

- 6 程海荣,关慧,陈杰,等. 白蛋白结合型紫杉醇与紫杉醇脂质体治疗复发性卵巢癌近期疗效与安全性分析[J]. 实用妇产科杂志, 2015,31(3):229-232
- 7 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 卵巢恶性肿瘤诊断与治疗指南[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2018,34(7):739-749
- 8 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 肿瘤放疗相关中性粒细胞减少症规范化管理指南[J]. 中华肿瘤杂志,2017,39(11):868-878
- 9 罗利琼,王继红,霍丹,等. CIK 细胞治疗恶性实体瘤的临床疗效评价[J]. 中国医药指南,2013,11(8):34-36
- 10 李亚芳,谷春会. 复发性卵巢癌治疗进展[J]. 吉林医学,2018,39(1):169-172
- 11 曾玉,许鹏飞,陈辰,等. 外周血循环 miRNA 诊断卵巢癌的 Meta 分析[J]. 实用肿瘤杂志,2016,31(1):52-59
- 12 王晓慧,高丽梅,李鑫. 新辅助化疗联合肿瘤细胞减灭术及术后腹腔热灌注治疗晚期卵巢癌的近期、远期疗效观察[J]. 国际老年医学杂志,2017,38(4):145-148
- 13 王成双,张春梅. 卵巢癌治疗现状[J]. 安徽医药,2012,16(3):286-289
- 14 张英,马瑞霞,高玉霞. 甘露聚糖肽对卵巢癌患者免疫功能及生存质量影响[J]. 实用肿瘤杂志,2017,32(2):159-163
- 15 McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer[J]. N Engl J med,1996,334(1):1-6
- 16 熊云琪,狄文,吴霞. 白蛋白结合型紫杉醇联合铂类或异环磷酰胺治疗复发性卵巢癌的疗效及安全性分析[J]. 现代妇产科进展,2017,26(5):325-328
- 17 郭凤,黄伟,赵莉,等. 白蛋白结合型紫杉醇联合卡铂在晚期、复发性上皮卵巢癌治疗中的应用价值[J]. 实用癌症杂志,2018,33(1):156-158
- 18 赵莎莎,从晓凤,刘子玲,等. 白蛋白结合型紫杉醇治疗晚期耐药复发卵巢癌的疗效及安全性[J]. 中国老年学杂志,2017,37(16):4006-4008
- 19 Socinski MA, Bondarenko I, Karaseva NA, et al. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial[J]. J Clin Oncol,2012,30(17):2055-2062
- 20 毕大鹏. 白蛋白结合型紫杉醇治疗晚期乳腺癌患者的临床效果观察[J]. 中国药物经济学,2017,12(2):29-31

(收稿日期:2019-01-22)

(修回日期:2019-03-29)

## 异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的筛选和生物被膜形成能力的研究

王 兵 杨靖娴 邵冬华 梁国威

**摘要** **目的** 调查笔者医院异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(hVISA)的分离率,并探索 hVISA 菌株的生物被膜形成能力。**方法** 收集临床 139 例 MRSA 菌株,采用浓度为 5mg/L 的替考拉宁脑心浸液琼脂平皿(BHIA5T)进行 hVISA 筛选,应用改良菌群分析-曲线下面积(PAP-AUC)法进行确证,报告笔者医院 hVISA 的发生率。用刚果红琼脂和结晶紫染色法检测 hVISA 的生物被膜形成能力,微量肉汤稀释法和 K-B 纸片法检测生物被膜中细菌对抗生素的敏感度。**结果** 经过 PAP-AUC 方法检测,从 139 株 MRSA 中确定 1 例为 hVISA 阳性,hVISA 的分离率为 0.72%。分离出来的 hVISA 菌株可以形成生物被膜,hVISA 菌株的最低抑制生物被膜浓度(MBIC)明显升高,K-B 法检测显示它对利奈唑胺和替加环素敏感。同时,研究发现低浓度的万古霉素可能对生物被膜的形成有促进作用。**结论** 笔者医院 hVISA 的发生率虽然不高,但此菌株可以形成生物被膜,形成生物被膜后细菌对万古霉素敏感度降低,需要引起临床的高度重视,此时可尝试换用利奈唑胺或替加环素。

