

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20222087

综述·多重耐药菌专题

## 金黄色葡萄球菌异质性耐药机制及实验室检测技术

韩塔拉<sup>1</sup>, 王俊瑞<sup>2,3</sup>

(1. 内蒙古医科大学第一临床医学院, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 3. 内蒙古自治区临床病原微生物重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010050)

**[摘要]** 异质性耐药是一种特殊的细菌耐药类型, 常表现为同一克隆来源的不同细菌亚群对某种抗菌药物表现出不一致的耐药特征, 大多数亚群对某种抗菌药物敏感, 而少部分亚群对其耐药或高度耐药。异质性耐药分离株常会导致特定抗菌药物抗感染治疗失败。针对异质性耐药菌较为深入的研究主要集中于革兰阴性菌, 革兰阳性球菌的相关报道较少。近年有研究报道万古霉素、利奈唑胺、苯唑西林等多种类型抗菌药物异质性耐药金黄色葡萄球菌分离株出现, 但其实际临床意义尚待进一步评估。此文对金黄色葡萄球菌异质性耐药机制和检测技术最新进展进行综述, 为细菌异质性耐药机制研究和新型检测技术研发提供新的思路。

**[关键词]** 葡萄球菌; 金黄色葡萄球菌; 异质性耐药; 耐药机制; 检测技术

**[中图分类号]** R446. 5

### Mechanisms and laboratory detection technologies of heteroresistance in *Staphylococcus aureus*

HAN Ta-la<sup>1</sup>, WANG Jun-rui<sup>2,3</sup> (1. The First Clinical Medical College of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; 3. Inner Mongolian Key Laboratory of Clinical Pathogenic Microbiology, Hohhot 010050, China)

**[Abstract]** Heteroresistance is a special type of drug resistance of bacteria, which is often characterized by different bacterial subpopulations from the same clone presenting inconsistent drug resistance to certain antimicrobial agents. Most subpopulations are sensitive to a certain type of antimicrobial agent, while a small number of the subpopulations are resistant or highly resistant to it. Heteroresistance isolates often lead to the failure of anti-infection treatment of specific antimicrobial agents. Studies on heteroresistant bacteria are mainly focused on Gram-negative bacteria, while reports on Gram-positive cocci are rare. In recent years, studies have reported the emergence of *Staphylococcus aureus* isolates with heteroresistance to vancomycin, linezolid, oxacillin and other types of antimicrobial drugs, but its practical clinical significance remains to be further evaluated. In this paper, the latest advances in the mechanisms and detection technologies of *Staphylococcus aureus* heteroresistance were reviewed to provide new ideas for the research of bacterial heteroresistance mechanism and the development of novel detection technologies.

**[Key words]** *Staphylococcus*; *Staphylococcus aureus*; heteroresistance; drug resistance mechanism; detection technology

[收稿日期] 2022-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260244, 81660352); 内蒙古自然科学基金项目(2020MS08110); 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(202201306)

[作者简介] 韩塔拉(1989-), 男(蒙古族), 内蒙古通辽市人, 主管检验师, 主要从事金黄色葡萄球菌莫匹罗星异质性耐药机制及实验室检测技术研究。

[通信作者] 王俊瑞 E-mail: wangjunrui123@yeah.net

异质性耐药被发现广泛存在于各种属细菌中,以革兰阴性菌(如肠杆菌目细菌、不动杆菌属细菌、假单胞菌属细菌等)的研究报道最多。由于实验室检测技术方法的限制、不同研究对异质性耐药定义标准的不统一、异质性耐药机制多样性等原因,异质性耐药对临床治疗的实际影响尚缺乏充分有效的研究数据支持。目前关于金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)异质性耐药的研究主要针对万古霉素,对其他类型抗菌药物异质性耐药机制的报道仍较少。有研究发现一种具有特殊耐药表型的金黄色葡萄球菌(oxacillin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 苯唑西林敏感 MRSA, OS-MRSA),其对苯唑西林呈现出广泛的异质性耐药特征<sup>[1]</sup>,而目前实验室常规检测技术不能准确鉴别,容易被误认为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)而延误抗感染治疗,甚至导致患者死亡<sup>[2]</sup>。因此,本文将从异质性耐药的定义、影响因素、金黄色葡萄球菌对不同种类抗菌药物的异质性耐药机制及实验室检测技术等几个方面进行综述,更好地认知其发生机制及潜在临床意义。

