

医院环境与住院患者耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性

吴安华，李春辉

中南大学湘雅医院感染控制中心，长沙 410008

通信作者：吴安华 电话：0731-4327429，传真：0731-4327237，电子邮件：dr_wuanhua@sina.com

摘要：目的 调查耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）在医院内的流行及耐药情况。**方法** 以湖南省4家综合医院临床标本中分离的110株金黄色葡萄球菌（SA）和1所医院环境及工作人员手中分离的30株SA为研究对象，分别采用苯唑西林和头孢西丁药敏纸片法及基因法检测MRSA，Nitrocephin试棒法测定MRSA的 β -内酰胺酶检出率，K-B纸片法检测MRSA对14种抗菌药物的敏感性。**结果** 140株SA中，MRSA检出率为63.57%（89/140），其中临床分离株和环境分离株中的MRSA检出率分别为64.55%（71/110）和60.00%（18/30），两者相比差异无显著性（ $P > 0.05$ ）。89株MRSA中， β -内酰胺酶产酶率为95.51%（85/89）。抗菌药物敏感性检测实验结果显示，MRSA对万古霉素和利奈唑胺的敏感率为100%，对替考拉宁的敏感率为97.75%（87/89），对其他抗菌药物均呈多重耐药。**结论** MRSA在医院内有较高的流行度，大多对包括 β -内酰胺类抗生素在内的抗菌药物呈多重耐药，但对万古霉素、利奈唑胺和替考拉宁较为敏感。

关键词：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌；医院感染；耐药性

中图分类号：R446.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-503X(2008)05-0525-06

DOI：10.3881/j.issn.1000-503X.2008.05.003

Antimicrobial Resistance of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hospital Environment and Inpatients

WU An-hua, LI Chun-hui

Centre for Infection Control, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: WU An-hua Tel: 0731-4327429, Fax: 0731-4327237, E-mail: dr_wuanhua@sina.com

ABSTRACT: Objective To investigate the spread and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital. **Methods** Totally 110 strains of *Staphylococcus aureus* (SA) were isolated from the clinical samples of patients in 4 hospitals and 30 strains of SA were isolated from the hospital environment and personnel in Xiangya Hospital. MRSA was detected using oxacillin disk diffusion test, cefoxitin disk diffusion test and *MecA*, *FemA* gene PCR assay. β -lactamase was detected using nitrocephin sticks. The antimicrobial susceptibility of MRSA was tested by K-B disk diffusion test. **Results** Among the 140 strains, 89 were MRSA, accounting for 63.57% of the total SA. The isolation rates of MRSA in clinical strains and environment strains were 64.55% and 60.00% ($P > 0.05$). All MRSA strains were sensitive to vancomycin and linezolid, 87 MRSA strains (97.75%) were sensitive to teicoplanin, most of which, however, were resistant to other antibiotics. Among the 89 strains, 85 MRSA strains (95.51%) expressed β -lactamase.

Conclusions MRSA is highly prevalent in hospitals. Most MRSA strains are multi-drug resistant, but are still

sensitive to vancomycin, linezolid, and teicoplanin.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; nosocomial infection; antimicrobial resistance

Acta Acad Med Sin, 2008, 30(5):525–530

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是医院感染的重要致病菌之一, 对包括甲氧西林在内的 β -内酰胺类抗生素耐药, 可导致医院感染流行或暴发, 且难以控制, 目前已成为临床感染治疗及控制医院内传播感染的一大难题。医务人员及环境物品是导致 MRSA 医院内传播的重要途径, 因此了解医院患者与环境中分离 MRSA 的临床分布和药物敏感性非常重要。本研究调查了湖南省 4 所综合性医院中 MRSA 的流行状况及其对 14 种抗菌药物的敏感性, 以期为预防和控制 MRSA 医院感染提供参考。

