

两株对万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌的透射电镜下超微结构观察

张晨^a, 朱海平^a, 金凤玲^b, 孙虹佳^a, 姚立琼^a

(兰州大学第一医院 a. 检验科; b. 感染管理科, 兰州 730000)

摘要:目的 对前期课题筛选出的万古霉素中介金黄色葡萄球菌 (vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, VISA) 及异质性耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (heterogeneous vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, hetero-VISA) 进行透射电镜下的超微结构观察。方法 用 KB 法、琼脂稀释法和 E-test 法、菌谱分析法对分离出的 VISA 和 h-VISA 进行确认, 并用透射电镜法对其进行超微结构观察。结果 检测到的 VISA 和 h-VISA 经透射电镜观察发现菌株较标准菌株细胞壁增厚, 细胞表面粗糙。结论 VISA 和 h-VISA 等万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药很可能是由于细菌细胞壁增厚所引起的。

关键词: 万古霉素耐药; 万古霉素中介金黄色葡萄球菌; 异质性耐万古霉素金黄色葡萄球菌; 超微结构
中图分类号: R378.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 04-109-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.04.027

Study on Ultrastructure of VISA and Hetero-VISA Strains

ZHANG Chen^a, ZHU Hai-ping^a, JIN Feng-ling^b, SUN Hong-jia^a, YAO Li-qiong^a

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Infection Control, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective To study the ultrastructure of Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* and Heterogeneous vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolation. **Methods** The resistant strains VISA and hetero-VISA were confirmed by KB method and agar dilution method and E-test and population analysis, and in the mean time studied by transmission electron microscope. **Results** The VISA and h-VISA strain showed that there were thicker cell wall and rough cell surface. **Conclusion** Two strains of SA reduced susceptibility to vancomycin may because their thicker wall and rough cell surface.

Keywords: vancomycin resistance; vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*; heterogeneous vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*; ultrastructure aureus

金黄色葡萄球菌是临床出现下呼吸道感染最常见的病原菌^[1], 具有较强毒性, 能够引起皮肤黏膜、肺部、心内膜、骨关节等部位的感染性疾病, 严重时会引起脓毒性休克及败血症等^[2]。万古霉素自 1958 年应用于临床治疗革兰阳性球菌感染, 1961 年耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 出现后^[3], 万古霉素更是成为治疗 MRSA 所致感染的最后一道防线, 也是为数不多的对多重耐药金黄色葡萄球菌有活性的药物之一。近年来随着 MRSA 的迅速播散以及临床治疗中万古霉素的滥用, 万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌开始出现, 包括耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (VRSA)、万古霉素中介耐药金黄色葡萄球菌 (VISA) 及异质性耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (h-VISA)^[4]。1996 年 1 月日本从一位 MRSA 肺炎患者的痰液标本中分离出了首

例 h-VISA。同年, 日本报道分离出第一株 VISA^[5], 而 2002 年美国更是出现了首例 VRSA^[6-7], 这引起了科学家的极大重视。2006 年美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 将万古霉素对金黄色葡萄球菌的折点更新为 MIC $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ 为敏感, $4 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ 为中介, $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 为耐药。

本试验将前期基础试验中获得的一株 VISA 和一株 h-VISA 通过 K-B 法、琼脂稀释法、菌谱分析法等进行复核, 并对检出的两株耐药菌株进行透射电镜观察以了解其超微结构及耐药机制。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 试验菌株为课题前期试验中分离出的两株万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌, M1278 经鉴定为 VISA, M1275 为 h-VISA。金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 购自甘肃省临床检