**关键词** 异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌 hVISA 筛选 生物被膜

**中图分类号** R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.11.035

**Screening of Heterogeneous Vancomycin - Intermediate Resistant Staphylococcus Aureus and its Biofilm Formation Ability Study.** Wang Bing, Yang Jingxian, Shao Donghua, et al. Department of Clinical Laboratory, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China

**Abstract Objective** To investigate the isolation rate of heterogeneous vancomycin - intermediate resistant staphylococcus aureus (hVISA) in our hospital and explore the biofilm formation ability of hVISA strain. **Methods** A total of 139 MRSA clinical isolates were

基金项目:航天中心医院院级基金资助项目(YN201503)

作者单位:100049 北京,航天中心医院检验科

通讯作者:梁国威,电子信箱:lgw721@126.com

collected and screened for hVISA with 5mg/L teicoplanin brain – heart infusion agar plate (BHIA5T). We chose the modified population analyzed profile – area under the curve (PAP – AUC) method as the gold standard to validate hVISA strains and reported the incidence rate of hVISA in our hospital. Congo red agar and crystal violet staining were used to detect the biofilm formation ability of hVISA strain, and we tested the sensitivity of bacteria in the biofilm to vancomycin using the standard broth microdilution and Kirby – Bauer methods.

**Results** After detecting by PAP – AUC method, one of the 139 MRSA strains was confirmed to be hVISA positive, and the isolation rate of hVISA was 0.72%. The isolated hVISA strain could form a biofilm, and the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) of the hVISA strain was significantly increased. It was found to be sensitive to linezolid and tigecycline by Kirby – Bauer method. At the same time, we found that low concentrations of vancomycin may promote the formation of biofilm.

**Conclusion** Although the incidence rate of hVISA in our hospital is not high, it also needs to be given great attention in clinic because of its biofilm formation ability. Once the biofilm is formed, the sensitivity of bacteria to vancomycin will be reduced. At this time, it is better to use other antibiotics such as linezolid or tigecycline.

**Key words** Heterogeneous vancomycin – intermediate resistant staphylococcus aureus; hVISA; Screening; Biofilm

MRSA 作为医院感染的常见病原菌之一,目前治疗主要依赖于糖肽类抗生素。随着万古霉素临床使用的增多,临床上已经出现了耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)、万古霉素中介金黄色葡萄球菌(VISA)及异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌(hVISA),成为医学治疗的难题。目前认为 hVISA 作为 VISA 的前体,母代对万古霉素敏感, MIC  $\leq 2\text{mg/L}$ , 但是子代中却存在少量可以在万古霉素含量  $\geq 4\text{mg/L}$  的 BHI 平皿上生长的亚群,发生率为  $10^{-6} \sim 10^{-5}$ , 在治疗过程中,随着不断存在的万古霉素的选择压力,导致 hVISA 克隆的增加,并逐渐发展为 VISA,对万古霉素耐药<sup>[1]</sup>。目前在临床上还没有一种简单方便并且敏感度和特异性都比较高的方法用于 hVISA 筛选,这也成为困扰临床和实验室工作的难题。本研究以改良菌群分析策略 – 曲线下面积 (PAP – AUC) 方法作为金标准,对替考拉宁脑心浸液琼脂平皿筛选方法进行评价,了解笔者医院 hVISA 的发生率,探索出适合笔者医院检验科 hVISA 的筛选方法和平台,以便尽早发现并向临床报道 hVISA,引起临床的重视<sup>[2]</sup>。同时,笔者也探索了 hVISA 菌株的生物被膜形成能力以及生物被膜中细菌对抗生素的敏感度,筛选出对其敏感的抗生素,期待对临床有提示作用,尽早采取措施,避免 VISA 和 VRSA 的发生。

