维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)03 - 0449 - 03

耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌的检测及耐药性分析

廖 璞, 洪 波

(重庆市临床检验中心,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨不同方法检测耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)的敏感性,并对其耐药性进行分析。方法:应用 PCR 检测 mecA 基因、E - test、青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)乳胶凝集法、苯唑西林(OXA)琼脂筛选法和 K - B 法对临床分离的 200 株凝固酶阴性葡萄(CNS)球菌进行 MRCNS 检测,并用 WHONET4 软件进行耐药性分析。结果:各方法 MRCNS 检测阳性率分别为:OXA 琼脂筛选法 74%;OXAK - B 法 72%;E - test71%;PBP2a 乳胶凝集法 73.5%,mecA 基因检测法 70%,检测结果无显著性差异($\chi^2 = 1.5124$, $P > 0.05$)。MRCNS 对青霉素(PEN)、庆大霉素(GEN)、复方磺胺(SXT)、环丙沙星(CIP)、四环素(TET)、克林霉素(CLI)、红霉素(ERY)等传统抗生素耐药率均在 50%以上;甲氧西林敏感凝固酶阴性的葡萄球菌(MSCNS)除 PEN、ERY 耐药率为 80.4%和 57.1%以外,其他抗生素均小于或在 50%左右,CNS 中耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)达 70%以上,未发现耐万古霉素(VAN)的 CNS。结论:五种方法均能满足 MRCNS 的临床筛选,其中以乳胶凝集法最为简便、快速,临床值得推广;MRCNS 对氨基甙类、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类、磺胺存在严重的交叉耐药现象,经验用药首选 VAN,而 MSCNS 除 VAN 外,还可选用 GEN、SXT、CIP、TET、CLI。

【关键词】MRCNS;mecA 基因;PBP2a;耐药性

【中国图书分类法分类号】R978.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 03 - 17

Detection of MRCNS and analysis of their drug resistance

LIAO Pu, et al

(*Clinical Laboratory Center of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the sensibility of different methods to test MRCNS, and analyze the antibiotic resistance of CNS. *Methods*: 200 strains CNS were detected by mecA genic, E - test, PBP2a latex agglutination, OXA agar election and K - B, and analyze the resistance with WHONET4. *Results*: The positive rates of MRCNS by agar election method, K - B, E - test, PBP2a latex agglutination, mecA genic were 70%, 74%, 72%, 71%, 73.5% respectively. There is no statistic significance in 5 assays ($\chi^2 = 1.5124$, $P > 0.5$). The resistance rates of MRCNS to PEN, GEN, SXT, CIP, TET, ALL and ERY, are all above 50%. The resistant rates of MSCNS to other antibiotics are below about 50% except for PEN(80.4%) and ERY(57.1%). MRS are more than 70% and no VAN resistant in CNS. *Conclusion*: All the 5 methods are suitable for clinical detection of MRCNS, and latex agglutination is the most convenient and rapid. MRCNS had a serious cross - resistance in aminoglycosides, guinolones, tetracycline, macrolides, sulfanilamide and, so the best choice for therapy is VAN. GEN, SXT, CIP, TET and CLI could be used for MSCNS, except VAN.

【Key words】MRCNS; MecA gene; PBP2a; Resistance

血浆凝固酶阴性葡萄球菌(Coagulase - negative Staphylococci, CNS)属人体正常菌群,广泛存在于自然界及人体的皮肤、粘膜,是人体正常菌群的重要组成部分,80 年代后随着介入性治疗和免疫抑制剂的使用,使其成为重要的条件致病菌。同时,由于抗生素的大量应用,耐甲氧西林凝固酶阴性的葡萄球菌(methicillin resistant coagulase megative staphylococci, MRCNS)比例逐渐升高,成为临床治疗的难题之一[1~3]。怎样快速、准确地检出 MRCNS 及预测其耐药性变化对临床治疗及合理应用抗生素都有十分重要的意义。为此,我们对 MRCNS 的检测方法进行了探讨,并对其耐药性进行了分析,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