材料和方法

试验菌株 临床菌株: 2006 年 6~10 月在湘雅医院、湘雅三医院、郴州市第一医院和株洲市第一医院临床标本中分离出的 110 株金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA)。环境菌株: 共 30 株 SA, 分离自 2006 年 7~10 月在湘雅医院采集的 160 份环境标本, 其中 102 份来自床架、床头柜、监护仪、供养管、吸痰瓶、病室门把手、病历夹、办公桌和空气, 28 份来自医生手、护士手和陪护人员。

质控菌株 SA (ATCC25923)、MRSA 标准菌株 (ATCC43300)、大肠埃希菌标准株 (ATCC25922)、 β -内酰胺酶阳性株 (ATCC29213) 和 β -内酰胺酶阴性株 (ATCC25923) 均为湘雅医院感染控制中心保存菌株。

MRSA 检测

纸片法: 采用英国 Oxoid 公司的苯唑西林 (OX, 1 μg) 及头孢西丁 (FOX, 30 μg) 药敏纸片, 根据 2004 年美国临床实验室标准化委员会 (National Committee for Clinical Laboratory, NCCL) 提供的标准判读结果^[1]。头孢西丁: (1) 抑菌圈直径 $\leq 19 \text{ mm}$ 判断为耐药, 确定为 MRSA; (2) 抑菌圈直径 $\geq 20 \text{ mm}$ 判断为敏感, 确定为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)。苯唑西林: (1) 抑菌圈直径 $\leq 10 \text{ mm}$ 时判断为耐药, 确定为 MRSA; (2) 抑菌圈直径 $\geq 13 \text{ mm}$ 判断为敏感, 确定为 MSSA; (2) 抑菌圈直径为 11~12 mm

判断为中介。

基因检测法: (1) 参照《分子克隆实验指南》^[2] 碱裂解 DNA 小量提取法, 采用 TIANamp Bacteria DNA kit 试剂盒 (北京, TIANGEN) 提取 SA 基因组 DNA 模板。(2) 参考文献^[3,4] 合成 *MecA* 和 *FemA* 基因引物: *MecA* 引物 (310 bp): M1: 5-TGGCT-ATCGTGTACAAATCG-3, M2: 5-CTGGAACTTGTTGA-GCAGAG-3; *FemA* 引物 (686 bp): F1: 5-CTTACTT-ACTGGCTGTACCTG-3, F2: 5-ATGTCGCTTGTATGT-GC-3。(3) PCR 总反应体系 25 μl : 灭菌双蒸水 8.5 μl , 2 \times Master MIX 12.5 μl , 上下游引物各 1 μl , 模板 1 μl 。(4) PCR 反应条件: 92°C 预变性 1 min; 92°C 变性 1 min, 56°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 最后延伸 3 min。

MRSA β -内酰胺酶检测 以 ATCC29213 作为 β -内酰胺酶阳性对照株, ATCC25923 为 β -内酰胺酶阴性对照株, 采用英国 Oxoid 公司 β -内酰胺酶检测试剂 Nitrocephin 试棒, 参照提供的检测操作说明进行。

MRSA 药物敏感性实验 采用英国 Oxoid 公司的青霉素 (10 U)、头孢唑林 (30 μg)、亚胺培南 (10 μg)、替考拉宁 (30 μg)、阿米卡星 (30 μg)、红霉素 (15 μg)、泰利霉素 (15 μg)、加替沙星 (5 μg)、克林霉素 (2 μg)、利福平 (5 μg)、奎奴普丁/达福普汀 (15 μg)、利奈唑胺 (30 μg)、万古霉素 (30 μg) 和头孢哌酮/舒巴坦 (105 μg) 药敏纸片, 根据 2004 年 NCCL 提供的标准判读结果^[1]。

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件, 应用 χ^2 检验计算概率 *P* 值, *P* < 0.05 表示差异有显著性。

