

医院内外感染葡萄球菌的耐药性分析*

鲍群丽¹, 汪宏良^{2△}, 柯俊¹, 罗卓跃¹ (1. 湖北省黄石市中心医院检验科 435000; 2. 湖北省黄石市肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室 435000)

【摘要】目的 分析医院内与院外感染葡萄球菌的耐药性, 为临床用药提供依据。**方法** 收集 2011 年 1 月至 2013 年 12 月黄石市中心医院门诊(院外)、住院(院内)患者各种标本中分离的 454 株葡萄球菌, 用 VITEK-32 专用卡 GPI 及血浆凝固酶试验进行鉴定, 药敏试验按 K-B 琼脂扩散法进行, 根据美国临床和实验室标准化协会 2006 对头孢西丁的耐药情况进行分类分析, 数据分析用 WHONET 5.5 药敏分析软件。**结果** 在 379 株金黄色葡萄球菌(SA)中, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检出率为 41.2%, 医院内、外标本 MRSA 检出率分别为 44.1% 和 19.6%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 共检出凝固酶阴性葡萄球菌 75 株, 医院内、外标本耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)检出率分别为 61.1% 和 38.1%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。未检出万古霉素、替考拉宁耐药菌株。**结论** 耐甲氧西林葡萄球菌具有多重耐药性; 院外 SA 感染者首选药物为庆大霉素、苯唑西林; 若为院内 SA 和对于 MRCNS 引起的不论是院内或院外感染, 均推荐首选万古霉素或替考拉宁。

【关键词】 医院内; 医院外; 金黄色葡萄球菌; 凝固酶阴性葡萄球菌; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)03-0332-02

Analysis of drug resistance of staphylococcus in patients infected inside and outside hospitals* BAO Qun-li¹, WANG Hong-liang^{2△}, KE Jun¹, LUO Zhuo-yue¹ (1. Department of Clinical Laboratory, the Central Hospital of Huangshi City, Huangshi, Hubei 435000, China; 2. Hubei Key Laboratory of Kidney Disease Pathogenesis and Intervention of Huangshi City, Huangshi, Hubei 435000, China)

【Abstract】Objective To analyze the drug resistance of staphylococcus aureus(SA) in patients infected inside and outside hospitals in order to provide a basis for clinical drug use. **Methods** A total of 454 strains of staph were discreted from various kinds of examples of patients inside and outside hospitals in the hospital from Jan 2011 to Dec 2013, which were identified with GPI of VITEK-32 system and plasma-coagulase test, the disk diffusion method and classification analysis about drug fast of cefoxitin was performed according to guidelines of the CLSI (2006), WHO-NET 5.5 software was used to analyze the data. **Results** The detection rate of methicillin resistant staphylococcus aureus(MRSA) was 41.2% of all 379 strains SA, which was 44.1% and 19.6% of samples inside and outside hospitals, respectively, the difference was statistically significant($P < 0.05$); in total, 75 strains coagulase negative staphylococcus(CNS) were collected, the detection rate of methicillin resistant coagulase negative staphylococcus(MRCNS) was 61.1% and 38.1% of samples inside and outside hospitals, respectively, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The drug resistant strain about vancomycin, teicoplanin wasn't been detected. **Conclusion** MRS had multidrug resistance, the choice drug of patients infected outside hospitals by SA was gentamycin, oxacillin; if hospital onset of infection of SA and hospital onset of infection or community infection of MRCNS, the choice drug was vancomycin or teicoplanin.

【Key words】 inside hospitals; outside hospitals; staphylococcus aureus; coagulase negative staphylococcus; drug resistance

近年来, 有研究表明, 葡萄球菌是引起医院及社区获得性感染的主要致病菌之一, 同时亦发现引起医院和社区感染的葡萄球菌耐药性存在较大区别^[1]。因此, 加强黄石地区葡萄球菌的耐药性监测, 对制订经验治疗方案及细菌耐药性防治具有重要参考价值, 对有效控制多重耐药葡萄球菌的流行和传播具有重要意义。为了探讨黄石地区院内与院外感染的葡萄球菌对某些常用抗菌药物的耐药性, 作者对 2011 年 1 月至 2013 年 12 月在黄石市中心医院住院与门诊患者分离的葡萄球菌进行药敏试验和耐药性分析, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2013 年 12 月黄石市中心医院

各种标本中分离的葡萄球菌共 454 株, 均为非重复菌株, 其中来自门诊患者 67 株, 住院患者 387 株; 金黄色葡萄球菌 379 株, 凝固酶阴性葡萄球菌 75 株。

1.2 仪器与试剂 全自动细菌鉴定仪 VITEK-32 系统和配套鉴定卡 GPI(法国生物梅里埃公司产品)。M-H 琼脂购于杭州天和微生物试剂有限公司。药敏纸片系 Oxoid 公司产品。质控菌株金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)由卫生部临床检验中心提供, 所有药敏质控结果符合美国临床和实验室标准化协会(CLSI)最新颁布的药敏质控范围。

