

耐喹诺酮类药物金黄色葡萄球菌研究进展

Advances in quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*

梁建生(LIANG Jian-sheng), 王斌(WANG Bin), 江元山(JIANG Yuan-shan) 综述 周旺(ZHOU Wang) 审校

(武汉市疾病预防控制中心, 湖北 武汉 430015)

(Wuhan Center for Disease Prevention and Control, Wuhan 430015, China)

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 喹诺酮类药物; 抗药性; 微生物; 流行病学; 感染控制

[中图分类号] R378.1⁺1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2012)02-0154-04

自 1962 年人工成功合成了以萘啶酸为代表的第一代喹诺酮类(quinolones)药物至今, 已发展到第四代, 其中第三、四代又称为氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQNs), 因其抗菌谱广、抗菌作用强和耐受性好而广泛用于各种感染的治疗。然而, 随着喹诺酮类药物的频繁使用, 其耐药程度也日趋严重。本文主要针对临床分离的耐喹诺酮类药物金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)的流行病学、耐药机制、耐药检测方法与控制对策研究方面作一综述, 为该类细菌耐药性的预防与感染控制提供参考。

1 流行病学研究

1.1 耐药现状 据卫生部全国细菌耐药性监测网(Mohnarlin)报道^[1], 在对国内 84 所三级甲等医院 2006—2007 年度临床分离的革兰阳性(G⁺)菌进行耐药监测的结果显示, 金葡菌占有监测细菌的 29.2%(8 382/28 741), 其中金葡菌对喹诺酮类药物中的左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率分别为 58.1%(2 640/4 544)和 59.2%(1 931/3 262), 其耐药程度之高, 次于大环内酯类、林可霉素类、头孢菌素类以及青霉素类药物, 排名第 5 位。喹诺酮类抗菌药物进入我国仅 20 多年, 细菌对其的总耐药率已达 60%~70%, 居全球首位^[2]。刘诗强等^[3]应用随机扩增 DNA 多态性分型(RAPD)技术对临床分离的 21 株金葡菌进行分型研究, 结果发现其中 I 型金葡菌是医院感染的主要流行株, 且对喹诺酮类耐

药。我国耐甲氧西林金葡菌(MRSA)对环丙沙星的耐药率, 各地均在 50% 以上。2009 年中国细菌耐药监测网(CHINET)监测结果表明^[4], MRSA 对喹诺酮类等抗菌药物的耐药率显著高于甲氧西林敏感株(MSSA 及 MSCNS), 金葡菌尤其是 MRSA 呈现明显的多重耐药性以及在喹诺酮类药物之间存在明显的交叉耐药性。

国外曾有学者报道^[5], 美国 G⁺ 菌感染增长迅速。在美国, 大约 25% 的菌血症是由金葡菌引起, 金葡菌对环丙沙星的耐药率从 1989 年的 2.9% 上升至 1997 年的 23.1%^[6]。根据美罗培南年度监测项目(MYSTIC)的报道^[7], 世界各地共 100 多家医学中心的检测数据显示 2008 年金葡菌对左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率分别为 10.1% 和 11.0%。

1.2 耐药产生原因与传播途径 喹诺酮类药物耐药菌的来源通常有医源性、动物源性和食源性。抗菌药物在临床治疗过程中的过度和不规范使用均助长了耐药菌的产生。即使在正常使用条件下, 当患者接受一定时间的抗菌药物治疗后也有可能产生耐药菌, 但这些耐药菌通常会在抗菌药物停止使用后被敏感菌株所稀释。另外, 由于喹诺酮类药物在动物疾病治疗和预防中的广泛应用, 甚至在动物饲料中的过量添加, 动物源性和食源性的细菌也成为喹诺酮类耐药菌的主要来源。不同研究者均从动物源性食品中分离出对喹诺酮类药物耐药的细菌^[8]。

