

新生儿呼吸道分离凝固酶阴性葡萄球菌耐药性分析^{*}

郭瑞林, 李凯旋, 苏冰, 郭建春, 董昌虎, 张晓雪(陕西中医学院第二附属医院检验科, 陕西咸阳 712000)

【摘要】 目的 探讨新生儿呼吸道感染凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)的耐药特点, 指导临床合理用药和预防院内感染。**方法** 采用 K-B 纸片扩散法, 测定 CNS 对 16 种抗菌药物的耐药性。**结果** 1 332 例新生儿呼吸道标本中检出 CNS 132 例, 阳性率 10.1%, 其中耐甲氧西林 CNS 检出 14 例, 占 CNS 的 10.6%。132 例 CNS 对青霉素类(97.7%)、红霉素(77.3%)、克林霉素(57.6%)耐药率较高, 对头孢吡肟(7.2%)和头孢哌酮/舒巴坦(9.7%)耐药率较低, 对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺全部敏感。**结论** CNS 为新生儿呼吸道感染的重要致病菌, 临床医生应根据新生儿感染 CNS 的药物敏感试验结果合理使用抗菌药物。

【关键词】 新生儿; 呼吸道感染; 凝固酶阴性葡萄球菌; 耐药性; 院内感染

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)03-0322-02

Resistance analysis of coagulase negative staphylococcus in newborn respiratory tract samples^{*} GUO Rui-lin, LI Kai-xuan, SU Bing, GUO Jian-chun, DONG Chang-hu, ZHANG Xiao-xue (Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Shanxi University Of Chinese Medicine, Xianyang, Shanxi 712000, China)

【Abstract】 Objective To explore drug resistance characteristics of neonatal respiratory infections coagulase-negative staphylococci (CNS), and to guide clinical rational drug use and to prevent nosocomial infection. **Methods** K-B disk diffusion method was used to determinate CNS on 16 antimicrobial drug resistance. **Results** CNS 132 cases were detected from 1 332 cases of neonatal respiratory specimens, the positive rate was 10.1%, in which MRCNS detected in 14 cases, accounting for 10.6% of coagulase-negative staphylococci. And 132 coagulase-negative staphylococci had higher resistance rates to penicillin (97.7%), erythromycin (77.3%), clindamycin (57.6%); had lower resistance rates to cefepime (7.2%) and cefoperazone/sulbactam (9.7%), and with all sensitive to vancomycin, teicoplanin, linezolid. **Conclusion** CNS might be important pathogenic bacteria for neonatal respiratory tract infection, clinicians should rational use of antimicrobial drugs based on the results of drug susceptibility testing of newborns infected with CNS.

【Key words】 newborn; respiratory infections; coagulase-negative staphylococci; resistance; nosocomial infections

凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)广泛存在于自然界和人体表面, 是引起各种院内感染的常见致病菌。新生儿免疫系统不健全, 呼吸道抵抗力较弱, 在生产过程和出生后极易发生呼吸道 CNS 感染, 因此, 针对新生儿呼吸道感染 CNS 的治疗尤为重要。现将本院 2012 年 1 月至 2013 年 12 月新生儿病房呼吸道分离 CNS 132 例的耐药性进行分析, 以期临床合理使用抗菌药物提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院新生儿病房 2012 年 1 月至 2013 年 12 月送检的疑为呼吸道细菌感染患儿痰标本共 1 332 例。

1.2 仪器与试剂 分离培养基哥伦比亚羊血平板、巧克力平板、麦康凯平板由郑州安图生物工程股份有限公司生产, 药敏培养基 M-H 琼脂由法国生物梅里埃公司生产, 细菌鉴定采用 API 或手工鉴定, 药敏纸片由英国 Oxoid 公司生产。

1.3 方法

1.3.1 新生儿留取痰标本的方法 先清洁口腔, 将一次性婴儿吸痰管的长管接好负压吸引器, 用无菌持物镊将插入管经口咽或者呼吸道轻轻插入, 开动吸引器, 此时痰液慢慢吸出, 并流入婴儿吸痰器中, 吸痰完毕, 分开接头, 用一次性吸痰器的无菌

盖将痰液存于痰液器中密封后送检。

1.3.2 细菌分离与鉴定 严格按照《全国临床检验操作规程》第 3 版和本科室操作规程执行, 细菌鉴定采用 API 微生物鉴定系统^[1]。

1.3.3 药敏试验方法和资料统计 按美国临床和实验室标准化协会(CLSI)规定 K-B 纸片扩散法进行试验, 根据 2012 年 CLSI 标准判断药敏试验结果, 将中介并入耐药结果。