基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目 (项目编号: 1011FKCA086)。

作者简介: 张晨 (1984-), 女, 硕士研究生, 主管检验师, 研究方向为临床微生物检验, E-mail: happyjocelyn@163.com。

通讯作者: 朱海平, E-mail: 13919178960@163.com。

验中心。

1.2 仪器与试剂 法国 Bio-Merieux 公司生产的 VITEK32 细菌鉴定系统及配套鉴定试卡、美国 Thermo Fisher 公司的二氧化碳培养箱等。盐酸万古霉素生产企业为 Eli Lilly Japan K.K., Seishin Laboratories, 有效期内使用, 使用前用 ATCC25923 进行质控; 万古霉素 (30 μ g) 药敏纸片由英国 OXOID 公司生产。脑心浸液肉汤 (BHI) 产于法国 Bio-Merieux 公司; 琼脂粉为英国 OXOID 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 VISA 和 h-VISA 的确认

1.3.1.1 K-B 法: 按照 CLSI 推荐的 K-B 法进行药敏试验, 采用 MH 培养基, 30 μ g 万古霉素药敏纸片, 37 $^{\circ}$ C 孵育 18 ~ 24h, 测量抑菌环直径。

1.3.1.2 琼脂稀释法: 在 MIC \geq 4 μ g/ml 的 BHI- 万古霉素选择性培养基上如出现 1 个以上菌落生长, 经质谱鉴定确定为金黄色葡萄球菌菌株, 可初步判定为可疑 h-VISA。

1.3.1.3 可疑菌落菌谱分析法^[8]: 试验菌株 M1278 和 M1275 在血平板上纯培养 24h, 取 M1278 和 M1275 的纯培养菌落及标准菌株 ATCC25923 用无菌生理盐水配制成 10¹⁰CFU/ml, 再连续进行 10 倍稀释, 配制成 10²~10¹⁰CFU/ml 的菌悬液。在含万古霉素 4~64 μ g/ml 的万古霉素选择性培养基上点种每个浓度的菌液 10 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 分别于 24h 和 48h 进行菌落计数, 并计算其相应的变异频率。变异频率 = 每块平板上生长的菌落数 (CFU)/ 该平板所接种的细菌总量 (CFU)。

1.3.2 耐药稳定性实验: 取万古霉素选择性培养基上分离到的菌株, 经鉴定为 VISA 或 h-VISA 后以常规方法接种于不含任何抗生素的 MH 琼脂平板, 持续传代 9 代以上, 再采用琼脂稀释法及 E-test 法检测该菌株的 MIC。

1.3.3 质量控制: 为防止假阳性的出现, 每次试验应使用金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 作为对照, 严格无菌操作, 并用比浊仪准确控制菌悬液的浊度。

1.3.4 透射电镜标本制备过程: 挑取血琼脂平板金黄色葡萄球菌标准株纯培养菌落作为正常对照组。菌落分别用 2.5ml/dl 戊二醛固定, PBS 漂洗 3 次 (每次 10min), 再经饿酸固定, 系列浓度丙酮 + 乙醇梯度脱水 (每个浓度脱水 10min), 环氧树脂包埋、超薄切片、铅铀电子染色, 透射电镜观察。

2 结果

2.1 K-B 法药敏试验结果 K-B 法药敏试验 M1275 和 M1278 抑菌环直径均为 6。

2.2 VISA 和 h-VISA 检测结果

2.2.1 琼脂稀释法结果: 两株菌 (M1275 和 M1278) 在含 4 μ g/ml 的万古霉素选择性培养基上能够生长。

2.2.2 E-test 法复查 MIC: 用 E-test 法对 MIC 进行复查, M1275 和 M1278 的 MIC 均为 4 μ g/ml。

2.2.3 万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌菌株菌谱分析: 2 株菌均在万古霉素选择性培养基上有生长现象, 结果见表 1。