## 1 异质性耐药定义及影响因素

异质性耐药被认为是细菌耐药性进化过程中的一个中间过程,机制复杂,其定义尚无统一标准。现通常以 El-Halfawy 等<sup>[3]</sup>定义的标准作为参考,即测试菌株可分离出几种具有不同耐药程度的细菌亚群,其中 1 种或多种亚群对某种抗菌药物的耐药水平高于该菌株主要亚群的耐药程度。判定异质性耐药时应至少考虑以下几个方面。第一,异质性耐药亚群的频率(即在所有亚群中的占比)和最低耐药水平<sup>[4]</sup>。通常以耐药亚群对某种抗菌药物最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值与主要亚群(敏感亚群)MIC 值的倍数来定义异质性耐药亚群的耐药程度。异质性耐药不包括仅比优势亚群 MIC 稍高的亚群。异质性耐药亚群出现频率在不同种属细菌中差异显著,如结核分枝杆菌常会出现高频率的异质性耐药<sup>[5]</sup>,而其他菌属细菌耐药亚群出现频率很低。对于低频率异质性耐药性的检测,高灵敏度、标准化检测技术至关重要,如具有更高敏感性的分子检测技术。El-Halfawy 等<sup>[3]</sup>建议:耐药亚群 MIC 值至少高于相应菌株主要亚群 MIC 值 8 倍且耐药亚群频率高于  $10^{-7}$  时,可鉴定为异质性耐药而无需考虑其他因素。第二,耐药亚群

的稳定性也是定义异质性耐药时需要考虑的因素。如果在不含抗菌药物的培养基中连续传 50 代后耐药亚群能恢复到亲代耐药水平,则判定为不稳定型异质性耐药;反之,如能继续保持高水平耐药(主要亚群 MIC 值的 8 倍),则判定为稳定型异质性耐药<sup>[4]</sup>。异质性耐药亚群大多属于不稳定型异质性耐药,这是由于暴露在抗菌药物环境时,异质性耐药亚群的耐药基因出现自发串联扩增,这种扩增除本身具有不稳定性外,伴发的高适应性代价也进一步增加了其不稳定性。因此,耐药亚群在不含抗菌药物培养基中经过连续传代(40~50 代),基因自发扩增减缓或消失,加之适应性代价的补偿,耐药水平逐渐降低,88%可恢复至亲代耐药水平<sup>[6-7]</sup>。第三,异质性耐药亚群形成的适宜培养条件也需要考虑。某些金黄色葡萄球菌菌株的异质性耐药特性呈温度依赖性:30℃培养条件下,暴露于高浓度甲氧西林时,菌株可以生长;但温度增高至 37℃时,30 min 内就会失去耐药性;当温度再次恢复到 30℃时耐药性又会快速恢复<sup>[3]</sup>。最后,鉴定异质性耐药时也应注意小菌落变异(small colony variants, SCVs)。与异质性耐药相同,SCVs 通常也是在长期暴露于抗菌药物的条件下形成,其与异质性耐药菌株的差异主要体现在耐药机制不同。异质性耐药由耐药相关基因突变所致,导致小部分细菌亚群对抗菌药物产生高水平耐药。而 SCVs 耐药主要源于某些代谢相关基因发生突变。由于 SCVs 利用特定营养成分的能力减弱,导致其对磺胺类、庆大霉素、环丙沙星、磷霉素等抗菌药物产生耐药<sup>[8-9]</sup>。此外,SCVs 易在宿主细胞内存活和增殖也是导致其对特定抗菌药物耐药的原因之一<sup>[8]</sup>。

## 2 金黄色葡萄球菌异质性耐药机制

金黄色葡萄球菌是导致人类各种感染性疾病的重要病原菌之一。近年来,金黄色葡萄球菌耐药性问题日益严峻,特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的出现及传播,增加了临床医生选择抗菌药物的难度。万古霉素及利奈唑胺异质性耐药金黄色葡萄球菌的相关报道明显增加,金黄色葡萄球菌呈现出对多种抗菌药物普遍耐药的趋势,给临床抗感染治疗带来了巨大挑战。

