

红霉素体外诱导金黄色葡萄球菌耐药分析^{*}

聂署萍¹, 张 扬^{1,2}, 王 琼¹, 黄 烈¹, 吴润香¹, 凌利芬¹, 范菲楠¹

(1. 广东医学院附属深圳福田医院检验科, 广东深圳 518033; 2. 陕西中医学院, 陕西咸阳 712046)

摘要:目的 体外诱导金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923 对红霉素耐药, 分析其耐药后菌株生长及对其它药物敏感性变化。**方法** 用红霉素浓度 2 倍递增的方法对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 进行体外诱导, 比较诱导前后金黄色葡萄球菌的生长表型以及对其它抗菌药物的耐药性变化。**结果** 诱导后 ATCC25923 红霉素 MIC 由 0.032 5 mg/L 增加到 >256 mg/L, 诱导耐药后金黄色葡萄球菌出现生长缓慢, 溶血性减弱等变异, 对其它非诱导抗菌药物耐药性未发生变化。**结论** 经红霉素体外诱导后金黄色葡萄球菌可以获得稳定耐药性, 但同时也产生了表型及部分生化特性变化, 与其它非诱导抗菌药物无交叉耐药。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 红霉素; 交叉耐药性

中图分类号: R378.11; R446.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)01-138-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.040

Drug-Resistance of *Staphylococcus Aureus* Induced by Erythromycin in Vitro

NIE Shu-ping¹, ZHANG Yang^{1,2}, WANG Qiong¹, HUANG Lie¹, WU Run-xiang¹,

LING Li-fen¹, FAN Fei-nan¹ (1. Department of Laboratory Medicine, Futian Hospital of

Guangdong Medical College, Guangdong Shenzhen 518033, China;

2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China)

Abstract: **Objective** To investigate the drug-resistance of *Staphylococcus aureus* induced by erythromycin in vitro and its changes in growth and susceptibility of antibiotics. **Methods** Erythromycin in vitro induction was conducted with the *S. aureus* reference strain ATCC25923 on the serial of erythromycin agar plates. The growth of *S. aureus*, and the susceptibility against other antibiotics was compared after induced to the parent strain. **Results** Resistance to erythromycin was successfully, and the maximum MIC was over 256 mg/L. The Erythromycin-resistant *S. aureus* grew much slower than the susceptible parent, and the strains didn't have cross-resistance to other antibiotics. **Conclusion** *S. aureus* could be induced resistance in vitro by erythromycin, and this resistance inherited stably. Some phenotype and biochemical characteristic features of the strain were changed after induced.

Keywords: *staphylococcus aureus*; erythromycin; induced -resistance

金黄色葡萄球菌是引起医院感染最常见的病原菌,能导致局部化脓性感染甚至严重的全身感染,近年来随着抗生素的广泛使用其耐药性日益增强^[1]。尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的出现给全球抗感染治疗提出新的挑战^[2]。目前,大环内酯类抗生素是现今最为常用的口服抗菌药物之一,被广泛使用在临床金黄色葡萄球菌敏感株感染上^[3]。本研究以红霉素为代表,通过对标准菌株进行红霉素体外诱导耐药,了解金黄色葡萄球菌在不同药物浓度下诱导出的耐药菌株是否有遗传稳定性,及对其它种类抗生素有无交叉耐药,给临床用药提供指导。

1 材料和方法

1.1 受试菌株 金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923 购自卫生部临床检验中心。菌株试验

前经 Vitek-2 Compact 全自动微生物仪进行鉴定及药敏检测。

1.2 试剂和仪器 红霉素药粉, Mueller-Hinton (M-H) 琼脂购自杭州天和微生物试剂有限公司。E-test, Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定仪购自法国梅里埃公司。

1.3 红霉素对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定 严格按照说明书,采用 E-test 进行操作及判读结果。依据美国临床和实验室标准化研究所(CLSI)2012 年标准,红霉素对金黄色葡萄球菌 MIC 值 ≤4 mg/L 为敏感(S), MIC 值 ≥8 mg/L 为耐药(R)。试验前用 E-test 检测金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 的红霉素 MIC。

1.4 诱导方法 含红霉素的 MH 琼脂平板从

^{*} 基金项目:深圳市福田区卫生系统公益性科研项目(FTWS201236)。

作者简介:聂署萍(1983—),女,硕士,副主任技师,从事微生物鉴定与耐药监测研究, E-mail: nieping2@126.com。

0.032 5 $\mu\text{g/ml}$ 开始,以 2 倍连续稀释浓度配制。将金黄色葡萄球菌 ATCC25923 依次接种在红霉素浓度 2 倍递增的 MH 琼脂平板上,每个药物浓度培养 5 代。同时接种无药血平板进行同期培养,观察细菌生长情况。每个药物浓度诱导成功后做菌株鉴定及红霉素对菌株 MIC 值的测定。