结 果

MRSA 检测结果 对 *MecA* 和 *FemA* 基因的联合检测结果显示, 140 株 SA 均可检测到 *FemA* 基因, 对苯唑西林和头孢西丁均耐药的 89 株 SA (63.57%, 89/140) 均可检测到 *MecA* 基因, 而仅对苯唑西林耐药的 1 株 SA 和中介的 1 株 SA 均未检测到 *MecA* 基因。以检出 MRSA 耐药基因 *MecA* 基因为金标准, 比较苯唑西林和头孢西丁纸片法检测 MRSA 的结果显示, 苯唑西林纸片法的敏感性为 100.00%,

特异性为 98.04%；头孢西丁纸片法的敏感性和特异性均为 100%；两种方法差异无显著性 ($\chi^2 = 0.02$, $P = 0.99$)。临床分离株和环境分离株中的 MRSA 检出率分别为 64.55% (71/110) 和 60.00% (18/30)，两者相比差异无显著性 ($\chi^2 = 0.210$, $P = 0.647$)。

临床标本中 MRSA 检出情况：临床标本中共检出 71 株 MRSA，其中 33 株 (46.5%) 来自痰，25 株

(35.2%) 来自创面分泌物，6 株 (8.5%) 来自引流穿刺液，5 株 (7.0%) 来自血液，1 株 (1.4%) 来自尿液，1 株 (1.4%) 来自粪便。

环境标本中 MRSA 检出情况：环境标本中共检出 18 株 MRSA，其中 13 株来自医疗环境，5 株来自工作人员手（表 1）。

表 1 环境标本来源及分离率

Table 1 Specimen sources and isolation rates of *Staphylococcus aureus*

标本来源 Isolating place of specimens	n	MSSA	MRSA	合计 Total
床架 Bedframe	20	20.00% (4/20)	30.00% (6/20)	50.00% (10/20)
陪护手 Hands of accompany's personnel	19	5.26% (1/19)	21.05% (4/19)	26.31% (5/19)
床头柜 Bedside commode	11	27.27% (3/11)	36.36% (4/11)	63.64% (7/11)
护士手 Hands of nurse	30	0 (0)	3.33% (1/30)	3.33% (1/30)
门把手 Door knob	9	11.11% (1/9)	11.11% (1/9)	22.22% (2/9)
监护仪 Invigilator	5	0 (0)	20.00% (1/5)	20.00% (1/5)
病历夹 Chart file	12	8.33% (1/12)	8.33% (1/12)	16.67% (2/12)
空气 Air	32	6.25% (2/32)	0 (0)	6.25% (2/32)
医生手 Hands of doctor	9	0 (0)	0 (0)	0 (0)
办公桌 Desk	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)
导管、吸痰瓶 Catheter, aspiration sputum bottle	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)
其他 Others	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)
合计 Total	160	7.50% (12/160)	11.25% (18/160)	18.75% (30/160)

MSSA：甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌；MRSA：耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

MSSA：methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*；MRSA：methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MRSA β-内酰胺酶检测结果 89 株 MRSA 中，有 85 株 (95.50%) 可检出 β-内酰胺酶，其中 18 株环境 MRSA 均可检出 β-内酰胺酶，而 71 株临床 MRSA 的 β-内酰胺酶产酶率为 95.77% (68/71)。

MRSA 和 MSSA 药敏结果 89 株 MRSA 对青霉素、头孢唑林和加替沙星完全耐药，对亚胺培南、克林霉素、红霉素、泰利霉素、头孢哌酮/舒巴坦和阿米卡星的耐药率均在 90% 以上，对利福平耐药率

为 60.67%，对奎奴普丁/达福普汀的耐药率为 4.49%，对替考拉宁的耐药率为 0，未发现对利奈唑胺和万古霉素的耐药菌株。51 株 MSSA 只有对青霉素的耐药率在 90% 以上。MRSA 与 MSSA 对青霉素、奎奴普丁/达福普汀、替考拉宁、利奈唑胺和万古霉素的药物敏感性差异无显著性 ($P > 0.05$)，对其他 9 种抗菌药物的耐药率 MSSA 要明显低于 MRSA ($P = 0.00$)（表 2）。