1.3.4 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)检测 MRCNS 的检测采用 CLSI 推荐的头孢西丁纸片扩散法(K-B 法)进行筛选, 即抑菌环直径小于或等于 24 mm 为 MRCNS 耐药菌株。用琼脂扩散进行确证, 在含 4% 氯化钠注射液, 6 μg/mL 苯唑西林 M-H 平板中点种 0.5 麦氏单位菌液, 经 35 ℃, 24 h 孵育, 只要有一个菌落生长即判断为 MRCNS^[2]。

1.3.5 质量控制 以金黄色葡萄球菌(ATCC 43300)为葡萄球菌阳性参考菌株, 葡萄球菌(ATCC 12228)为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌阴性参考菌株, 药敏质控菌株与试验菌株同时进行检测。

1.4 统计学处理 采用 WHONET5.6 软件统计分析药物敏感试验结果。

^{*} 基金项目: 陕西省咸阳市科学技术研究发展计划项目(2011K13-2)。

作者简介: 郭瑞林, 男, 本科, 主任技师, 主要从事微生物检验与细菌耐药研究。

2 结 果

2.1 检出阳性率 1 332 例新生儿呼吸道标本中检出 CNS 132 例,阳性率 10.1%,其中 MRCNS 检出 14 例,占 CNS 的 10.6%。CNS 以表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌为主,表皮葡萄球菌 76 例(57.6%),溶血葡萄球菌 28 例(21.2%),人葡萄球菌 16 例(12.1%),松鼠葡萄球菌 6 例(4.5%),华纳葡萄球菌 1 例(0.8%),耳葡萄球菌 1 例(0.8%),孔氏葡萄球菌 1 例(0.8%),其他葡萄球菌 3 例(2.3%)。

2.2 细菌药敏试验结果 132 例 CNS 对青霉素类耐药率达 95.0%以上、对红霉素耐药率 77.3%、对克林霉素耐药率 57.6%、对复方磺胺甲噁唑耐药率 51.5%;对 4 代头孢菌素头孢吡肟和 3 代头孢加酶抑制剂头孢哌酮/舒巴坦耐药率低于 10.0%;对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺全部敏感。各种抗菌药物对 CNS 药敏试验结果见表 1。

表 1 凝固酶阴性葡萄球菌药敏试验结果[n(%)]

抗菌药物	耐药	敏感
青霉素 G	129(97.7)	3(2.3)
氨苄西林	126(95.5)	6(4.5)
头孢唑啉	31(23.5)	101(76.5)
头孢呋辛钠	46(35.0)	86(65.0)
头孢曲松	27(20.9)	105(79.1)
头孢噻肟	14(10.9)	118(89.1)
头孢吡肟	9(7.2)	123(92.8)
头孢哌酮/舒巴坦	13(9.7)	119(90.3)
利福平	41(31.3)	91(68.7)
左氧氟沙星	21(15.9)	111(84.1)
复方磺胺甲噁唑	68(51.5)	64(48.5)
克林霉素	44(57.6)	88(42.4)
红霉素	102(77.3)	30(22.7)
利奈唑胺	0(0.0)	132(100.0)
万古霉素	0(0.0)	132(100.0)
替考拉宁	0(0.0)	132(100.0)

3 讨 论

CNS 是除金黄色葡萄球菌外的一类葡萄球菌,大量存在于人体表面,正常条件下不致病,但某些情况如免疫力降低或接受一些侵入性治疗容易引起 CNS 感染。新生儿免疫系统不健全,抵抗力差,可能存在体质量极低、中心静脉置管、胃肠外营养以及广谱抗菌药物不合理使用等因素,使 CNS 感染的机会大大增加[3]。感染新生儿的主要环境包括母婴同室时的产科病房、新生儿病房、新生儿重症监护病房等,主要通过母体及医护人员的手、口鼻、医疗器械、暖箱、奶嘴、衣物、敷料等物品在医护人员或患者间播散。特别是 CNS 能产生黏质物,在其表面形成生物膜,对光滑的生物医学材料具有吸附作用,细菌藏于厚厚的生物膜内,使抗菌药物治疗效果较差[4]。

本研究 1 332 例疑为新生儿呼吸道感染患者标本中检出 CNS 132 例,阳性率 10.1%,其中 MRCNS 14 例,占 CNS 的 10.6%。表皮葡萄球菌在新生儿呼吸道 CNS 感染中有 76 例,占 57.6%,与彭敬红等[5]的报道一致,由此提示新生儿呼吸道感染不可忽视表皮葡萄球菌感染。

新生儿呼吸道分离 CNS 对青霉素类耐药率达 95.0%以上,对红霉素、克林霉素、复方磺胺甲噁唑耐药率大于 50.0%,表现为多重耐药。本研究尚未发现万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺耐药株。万古霉素和替考拉宁是针对成人葡萄球菌感染的首选抗菌药物,但它们对耳、肾的不良反应较大,新生儿患者使用应十分慎重,未成熟的新生儿,最好测定血清药物浓度以积累使用经验。万古霉素在肺组织的浓度低,并不推荐用于肺部感染的治疗[6]。

