

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌医院感染研究概况

廖远泉

作者单位:242500 宣城市,安徽省泾县医院检验科

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.03.015

新的广谱抗生素的不断问世以及抗生素的大量应用,致使细菌耐药性日趋严重,已经成为世界关注的公共卫生问题。医院感染的重要病原菌—耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的临床感染十分常见,因其表现为多重耐药性(multi-drug resistance, MDR),易引起感染的暴发流行,而 MRSA 医院感染严重,社区获得性 MRSA 感染也有增加的趋势^[1]。且国外已经出现耐万古霉素的金黄色葡萄球菌(vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)^[2]。因此,MRSA 的治疗是临床非常棘手的一大难题和研究热点。本文就 MRSA 医院感染的现状及其防治的研究进展作一综述。

1 MRSA 医院感染的发展与现状

Jevons 等^[3]于 1961 年率先在英国发现并报道世界首例 MRSA 感染病例,此后,英国、美国、日本相继报道 MRSA 感染。20 世纪 80 年代后,随着抗生素种类的不断增多及其在临床的广泛应用,MRSA 引起严重感染的发病率在全球范围迅速升高,由于其异质性 MDR,全身感染患者的病死率高达 50%以上^[4]。如今,世界许多国家 MRSA 感染率持续上升,一些亚洲国家 MRSA 感染率已高达 80%。国内一些省市医院内金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)的感染耐药性监测^[5-7]显示 MRSA 检出率也已显著增高,如上海华山医院 MRSA 检出率高达 83.9%,浙医大一院为 64.4%;昆明地区 MRSA 检出率也从 2002 年的 36.3%升高到 2008 年的 81.4%;哈尔滨医大附一院神经外科 2007 年—2009 年 3 年的 MRSA 检出率平均已达 83.7%。MRSA 感染率持续增高的趋势不容忽视。

以上研究表明,MRSA 检出率差异主要与医院所在地理位置和医院类型有关,MRSA 感染的最终原因与患者是否免疫功能低下、介入性医疗操作、MRSA 寄殖及长期使用广谱抗生素等因素密切相关。

2 MRSA 生物学特性及其耐药机制

MRSA 具有不均一耐药性、广谱耐药性和生长特殊性的生物学特性。MRSA 耐药主要表现为由染色体介导的固有耐药和由质粒介导的获得性耐药。

细菌对 β -内酰胺类抗生素的固有耐药主要与细菌产生的青霉素结合蛋白(penicillin binding protein, PBP)有关。某些菌株通过耐药因子的传递,在种间或属间转移,并产生大量 β -内酰胺酶,而表现出耐药性(多为临界耐药),为获得性耐药。MRSA 产生的大量 β -内酰胺酶通过水解机制作用于 β -内酰胺类抗生素,使其水解灭活;再是因为牵制机制致使过量的 β -内酰胺酶迅速、牢固地与抗生素结合,并滞留在细菌包膜外间隙不易进入作用靶位,从而促使 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素产生耐药^[8]。

MRSA 所表现的高度耐药性,除了与其携带的 PBP2a 相关外,还与一个重要的可以在不同细菌种间转移的 SA 盒式染色体 *mec*(*Staphylococcal cassette chromosome*, SCC*mec*)密切相关^[9]。SCC*mec* 是一种长约 21~67 kb 的可转移的新型元件,包括 *mec* 基因复合体和其转移的染色体重组酶基因复合体(*cassette chromosome recombinase*, *ccr*)。*mec* 基因复合体由编码 PBP2a 的结构基因 *mecA* 基因、调控基因 *mecR1* 和 *mecI* 组成。通过 *mecR1* 和 *mecI* 调控基因抑制 *mecA* 基因的转录,决定 PBP2a 的合成水平而控制细菌的耐药程度。此外,在细菌基因组中还存在着辅助基因 *femA*、*femB*、*femD* 和 *femE*,与甲氧西林耐药性的表达有关,这些辅助基因与 *mecA* 基因的协调作用,产生对 β -内酰胺类抗生素的高度耐药性。同时,也与 MRSA 的主动外排耐药机制相关^[10]。细菌的主动外排系统是其正常生理结构,在敏感菌株中也有存在,有待深入研究。