表 2 89 株 MRSA 和 51 株 MSSA 对 14 种抗菌药物敏感性检测结果比较

Table 2 Comparison of 14 antibiotics sensitivity test among 89 MRSA and 51 MSSA

药敏纸片 Discs	MRSA (%)			MSSA (%)			χ^2	P
	耐药 Resistant	中介 Intermediate	敏感 Sensitive	耐药 Resistant	中介 Intermediate	敏感 Sensitive		
青霉素 Penicillin	100.00	0	0	98.04	0	1.96	1.76	0.19
头孢唑林 Cefazolin	100.00	0	0	0	0	100.00	140.00	0.00
加替沙星 Gatifloxacin	100.00	0	0	5.88	21.57	72.55	127.47	0.00
亚胺培南 Imipenem	98.88	1.12	0	0	0	100.00	140.00	0.00
克林霉素 Clindamycin	98.88	1.12	0	41.18	31.37	27.45	62.73	0.00
红霉素 Erythromycin	97.75	2.25	0	66.67	23.53	9.80	27.04	0.00
泰利霉素 Telithromycin	93.26	6.74	0	3.92	5.88	90.20	122.93	0.00
头孢哌酮/舒巴坦 Cefoperazone/Sulbactam	93.26	1.12	5.62	1.96	66.67	31.37	115.09	0.00
阿米卡星 Amikacin	91.01	3.37	5.62	1.96	5.88	92.16	109.74	0.00

(续表)

药敏纸片 Discs	MRSA (%)			MSSA (%)			χ^2	P
	耐药 Resistant	中介 Intermediate	敏感 Sensitive	耐药 Resistant	中介 Intermediate	敏感 Sensitive		
利福平 Rifampicin	60.67	2.25	30.08	13.73	7.84	78.43	43.94	0.00
奎奴普丁/达福普汀 Quinupristin/Dalfopristin	4.49	5.62	89.89	0	7.84	92.16	2.56	0.28
替考拉宁 Teicoplanin	0	2.25	97.75	0	0	100.00	1.16	0.28
利奈唑胺 Linezolid	0	0	100.00	0	0	100.00	-	-
万古霉素 Vancomycin	0	0	100.00	0	0	100.00	-	-

71 株临床 MRSA 和 18 株环境 MRSA 对 14 种抗菌药物敏感性的检测结果显示，两者均表现出多重

耐药性，差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 71 株临床 MRSA 和 18 株环境 MRSA 对 14 种抗菌药物敏感性检测结果比较

Table 3 Comparison of 14 antibiotics sensitivity test among 71 clinical MRSA and 18 environment MRSA

药敏纸片 Discs	临床株 Clinical strains (%)			环境株 Enviroment strains (%)			χ^2	P
	耐药 Resistant	中介 Intermediate	敏感 Sensitive	耐药 Resistant	中介 Intermediate	敏感 Sensitive		
青霉素 Penicillin	100.00	0	0	100.00	0	0	-	-
头孢唑林 Cefazolin	100.00	0	0	100.00	0	0	-	-
加替沙星 Gatifloxacin	100.00	0	0	100.00	0	0	-	-
亚胺培南 Imipenem	98.59	1.41	0	100.00	0	0	0.26	0.61
克林霉素 Clindamycin	98.59	1.41	0	100.00	0	0	0.26	0.61
红霉素 Erythromycin	97.18	2.82	0	100.00	0	0	0.52	0.47
泰利霉素 Telithromycin	92.96	7.04	0	94.44	5.56	0	0.05	0.82
头孢哌酮/舒巴坦 Cefoperazone/Sulbactam	95.77	1.41	2.82	83.33	0	16.67	5.40	0.07
阿米卡星 Amikacin	90.14	4.23	5.54	94.44	0	5.56	0.79	0.67
利福平 Rifampicin	73.24	2.82	23.94	72.22	0	27.78	0.59	0.74
奎奴普丁/达福普汀 Quinupristin/Dalfopristin	5.63	5.63	88.74	0	5.56	94.44	1.07	0.59
替考拉宁 Teicoplanin	0	2.82	97.18	0	0	100.00	0.52	0.47
利奈唑胺 Linezolid	0	0	100.00	0	0	100.00	-	-
万古霉素 Vancomycin	0	0	100.00	0	0	100.00	-	-