表 1 2 株万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌菌株菌谱分析结果

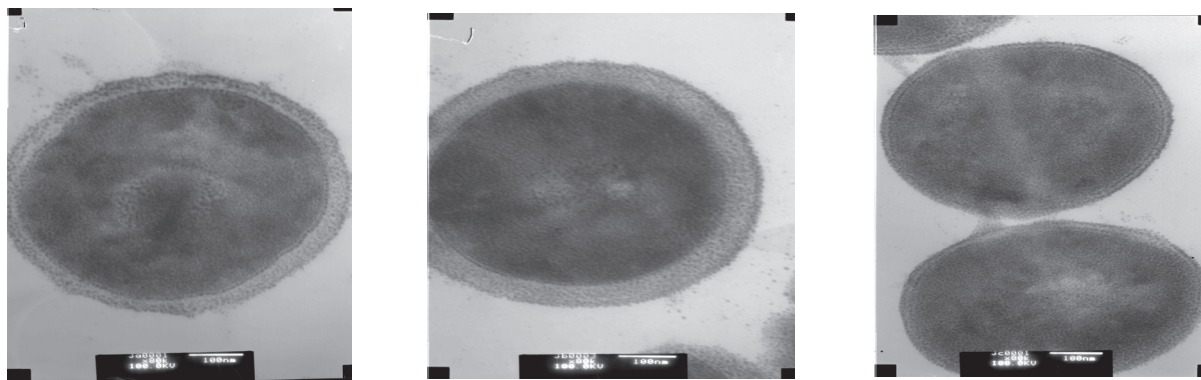
编号	菌种	MRSA /MSSA	原代菌 MIC	万古霉素选择性培养基					
				4	6	8	16	32	64
ATCC25923	<i>S.aureus</i>	MSSA	1.0	-	-	-	-	-	-
M1275	<i>S.aureus</i>	MRSA	4.0	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	-	-
M1278	<i>S.aureus</i>	MRSA	4.0	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	-	-	-

根据 HIRAMATSU 的研究^[5], h-VISA 的判断标准为: ①金黄色葡萄球菌原代菌的 MIC 在 1~4 μ g/ml, 而子代亚克隆在 \geq 8 μ g/ml 的万古霉素选择性培养基上生长, 且变异率 \geq 10⁻⁶。②或是在含 4 μ g/ml BHI- 万古霉素选择性培养基上接种 10 μ l 10¹⁰CFU/ml 菌悬液, 孵育 48 h, 出现 1 ~ 30 个菌落则可能为 h-VISA。③该亚克隆在不含万古霉素的培养基上连续传 9 代耐药性不丢失^[9-10]。通常 h-VISA 的判断标准为①③, 但是由于操作繁琐, 工作量大, 较难在临床实验室开展, 因此 HIRAMATSU 等^[5]重新设计了 h-VISA 的筛选方法,

即②③。

由于本试验采用的是改良前的实验方法, 所以要根据 h-VISA 的判断标准①③来判定筛出菌株是否是 h-VISA, 两株菌 M1275 和 M1278 的原代 MIC 都为 4 μ g/ml, 其子代也在 \geq 8 μ g/ml 的万古霉素选择性培养基上能够生长, 但是 M1278 的变异率只有 10⁻⁸, 达不到 10⁻⁶, 所以, M1278 为万古霉素中介金黄色葡萄球菌 (VISA), 并可认为只有 M1275 符合判断标准①③, 判定为 h-VISA。

2.3 电镜结果 见图 1。



A. M1275(31.3 ± 18.8)nm

B. M1278(56.3 ± 12.5)nm

C. ATCC25923(12.5 ± 12.5)nm

图1 电镜结果

3 讨论

万古霉素中介金黄色葡萄球菌(VISA)可分为同质性和异质性VISA。同质性VISA是指对万古霉素MIC在4~8μg/ml的金黄色葡萄球菌,表现为所有细菌为单一万古霉素中介的群体,在无万古霉素的非选择性培养基上能够稳定传代二十代以上。异质性VISA(h-VISA)是指金黄色葡萄球菌含有耐万古霉素的子代,原代菌株对万古霉素MIC仅为1~2μg/ml,而对万古霉素MIC ≥ 4μg/ml的子代变异株可通过含4~6μg/ml万古霉素的心脑浸液(BHI)选择琼脂筛选出来,其出现的频率是10⁻⁶或更高,该子代细胞亚群在无药培养基上连续传代9代以上仍能保持其耐药性不变。VISA和h-VISA统称为万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌。在前期实验过程中筛选出的2株菌(M1275和M1278)MIC为4μg/ml,均为上述万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌。