### 材料与方 法

1. 菌株来源:收集航天中心医院 2014 ~ 2017 年临床分离的 139 株 MRSA 菌株,其中痰标本 59 株,血标本 37 株,鼻拭子 19 株,分泌物 9 株,其他 15 株,所有菌株均经过 VITEK2 – Compact 仪器鉴定,标准菌株 ATCC700698 (Mu3) 购自美国典型菌种保藏中心。

2. 试剂和材料:VITEK 全自动细菌鉴定仪和比浊

仪购自法国生物梅里埃公司,万古霉素和替考拉宁粉剂购自中国食品药品检定研究院,脑心浸液琼脂 (brain heart infusion agar, BHIA)、胰蛋白胨大豆肉汤 (tryptic soy broth, TSB) 购自英国 OXOID 公司,刚果红干粉购自美国 Sigma 公司。

3. hVISA 筛选:(1)替考拉宁琼脂平皿筛选法:挑取哥伦比亚血平板上培养过夜的 MRSA 单个菌落,用 0.85% 的 NaCl 溶液配置成 0.5 麦氏单位的菌悬液,吸取  $10\mu\text{l}$  菌液点种在含有替考拉宁  $5\text{mg/L}$  的 BHIA (BHIA5T) 上,  $35^\circ\text{C}$  培养 48h,平板上有  $\geq 1$  个菌落为 hVISA 阳性,每个菌株重复两次。以 ATCC25923 为阴性对照, Mu3 为阳性对照。(2)改良菌群分析策略 – 曲线下面积法 (PAP – AUC):制备不同浓度的万古霉素脑心浸液琼脂平板:每 400ml BHI 中分别加入  $10\text{mg/ml}$  的万古霉素母液 0、20、40、80、100、160、240、320  $\mu\text{l}$ ,配置成浓度为 0、0.5、1.0、2.0、2.5、4.0、6.0、8.0  $\text{mg/L}$  8 个浓度的 BHI 平皿。在 8ml 的 TSB 中加入培养过夜的纯菌落,  $35^\circ\text{C}$  振荡培养 24h 后形成的菌液定义为原液。将原液用 0.85% 的 NaCl 溶液稀释成  $10^5\text{CFU/ml}$  和  $10^2\text{CFU/ml}$  两种浓度,然后取原液和稀释菌液  $50\mu\text{l}$  分别均匀涂布到上述 7 个含万古霉素的浓度的 BHIA 上,充分晾干后在  $35^\circ\text{C}$  温箱培养 48h,以 Mu3 为阳性对照, ATCC29213 为阴性对照。利用 Graphpad Prism 软件绘制菌落数 lg 对数值对万古霉素浓度的曲线并计算曲线下面积 AUC,比较待测菌株的 AUC 与 Mu3 的 AUC。目前公认的确认为  $(\text{AUC}_{\text{待测菌株}}/\text{AUC}_{\text{Mu3}}) < 0.9$  为万古霉素敏感的金黄色葡萄球菌 (VSSA);  $(\text{AUC}_{\text{待测菌株}}/\text{AUC}_{\text{Mu3}}) \geq 1.3$  为 VISA;  $0.9 \leq (\text{AUC}_{\text{待测菌株}}/\text{AUC}_{\text{Mu3}}) < 1.3$  为 hVISA。