讨 论

FemA 基因是 SA 独有的基因，也是 MRSA 的辅助耐药基因^[5]，检测 *FemA* 基因可以区分 SA 与其他凝固酶阴性葡萄球菌。*MecA* 基因编码可产生一种特殊的青霉素结合蛋白 (penicillin-binding protein, PBP) 2a，MRSA 的耐药性在于 PBP2a 与 β -内酰胺类抗生素结合能力很低，但具有正常 PBP 的活性，用 PCR 扩增 SA 的 *MecA* 基因能特异性检测出 MRSA。本研究采用 PCR 方法，检测了湖南省 4 家综合医院分离出的 140 株 SA 中 *FemA* 和 *MecA* 基因的表达情况。结果显示，140 株 SA 均可检测到 *FemA* 基因，仅有 89 株 SA 检测到 *MecA* 基因，即 MRSA 检出率为 63.57%，高于国外研究 (0.5% ~ 60%)^[6-7]，也高于 2002 ~ 2003 年中国细菌耐药监测研究组对 14 个

城市的 MRSA 调查结果 (41.0%)^[8]，仅低于朱德妹等^[9]对上海地区的调查结果 (63.9%)。

苯唑西林和头孢西丁纸片法均可快速准确检测出 MRSA。其中，头孢西丁纸片法特异性更高，可避免假阳性结果。此外，由于头孢西丁可诱导 *MecA* 基因表达，因此具有更高的敏感性，因此美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐使用头孢西丁药敏纸片法检测 MRSA^[1]。本研究以检出 *MecA* 基因为金标准对两种纸片法进行了比较，结果显示苯唑西林纸片法的敏感性为 100.00%，特异性为 98.04%，头孢西丁纸片法的敏感性和特异性均为 100%，两种方法差异无显著性。推测其原因可能为本研究所收集 MRSA 菌株均能很好的表达 *MecA* 基因，故两种方法均表现出很高的敏感性。

已知 MRSA 对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要原

因为：(1) 染色体上 *MecA* 基因编码产生 PBP2a^[10]；(2) 产生由外源性质粒 DNA 转化、转导等介导产生的 β -内酰胺酶，对部分 β -内酰胺类抗生素耐药。本研究共检测到 89 株 MRSA，其中 85 株可产生 β -内酰胺酶，产酶率达 95.51%。对 14 种抗菌药物的敏感性检测结果显示，89 株 MRSA 对青霉素、头孢唑林和加替沙星完全耐药，对亚胺培南、克林霉素、红霉素、泰利霉素、头孢哌酮/舒巴坦和阿米卡星的耐药率均在 90% 以上，对利福平耐药率为 60.67%，对奎奴普丁/达福普汀的耐药率为 4.49%，对替考拉宁的耐药率为 0，未发现对利奈唑胺和万古霉素的耐药菌株。提示本组 MRSA 几乎对所有 β -内酰胺类抗生素都耐药（CLSI 指出即使药敏实验敏感也要报告耐药），对喹诺酮类、氨基苷类和大环内酯类等多种抗菌药物也耐药，而对替考拉宁及奎奴普丁/达福普汀则显示了较高的敏感性，对万古霉素和利奈唑胺的敏感率则为 100%。