多数 MRSA 菌株存在耐 β -内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类等多种抗生素耐药基因,具有 MDR 特征。张珏等^[11]对医院感染的 20 株 MRSA 耐药基因 *mecA* 的阳性检出率为 100%。PBP 的改变以及缘于甲氧西林敏感的 SA 获得 SCC*mec* 基因元件,是 MRSA 产生耐药的重要机制^[12]。

3 MRSA 的实验室检测及其分型

3.1 实验室检测 检测 MRSA 最确切的方法就是检验其是否产生了 PBP2a(或者检测 *mecA* 基因);但目前临床常用的方法主要是根据抗生素对病原菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)来检测 MRSA。

NCCLS/CLSI(2005)^[13]建议检测 SA 增加 *mecA* 和 PBP2a 的检测,或者用头孢西丁作纸片扩散药敏实验。因为由 *mecA* 基因决定的苯唑西林耐药是“经典”的 MRSA,只有极少数苯唑西林耐药的 SA 菌株 *mecA* 基因检出呈阴性;亦有苯唑西林 MIC 显示“S”,而纸片扩散药敏试验的抑菌环在“R”范围,称为“borderline”苯唑西林耐药。因此,要求检测 *mecA*/PBP2a 以明确界定“经典”的苯唑西林耐药菌株。但对其 MIC 处于阈值(2 mg/L),即对苯唑西林处于边缘敏感的 SA 耐药性变化的监测,临床研究较少,仍然是值得深入研究的课题^[14]。

临床检测 MRSA 的方法主要有:①经典的常规检测方法如苯唑西林 MIC 及纸片扩散药敏实验、含盐苯唑西林琼脂筛选平板(MHA+4% NaCl+6 μg/mL 苯唑西林)。②分子生物学技术如聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术、核酸探针杂交技术等检测 *mecA* 基因。③乳胶凝集试验检测 PBP2a、头孢西丁纸片扩散药敏试验、显色平板试验等。快速检测细菌药敏的方法和自动化药敏检测系统等也已用于 MRSA 的检测。近年,在 MRSA 的检测和耐药性分析中还有质粒图谱分析,免疫印迹技术、染色体限制性内切酶分析技术等。除此之外,还应用了多重实时荧光定量 PCR、环介导等温扩增技术以及基因芯片等检测技术,多用于 MRSA 的临床和实验室研究。

然而,上述的一些检测技术和方法耗时较长;有的操作复杂、繁琐;或需特殊设备,费用昂贵,不利于推广。分子生物学方法虽然敏感、特异、快速,但多数葡萄球菌内存在 *mecA* 基因,少数耐药菌缺乏该基因,由于细菌的异质性的影响,耐药基因的检出并非等同于细菌耐药的情况。因此,头孢西丁纸片扩散药敏试验和乳胶凝集试验(latex agglutination test, LAT)在 MRSA 感染的临床检测和耐药性分析中,仍然是各级实验室常用的、主要的试验方法。

3.2 头孢西丁纸片扩散药敏试验和 LAT 检测 MRSA

3.2.1 头孢西丁纸片扩散药敏试验 头孢西丁属头孢霉素类抗生素,与 SA 的 PBP 具有高度亲和力,故推荐应用于 MRSA 的检测^[15]。应用头孢西丁、苯唑西林纸片法筛选 MRSA 的敏感度和特异性均>97%;且头孢西丁可准确检测所有的耐甲氧西林葡萄球菌,而苯唑西林只能用于检测 MRSA,不能检测耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌^[16]。

该试验检测结果与 *mecA* 基因检测符合率高,方法准确、可靠。而且,其所显示的抑菌环清晰,易于判读试验结果;该药敏试验结果可以等同于苯唑西林检测 MRSA,但试验结果仍以苯唑西林报告 S/R,而不写头孢西丁。修正的药敏判读标准(New M100-S17/2007):头孢西丁纸片(30 μg/片)扩散法抑菌环直径界值(mm)≤21 为 R;≥22 为 S,孵育 18 h 判读试验结果。应选择适宜的孵育温度 33~35℃(不可高于 35℃),否则,可能因为 *mecA* 未充分表达而出现假阴性。

