

## · 短篇论著 ·

## 插入式 E-test 监测脑外伤昏迷患者痰中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对万古霉素的敏感性研究

高灵宝 韩静 孙雅馨 陆桃红 张庆芳

由于抗菌药物的广泛应用,细菌的高度耐药性越来越引起社会的关注,超级耐药菌的出现给抗菌药物的滥用敲响警钟,国外报道在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)中分离到万古霉素中度敏感的金黄色葡萄球菌(vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*, VISA)和 VRSA 耐万古霉素金黄色葡萄球菌(vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)后,我国学者亦对 MRSA 进行严密的万古霉素敏感性监测。本研究应用插入式 E-test 纸条检测 MRSA 最小抑菌浓度,观察脑外伤昏迷患者呼吸道分泌物中分离的 MRSA 对万古霉素敏感性的变化,现报道如下。

## 一、资料与方法

1. 材料: (1) 菌株来源和选择: 标准菌株 ATCC25923、ATCC29213 为江苏省临床检验中心提供,作为质控菌株; 91 次分离的 MRSA 临床株均为本院 2011 年 2 月份至 2013 年 2 月, 32 例脑外伤昏迷住院患者呼吸道分泌物标本分离。

(2) 试剂: 插入式 E-test 试条由安徽淮北宏远药敏试条厂生产并提供, MH 琼脂系 Oxoid 公司产品, 购自广东乐通泰公司。

2. 方法: (1) 菌悬液的配制: 将纯菌液用生理盐水调至 0.5 号麦氏管浊度。

(2) MH 药敏平板要求: pH 值为  $(7.3 \pm 0.1)$ , 平板直径 90 mm, 琼脂高度为  $(4.0 \pm 0.5)$  mm, 琼脂平板上皿和下皿盖好后, 空间高度不低于 1 cm, 即下皿需高 1 cm。

(3) 细菌接种: 将无菌无毒的拭子浸泡在菌悬液中, 在试管内壁挤压多余的菌液。在整个琼脂面上仔细划线 3 次, 每次划线后将平板旋转  $60^\circ$ , 使菌悬液均匀分布在 MH 平板上。静置 15 ~ 20 min, 待菌液被琼脂充分吸干。

(4) 药敏试条的放置: 琼脂表面完全干燥后, 用平头镊子夹住试条上部无药部分, 将梳状药敏试条

的梳齿垂直插入涂有待检菌悬液的琼脂培养基内, 试条最大药量附着端的梳齿紧贴培养皿边缘, 另一端则指向培养皿中心, 检测药敏试条放置如图 1 所示, 即在 90 mm 平皿上可以插入 5 种抗菌药物条, 对于预期结果高度敏感的细菌, 每个 9 cm 平板最多贴 4 条。

(5) 孵育: 普通细菌培养箱 35 °C 孵育 16 ~ 24 h。

(6) 结果判读: 在普通细菌培养箱 35 °C 孵育 16 ~ 24 h 时且菌苔已有均匀显著生长时, 读取抑菌圈椭圆的边与试条相交位置处的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值。如果有混合菌生长则需要将细菌分纯后重新纯培养后测试, 菌苔生长过多或过少也必须重新测试。

(7) 记录应用万古霉素插入式 E-test 药敏试条检测脑外伤昏迷患者痰中常规分离的 MRSA 最小抑菌浓度(MIC)结果, 同时检测万古霉素对标准菌株 ATCC25923 和 ATCC29213 的最小抑菌浓度作为质控, 参照美国国家临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)<sup>[1]</sup>标准判读结果。

## 二、结果

32 例脑外伤昏迷患者痰中分离 MRSA 共 91 株次, 其中重复检出 MRSA 的患者 24 例, 同一患者重复检出次数最多是 6 次, 91 株次中 MIC 最大值为 2 μg/ml, MIC 最小值为 0.25 μg/ml, 平均 MIC 为 0.79 μg/ml, 见表 1。

讨论 病情危重的颅脑损伤患者, 常使用气管切开术解决其呼吸道阻塞, 来改善通气功能, 但气管切开后, 无鼻腔屏障保护, 气管直接与外界相通, 细菌、真菌等微生物直接侵入肺部; 颅脑外伤引起的昏迷时间不确定, 昏迷患者则出现意识障碍, 长时间昏迷导致咳嗽及吞咽反射减弱或消失, 患者无法有效排痰, 另外颅脑损伤早期呕吐物的误吸等原因均易引起肺部感染。据全国细菌耐药监测网报告, 自重症监