万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌在电镜下的形态改变主要为细菌细胞壁增厚、表面凸起增多(见图1)。金黄色葡萄球菌细胞壁结构主要是肽聚糖,由氨基糖N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸交替组成,在电子显微镜下观察细胞壁平均厚度约为20~40nm^[11]。金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药机制目前尚不明确,但有研究认为可能与金黄色葡萄球菌细胞壁增厚密切相关。1997年,平松啓一教授研究团队首次报道了万古霉素敏感度减低的金黄色葡萄球菌VISA菌Mu50(MIC_{van}=8)和hVISA菌Mu3(MIC_{van}=3)^[5,12],并应用透射电子显微镜观察发现Mu50细胞壁存在明显增厚的现象,达到对照菌株的2倍^[12]。本实验中M1278(VISA)的细胞壁厚度为(56.3 ± 12.5)nm,较标准菌株ATCC25923的细胞壁厚度(12.5 ± 12.5)nm明显增厚,且达2倍以上。M1275(h-VISA)的细胞壁厚度为(31.3 ± 18.8)nm,也较标准菌株ATCC25923的细胞壁明显增厚。

为进一步明确细胞壁增厚与金黄色葡萄球菌对万古霉素低度耐药的相关性,随后有崔龍洙等^[13]研究者收集到7个国家的16株VISA,研究发现这16株VISA均出现了细胞壁增厚,且增厚程度与糖肽类抗生素的MIC值密切相关,其相关系数为0.908,与替考拉宁的相关系数为0.655。国内也有研究得出相类似的结论^[14]。关于细胞壁增厚与金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药的关系目前认为可能有两种机制^[15]:一种为“亲和诱捕”,普遍认为在增厚的细胞壁肽聚糖层上有大量D-丙氨酰-D-丙氨酸残基存在,这些残基与万古霉素有着较强的亲和力,可与大量万古霉素结合,导致大部分的万古霉素药物分子结合在细胞壁外层肽聚糖的残基上,而不能到达肽聚糖合成的活性部位,导致金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药;第二种是“阻塞现象”,万古霉素分子与金黄色葡萄球菌表面肽聚糖层上的D-丙氨酰-D-丙氨酸残基的结合,结合体阻塞了肽聚糖层的网孔,阻止了其它万古霉素分子继续向细胞内渗透到达靶位,继而导致金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药。

本次实验经透射电镜显示,M1275(h-VRSA)和M1278(VISA)与金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC25923相比细胞壁明显增厚,证明h-VRSA和VISA对万古霉素耐药很可能是由于细菌细胞壁增厚所引起的。但仍需进一步进行PCR试验对两株菌进行万古霉素耐药基因的检测,以排除耐药是因获得万古霉素耐药基因所引起的可能性。前期实验中获得VISA和h-VISA较少,可进一步对M1275(h-VISA)进行诱导,观察随着万古霉素诱导浓度和诱导时间的增加,h-VRSA诱导株的MIC和细胞壁厚度是否相应的增加,以验证本次电镜结果。

参考文献:

- [1] 王悦,史利克,张鲁涛,等. 医院获得性下呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J]. 临床荟萃,