1.5 诱导耐药菌株的耐药稳定性测定 将各个药物浓度诱导产生的耐药菌株用无抗菌药物的 MH 培养基传代培养 5 次,再用 E-test 测量红霉素 MIC。

1.6 交叉耐药检测 使用 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定仪及 GP-67 药敏卡片进行其它抗生素包括头孢曲松、环丙沙星、红霉素、克林霉素、庆

大霉素、左旋氧氟沙星、利奈唑胺、莫西沙星、青霉素 G、四环素、万古霉素、苯唑西林、替加环素、利福平、复方新诺明、呋喃妥英等 MIC 检测。

2 结果

2.1 体外耐药性诱导结果 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 经红霉素体外诱导后, MIC 值明显增高($>256 \text{ mg/L}$);经过连续 5 次传代后,耐药性仍稳定。且在体外诱导过程中还发现,耐药株的菌落较诱导前小,继续培养至 36 h,菌落大小才达到诱导前大小,色素生成减少,且耐药株菌落周围形成的溶血环也较小,溶血现象明显减弱,凝固酶活性降低。见图 1。

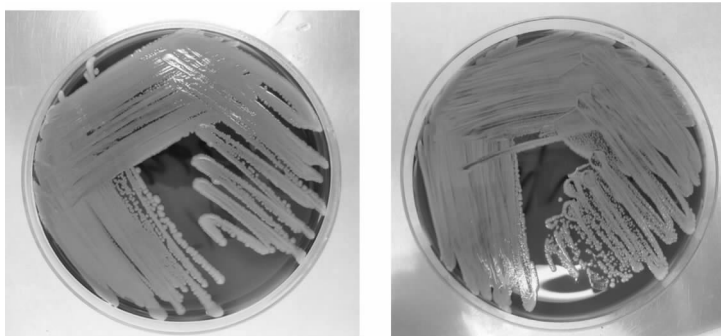


图 1 红霉素诱导前后金黄色葡萄球菌 ATCC25923 的菌落形态

2.2 耐药稳定性测定 诱导成功的耐药菌株经无抗菌药物的 MH 培养基传代培养 5 次后, MIC 值无明显改变,表明采用红霉素 2 倍增加的培养方法对金黄色葡萄球菌进行体外诱导所获得的耐药性稳定。

2.3 交叉耐药检测 各诱导菌株对其它非诱导抗菌药物 MIC 值未发生变化。

3 讨论 大环内酯类抗生素因不良反应少、半衰期长而被广泛使用在金黄色葡萄球菌的社区感染和医院感染的敏感菌株治疗上。红霉素作为大环内酯类抗生素的代表,主要通过蛋白质合成的早期抑制核糖体的组装,并结合于肽链延伸移位时通过的通道入口处,阻碍多聚肽移位时出通道并促使未成熟肽链自肽酰 tRNA 脱离抑制肽链的延伸而发挥杀菌作用。细菌对红霉素的耐药机制主要有:有靶位改变、主动外排及核糖体突变等^[4]。临床用药过程中,给药剂量不足、给药途径不合理等是导致致病菌耐药性出现的重要原因之一。本研究以红霉素为代表,通过对标准菌株进行红霉素体外诱导耐药,并对比诱导前后菌株表型和生化特性及对其它抗菌药物的耐药性变化,来指导临床合理用药。

本研究发现,诱导后的耐药金黄色葡萄球菌生

长缓慢,色素生成减少,溶血能力和凝固酶活性降低等异常的表型和生化特性,与李艳芬等^[5]利用利奈唑胺诱导后观察的现象相同。可能是在诱导过程中金黄色葡萄球菌在药物选择压力的作用下,为了使自身适应生存环境,通过一系列的方式去适应耐药环境而形成的,具体机制还需进一步研究。但这种生化特性的改变明显增加了细菌鉴定的难度,易被误认为凝固酶阴性葡萄球菌而影响临床治疗,从而使病原菌在人体内持续存在,进而导致隐性或复发性感染。

耐药菌株成功诱导后,在无红霉素的 MH 平板中传代 5 次,其 MIC 值未改变,表明菌株的获得性耐药具有稳定性,提示病原菌一旦在临床治疗过程中出现对某种抗菌药物耐药,就会出现稳定的耐药性,应停止使用该耐药药物,而不是间隔一段时间再用同类药物治疗^[6]。测定其它非诱导药物对诱导后耐药株的 MIC,并比较诱导前后的 MIC 值,其它非诱导药物包括利奈唑胺、万古霉素、替加环素、头孢类、青霉素类、氨基糖甙类、氟喹诺酮类的 MIC 无明显变化,与王轶等^[7]的研究结果一致,说明红霉素与其它抗生素无交叉耐药,临床上感染严重时联合其它的药物治疗以提高疗效。