3.2.2 PBP2a LAT Felten 等^[17]应用 PBP2a LAT 分别检测 83 株 MRSA 和 69 株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌,结果显示其敏感性为 97.6%、特异性为 100.0%。其中,26 株极低水平耐药的异质性 MRSA 均被正确鉴定。LAT 条件要求不高、操作简单,可以直接、快速(15 min)检测整合于细菌细胞膜上的 PBP2a 以鉴定 MRSA。但本法对 PBP2a 低水平表达的 MRSA 易产生假阴性。苯唑西林纸片扩散法、苯唑西林-高盐琼脂筛选试验和 PBP2a LAT 三种方法检测 MRSA 临床分离株的一致性为 100%^[18]。因此,LAT 法适于临床实验室快速准确检测 MRSA,国内已有进口的商品试剂盒。此外,采用层析式双抗体夹心法快速检测 MRSA PBP2a 的方法—胶体金法近年已在国内临床应用,且获得好评。

3.3 MRSA 细菌学基因分型 主要用于传染源的追踪调查、型别与病原菌感染种类及耐药性关系的研究。MRSA SC-CmecA 基因分型技术的研究为细菌分型提供了一个新的检测方法。根据 SCCmec 其中 *mec* 和 *ccr* 基因复合体的不同,SCCmec 可分为 I-V 型;其中,又可分为若干亚型。SCCmec I、II、III 型多见于医院感染的 MRSA^[19]。我国医院内感染分离的 MRSA 主要流行株为 ST239-MRSA-SCCmec III、和 ST5-MRSA-SCCmec II 型^[20]。

研究^[21]表明,以 SCCmec III 型为医院感染优势基因型,且经脉冲场凝胶电泳证实主要有 2 种克隆株。临床分离的 MRSA 呈 MDR,不同医院流行的 MRSA 菌株基因型经脉冲场凝胶电泳检测显示主要为 A1、A2;SCCmec 基因分型显示以 SCCmec III 型为医院感染优势基因型;但不同地区的医院感染流行的菌株基因型不同,同一医院流行的菌株基因型也可能不同。SCCmec 由 *mec* 复合体和 *ccr* 复合体构成,作为菌体基因组上可以移动的基因结构,除 *mecA* 外,其还可以携带多种耐药基因。所以,建立在 *mec* 复合体以及 *ccr* 复合体组合携带耐药基因的 SCCmec 细菌学基因分型在细菌耐药性研究上具有显著的优势。此外,血清学、生物化学、耐药谱分型等也适用于临床实验室 MRSA 的细菌学分型。

4 MRSA 医院感染的治疗和预防

4.1 医院感染的治疗 MRSA 对万古霉素和替考拉宁的敏感度均为 100%^[6]。所以重症 MRSA 感染者宜首选糖肽类抗菌药物万古霉素或替考拉宁,或根据药敏加用磷霉素和利福平等;MRSA 所致心内膜炎患者可用万古霉素与利福平、氨基糖苷类联合用药。必须注意,鉴于 MRSA 特殊的耐药机制,不论其对 β-内酰胺类抗生素体外药敏试验结果是否敏感,根据美国 CLSI 的规定均应视为耐药。所以,凡 β-内酰胺类抗生素均不宜用于 MRSA 感染患者的临床治疗。

一项对全国 17 家综合性医院临床分离的 MRSA 菌株进行的大样本耐药性及分子流行病学研究^[22]表明,MRSA 菌株主要分布于呼吸、血液、感染、普通外科、神经外科及 ICU 等

病区;菌株来源于医院感染患者;同期对这些菌株进行的 SC-Cmec 分型研究予以证实。MRSA 对很多种抗菌药物耐药,对青霉素类以及头孢菌素类耐药率达到 99.4%~100.0%;对红霉素、克林霉素及四环素的耐药率也极高;对氨基糖苷类与喹诺酮类也有较高的耐药率。未发现对万古霉素与替考拉宁耐药的菌株。因为万古霉素的肾毒性,近年临床也已选用具有良好抗菌活性的利奈唑胺,其对 MRSA 的 MIC₉₀ 为 0.5~2.0 mg/L,疗效优于糖肽类抗生素^[23]。利奈唑胺属恶唑烷酮类抗生素,其通过与细菌核糖体的 50S 亚基结合,抑制 70S 起始复合物的形成,作用于病原体蛋白质合成的起始阶段,从而产生抗菌作用。临床肺部 MRSA 感染可以应用糖肽类联合利福平治疗,以避免单一药物治疗所出现的选择性耐药。或者当万古霉素治疗无效时,可以选择利奈唑胺治疗^[24]。但有研究^[25]表明,因为细菌 23S rRNA 的突变和 cfr 介导的耐药性,导致 SA 对利奈唑胺耐药。所以,CLSI(2010)药敏试验标准已修订为:利奈唑胺(稀释法)的 MIC $\geq$ 8.0 mg/L;或者 K-B 法的抑菌环直径 $\leq$ 20 mm 判读为利奈唑胺耐药菌株。检验医师应予以重视。

