977.

[10] 袁林, 徐又先, 刘振. 血清 AFP、CG、SF 在原发性肝癌早期诊断和预后中的价值[J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(1): 3-5.

[11] Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients[J]. Gastroenterology, 2006, 131(3): 729-737.

[12] Araujo SE, Bernardo WM, Habr-Gama A, et al. DNA ploidy status and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of published data[J]. Dis Colon Rectum, 2007, 50(11): 1800-1810.

(收稿日期: 2014-12-25)