### 2.1 $\beta$ -内酰胺类异质性耐药 MRSA

#### 2.1.1 OS-MRSA 及其耐药机制 OS-MRSA 因

体外培养时对苯唑西林敏感(通常 MIC $<4 \mu\text{g}/\text{mL}$ )且 *mecA* 基因阳性而得名<sup>[2]</sup>。OS-MRSA 在体外药敏试验呈现对苯唑西林和/或头孢西丁敏感,但由于 *mecA* 基因在被感染宿主体内表达 PBP2a 蛋白致使其对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药,因此常导致该类药物治疗失败。绝大多数 MRSA(包括 OS-MRSA)对  $\beta$ -内酰胺类抗生素既可表现出匀质性耐药,也可表现出异质性耐药<sup>[10]</sup>,即在体外药敏试验中,大部分亚群对苯唑西林的 MIC 较低,极少部分亚群高水平耐药,频率约为  $10^{-4}$ <sup>[11]</sup>。Liu 等<sup>[12]</sup>检测临床 1 200 株金黄色葡萄球菌对苯唑西林的耐药情况,发现 14 株(1.17%)为 OS-MRSA,且 14 株菌全部表现为对苯唑西林异质性耐药。OS-MRSA 耐药机制主要有以下几种:一是 *fem* 基因家族(包括 *femA*、*femB* 和 *femX* 基因)的低表达和突变。*fem* 基因家族参与细菌细胞壁合成,其低表达和突变可能使细菌细胞壁结构异常,最终导致 *mecA* 基因阳性 MRSA 表现为对苯唑西林敏感,即 OS-MRSA<sup>[10]</sup>。二是与调控系统 *mecR1-mecI* 同源的 *blaI-blaR1-blaZ* 系统的表达。Sabat 等<sup>[13]</sup>在有/无  $\beta$ -内酰胺类抗生素压力的情况下对 1 株 OS-MRSA 菌株 GR2 的 *mecA* 基因表达程度进行定量分析,该菌株基因组由染色体和质粒 pGR2A 和 pGR2B 组成,携有无应答/无功能的 *mecR1* 基因,且无 *mecI* 基因。在质粒 pGR2A 的作用下,发现了一个 *bla* 系统的单拷贝。*blaZ* 基因与其调控基因 *blaI* 和 *blaR1* 定位一致,在 *blaZ* 与调控基因之间整合了一个编码转座子 IS66 基因,删除 *blaR1* 的 5'端,编码 *blaZ/mecA* 阻遏因子的 *blaI* 完好无损。质粒丢失后,GR2 对青霉素和苯唑西林产生耐药。此结果提示,暴露在  $\beta$ -内酰胺类药物环境中时,非功能的 BlaR1 不能裂解 *mecA* 阻遏物 BlaI,使 *mecA* 基因的有效表达受阻,最终造成 OS-MRSA 敏感表型的出现。此外,*mecA* 基因的不稳定突变,也可改变 MRSA 对苯唑西林原有的耐药表型,从而对苯唑西林敏感。此类 OS-MRSA 暴露于一定浓度的头孢西丁时,又会恢复原有耐药性,导致治疗失败<sup>[1,14]</sup>。

以上耐药机制并不足以解释 MRSA 的异质性耐药现象。研究<sup>[11,15]</sup>表明,*relA* 基因突变可能是 MRSA 异质性耐药的主要原因之一。野生 *rel* 基因长度为 2 211 bp,RelA 蛋白由 736 个氨基酸组成,包含 4 个结构域,分别为水解酶结构域(HD)、合成酶结构域(SYN)、TGS 和 ACT。苯唑西林高水平耐药亚群 *relA* 基因在 1 052 碱基和 1 546 碱基处出

现突变,分别为 G $\rightarrow$ A 和 G $\rightarrow$ C。G $\rightarrow$ A 突变导致 RelA 蛋白缺失 TGS 和 ACT 结构域。*relA* 基因参与合成信号分子( $\rho$ )ppGpp。在应对特定压力时, ( $\rho$ )ppGpp 可启动一种称为严谨反应的复杂细胞程序,从而对多种基因表达进行调控并减缓生长速度。在高水平耐药亚群中, ( $\rho$ )ppGpp 含量明显增加,可能参与甲氧西林高水平耐药。向 OS-MRSA 生长培养基中加入一定浓度莫匹罗星,同样可引起细胞内 ( $\rho$ )ppGpp 的积累,导致严谨反应发生,提高该菌株对苯唑西林的耐药程度,甚至能让原本低水平耐药亚群呈现出匀质性高水平耐药<sup>[15-16]</sup>。因此,适当增加莫匹罗星可能提高实验室常规方法检测异质性耐药 OS-MRSA 的灵敏度<sup>[12]</sup>。