1.3 细菌鉴定及药敏试验 细菌分离培养按《全国临床检验操作规程》进行^[2], 用 VITEK-32 专用卡 GPI 及血浆凝固酶试

* 基金项目: 湖北省黄石市医药卫生立项科研项目[黄科农社(2011)1号]。

作者简介: 鲍群丽, 女, 硕士, 主管技师, 主要从事病原微生物快速检测与耐药方面的研究。△ 通讯作者, E-mail: bql117@163.com。

验进行鉴定,严格按照操作说明进行操作。耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)检测:采用 M-H 培养基,K-B 琼脂扩散法,结果判断按 CLSI 2006 年版标准^[3]。MRS 判断标准:用 30 μg 头孢西丁药敏纸片代替 1 μg 苯唑西林,抑菌环直径小于或等于 19 mm 判为耐药 MRS,抑菌环直径大于 19 mm 判为甲氧西林敏感葡萄球菌。

1.4 统计学处理 用 WHONET 5.5 药敏分析软件进行数据分析,统计方法采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 454 株葡萄球菌中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)及 MRS 检出结果 见表 1。检出金黄色葡萄球菌 379 株,其中院内 MRSA 147 株,院外 MRSA 9 株;凝固酶阴性葡萄球菌 75 株,其中院内 MRCNS 33 株,院外 MRCNS 8 株。检出 MRS 197 株,其中院内 MRS 180 株,院外 MRS 17 株,院外与院内 MRS 检出率差异有统计学意义($P<0.05$);院外与院内 MRSA 检出率差异有统计学意义($P<0.05$);院外与院内 MRCNS 检出率差异也有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 454 株葡萄球菌 MRSA、MRCNS 及 MRS 检出结果[n(%)]

菌种来源	金黄色葡萄球菌		凝固酶阴性葡萄球菌		葡萄球菌	
	n	MRSA	n	MRCNS	n	MRS
院外	46	9(19.6)	21	8(38.1)	67	17(25.4)
院内	333	147(44.1)	54	33(61.1)	387	180(46.5)
合计	379	156(41.2)	75	41(54.7)	454	197(43.4)

表 2 14 种抗菌药物的耐药率(%)

抗菌药物	金黄色葡萄球菌 (n=379)		凝固酶阴性葡萄球菌 (n=75)	
	院外 (n=46)	院内 (n=333)	院外 (n=21)	院内 (n=54)
苯唑西林	28.1	48.6	80.0	92.5
青霉素 G	75.6	92.0	93.8	98.0
红霉素	45.6	76.9	64.7	73.1
万古霉素	0.0	0.0	0.0	0.0
克林霉素	29.3	52.1	45.0	57.1
氯霉素	22.5	43.5	41.4	41.7
复方磺胺甲噁唑	51.4	59.1	72.9	82.2
庆大霉素	10.3	29.0	20.0	38.8
四环素	21.2	44.4	40.5	42.2
环丙沙星	28.5	52.4	57.9	60.4
左氧氟沙星	26.1	43.0	38.1	54.7
替考拉宁	0.0	0.0	0.0	0.0
头孢西丁	18.4	44.1	36.7	61.7
阿奇霉素	47.8	77.5	61.5	71.1

2.2 耐药率结果 见表 2。由表 2 可见,除万古霉素、替考拉宁外,院内与院外感染的葡萄球菌对其余 12 种抗菌药物中绝大部分药物耐药率差异均有统计学意义($P<0.05$)。院外金黄色葡萄球菌对 14 种抗菌药物除青霉素 G、红霉素、复方磺胺甲噁唑、阿奇霉素耐药率较高外,对其余抗菌药物的耐药率均小于 30.0%,未发现万古霉素和替考拉宁耐药菌株。凝固酶阴性葡萄球菌耐药性统计结果显示其具有严重的多重耐药性,

院内与院外凝固酶阴性葡萄球菌耐药率差异有统计学意义($P<0.05$)。所有凝固酶阴性葡萄球菌菌株对青霉素 G 耐药率最高,达 90.0%以上,MRSA 耐药率小于 40.0%者仅有庆大霉素、万古霉素、替考拉宁 3 种抗菌药物。

3 讨 论

随着抗菌药物的广泛应用,出现了大量的临床耐药致病菌。MRSA 和 MRCNS 都是医院感染的重要致病菌,特别是 MRSA,其对多种抗菌药物产生耐药性,它导致的各种感染治疗困难,病死率较高,早已引起医学界的广泛关注^[4]。本文分离的 454 株葡萄球菌中 MRSA 156 株,MRCNS 41 株,MRSA 分离株明显高于 MRCNS 株数。MRCNS 医院感染率低于 MRSA 的主要原因可能是 MRCNS 的致病性相对较弱,其治疗效果比 MRSA 感染者好,部分病例因经验治疗有效而未能及时留取标本送检,可能存在漏诊现象。另外,MRCNS 感染者的病程相对较短,传播他人的机会相对减少。