4. 生物被膜形成能力检测:(1)刚果红琼脂实验:将冻存菌株接种于哥伦比亚血平板上培养过夜,

挑取单个菌落接种于刚果红平板上,37℃培养24h后于室温放置24h,观察培养结果。如果出现黑色干燥菌落则提示为生物膜阳性菌株,红色光滑菌落则提示为生物膜阴性菌株。(2)半定量黏附检测:采用96孔板培养,结晶紫染色法进行半定量检测。挑取在哥伦比亚血平板上培养24h的单个菌落,加入8ml的TSB培养液,摇菌过夜;取过夜的菌液用TSB配成0.5麦氏浊度;96孔板中每孔200 $\mu$ l,每个重复3孔,37℃培养24h;吸取96孔板中的液体,用200 $\mu$ l PBS洗3次,弃去液体;每孔加入200 $\mu$ l的无水乙醇固定15min,倒掉液体,自然晾干;每孔加入0.5%的结晶紫200 $\mu$ l,染色2min,PBS洗3次,加入100 $\mu$ l无水乙醇室温放置10min,595nm处测吸光度值(A值)。按照Christensen等1985年提出的生物被膜黏附程度的分类方法,将生物被膜分为不黏附、弱黏附、中等黏附和强黏附4种,采用微孔板法测定生物被膜的临界A值( $A_c$ ), $A_c$ 等于空白对照的A均值加上其3倍标准差,因此可以根据以下A范围进行生物被膜分类: $A \leq A_c$ 为不黏附, $A_c < A \leq 2A_c$ 为弱黏附, $2A_c < A \leq 4A_c$ 为中等黏附, $A > 4A_c$ 为强黏附<sup>[3]</sup>。随后,笔者检测了低浓度的万古霉素对生物被膜形成能力的影响,即在配置菌液的时候加入不同浓度的万古霉素(0、0.5、1.0mg/L),其他步骤同上。

5. 最低抑菌浓度(minimum inhibition concentration, MIC)和最低抑制生物被膜浓度(minimum biofilm inhibitory concentration, MBIC)测定:采用2015年版美国临床和实验室标准协会推荐的微量肉汤稀释法测定MIC。然后,体外制备生物被膜模型,用TSB将万古霉素做梯度稀释,浓度范围为 $1 \times \text{MIC} \sim 1024 \times \text{MIC}$ 。取200 $\mu$ l加入96孔板生物被膜模型中,无菌TSB作为阴性对照。37℃培养24h,将肉眼观察无浑浊孔的最低药物浓度即MBIC。

### 结 果

1. 替考拉宁琼脂平皿筛选:139株MRSA经过BHIA5T初筛阳性46株。S131、S134和S92菌株在平皿上有菌落生长,为BHIA5T初筛阳性菌株,Mu3为阳性对照,ATCC25923为阴性对照,详见图1。

2. hVISA的临床分离率:139株MRSA经过PAP-AUC方法检测,确定hVISA阳性菌株仅1株,为S92,来源于血标本,因此血标本中hVISA的分离率为2.7%,笔者医院临床上hVISA的总体分离率为0.72%。这例患者的万古霉素MIC的浓度为2 $\mu$ g/ml,之前的研究结果也显示hVISA菌株的万古霉素



图1 BHIA5T 筛选结果

的MIC一般集中在1~2 $\mu$ g/ml。PAP-AUC结果如图2所示。

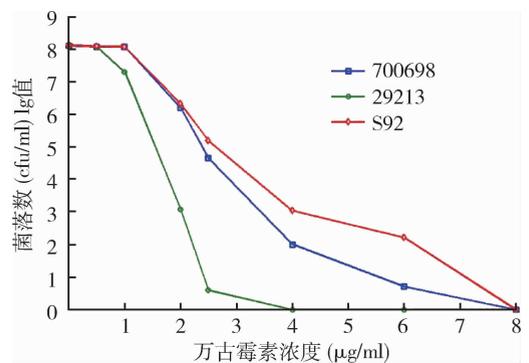


图2 菌群分析/曲线下面积(PAP-AUC)图

ATCC700698(Mu3)作为阳性质控菌株,ATCC29213作为阴性质控菌株, $AUC_{S92}/AUC_{Mu3} = 1.21$ ,因此S92为hVISA菌株