细菌的耐药性可以是先天固有的或基因突变产生的, 但引起耐药菌的流行和传播主要是外源性获

[收稿日期] 2011-08-22

[作者简介] 梁建生(1962-), 男(汉族), 湖北省武汉市人, 主任医师, 主要从事医院感染管理研究。

[通讯作者] 梁建生 E-mail: wh-ljs@sohu.com

得。细菌耐药性可藉质粒、转座子在细菌之间传播,耐药菌又可通过手及物品在人与人之间传播。有研究者在医院消毒洗手后的医护人员手部检出了耐喹诺酮类药物金葡菌^[9]。

2 耐药机制

2.1 药物作用机制 研究^[10]认为,FQNs 在细菌体内能够选择性地抑制在 DNA 合成中起作用的 II 型拓扑异构酶;对金葡菌发挥抗菌作用的靶酶是 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV,前者由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码,后者由 *griA* 和 *griB* 基因编码。耐药基因 *gyrA* 和 *gyrB* 的序列分析结果表明^[11-12],对不同 FQNs 耐药金葡菌的 *gyrA* 基因序列发生突变,而金葡菌的 *gyrB* 基因序列未发生突变,由于这些基因的突变导致其编码亚基上 FQNs 耐药决定区域(quinolone resistance-determining regions,QRDRs)改变,从而引起酶结构的改变而使酶产生空间上的障碍,或者引起其物理、化学变化,干扰 FQNs-DNA-酶的相互作用,进而使金葡菌逃逸 FQNs 的杀灭。

2.2 药物靶酶及编码基因的突变 当细菌 II 型拓扑异构酶发生变异时,喹诺酮类药物对靶酶的亲和力可降低,致抑/杀菌作用也降低,从而出现耐药性。有数据显示^[13],金葡菌 GyrA 的突变,其 Ser84、Ser85、Glu88 位点突变与喹诺酮类药物耐药有关,其中又以 Ser84 最为多见。然而,单一 GyrA 突变不会导致喹诺酮类耐药,必须是细菌拓扑异构酶 IV-DNA 复合体发生突变,即组成拓扑异构酶 IV 的 GriA、GriB 氨基酸发生突变。研究证实^[13-14],单一 GriA 突变时会产生萘啶酸耐药,并对喹诺酮类药物敏感性降低;DNA 旋转酶基因和拓扑异构酶 IV 基因同时发生突变,以及 GriA 突变的累积或合并 GyrA 突变会导致其高水平耐药;ParC 突变仅引起对 FQNs 低水平耐药,只有与 GyrA 共同突变时才产生高水平耐药。由此而知,细菌 GyrA 突变是其耐喹诺酮类药物的主要机制。

2.3 药物在细菌体内蓄积量减少

2.3.1 NorA 外排泵介导的耐药 NorA 是多重外排蛋白,能够将 FQNs 以及其他结构不相关的化合物运出胞外。与其他耐药基因编码的泵出蛋白不同,NorA 是内源性的,在 FQNs 敏感菌株及耐药菌株均有表达。菌株对抗菌药物耐药是因为 *norA* 启动子的突变,增强了 NorA 蛋白表达,从而将更多的

FQNs 泵出菌外^[12]。NorA 蛋白对亲水性的 FQNs,如环丙沙星和诺氟沙星具有偏嗜性^[15]。

2.3.2 NorB 外排泵介导的耐药 NorB 外排泵结构与 NorA 外排泵有 30% 相似,当一种 *mgrA* 基因突变体的耐药表型过度表达时,*norB* 基因会导致金葡菌对亲水类 FQNs 耐药性增加;Truong-Bolduc 等^[16]研究发现,*norB* 基因的过度表达会导致金葡菌对 NorA 作用底物产生一定程度耐药。

2.3.3 NorC 外排泵介导的耐药 NorC 外排泵也是一种受 *mgrA* 基因负性调控的金葡菌外排泵。介导其外排作用的 NorC 蛋白有 61% 的氨基酸与 NorB 蛋白一致,Truong-Bolduc 等^[16]实验证实,当 *mgrA* 发生突变时,*norC* 基因上游的启动子 PnorC 催化活性增加,*norC* 基因表达增加,其过度表达亦会导致喹诺酮类药物的低水平耐药^[17]。