自发现 MRS 以来,我国近年来各地报道的 MRS 检出率高低不一,在 30%~95%,具有较大差异,但总体呈上升趋势^[5-7]。黄石市中心医院 MRS 检出率为 43.4%,与文献^[6-8]报道有一定差异。国内 MRS 检出率的差异提示,不同时期和地域 MRS 感染与流行情况有较明显的差别,造成这一差别的可能原因是各地对抗菌药物使用情况不同,从而导致细菌的耐药性变异不同^[8]。

根据本研究统计结果可以看出,黄石市中心医院住院患者 MRS 检出率(46.5%)明显高于门诊患者 MRS 检出率(25.4%),其中金黄色葡萄球菌院内与院外 MRSA 检出率分别为 44.1%和 19.6%;院内与院外 MRCNS 检出率分别为 61.1%和 38.1%。这提示加强院内感染的管理,积极采取各种消毒隔离措施,对预防 MRS 在医院内传播和流行具有十分重要的意义。

从耐药性检测结果可见,除万古霉素、替考拉宁外,院内与院外感染的葡萄球菌对其余 12 种抗菌药物中绝大部分药物耐药率差异均有统计学意义($P<0.05$)。院外金黄色葡萄球菌对 14 种抗菌药物除青霉素 G、红霉素、复方磺胺甲噁唑、阿奇霉素耐药率较高外,对其余抗菌药物的耐药率均小于 30.0%。未发现万古霉素和替考拉宁耐药菌株,这提示院外金黄色葡萄球菌的耐药率较低,有别于院内金黄色葡萄球菌和所有凝固酶阴性葡萄球菌菌株,且 MRSA 检出率低。因此如果金黄色葡萄球菌为院外感染,首选药物可为庆大霉素、苯唑西林等而不是万古霉素。若为院内金黄色葡萄球菌感染,由于 MRSA 检出率较高,多重耐药严重,推荐首选万古霉素或替考拉宁。

凝固酶阴性葡萄球菌耐药性统计结果显示其具有严重的多重耐药性,院内与院外凝固酶阴性葡萄球菌耐药率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。所有凝固酶阴性葡萄球菌菌株对青霉素 G 耐药率最高,达 90.0%以上,MRSA 耐药率小于 40.0%者仅有庆大霉素、万古霉素、替考拉宁 3 种抗菌药物,由此可见院内与院外凝固酶阴性葡萄球菌耐药性虽有部分差异,但均存在严重的多重耐药或交叉耐药。

因此,对于 MRCNS 引起的不论是院内或院外感染,推荐首选的药物都是万古霉素或替考拉宁。

参考文献

[1] Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in three communities[J]. N Engl J Med,2005,352(14):1436-1444.
[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验(下转第 336 页)

2.3 AFS 及 IMC-AFS 结果判断 涂片中结核分枝杆菌及非结核分枝杆菌被染成红色,其他细菌染成蓝色。阳性质控菌株:结核分枝杆菌标准菌株 H37Ra;阴性质控菌株:大肠埃希菌(ATCC 25922)。

3 讨 论

本室建立的采用 IMC 联合 IMC-PCR-ELISA,首先通过抗结核杆菌抗体包被的免疫磁珠,能特异地捕获结核分枝杆菌^[7]。这样既起到了浓缩收集结核分枝杆菌的作用,又减少了标本中其他细菌对试验的干扰。然后,在 PCR 反应体系中加入目的模板和另外 2 个已知不同溶度的双内标模板,反应后得到 3 类扩增产物。由于其中一条引物的 5'端用生物素进行了标记,生成的 3 类扩增产物均带有生物素标记。进一步用链霉亲和素包被的酶标板捕获 PCR 扩增产物,经变性解链后,用 3 套特异性探针(3'端用地高辛标记)与扩增产物分别进行杂交。再用抗地高辛酶标记抗体与杂交体上的地高辛结合,漂洗后加底物显色,测定吸光度值。最后根据 3 种模板起始拷贝数与检测的吸光度值呈正比的关系,通过公式计算得到目的模板的起始拷贝数。