2.1.2 甲氧西林异质性耐药 MRSA 向同质性耐药 MRSA 的转变及机制 MRSA 对甲氧西林耐药主要呈现三种形式:同质性耐药(均质性耐药)、异质性耐药以及鹰型耐药<sup>[17]</sup>。鹰型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(eagle-type MRSA)比较罕见,且对甲氧西林具有特殊的耐药性,表现为对高浓度甲氧西林耐药而对低浓度甲氧西林敏感<sup>[18-19]</sup>。鹰型与异质性耐药的共同点体现在二者均是甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)株向甲氧西林完全耐药 MRSA 株转变过程中的过渡形式,但分子机制不同。目前认为,鹰型耐药表型的产生主要因为 MSSA 直接暴露于高浓度甲氧西林(128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )时特定染色体基因(如 *rpoB* 等)发生错义突变,增加了细菌对高浓度甲氧西林的耐受力,从而呈现高水平耐药<sup>[19]</sup>。而当 MSSA 暴露于低浓度甲氧西林时,可引起 *mecI* 基因功能失活,转变为异质性耐药 MRSA;继续暴露于高浓度甲氧西林时则进一步转变为均质性 MRSA。虽然临床治疗中鹰型耐药比异质性耐药更为罕见,但这种耐药演变机制值得进一步关注。

2.2 异质性万古霉素中介金黄色葡萄球菌 万古霉素是治疗耐药金黄色葡萄球菌感染的“最后防线”之一,其与细胞壁肽聚糖合成前体末端的 D-丙氨酰-D-丙氨酸(D-Ala-D-Ala)呈现高亲和力,破坏细胞壁的合成进而杀灭细菌<sup>[20]</sup>。万古霉素敏感性下降的金黄色葡萄球菌常分为三类:万古霉素完全耐药金黄色葡萄球菌(VRSA, MIC $\geq 16 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、万古霉素中等耐药金黄色葡萄球菌(VISA, MIC 为 4~8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )及万古霉素异质性中介耐药的 h-VISA,且 h-VISA 被定义为万古霉素 MIC $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,但其子代含有少量对万古霉素中介(MIC $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ )的亚群<sup>[21]</sup>。含 4~6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  万古霉素的脑心浸液

(BHI)选择性培养基可用于筛选 h-VISA,频率约为  $10^{-6}$  或更高,且在无药物的非选择培养基中能稳定 9 代<sup>[20]</sup>。VRSA 的分离率很低,目前我国尚未见 VRSA 感染的报道。

VISA 和 h-VISA 的耐药机制尚未完全清晰,目前认为与表型及基因型改变有关。第一,由于 VISA 中的肽聚糖交联减少导致其合成富含 D-丙氨酰-D-丙氨酸残基的肽聚糖侧链,使细胞壁增厚并阻碍细胞壁水解酶的通道,最终使得药物无法破坏细胞壁发挥其抗菌活性<sup>[22]</sup>。此外,增厚的细胞壁也为万古霉素的结合提供了更多“靶点”,增加了万古霉素的活性剂量<sup>[23]</sup>。第二,另有研究<sup>[23]</sup>显示,MRSA 产生耐受性也是 h-VISA 形成的重要原因,而这种耐受性可能与细菌的自溶活性降低有关。第三, Nelson 等<sup>[24]</sup>发现 h-VISA 菌株存在醋酸盐分解代谢障碍。该研究全部 VISA 株中,71% 菌株存在醋酸盐分解代谢下降特征,而万古霉素敏感金黄色葡萄球菌(VSSA)菌株醋酸盐分解代谢降低的比率仅为 8%。因此,醋酸盐分解代谢活性减低很可能是导致细菌自溶活性降低甚至万古霉素耐药的原因之一。

*WalkR*、*VraSR* 均属于细菌响应环境信号的二元调控系统(two-component systems, TCSs),参与调控金黄色葡萄球菌的细胞壁代谢、毒力调控基因的表达以及溶血活性等<sup>[25]</sup>。多项研究<sup>[26-30]</sup>表明,VISA 和 h-VISA 菌株中均存在较高比例的 *walk* 及 *vra* 基因突变,突变的 VISA 和 h-VISA 通过下调某些毒力调控基因(*agrA*、RNA III、*saeR*)以及细胞壁代谢相关基因(*arlA*、*ssaA*、*isaA*、*lytM*)的表达,导致菌株细胞壁明显增厚、毒力水平降低、细胞自溶活性减弱,最终致使对万古霉素的敏感性减弱。VISA 和 h-VISA 生物学性状的改变,也可以部分解释 VISA 和 h-VISA 菌株抗菌药物敏感性的降低。从中可以看出,高水平耐药可能也需要其他因素在其中起作用。VISA 与 h-VISA 耐药机制之间的关系有待进一步探究,但现有的相关报道至少提示二者之间有着相似的耐药机制。

2.3 利奈唑胺异质性耐药金黄色葡萄球菌(hLRSA) 利奈唑胺是一种细菌蛋白质合成抑制剂,它可以抑制肽链形成过程中肽链由 A 位点向 P 位点移位。这种有别于其他抗菌药物的独特机制,使得利奈唑胺不易与其他药物产生交叉耐药,且对大多数革兰阳性菌引起的感染具有较好的治疗效果。现主要有肠球菌对利奈唑胺耐药的报道,但少有报道金黄色葡萄球菌对利奈唑胺耐药,其耐药机制以及是