3. hVISA的生物被膜形成能力:经过刚果红琼脂实验,S92菌株菌落明显变黑,显示有生物被膜形成(图3),随后进行96孔板的培养和结晶紫染色,发现96孔板的底部有明显的生物膜形成,通过分光光度计检测,A值( $1.00 \pm 0.05$ )明显高于万古霉素敏感的29213菌株( $0.39 \pm 0.05$ ),空白对照的 $A_c$ 为0.14,因此,依据A值范围对生物被膜进行分类,S92属于强黏附的生物被膜菌株。

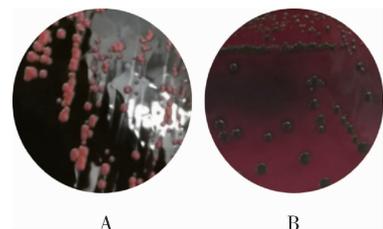


图3 刚果红琼脂实验

A. 菌落呈现红色,无生物被膜形成;B. 菌落呈现黑色,生物被膜形成阳性

4. 低浓度的万古霉素对生物被膜的影响:在研究中笔者将培养 S92 菌株的 96 孔板中加入了 1/4MIC 即 0.5mg/L 的万古霉素,发现此菌株形成生物被膜能力增强了,A 值为  $1.26 \pm 0.22$ ,但是万古霉素浓度增加为 1mg/L 时,形成的生物被膜减弱了,A 值为  $0.57 \pm 0.12$ (图 4)。

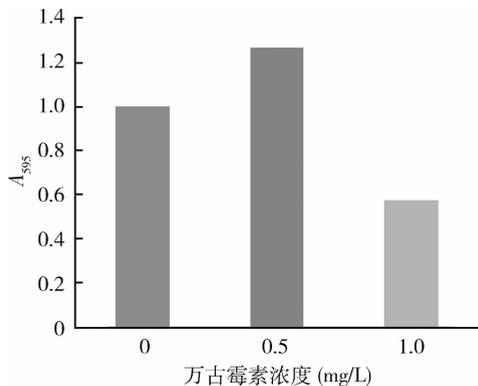


图 4 低浓度万古霉素对生物被膜的影响

5. 生物被膜中细菌对万古霉素的敏感度降低:通过研究发现 S92 菌株的最低抑制生物被膜浓度 (MBIC) 明显升高,256 $\mu$ g/ml 的万古霉素浓度才能完全抑制生物被膜的生长,生物被膜中的细菌对万古霉素的敏感度降低,MIC 值升高。

## 讨 论

自万古霉素 1958 年被美国 FDA 批准应用于 MRSA 引起的感染,一直以来对革兰阳性菌保持着较高的活性,但是自 1997 年日本首次报道 hVISA 以来,多个国家也陆续报道发现了 hVISA 和 VISA<sup>[4-7]</sup>。hVISA 存在于 VISA 前期,虽然 hVISA 的母代对万古霉素敏感,但是在万古霉素的选择压力下,hVISA 克隆增加,最终形成 VISA,对万古霉素耐药,并且 hVISA 存在不同的表型和生物学变化,导致在临床工作中难以辨认,不能及时发现,因此尽早筛选出 hVISA 菌株并向临床报道就至关重要<sup>[8]</sup>。目前 hVISA 的检测方法很多,作为金标准的 PAP - AUC 方法需要螺旋涂布仪和标准菌株 Mu3,耗时费力,无法在临床常规工作中开展。这几年推荐的宏量 E 试验法,操作简单,重复性好,也有较高的敏感度和特异性,但是需要万古霉素和替考拉宁的 E - test 条,价格昂贵,也难以在临床工作中推广。Wang 等<sup>[9]</sup>报道显示可以用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI - TOF) 进行 hVISA 检测,但筛选效果有待进一步的验证。目前应用较多的筛选方法仍然为含万古霉素或