本研究以结核分枝杆菌培养法为金标准,将培养结果为阳性的 102 例患者的痰标本和血清标本作为阳性对照,以 48 例培养结果为阴性的非结核患者痰标本和血清标本作为阴性对照。对 IMC-PCR-ELISA 与其他临床常用的几种结核杆菌检测方法进行了对比分析,结果显示,AFS 简单、快速,但敏感性(35.29%)较差,与文献^[8]报道结果一致;IMC-AFS 由于结合了免疫磁珠捕获技术,敏感性(43.14%)较 AFS 高。但上述两种方法,结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌均显示阳性,不能有效区分。DICA 检测的是血清中抗结核抗体,其敏感性较涂片法高,但由于非结核患者中因免疫接种等原因会有一定的假阳性结果出现,本次测试中该法的特异性(75.00%)为 5 种检测方法中最低的。普通 PCR 显示出较高的敏感性(91.67%)和特异性(93.14%),但仍出现 4 例假阳性和 7 例假阴性,经分析其中假阴性结果为目的模板的拷贝数较低而导致,假阳性结果则为非特异性扩增所致。本室建立的 IMC-PCR-ELISA 定量检测结核分枝杆菌方法,通过磁性微粒表面包被抗结核分枝杆菌抗体,可特异性捕获结核分枝杆菌,起到了浓缩收集目的菌和减少干扰的作用,再联合 PCR 检测技术能显著提高目的基因的检出率,其灵敏度要比单独 PCR 增加 8~2 000 倍^[9-11]。同时,分子杂交技术的应用,也大大提高了方法的特异性^[12]。此外,双内标 PCR 技术实现了定量检测目的模板起始拷贝数的目的。IMC-PCR-ELISA 检测全过程约 4.5 h,最低检测限为 5 copy/ μ L,特异性和敏感性均为 100.00%。结果显示,IMC-PCR-ELISA 具有快速、灵敏、特异、可定量检测的特点,

是临床快速诊断结核病的有效检测方法。

参考文献

[1] 廖丽.我国结核病流行现状及防治工作形势分析[J].中外医疗,2014,33(3):129-130.

[2] 杨江华,王文杰,何自芳,等.免疫磁珠捕获法分离抗酸杆菌的实验研究[J].中国病原生物学杂志,2011,6(3):168-169.

[3] 代旭磊,柳爱华,宝福凯,等.结核分支杆菌的分子检测技术研究进展[J].现代预防医学,2012,39(8):2032-2034.

[4] 李春林,孙峰.结核分枝杆菌检测方法临床应用的对比研究[J].检验医学与临床,2012,9(17):2164.

[5] 颜京瑞.检测结核抗体对结核病的临床诊断价值[J].检验医学与临床,2010,7(2):113-115.

[6] 郑玉群,许卫国,陆伟,等.免疫磁珠分离涂片和 PCR 检测痰内结核分枝杆菌的诊断价值研究[J].江苏预防医学,2010,21(2):14-17.

[7] Wilson S, Lane A, Rosedale R, et al. Concentration of mycobacterium tuberculosis from sputum using ligand-coated magnetic beads[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(9): 1164-1168.

[8] 王华钧,孙小军,金法祥,等.4 种结核分枝杆菌检测方法的比较[J].中华医院感染学杂志,2012,22(11):2472-2474.

[9] Barletta J, Bartolome A, Constantine NT. Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion[J]. J Virol Methods, 2009, 157(2): 122-132.

[10] Thompson DE, Rajal VB, Batz SD, et al. Delection of salmonellasp in water using magnetic capture hybridization combined with PCR or real-time PCR[J]. J Water Heath, 2006, 4(1): 67-75.

[11] Hwang YC, Leong OM, Chen W, et al. Comparison of a reporter assay and immunomagnetic separation real-time reverse transcription-PCR for the detection of enteroviruses in seeded environmental water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(7): 2338-2340.

[12] 高媛,郑文岭,马文丽.基因诊断技术的临床应用进展[J].基础医学与临床,2013,33(1):15-18.

(收稿日期:2014-08-24 修回日期:2014-10-18)

(上接第 333 页)

操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:178-180.

[3] Clinical and Laboratory Sandards Institute (CLSI). Performance stan -dards for antimicrobial susceptibility tes-ting[S]. PA, USA; CLSI, 2006.

[4] Menichetti F. Current and emerging serious gram-positive infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11 (Suppl 3): 22-28.

[5] 黎村艳,曹友德,蔡瑞云,等.1 296 株革兰阳性球菌的分布和耐药性分析[J].中国病原生物学杂志,2013,8(1):

76-79.

[6] 郭燕,朱德妹,胡付品,等.2010 年中国 CHINET 葡萄球菌属细菌耐药性监测和分析[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(2):86-92.

[7] 胥萍瑶.2012 年四川省肿瘤医院细菌耐药性监测[J].国际检验医学杂志,2013,34(16):2117-2118.

[8] 李家泰,齐慧敏,李耘,等.2002~2003 年中国医院和社区获得性感染革兰阳性细菌耐药监测研究[J].中华检验医学杂志,2005,28(3):34-45.

(收稿日期:2014-08-07 修回日期:2014-10-16)