2.4 质粒介导的金葡菌对喹诺酮类耐药 1998 年 Martinez 等在美国发现了 pMG252 质粒,此质粒经接合传递后,其接合子对环丙沙星的耐药性增加,并且易选择出喹诺酮耐药的突变株,表明新的喹诺酮耐药机制的出现。研究^[18]发现介导这一耐药过程的是质粒上 *qnr* 基因编码的 Qnr 蛋白。*qnr* 基因的存在可使菌株对喹诺酮药物的敏感性降低,仅仅导致低水平的喹诺酮耐药。

2.5 关于药物交叉耐药或金葡菌多重耐药的机制 喹诺酮类药物存在相似的化学结构和抗菌机制,所以存在交叉耐药性的可能。国内外文献相继报道了对于环丙沙星耐药的菌株也耐左氧氟沙星。研究^[19]发现,耐药株 *gyrA* 和 *parC* 基因编码的氨基酸序列均发生了突变,细菌细胞膜上外排泵的表达水平不断提高,能主动将扩散入细菌细胞内的药物或其他底物泵出细胞外,这是形成细菌多重耐药性的主要原因。

3 耐药检测方法研究

近年来,自动化分析是临床微生物学实验,包括体外药物敏感试验的发展方向。最具代表性的是 VITEK-AMS 微生物自动分析系统,可同时完成细菌鉴定和药敏试验,此方法的优点是简便、快速、鉴定范围广,受人为的影响小,可靠性高^[20]。

越来越多的研究利用各种分子生物学技术进行耐药性检测,其中一些方法是利用耐药基因进行细菌耐药性分析,与传统的药敏试验方法比较,有可能提供更加快速、可靠的检测结果。在临床药敏试验

中,通过检测 *mecA* 基因的有无来确定葡萄球菌属是否为 MRSA 或者 MRCNS 菌株已经成为临床检验中的“金标准”方法。另外,实时荧光聚合酶链反应(PCR)技术也已应用于临床菌株的检测中^[20]。有研究^[21]报道,利用 TaqMan 技术进行的实时荧光定量 PCR,由于其为封闭式检测、自动化程度高、通量大、特异性更强以及具有实时检测的优点,已成为目的核酸定量及定性检测的一种重要手段。还有研究^[22]利用基因芯片检测临床金葡菌中存在的多种 MLSB 耐药相关基因。

4 对策研究

4.1 政策支持方面 在全球,世界卫生组织(WHO)制定了《WHO 遏制食用动物中细菌耐药性的全球基本原则》(2000 年)、《遏制细菌耐药性出现和蔓延的全球战略》(2001 年)。在我国,2004 年颁布了《抗菌药物临床应用指导原则》;近年来,国家卫生、农业、药监等部门还针对加强抗菌药物临床应用管理以及动物源性、食源性细菌耐药性管理与监测,出台了一系列相关规定与要求,对我国当前合理使用抗菌药物、遏制细菌耐药性的出现和发展起到了积极的作用。

4.2 新喹诺酮类药物的研制与开发 为克服耐药性问题,人们一直在寻找、研究与开发新的喹诺酮类药物。有报道^[23],几种非 FQNs,如金葡菌对 6-去氟-8-甲基喹诺酮的耐药有明显改善作用,对 MRSA 等 G⁺ 菌的活性优于左氧氟沙星和曲伐沙星。其他新开发的非氟喹诺酮化合物,如 PGE-926293 和 2-吡酮类(2-Pyridone)化合物(如 ABT-719),均对 MRSA、耐环丙沙星的金葡菌等有很强活性^[24]。

据报道^[25],现在喹诺酮类药物已经发展到第五代,由日本医药学家于 2002 年研究合成的 LM. K,其抗菌作用是同类抗菌药物的几十倍,尚处于人用药的试用时期,兽药上应用较少。

4.3 外排泵抑制剂的研究与应用 研究和开发外排泵抑制剂是一条解决细菌多药耐药性的重要途径。如利血平有竞争性抑制 NorA 外排泵的作用,因对人体所需要的抑制活性浓度可导致神经毒性,故目前未能直接用于临床治疗;维拉帕米虽在与外排泵作用时有相应的结合位点,但目前也未见有临床研究的报道^[26]。