随着万古霉素的广泛应用,某些 MRSA 菌株由于继续突变或者基因转移,使得 SA 对其敏感性逐渐下降,国外已经出现 VRSA 菌株的报道^[2],发现耐万古霉素的肠球菌可以把万古霉素耐药基因传递给 SA;且证实 VRSA 对万古霉素的耐药性与 PBP2a 有关。2002 年 6 月,在美国密西根发现了世界第 1 例 SA 对万古霉素的高度耐药株;该例患者为一糖尿病致肾衰行肾透析者,分离的菌株对苯唑西林耐药 (MIC=10 mg/L),对万古霉素也耐药 (MIC>128 mg/L)。VRSA 的出现,给临床治疗带来了非常棘手的难题,因为 VRSA 的扩散会增加 MDR 的 SA 感染的治疗难度,且可能导致葡萄球菌感染无法治疗。国内迄今尚未见 VRSA 菌株的报道。但是,有学者^[26]对血培养获得的 200 株 MRSA 中 13% 的异质性万古霉素中介 SA 菌株的研究发现,万古霉素对 MRSA 的 MIC 从 2005 年到 2007 年已呈现逐渐增高的趋势。MRSA 多重耐药包括万古霉素治疗无效,与万古霉素对 SA 的 MIC 渐趋增高,尤以异质性万古霉素中介 SA 菌株的播散密切相关^[26]。

4.2 预防 MRSA 医院感染多发生于免疫缺陷、大面积烧伤、大手术后、长期住院及老年患者。感染部位以呼吸道为主;易感染科室以神经外科、ICU 科和普外科为常见。侵入性诊疗、长期使用抗生素和神经外科是 MRSA 感染的 3 大主要危险因素,易导致感染的流行和暴发。医护人员 MRSA 携带率较高,通过医护人员的手在患者、医护人员及患者间播散;此外,衣物、敷料等亦可携带 MRSA,可引起 MRSA 在医院内的播散及流行。提高医护人员对 MRSA 医院感染的认识,加强抗生素的合理应用与管理,对住院易感患者 MRSA 前瞻性监测,积极治疗并隔离 MRSA 感染者及携带者,严格执行消

毒隔离及无菌操作技术是切断其传播途径的重要措施。

5 参考文献

- 1 Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains. *Clin Infect Dis*, 2008, 46: 787-794.
- 2 Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1342-1347.
- 3 Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet*, 1963, 1: 904-907.
- 4 Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7: 629-641.
- 5 倪语星. 葡萄球菌感染的最新动态. *中国处方药*, 2006, 9: 6-9.
- 6 马小波, 陈端, 单斌. 昆明地区 MRSA 多重耐药情况与 mecA, femA 基因检测分析. *实用检验医师杂志*, 2009, 1: 12-15.
- 7 赵金英, 路娟, 罗文涛, 等. 2007-2009 年神经外科 MRSA 耐药性分析. *中国实验诊断学*, 2011, 15: 298-299.
- 8 Stefani S, Goglio A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis*, 2010, 14: S19-22.
- 9 Ito T, Katayama Y, Asada K, et al. Structural comparison of three types of Staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 1323-1336.
- 10 Truong-Bolduc QC, Strahilevitz J, Hooper DC, Nor C, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 1104-1107.
- 11 张珏, 乔昀, 倪语星. 医院感染的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药基因分析. *检验医学*, 2007, 22: 19-22.
- 12 Hiramatsu K, Okuma K, Ma XX. New trends staphylococcus aureus infections. glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community. *Curr Opin Infect Dis*, 2002, 15: 407-413.
- 13 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. 2005.
- 14 Petersson AC, Kamme C, Miomer H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 2047-2050.
- 15 Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* Mar, 2005, 55: 379-385.