目前对 MRSA 的治疗主要依赖于万古霉素等糖肽类抗生素，但随着万古霉素在临床上的广泛应用，逐渐导致了耐万古霉素金黄色葡萄球菌（vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA）的出现，自 2002 年美国疾病预防控制中心报道第 1 例 VRSA 感染病例，VRSA 不断被检测出，2008 年印度又报道了 1 例 VRSA 感染^[11]。利奈唑胺是第 1 个用于临床的新型恶唑烷酮类抗菌药，对 MRSA 等革兰阳性细菌具有很强的抑制作用，尚未发现与其他抗菌药物交叉耐药。奎奴普丁/达福普汀属链阳菌素类药物，是奎奴普丁与达福普汀以 3:7 比例混合而成，两种药物具有协同抗菌作用，其抗菌活性为单药的 8~16 倍，对 MRSA 具有良好的抗菌效果，但奎奴普丁/达福普汀在我国尚未进入临床使用，本研究有 4 株 MRSA 对奎奴普丁/达福普汀耐药，其原因尚不明确。国外曾有报道在链阳菌素类药物上市前即在肉食品中检测出对其耐药的肠球菌，推测与类似药物用于动物饲料添加剂有关^[12]。

本研究中，医院环境来源的 MRSA 菌株主要来自与感染患者密切接触的物品，如床头柜等，患者陪护人员手 MRSA 的检出率也较高，提示其可能为患者与医院环境间 MRSA 传播的桥梁，而护士和医师手 MRSA 检出率相对较低，推测可能与在医护人员中加强手卫生有重要关系。此外本研究还发现，临床分离株和环境分离株的 MRSA 检出率差异无显著性，来自两者的 MRSA 对 14 种抗菌药物的耐药性差异也均无显著性，都表现出多重耐药。提示本研

究中环境 MRSA 与临床 MRSA 可能具有同源性，推測除本身耐药基因外，两者还携带了同样的其他耐药基因或质粒，因而在对药物敏感性上出现了相似的药敏谱。因此应重视 MRSA 感染者与污染环境、一般患者与未污染环境间的交叉感染、定植、污染，切实做好消毒隔离。

参 考 文 献

- [1] National Committee of Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fourteenth informational supplement [S]. Pennsylvania: NCCLS, 2004.
- [2] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 2-137.
- [3] Vannuffel P, Laterre PF, Bouyer M, et al. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant staphylococcus aureus in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients [J]. J Clin Microbiol, 1998, (36)8: 2366-2368.
- [4] Pascal V, Jacques G, Houda E, et al. Specific detection of methicillin-resistant staphylococcus species by multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(11):2864-2867.
- [5] 张怡滨, 宋诗铎. 基因 FemA 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌不均一耐药性的关系 [J]. 国外医药抗生素分册, 2000, 21(3):123-125.
- [6] Sabine P, Klaus O, Constanze W. Longitudinal study of the molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(12):4297-4302.
- [7] CDC NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004 [J]. Am J Infect Control, 2004, 32(8):470-485.
- [8] 李家泰, 齐慧敏, 李耘代表中国细菌耐药监测研究组. 2002-2003 年中国医院和社区获得性感染革兰阳性细菌耐药监测研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3): 254-265.
- [9] 朱德妹, 汪复, 张婴元. 2004 年上海地区细菌耐药性监测 [J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(4):195-200.
- [10] Louie L, Matsumura SO, Choi E, et al. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2170-2173.
- [11] Saha B, Singh AK, Ghosh A, et al. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

- isolated from Kolkata (South Asia) [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(1): 72-79.
- [12] McDonald LC, Rossiter S, Mackinson C, *et al.* Quinupristin-dalfopristin-resistant enterococcus faecium on chicken and in human stool specimens [J]. N Engl J Med, 2001, 345(16):1155- 1160.

(2008-07-24 收稿)