4.4 联合用药与合理用药 有报道^[23],喹诺酮类药物与 β -内酰胺类或氨基糖苷类抗生素联用,在体

外通常呈相加或协同作用,因此联合用药可抑制细菌对喹诺酮类药物产生耐药性。在合理用药方面^[2],美国 CDC 在预防细菌耐药性上采取了“限制抗菌药物应用”、“根据培养及药敏结果进行针对性病原治疗”、“药品替换或更改”、“各科室药物应用评估”、“感染治愈后停药”、“培养阴性而且感染可能性不大时停药”、“未诊断为感染时不应用抗菌药物”等措施,取得了良好效果,值得我们借鉴。细菌反复与亚致死量的抗菌药物接触是导致耐药的最危险因素,因此在临床给药时应选择使药物最短的亚致死量时间。

4.5 手卫生管理 加强手卫生管理是降低医院感染最可行、最重要的措施。2002 年,美国 CDC 颁布了《医疗机构手卫生指南》,我国卫生部 2009 年颁布了《医务人员手卫生规范》行业标准,使手卫生的执行有了相应的法规要求。病区应完善洗手设施,如洗手池、洗手液或快速手消毒液、干手设备等,可提高医务人员洗手的依从性,有效地控制耐药株交叉感染,降低患者的临床感染风险。在管理层面,医疗机构中医院感染管理科的设置与手卫生的执行率有很大关系。有研究^[27]表明,连续 3 个月的培训、实地指导,医务人员手卫生的执行率可从 50% 上升到 90%。

4.6 细菌耐药监测网的建立与实验室内质控 欧盟、美国、日本、澳大利亚等均建立有食品、动物耐药菌及抗菌药物使用量的监测网,并开展了人类健康与公共卫生影响的相关监测和评估。近年来,亚太地区各国现有的 15 个监测网主要是监测临床常规标本和临床分离菌株。目前,我国主要建立有卫生部全国细菌耐药性监测网(Mohnarin)、国家抗生素细菌耐药性监测中心和中国细菌耐药监测网(CHINET)等耐药监测网络,每年均组织开展了常用抗菌药物细菌耐药监测及相关实验室室间质控评价活动。

4.7 其他相关研究 积极开发防细菌耐药的抗非抗菌药物,包括疫苗。促进新的特异性强的疫苗开发,是预防疾病发生,减少抗菌药物使用,从根本上解决细菌耐药问题的最后途径。一个较好的实例就是对抗耐受青霉素的纯系肺炎球菌属疫苗的研制开发^[28]。

[参考文献]

- [1] 王进,肖永红. Mohnarin 2006—2007 年度报告:革兰阳性菌耐药监测结果[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(10): 592-596.