- 2015, 30 (11) : 1269-1272.
- WANG Yue , SHI Like, ZHANG Lutao, et al. Distribution of pathogens and resistance analysis of hospital-acquired lower respiratory tract infection[J]. Clinical Focus, 2015, 30 (11) : 1269-1272.
- [2] DAYAN G H, MOHAMED N, SCULLY I, et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention , pathophysiology and strategies for prevention[J]. Expert Review of Vaccines, 2016, 15(11): 1373-1392.
- [3] NORDMANN P, NAAS T, FORTINEAU N, et al. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010[J]. Current Opinion in Microbiology, 2007, 10(5): 436-440.
- [4] HU Jian, MA Xiaoxue, TIAN Yuan, et al. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73300.
- [5] HIRAMATSU K, HANAKI H, INO T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility[J]. J Antimicrob Chemother, 1997, 40(1):135-136.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2002, 51 (26) : 565-567.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania, 2002 [J]. Morbidity and mortality Weekly Report, 2002, 51 (40) : 902.
- [8] 王敬华, 马筱玲, 濮跃晨, 等. Hetero-VRS 检测方法的建立及其临床意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2003, 18 (5) : 3-6.
- WANG Jinghua, MA Xiaoling, PU Yuechen, et al. To develop a new method for hetero-VRS isolation and its use in clinical laboratory[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2003, 18 (5) : 3-6.
- [9] HIRAMATSU K, ARITAKA N, HANAKI H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin[J]. Lancet, 1997, 350(12): 1670-1673.
- [10] FRIDKIN S K. Vancomycin intermediate and-resistant *Staphylococcus aureus*: What the infectious disease specialist needs to know[J]. Clin Inf Dis, 2001, 32(1): 108-115.
- [11] DMITRIEV B, TOUKACH F V, HOLST O, et al. Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(21): 7141-7148.
- [12] VAN HAL S J, LODISE T P, PATERSON D L, et al. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta analysis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2012, 54(6): 755-771.
- [13] CUI Longzhu, MA Xiaoyue, SATO K, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(1): 5-14.
- [14] 马筱玲. 万古霉素敏感性减低的金黄色葡萄球菌 [J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27 (9) : 620-622.
- MA Xiaoling. *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin sensitivity[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2004, 27 (9) : 620-622.
- [15] HIRAMATSU K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance [J]. Lancet Infectious Diseases, 2001, 1 (3) : 147-155.
- 收稿日期: 2020-03-21 修回日期: 2020-05-13
- (上接 86 页) [J]. BioFactors(Oxford, England), 2018, 44(6): 518-531.
- [9] LEE E, LEE Y K, KANG H J. Association between the urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase /creatinine ratio and factors of the metabolic syndrome[J]. Annals of Clinical and Laboratory Science, 2018, 48(5): 627-633.
- [10] ZHANG Lin, SUN Jin, ZHANG Ming, et al. The significance of combined detection of Cys C, urinary mAlb and β 2-MG in diagnosis of the early renal injury in pregnancy-induced hypertension syndrome[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(8): 1982-1985.
- [11] CHARALAMPOS I L, GREGORY P V, MARIA I M, et al. Twenty-four-hour urine α 1-microglobulin as a marker of hypertension-induced renal impairment and its response on different blood pressure-lowering drugs[J]. J Clin Hypertens, 2016, 18(10): 1000-1006.
- [12] 张宁, 张银辉, 吴正林, 等. 尿蛋白电泳评估肾损伤临床价值的探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33 (5) : 64-69.
- ZHANG Ning, ZHANG Yinwei, WU Zhenglin, et al. Study on clinical value of urinary protein electrophoresis of assessing renal injury [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5): 64-69.
- [13] 张华, 詹颖, 苏宝凤, 等. 血清 NGAL 与肾功能其它指标联合检测在原发性高血压肾病早期诊断中的应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31 (4) : 54-57.
- ZHANG Hua, ZHAN Jie, SU Baofeng, et al. Application of detecting serum NGAL combined with other renal function index in early diagnosis of essential hypertension nephropathy [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(4): 54-57.
- [14] XIAO Hua, XIONG Chongxiang, SHAO Xiaofei, et al. Visceral adiposity index and chronic kidney disease in a non-diabetic population: A cross-sectional study[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 257-265.
- [15] SEIBERT F S, SITZ M, PASSFALL J, et al. Prognostic value of urinary calprotectin , NGAL and KIM-1 in chronic kidney disease[J]. Kidney & Blood Pressure Research, 2018, 43(4): 1255-1262.
- [16] FOX J, JOUBERT G, LOGGENBERG E. Tunnelled haemodialysis catheters in central free state : Epidemiology and complications[J]. SA J Radiol, 2019, 23(1): 1791.
- 收稿日期: 2020-03-03 修回日期: 2020-03-17