2000 年 1 月~2004 年 6 月我院临床分离的 CNS,经凝

作者介绍:廖 璞(1966 -),女,副主任技师,博士,主要研究方向:实验室诊断技术。

维普资讯 http://www.cqvip.com

固酶初筛,按统一操作规程鉴定并保存。标准参考菌株 ATCC25923、ATCC29213、ATCC29212。

1.2 实验试剂与方法

1.2.1 实验试剂 苯唑西林(1μg/ml)筛选平板(重庆旁通);PBP2a 检测试剂盒(默里埃公司);E-test 苯唑西林(AB Biodisk);药敏纸片(北京天坛公司);mecA 基因的特异引物由上海生工工程公司合成,引物 1 为 5'-AGA TTG GGA TCA TAG CGT CA-3',引物 2 为 5'-GAA GGT ATC ATC TTG TAC CC-3'。

1.2.2 MRCNS 表型筛选 E-test、OXA 琼脂筛选和 K-B 法,按 NCCLS 标准进行,以生理盐水校正到 0.5 麦氏比浊标准,K-B 法质控菌株 ATCC29923,E-test、琼脂筛选法质控菌株 ATCC29213,PBP2a 严格按说明书进行。

1.2.3 药敏采用 K-B 法按 NCCLS 标准进行。

1.2.4 meaA 基因的 PCR 检测 按文献[4]进行,预期的靶基因片段为 278bp。

1.2.5 统计学方法 结果采用 WHONET4 软件进行统计分析,各方法间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

200 株 CNS 中 mecA 基因及 4 种 MRCNS 表型检测结果见表 1,经 χ^2 检验,5 种方法的检测结果无显著差别($\chi^2=1.5124$,$P<0.05$)。

表 1 200 株 CNS 中 MRCNS 表型检测结果

	PCR 法	E-test	乳胶法	琼脂筛选法	K-B 法
MSCNS	48	58	53	53	56
MRCNS	152	142	147	148	144
阳性率(%)	76	71	73.5	74	72

表 2 200 株 CNS 对 9 种抗生素的耐药率(%)

抗生素	OXA	PEN	GEN	SXT	CIP	TET	CLI	ERY	VAN
MRCNS	100	100	65.9	70.8	61.1	62.5	52.1	81.9	0
MSCNS	0	80.4	51.8	50.0	35.7	51.8	28.6	57.1	0

200 株 CNS 药敏结果(MRCNS 以 K-B 法划分)见表 2。

3 讨 论

目前,MRCNS 检测常采用的方法大致有三类。第一类是传统药敏方法如 NCCLS 推荐的药敏纸片法,苯唑西林-盐琼脂筛选法和 E-test 法等。他们检测的都是 CNS 的耐药表型,为了克服表型的异质,均采用不易降解的 OXA,通过适当的培养条件如 30~35℃培养、提高培养基 NaCl 的浓度(2%~4%)、强化耐药性的表达和延长培养时间(24~48h)来提高准确性;第二类是自动细菌鉴定仪。其原理与药敏方法相同,检测时间相对较短(一般 24h),York[5] 等报道培养 4h 检测灵敏度可达 91%~100%,但表型的异质性影响检测结果;第三类是分子生物学方法。现已经明确,PBP2a 是葡萄球菌对甲氧西林耐药的主要原因,由 mecA 基因编码。因此,mecA 基因被作为耐甲氧西林葡萄球菌(methicillin resistant ataphylococci, MRS)的分子标志,mecA 基因鉴定为公认的 MRS 检测"标准方法"[6,7]。Cavassini M[8] 等用 PBP2a 乳胶凝集法检测了 200 株金黄色葡萄球菌并与 NCCLS 药敏纸片法、苯唑西林-盐琼脂筛选法和 PCR 法进行了比较,结果显示,乳胶凝集法的灵敏度 100%,特异性 99.2%;NCCLS 药敏片法的灵敏度 61.3%,特异性 96.7%;苯唑西林-盐琼脂筛选法的灵敏度 82.5%,特异性 98.3%;其中乳胶凝集法重复性达到了 99.5%。Griethuysen AV[9] 等也报道此方法检测灵敏度高于苯唑西林-盐琼脂筛选法($P<0.05$)。本文采用默里埃公司快速乳胶凝集试剂盒检测了 200 株 CNS,同样得到了满意的结果。我们的结果还显示上述 5 种方法对 MRCNS 的检出无显著性差异($P>0.05$)。由于快速乳胶凝集法具备快速(可在 20min 内得到结果)、简便、特异性好、灵敏度高,无需特殊仪器盒技术等优点,因此该法非常适合于临床实验室检测和鉴定 MRCNS,对临床早期检出 MRCNS 带菌者,及时采取治疗和控制措施有很大帮助。