利奈唑胺是一种新型恶唑烷酮类合成抗菌药物,2000 年获得美国食品和药物管理局批准上市,已被批准用于新生儿和儿童,此类药物对各类耐药的革兰阳性球菌具有抗菌活性,通过抑制细菌蛋白质起始阶段的合成发挥作用,与其他抑制合成的抗菌药物很少有交叉耐药,且体外不易诱导细菌耐药性产生[7]。国内一项研究也显示利奈唑胺对革兰阳性球菌包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的疗效和安全性良好[8]。利奈唑胺在肺组织具有较高浓度,利奈唑胺在治疗新生儿革兰阳性球菌感染的有效性和安全性方面取得良好效果[9-11],在治疗新生儿呼吸道 CNS 感染时值得进一步积累经验。

其他敏感性较高的抗菌药物包括头孢噻肟、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦等。头孢噻肟为第 3 代头孢菌素,抗菌谱广,对大部分非耐药革兰阴性杆菌有良好的抗菌活性。本研究显示,头孢噻肟对 CNS 也具有有良好的抗菌活性,可作为经验用药之一。头孢吡肟虽然体外耐药率(7.2%)较低,但在新生儿的治疗经验较少,对 2 个月以下儿童使用本品应谨慎。舒巴坦为一种不可逆的β-内酰胺酶抑制剂,与第 3 代头孢菌素联合应用具有良好的杀菌活性。本项研究证明头孢哌酮与舒巴坦的复合制剂在体外具有良好的抗菌效果,耐药率为 9.7%,是控制新生儿感染的良好抗菌药物,可作为治疗新生儿呼吸道 CNS 感染的经验抗菌药物之一。总之,CNS 呼吸道感染治疗中应尽量根据药敏试验结果合理使用抗菌药物,避免盲目用药或联合使用。

新生儿发生的呼吸道 CNS 感染多为院内感染,防范是重点。应积极做好产前保健,预防早产及羊膜早破,减少产前、产时窒息损伤、减少气管插管机会;应加强对产房和新生儿病房的院内感染防范,规范工作人员手消毒;在产科新生儿室和儿科新生儿病房内一旦出现院内感染,应予以高度重视,尽快清除病原体 and 传播途径,积极采取相应消毒隔离措施,防止发生院内交叉感染和大规模暴发流行。临床用药应根据药敏试验结果并结合新生儿 CNS 呼吸道的特点合理使用抗菌药物,加强耐药监测和感染控制,从而改善 CNS 耐药现状。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].南京:东南大学出版社,2006:1744.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. PA, USA:CLSI,2006.

[3] 朱春兰,伍华东,朱立军,等.168 例新生儿血培养分离凝固酶阴性葡萄球菌及其耐药性分析[J].中国优生与遗传杂志,2013,8(8):100-101.

[4] Xiong ZJ,Li XY,Duan ZL,et al. Analysis on antimicrobial resistance of 107 strains of coagulase negative staphylococcus[J]. China Med Herald,2012,9(1):86-87.

[5] 彭敬红,吕军,吴均竹,等.凝固酶阴性葡萄球菌致新生儿败血症的耐药性分析[J].中华医院感染(下转第 326 页)

3 讨 论

梅毒是由 TP 引起的,严重危害人类健康的性传播疾病之一,主要通过性接触和血液传播。梅毒是一种传染性强且危害性大的疾病,不仅可以在普通人群中水平传播,还可以经母胎垂直传播,引起先天性梅毒^[2,6]。因此,早诊断、早治疗对控制梅毒蔓延至关重要,而选择敏感性高、特异性强的检测方法将有助于梅毒(特别是早期梅毒)诊断。

国内外目前检测 TP 主要有以下几种方法:(1)病原体检测,包括暗视野显微镜检查、银染色法、荧光抗体染色法等直接检测 TP 的方法。(2)血清学试验,包括性病研究实验室试验、快速血浆反应素环状卡片试验、不加热血清反应素试验和甲苯胺红不加热血清试验等非特异性血清学试验,以及梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验、梅毒螺旋体血球凝集试验、TP-ELISA 和免疫印迹等特异性血清学试验。(3)基因诊断技术。这些试验方法各有其优缺点:病原体检测法直接观察分泌物中的 TP,可直接诊断梅毒,是目前最特异、最准确的诊断方法,但灵敏度低^[7]。非特异性血清学试验检测反应素等非特异性抗体,敏感性高而特异性较低。特异性血清学试验检测 TP 抗体,敏感性和特异性都很高,可作为确认试验,但不能反映梅毒治疗效果及治愈情况,也不能判断是否具有传染性,仅适合于大批量的实验室检测^[8]。基因诊断技术检测 TP DNA,有很强的特异性和很高的敏感性,但目前国内 PCR 试剂盒质量有待改进,同时试剂成本较高^[4,9]。