表 1 插入式万古霉素检测 91 株 MRSA 的 MIC 值分布

万古霉素 MIC (μg/L)	MRSA 分布例数 (91 株)
0.064	0
0.125	0
0.250	3
0.500	38
1.000	48
2.000	2
4.000	0
8.000	0
16.000	0

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.06.027

基金项目: 江苏大学医学临床科技发展基金项目 (No. JLY20120131)

作者单位: 225300 泰州市, 江苏省泰州市人民医院临床医学检验中心

通讯作者: 高灵宝, Email: gxq1818@163.com

护患者分离的金黄色葡萄球菌分离率占有所有分离菌的10.6%，其中MRSA高达79.6%<sup>[2]</sup>。MRSA感染与HBV和AIDS已并列为世界范围内的三大难解决的感染性疾病<sup>[3]</sup>。2006年CLSI已将MRSA的敏感折点调整到MIC < 2 mg/ml, 4~8 mg/ml为中介, > 16 mg/ml为耐药<sup>[3]</sup>, CLSI-2010已弃用KB法药敏试验检测万古霉素的耐药性, 认为其检测MRSA耐药性的可靠性难以保证, 均需检测MIC<sup>[1]</sup>。用于定量测定体外抗菌活性, 对临床是非常有价值的药敏试验数值, 是临床调整用药拟定合理抗菌方案和实施个体化用药的依据<sup>[5]</sup>。临床实验室测定MIC的方法有肉汤稀释法、琼脂稀释法和E-test法, 前两法操作繁琐, 临床不能够常规开展, E-test则操作简便、结果可靠。在国外, E-test法已常规用于苛养菌<sup>[6]</sup>、真菌<sup>[7]</sup>、多重耐药菌<sup>[8]</sup>以及结核分枝杆菌的MIC检测<sup>[9]</sup>。插入式E-test试条测定MIC结果直观, 重复性好, 前期的研究结果已充分肯定了插入式试条的可靠性<sup>[10-12]</sup>, 现在应用其监测脑外伤昏迷患者痰中分离的耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌对万古霉素的敏感性, 91株次中MIC最大值为2 μg/ml, MIC最小值为0.25 μg/ml, 平均MIC值为0.79 μg/ml, 未检出耐万古霉素菌株, 同一患者重复分离菌株中亦暂未检出万古霉素敏感性降低的菌株。虽然未检出这些菌株, 但测得万古霉素对MRSA的MIC最大值已达2 μg/ml, 不得不提醒我们, 人类努力制服的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, 一丝一毫都未放松对抗菌药物包括万古霉素的斗争。密切监测其耐药动态, 也一定会是临床今后工作的重点。插入式E-test试条与平贴式E-test比较, 一致性极高, 检测细菌MIC重复性好, 不仅能够满足临床监测MRSA敏感性变化的需要, 还使得常规检测万古霉素对MRSA的MIC变得更加简单、方便和快速。

(本文图1见光盘)

高灵宝, 韩静, 孙雅馨, 等. 插入式E-test监测脑外伤昏迷患者痰中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对万古霉素的敏感性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(6): 848-849.

## 参 考 文 献

- 1 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100-S20. 2010.
- 2 张丽, 杨文航, 肖盟, 等. 2010年度全国细菌耐药监测网报告: ICU来源细菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(1): 34-38.
- 3 熊祝嘉, 肖盟, 王贺, 等. 中国7所教学医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学及耐药性研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(1): 22-26.
- 4 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing[S]. M100-S16. 2006.
- 5 邵海枫, 秦卫松, 李珍大, 等. E-test 法用于100株革兰阴性菌的药敏结果评价[J]. 临床检验杂志, 1997, 15(5): 276-278.
- 6 苏丹虹, 肖庆忠, 陈树生, 等. 广州地区52株流感嗜血杆菌对6种抗生素体外抗菌活性分析E-test法[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(1): 83-85.
- 7 Galani L, Kontopidou F, Souli M, et al. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(5): 434-439.
- 8 Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, et al. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 698-706.
- 9 Chihara S, Smith G, Petti CA. Carbapenem susceptibility patterns for clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* determined by the E-test method[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 579-580.
- 10 高灵宝, 陈亚宝. 一种插入式E-test药敏试条的临床应用[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(6): 108-112.
- 11 高灵宝, 陈亚宝, 沙鸭云. 插入式E-test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[J]. 中华烧伤杂志, 2012, 28(2): 119-120.
- 12 高灵宝, 沙鸭云, 陈亚宝. 插入式E-test检测非发酵糖菌药物敏感试验的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(5): 47-50.

(收稿日期: 2014-06-27)

(本文编辑: 孙荣华)