者替考拉宁的脑心浸液琼脂平皿筛选法,本研究选用敏感度较高的 BHIA5T 进行初筛,初筛阳性的菌株再经过 PAP - AUC 检测。

不同国家和地区的 hVISA 分离率差异很大。Chung 等<sup>[10-13]</sup>报道亚洲地区 hVISA 分离率为 3.5%,美国为 5.9%,2007 年我国 14 个城市 hVISA 的检出率为 9.5%,最新报道的山东省检出率为 5.6%。本研究收集了笔者医院的 139 例菌株进行检测,发现了 1 例来源于血标本的 hVISA,分离率为 0.72%。相对于其他医院的报道,目前笔者医院 hVISA 的发生率是比较低的,分析原因有两点:(1)本研究是一个单中心的研究,纳入的 MRSA 菌株相对较少,人群单一。(2)本研究纳入的是患者初次入院分离冻存的菌株,没有经过抗生素的选择压力,耐药性相对较弱。

目前笔者对 hVISA 的耐药机制并不是非常了解,比较肯定的是 hVISA 菌株的细胞壁增厚,增厚的细胞壁交联会明显减少,使游离的 D - 丙氨酰 - D - 丙氨酰侧链含量增加,这些游离的侧链可以与万古霉素结合,导致万古霉素被固定在细胞壁中,无法到达作用的靶点。Gregorio 等<sup>[14]</sup>通过自溶实验分析发现,与万古霉素敏感的金黄色葡萄球菌比较,hVISA/VISA 菌株的自溶活性明显降低<sup>[15]</sup>。另外,近期的研究提示 hVISA 的耐药可能与生物被膜形成相关,但是对于 hVISA 菌株的生物被膜形成能力却存在争议。Xu 等<sup>[15]</sup>却报道了 hVISA 菌株的生物被膜形成能力降低,而 Szymanek - Majchrzak 等<sup>[16]</sup>发现对糖类抗生素不敏感的 MRSA 菌株生物被膜形成明显增强。Kaplan<sup>[17]</sup>报道了低浓度的抗生素可以促进生物膜的形成。Abdelhady 等<sup>[18]</sup>报道了对万古霉素治疗无效的 5 株 MRSA 菌株中有 4 株在低浓度的万古霉素存在时,生物被膜形成能力明显增强。

本研究发现的 S92 也是一个强黏附的生物被膜菌株,并且在加入低浓度的万古霉素后,S92 的生物被膜形成能力增强,显示低浓度的万古霉素对生物被膜有促进作用<sup>[17,18]</sup>。Chang 等<sup>[19]</sup>研究也证明万古霉素在体外可以诱导 hVISA 菌株的耐药性增强,并且在诱导过程中,发现与生物被膜黏附、聚集和增殖阶段相关的多个基因如 *fnbA*、*atIA*、*icaA* 等的 mRNA 量增加,细菌的生物被膜形成能力逐渐增加。同时,笔者观察到 hVISA 菌株形成生物被膜后,需要明显提高万古霉素浓度才能抑制细菌的生长。通过 K - B 法检测研究发现 hVISA 菌株对利奈唑胺和替加环素依然敏感,这与之前的报道也是一致的<sup>[20]</sup>。这提示

在临床上怀疑有 hVISA 存在,并且万古霉素治疗时间长,不排除有生物膜形成时,可尝试换用利奈唑胺和替加环素进行治疗。

由于本研究只发现了 1 株 hVISA,无法进行统计分析和分子检测,后续希望能够扩大样本量继续研究,在分子层面探索 hVISA 的耐药机制以及生物被膜形成能力,为临床治疗提供更加可靠的依据。

本研究是首次检测创建笔者医院 hVISA 的检测平台,并发现了 1 株 hVISA,它的生物被膜形成能力强,并且低浓度的万古霉素对生物膜的形成有促进作用,这需要引起临床的高度重视,合理使用抗生素尤其是糖肽类药物,也可尝试换用利奈唑胺或替加环素,以避免 VISA 和 VRSA 产生,感染控制不佳,临床治疗失败。