PCR 可以在 TP 抗体产生前几周检测出 TP DNA,即窗口期隐性感染;实时荧光定量 PCR 具有实时监测、绝对定量和高通量检测的优势,克服了传统 TP 检测技术敏感性低、定量困难、假阳性率高等缺点^[4]。常用的 Taqman 探针技术存在探针标记和纯化难度高、Taq 酶要求高且反应时间较长等不足之处。Solinas 等^[10]使用二聚体蝎型探针进行 SNP 分析,这种探针通过一个 HEG 连接在引物 5'端,探针可与该引物扩增后的新生链互补,荧光报告基团标记在探针 5'端;另有一条单独的猝灭链与探针互补,猝灭基团标记在猝灭链 3'端。无特异性产物时,猝灭链和探针杂交,从而无荧光产生;有特异性产物时,由于分子内部杂交比分子间杂交更容易,探针更易杂交到产物链上并产生特异荧光。

本研究首次建立了二聚体蝎型探针荧光定量 PCR 检测 TP 的方法,并对该方法进行了初步的方法学评价,其线性范围为 10¹~10⁸ copy/mL,灵敏度为 10 copy/mL,特异性和敏感性均为 100.0%。二聚体蝎型探针方法对疑似梅毒患者阳性

检出率显著高于常用的 Taqman 荧光定量 PCR。后续试剂盒研发的优化试验中作者进一步将对该方法的批内、批间重复性,反应体系稳定性,以及病原体检测特异性等参数进行方法学评价。二聚体蝎型探针定量 PCR 为临床上早期诊断 TP 和控制其蔓延奠定了试验和理论基础,可在今后 TP 的监测等方面开展应用。

参考文献

[1] 胡冰雪,曲波,刘洁,等. 中国 1990~2011 年梅毒流行特征分析与趋势预测[J]. 现代预防医学,2014,41(6):961-963.

[2] 周动机,谢慧,张遇娴,等. 不同孕期治疗对妊娠梅毒分娩的预后影响[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2013,20(2):121-123.

[3] 刘燕平,吴忠勇,吴建松. 荧光定量聚合酶链反应技术在梅毒患者检测中的应用价值[J]. 当代医学,2013,19(18):115-116.

[4] Harris CL, Sanchez-Vargas IJ, Olson KE, et al. Polymerase chain displacement reaction[J]. Biotechniques, 2013, 54(2):95-99.

[5] 陈峰,吴尔翔,丁锁顺,等. 二聚体蝎型探针荧光定量 PCR 快速检测志贺菌方法的建立及初步应用[J]. 中国人兽共患病学报,2013,29(9):886-890.

[6] 张军,刘涛,盛晓红. 15 436 例住院患者梅毒抗体检测结果分析[J]. 检验医学与临床,2013,10(13):1735-1736.

[7] 高泽勤,李新科,朱夫俊. 梅毒螺旋体感染四种血清学检测方法的临床评价[J]. 安徽预防医学杂志,2014,20(2):88-90.

[8] 郭家权,洪敏,林永前. 酶联免疫吸附法检测与甲苯胺红不加热血清试验在梅毒检验中应用价值的比较[J]. 广东医学,2014,35(5):738-740.

[9] 刘新平,周方红. 临床常用三种梅毒检测方法的实验室比较[J]. 检验医学与临床,2012,9(20):2633-2634.

[10] Solinas A, Brown LJ, McKeen C, et al. Duplex scorpion primers in SNP analysis and FRET applications[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(20):E96.

(收稿日期:2014-08-19 修回日期:2014-10-05)

(上接第 323 页)

学杂志,2011,21(5):1034-1036.

[6] Tascini C, Gemignani G, Doria R, et al. Linezolid treatment for gram-positive infections; a retrospective comparison with teicoplanin[J]. J Chemother, 2009, 21(3):311-316.

[7] 汪复,张婴元. 实用抗感染治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:297-299.

[8] Lin DF, Zhang YY, Wu JF, et al. Linezolid for the treatment of infections caused by Gram-positive pathogens in China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 32(3):241-249.

[9] Shang W, Yang YQ, Wang XM, et al. Distribution of coagulase-negative staphylococci from trauma patients and

its drug resistance[J]. Chin J Nosocomiol, 2011, 21(5):1030-1033.

[10] Kocher S, Müller W, Resch B. Linezolid treatment of nosocomial bacterial infection with multiresistant Gram-positive pathogens in preterm infants: a systematic review[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(2):106-110.

[11] 王晓蕾,孙海滨,陈桃英,等. 利奈唑胺治疗新生儿耐药革兰氏阳性球菌败血症临床分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(2):213-214.

(收稿日期:2014-07-07 修回日期:2014-10-15)