- [2] 梁德雄. 抗生素的“囚徒困境”——谈美国 CDC 预防细菌耐药性的关键策略[J]. 抗感染药理学, 2007, 4(1): 1-4.
- [3] 刘诗强, 朱学源, 陈旭, 等. 医院感染金黄色葡萄球菌的流行与耐药机制[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(11): 1204-1206.
- [4] 汪复, 朱德妹, 胡付品, 等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5): 325-334.
- [5] Martin G S, Mannino D M, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000[J]. N Engl J Med, 2003, 348(1): 1546-1554.
- [6] Spencer R C. Bacteremia caused by multi-resistant gram-positive microorganisms[J]. Clin Microbiol Infect, 1999, 5(1): 17-28.
- [7] Rhomberg P R, Jones R N. Summary trends for the meropenem yearly susceptibility test information collection program; a 10-year experience in the United State(1999-2008)[J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2009, 65(4): 414-426.
- [8] 崔生辉, 李景云, 马越. 细菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制[J]. 中国药房, 2007, 18(2): 148-150.
- [9] 黄雪珍. 医护人员手金黄色葡萄球菌带菌状况及耐药性分析[J]. 现代预防医学, 2006, 33(8): 1465-1466.
- [10] Cheng J, Thanassi J A, Thoma C L, et al. Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV; Target interactions of heteroaryl isothiazolones in *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(7): 2445.
- [11] 杜锐, 韩文瑜, 雷连成. 金黄色葡萄球菌氟喹诺酮的耐药性与 gyrA, gyrB 突变的关系研究[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(4): 416-418.
- [12] 黄革. 金黄色葡萄球菌抗菌药物耐药分子机制的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(8): 873-876.
- [13] 潘晓娟, 唐英春. 喹诺酮类抗菌药耐药机制研究进展[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(3): 187-191.
- [14] 林居纯, 曾振灵. 氟喹诺酮类药物(FQs)耐药性产生的分子机制[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(9): 41-45.
- [15] DeMarco C E, Cushing L A, Frempong-Manso E, et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in blood-stream isolates of *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(9): 3235-3239.
- [16] Truong-Bolduc Q C, Dunman P M, Strahilevitz J, et al. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*[J]. J Bacteriol, 2005, 187(7): 2395-2405.
- [17] Truong-Bolduc Q C, Strahilevitz J, Hooper D C. NorC, a new efflux-pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(3): 110.
- [18] 陈文标. 细菌对喹诺酮类药物耐药机制的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(3): 200-201.
- [19] 王德智, 张秀英. 氟喹诺酮类药物的研究近况[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007, (4): 4-5.
- [20] 杨华为, 蒋迪, 王璨, 等. 细菌鉴定和耐药性检测方法的发展[J]. 临床药物治疗杂志, 2006, 4(4): 39-44.
- [21] 张行, 叶景佳, 魏群, 等. 利用 TaqMan 技术定量检测基因表达的引物探针设计[J]. 全科医学临床与教育, 2007, 5(6): 468-471.
- [22] Volokhov V, Chizhikov K, Chumakov A, et al. Microarray analysis of erythromycin resistance determinants[J]. J Appl Microbiol, 2003, 95(4): 787-798.
- [23] 范柏. 喹诺酮类抗菌药的作用机制及细菌耐药性的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 2004, 25(1): 27-29.
- [24] 张致平. 抗菌药物研究进展[J]. 中国处方药, 2006, 12(5): 20-24.
- [25] 胡本嵩. 第五代喹诺酮类药物——LM-K[J]. 兽药市场指南, 2008, (2): 18.
- [26] 刘忆霜, 肖春玲. 细菌多重耐药外排泵抑制剂研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(4): 211-216.
- [27] 李月玲. 我国医务人员手卫生的影响因素及对策[J]. 护理学报, 2007, 14(8): 20-22.
- [28] 尹军霞, 林德荣. 细菌耐药的机理及抗耐药菌药物的开发[J]. 绍兴文理学院学报(自然科学版), 2004, 24(8): 52-55.

(上接第 153 页)

不需要特殊仪器设备, 只需要增加一块平皿, 改变一下相关药敏纸片的位置, 就可以同时检测 AmpC 酶和 ESBLs, 操作简便, 成本低廉, 适宜于基层实验室推广。

对微生物检验标本的采集, 应严格执行无菌技术操作, 特别是血培养等需要增菌的无菌标本的采集, 要严格按照规范要求, 否则难以判断是病原菌还是污染菌。本病例标本采集虽然及时, 但第 1 次采集标本, 临床应用单瓶采血, 出现阳性结果且不纯后无法判断是感染菌还是污染菌, 只能重新采集标本, 这样不但没有给患者节约医疗费用, 反而增加了医疗费用, 更严重的是延缓了结果报告时间, 耽误诊断、治疗机会。因此, 应该重视检验前质量控制, 严格按照要求采集检验标本。

[参 考 文 献]

- [1] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 801-812.
- [2] 陈岩勤, 顾国浩, 张险锋, 等. 改良的纸片表型筛选法用于 AmpC 酶的检测[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(3): 202-203.
- [3] 张秀珍, 朱德妹. 临床微生物检验问与答[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 34.
- [4] 肖永红. 2008 年度细菌耐药检测结果汇报[G]//细菌耐药检测技术研讨会. 杭州, 2010: 18.
- [5] 沈定霞, 罗燕萍, 曹敬荣, 等. 肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌 AmpC β 内酰胺酶的表型检测[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(1): 4-6.
- [6] 严子禾, 吴风, 胡锡池, 等. 双纸片氯唑西林增效试验检测高产 AmpC 酶的大肠埃希菌和克雷伯菌[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(6): 450-451.