### 参考文献

- Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, *et al.* Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin - intermediate and heterogeneous vancomycin - intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(1):99 - 139
- Van Hal SJ, Wehrhahn MC, Barbogiannakos T, *et al.* Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin - intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4):1489 - 1494
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, *et al.* Adherence of coagulase - negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices [J]. *J Clin Microbiol*, 1985, 22(6):996 - 1006
- 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(9092):1670 - 1673
- 马笑雪,徐佳,胡健.万古霉素敏感性下降金黄色葡萄球菌(VISA/hVISA)的研究进展[J].微生物学杂志,2017,37(6):1 - 10
- Asadpour L, Ghazanfari N. Detection of vancomycin nonsusceptible strains in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in northern Iran [J]. *Int Microbiol*, 2019. doi: 10.1007/s10123 - 019 - 00063 - 7. [Epub ahead of print]
- 赵罗乐,黄文祥,李佳俊,等.异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌的流行病学及其感染的临床特征[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(03):267 - 272
- Sirichoat A, Wongthong S, Kanyota R, *et al.* Phenotypic characteristics of vancomycin - non - susceptible *Staphylococcus aureus* [J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2016, 9(1):e26069
- Wang HY, Chen CH, Lee TY, *et al.* Rapid detection of heterogene-

- ous vancomycin - intermediate *Staphylococcus aureus* based on matrix - assisted laser desorption ionization time - of - flight: using a machine learning approach and unbiased validation [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:2393
- Chung DR, Lee C, Kang YR, *et al.* Genotype - specific prevalence of heterogeneous vancomycin - intermediate *Staphylococcus aureus* in Asian countries [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 46(3):338 - 341
- Martirosov DM, Bidell MR, Pai MP, *et al.* Relationship between day 1 and day 2 vancomycin area under the curve values and emergence of heterogeneous vancomycin - intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) by Etest® macromethod among patients with MRSA bloodstream infections: a pilot study [J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1):534 - 541
- Kaplan JB. Antibiotic - induced biofilm formation [J]. *Int J Artif Organs*, 2011, 34(9):737 - 751
- Abdelhady W, Bayer AS, Seidl K, *et al.* Reduced vancomycin susceptibility in an in vitro catheter - related biofilm model correlates with poor therapeutic outcomes in experimental endocarditis due to methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(3):1447 - 1454
- 陈宏斌,王辉,孙闻嘉,等.2007 年中国 14 个城市异质性万古霉素中介耐药的金黄色葡萄球菌分子特征[J].中华检验医学杂志,2009,32(11):1223 - 1227
- 刘明涛,李凯述,李超,等.万古霉素耐药折点调整对异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌筛选方法的影响[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(4):455 - 459
- Di Gregorio S, Fernandez S, Cuirolo A, *et al.* Different vancomycin - intermediate *Staphylococcus aureus* phenotypes selected from the same ST100 - hVISA parental strain [J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(1):44 - 50
- Xu J, Pang L, Ma XX, *et al.* Phenotypic and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility derived in vitro [J]. *Open Med (Wars)*, 2018, 13:475 - 486
- Szymanek - Majchrzak K, Wodzyńska S, Młynarczyk A, *et al.* Production of extracellular polysaccharide and biofilm under different oxygen conditions by clinical isolates of *Staphylococcus aureus* non - susceptible to glycopeptides [J]. *Przegl Epidemiol*, 2018, 72(4):487 - 498
- Chang W, Ding D, Zhang S, *et al.* Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* grown on vancomycin - supplemented screening agar displays enhanced biofilm formation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(12):7906 - 7910
- Okado JB, Avaca - Crusca JS, Oliveira AL, *et al.* Daptomycin and vancomycin heteroresistance revealed among CC5 - SCCmecII MRSA clone and in vitro evaluation of treatment alternatives [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018, 14:209 - 216

(收稿日期:2019 - 02 - 21)

(修回日期:2019 - 03 - 12)