- 16 张智洁, 蒋国英, 周秀珍, 等. 两种纸片检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌结果比较. 中国微生态学杂志, 2011, 23: 367-369.
- 17 Felten A, Grandry B, Lagrange H, et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam the vitek 2 system and the MRSA screen latex agglutination test. J Clin Microbiol, 2002, 40: 2766-2771.
- 18 吴伟元, 王凌伟, 卢月梅, 等. 三种检测 MRSA 方法的比较. 实用医学杂志, 2008, 24: 306-307.
- 19 孙光明, 马筱玲, 戴媛媛. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型的研究. 中国抗生素杂志, 2006, 31: 287-291.
- 20 Liu Y, Wang H, Du N, et al. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 512-518.
- 21 潘宏升, 田素飞, 年华, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子流行病学研究. 微生物学杂志, 2011, 31: 34-38.
- 22 赵彩芸, 肖永红, 王珊, 等. 临床分离耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药性及分子流行病学研究. 中国临床药理学杂志, 2011, 27: 96-99.
- 23 Manfredi R. Update on the appropriate use of linezolid in clinical practice. Ther Clin Risk Manag, 2006, 2: 455-464.
- 24 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement, 2010, M100-S20.
- 25 Ferrare AM. Treatment of hospital-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents, 2007, 30: 19-24.
- 26 Sun W, Chen H, Liu Y, et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates from 14 cities in China. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 3642-3649.

(收稿日期: 2012-04-03)

(本文编辑: 李露)

消息

第七届粤桂琼检验医学新进展学术大会

为加强广东、广西和海南三省区的检验医学学术交流, 推动区域检验医学工作者学术交流和联系, 第七届粤桂琼检验医学新进展学术大会拟定于 2013 年 11 月 7-9 日在广州召开。本次会议面向全国的检验医学工作者征文。大会设立优秀论文奖, 广东省学会检验分会负责优秀论文交流和评选活动。现将有关征文通知如下:

1 征文内容

1、临床实验室管理: 实验室质量管理、室间质量评价、医学实验室认可、临床实验室标准化、实验室自动化与信息系统、检验与临床沟通等; 2、临床基础检验与血液学检验: 血液学、体液学、细胞形态学、血液病基因诊断、血栓与止血、血型与输血等的基础与临床研究; 3、临床生化检验: 生化方法学研究与应用、生化指标在临床疾病诊治中的应用、临床生化案例分析等; 4、临床免疫检验: 免疫学检验方法和技术研究、感染性疾病的免疫诊断、肿瘤标志物及其应用、自身免疫疾病的实验诊断、免疫学检测技术在临床疾病诊治中的应用研究等; 5、临床微生物检验: 微生物鉴定与药敏试验、医院感染检测与控制、临床病毒学检测、医学实验室生物安全等; 6、临床分子诊断: 病原体的分子诊断、产前与遗传病基因诊断、肿瘤早期诊断以及个体化治疗相关分子诊断、药物基因组学

等; 7、POCT: POCT 技术方法、质量控制与临床应用等; 8、检验医学教育: 检验医学教育的教学改革与实践, 尤其是加强实践能力与创新精神培养的教学研究等; 9、其他相关检验医学领域的基础与临床研究等。

2 征文要求

(1) 论著、经验总结、综述和评论性文章均可, 必须是未公开发表过的文章。入围优秀论文评选的原则上为原始研究(论著); (2) 按照杂志投稿要求撰写, 文章全文和 1000 字以内的摘要各一份, 无摘要或摘要字数过少者不予受理; (3) 投稿请注明单位、地址、邮政编码和联系电话。

截稿日期: 2013 年 10 月 20 日(以网上投稿日期为准)

3 会议时间及地点

会议时间: 2013 年 11 月 7-9 日

会议地点: 广东省广州市新塘碧桂园凤凰城酒店

4 联系方式

广东省医学会检验医学分会秘书

郑磊 电话: 020-62787681; 13570701908

E-mail: nflab@163.com

元涛 电话: 13688867078

E-mail: nflab@126.com