CNS 耐药性分析显示 MRCNS 同时耐氨基甙类、喹诺酮类、大环内酯类、四环素及磺胺比例很高,达 50%~80%以上,经验用药已不宜作为首选,严重感染首选 VAN;甲氧西林敏感凝固酶阴性葡萄球

维普资讯 http://www.cqvip.com

菌(methicillin sensitive coagulase - negative staphylococci, MSCNS)除 PEN、ERY 耐药率为 80.4% 和 57.1%外,GEN、SXT、CIP、TET、CLI 等耐药率均小于或在 50%左右,临床经验用药可选之。实验中没有发现耐古霉素的 CNS。因此,严重的葡萄菌感染应该选万古霉素治疗。

参 考 文 献

[1] 卢月梅,陈升汶,吴 伟,等.深圳地区甲氧西林耐药葡萄球菌的耐药性调查[J].中国抗感染化疗杂志,2004;3:143-145.

[2] 马 越,姚 蕾,陈鸿波,等.中国 51 家医院 2000 年葡萄球菌属临床分离株的耐药性[J].中国抗感染化疗杂志,2002;2:24-26.

[3] 周惠平.临床细菌学检验面临的挑战[J].中华医学检验杂志,1999;22:12-14.

[4] 洪秀华,唐 毅,倪语星.耐甲氧西林葡萄球菌四种检测方法的比较及临床应用[J].上海医学检验杂志,1999;14(4):203-205.

[5] MK York, L Gibbs, F Chehab, et al. Comparison of PCR detection of mecA with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase - negative staphylococci[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996;34(2):249-253.

[6] de Lencastre H, de Jonge BL, Matthews PR, et al. Molecular aspects of methicillin resistance in staphylococcus aureus [J]. Antimicrob Chemother, 1994;33:7-24.

[7] 李家泰,魏 瑾.甲氧西林耐药金葡萄(MRSA)感染的诊断与治疗[J].中国临床药理学杂志,1993;9:97-108.

[8] Matthias Cavassini, Aline Wenger. Evaluation of MRSA - Screen, a Simple Anti - PBP2a Slide Latex Agglutination Kit, for Rapid Detection of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999;37(5):1591-1594.

[9] Arjanne van Griethuysen, Miranda Pouw. Rapid Slide Latex Agglutination Test for Detection of methicillin Resistance in Staphylococcus aureus [J]. Jormal of Clinical Microbiology, 1999;37(9):2789-2792.

(上接第 448 页)升,减少急性心脑血管间外事件的发生,是一种安全有效的降压药物。

参 考 文 献

[1] 柏 瑾,诸骏仁,蔡 绳,等.替米沙坦治疗轻中度高血压的临床疗效和安全性——多中心随机对照临床试验[J].中华心血管病杂志,2002;30(12):738-742.

[2] Vabuuchi E, Takahashi M, Aritake K, et al. Post - stroke treatment with imidapril reduces learning deficits with less formation of brain edema in a stroke - prone substrain of spontaneously hypertensive rats[J]. Fundam Clin Pharmacol, 1999;13:475-483.

[3] 刘成伟,汪道文,邓又斌.替米沙坦逆转原发性高血压心肌肥厚的作用[J].临床心血管病杂志,2002;18(6):251-252.

[4] 张金枝.加强原发性高血压的防治[J].临床心血管病杂志,2000;6:2432.

[5] Lurbe E, Redon J, Kesani A, et al. Increase in nocturnal blood pressure and progression to microalbuminuria in type 1 diabetes[J]. N Engl J Med, 2002;347:797-805.

[6] Matsubara S, Kikkawa H, Kaminuma O, et al. Angiotensin - converting enzyme inhibitors can potenciate ozone - induced airway hyperrespon - siveness[J]. Eur J Pharmacol, 1997;337:259-265.

[7] White WB. How well does ambulatory blood pressure predict target - organ disease and clinical outcome in patients with hypertension[J]. Blood Press Monit, 1999;4:S17-21.

[8] O Brien E, Coats A, Owens P, et al. Use and interpretation of ambulatory blood pressure monitiring: recommendations of the British hypertension society[J]. BMJ, 2000;320:1128-1134.

[9] Veldhuisen D J, Genth Zotz S, Brouwer J, et al. High - versus low - dose ACE inhibition in chronic heart failure: a double - blind, placebo - controlled study of imidapri[J]. J Am Coll Cardiol, 1998;32:1811-1818.