综上所述,红霉素体外

(下转 143 页)

- 1998,97(10):979-986.
- [4] Boffelli D, Zajchowski DA, Yang Z, et al. Estrogen modulation of apolipoprotein(a) expression. Identification of a regulatory element[J]. J Biol Chem, 1999, 274(22):15569-15574.
 - [5] Pang RW, Lam KS. Hormonal influences on lipoprotein(a) metabolism[J]. Diabetes Obesity Meta, 2002, 4(3):156-165.
 - [6] 布庆侠,徐 军. 老年男性急性脑梗死患者血 Lp(a) 与性激素的相关性[J]. 实用老年杂志, 2007, 21(2): 99-100.
Bu QX, Xu J. Study on correlation between lipoprotein(a) and sex hormone in elderly male patients with acute cerebral infarction[J]. Pract Geriatr, 2007, 21(2):99-100.
 - [7] 钟 堃,王 薇,何法霖,等. 国内临床化学 9 项常规项目参考区间与即将发布的卫生行业标准的比较和分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3):38-42.
Zhong K, Wang W, He FL, et al. Comparison and analysis of the reference intervals of 9 serum routine chemical analytes between the current application of clinical laboratories and the latest health industrial standards draft for approval[J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(3):38-42.
 - [8] 陈伟伟,高润霖,刘力生. 中国心血管病报告 2013 概要[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(7):487-491.
Chen WW, Gao RL, Liu LS. 2013 report on cardiovascular diseases in China[J]. Chinese Circulation Journal, 2014, 29(7):487-491.
 - [9] Emerging Risk Factors Collaboration, Ergou S, Kaptoge S, et al. Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality[J]. JAMA, 2009, 302(4):412-423.
 - [10] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. Lancet, 2015, 385(9963):117-171.
 - [11] Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS)[J]. Atherosclerosis, 2011, 217(1):3-46.

收稿日期:2015-07-06

修回日期:2015-09-23

(上接 139 页)可诱导金黄色葡萄球菌产生耐药性且耐药性稳定,耐药株生长速率较敏感株降低,表型及部分生化特性有改变,与其它药物无交叉耐药。

参考文献:

- [1] Yang Z, Wang J, Wang W, et al. Proportions of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with surgical site infections in mainland China: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2015, 10(1):e0116079.
- [2] Gardiner BJ, Grayson ML, Wood GM. Inducible resistance to clindamycin in *Staphylococcus aureus*: validation of Vitek-2 against CLSI D-test[J]. Pathology, 2013, 45(2):181-184.
- [3] 陈方圆,马笑雪,蔡景钰,等. 多重耐药性金黄色葡萄球菌(MRSA)的临床药物治疗及耐药机制研究[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(1):71-74.
Chen FY, Ma XX, Cai JY, et al. Clinical medical treatment against multiple drug-resistant *Staphylococcus aureus* (MDRSA) and its drug-resistance mechanism [J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(1):71-74.
- [4] 郝秀红,赵强元,李艳君,等. 2008 年~2011 年金黄色葡萄球菌的临床分布和耐药特征[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(1):59-62.
Hao XH, Zhao QY, Li YJ, et al. Clinical distribution and drug resistance of *Staphylococcus aureus* to antibiotics in recent four years[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(1):59-62.
- [5] 李艳芬,王 俊,王淑香,等. 利奈唑胺体外诱导金黄色葡萄球菌耐药的实验研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2013, 7(5):694-698.
Li YF, Wang J, Wang SX, et al. The drug-resistance of *Staphylococcus aureus* induced by linezolid in vitro [J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Infectious Diseases (Electronic Edition), 2013, 7(5):694-698.
- [6] 王 强,王 跃,刘明方. 红霉素体外诱导肺炎链球菌耐药的研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12), 1185-1188.
Wang Q, Wang Y, Liu MF. Study on the *Streptococcus pneumoniae* resistance induced by erythromycin in vitro [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2009, 31(12), 1185-1188.
- [7] 王 轶,刘珊珊,黄 瑾. 红霉素诱导呼吸道分离金黄色葡萄球菌耐药状况研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(10):1719-1720.
Wang Y, Liu SS, Huang J. Study on *Staphylococcus aureus* from respiratory tract resistance induced by erythromycin [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2011, 15(10):1719-1720.

收稿日期:2015-05-08

修回日期:2015-08-20