否存在异质性耐药现象尚不完全清楚。王敬华等<sup>[31]</sup>采用菌群分析法从 192 株 MRSA 中筛选出 2 株(1.04%)hLRSA。耐药株生长具有明显时间依赖性,可能与低水平耐药株适应环境、恢复生长需要较长迟滞期有关。虞培娟等<sup>[32]</sup>检出 1 株 hLRSA,该菌株 23S RNA 基因 2 474 位点出现的 G→T 点突变可能介导 hLRSA 菌株对利奈唑胺低水平耐药。Ikeda-Dantsuji 等<sup>[33]</sup>发现 23S RNA 基因点突变(T2500A)可引起金黄色葡萄球菌对利奈唑胺的异质性耐药。目前,23S RNA 基因点突变被认为是介导 LRSA 和 hLRSA 菌株对利奈唑胺耐药的重要机制。

2.4 金黄色葡萄球菌对其他药物的异质性耐药 金黄色葡萄球菌对其他抗菌药物也存在异质性耐药现象,如红霉素、达托霉素及磺胺类等。

目前,金黄色葡萄球菌对大环内酯类药物均质性耐药机制的研究比较确定,主要有两种。一种是 *msrA* 基因引起的主动外排效应介导的 MS 型耐药;另一种是靶位改变所致耐药,称为大环内酯类-林可霉素-链霉素杀阳菌素 B(MLSb)型耐药,主要由红霉素核糖体甲基化酶(*erm*)基因介导。MLSb 型耐药又包括诱导型耐药(iMLSb)和组成型耐药(cMLSb)<sup>[34]</sup>。而金黄色葡萄球菌对大环内酯类药物异质性耐药的报道相对较少。Hoşbul 等<sup>[35]</sup>报道红霉素对金黄色葡萄球菌的异质性耐药与 *ermA*、*ermB*、*ermC* 和 *msrA/B* 等耐药基因相关,而 *ermA* 基因最常见。陈东科等<sup>[36]</sup>发现 17.7%(70/395)金黄色葡萄球菌对红霉素呈现异质性耐药,且均检出 *ermA* 基因,而未检出 *ermC* 基因。两项研究结果提示,*erm* 基因型是介导金黄色葡萄球菌对红霉素异质性耐药的主要机制。由于不同研究所选菌株的异质性,*ermA*、*ermB* 和 *ermC* 3 种基因型分布特征也存在一定差异。*erm* 基因分布的差异在均质性耐药相关文献<sup>[34]</sup>中也有报道。

达托霉素(DAP)是第一个获批上市的脂肽类抗生素。它可通过多种机制破坏细菌细胞膜,使细菌内容物外泄而杀灭细菌,因其独特的作用机制在治疗 MSSA 或 MRSA 感染时表现出特有的优势。但近年来 DAP 耐药病例呈增多趋势。研究<sup>[37-38]</sup>发现,DAP 的耐药性可能是由遗传基因 *yycG* 和 *MprF* 突变引起。*MprF* 负责磷脂酰甘油(PG)的赖氨酰化以生成带正电荷的赖氨酰-磷脂酰甘油(LPG),也参与 LPG 由内向外的细胞膜易位。*MprF* 突变使包膜上的 LPG/PG 比值提高,导致突变株的 DAP 连接点比突变前减少,最终导致药物敏感性降低。而

Cui 等<sup>[39]</sup>研究证明, *RpoB* 基因突变使得 MRSA 对达托霉素及万古霉素产生双重异质耐药性; 通过全基因组测序及基因置换的方式, 发现在 MRSA 菌株中, *RpoB* 基因 1 862 碱基位点突变, 导致 624 位的丙氨酸被谷氨酸所替换。这种突变导致细菌细胞壁增厚及细胞表面负电荷减少; 同时微阵列数据显示, *dlt* 操纵子高表达增加了细胞表面的正电荷。此外, 突变菌株嘌呤、嘧啶、精氨酸、尿素循环和 *lac* 操纵子的代谢途径被抑制, 而维生素 B<sub>2</sub>、K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub> 生物合成及细胞壁代谢活动增强, 这些机制共同促进 MRSA 对达托霉素的异质性耐药。

### 3 金黄色葡萄球菌异质性耐药的实验室检测技术

目前实验室检测金黄色葡萄球菌异质性耐药的方法主要有传统的 K-B 纸片扩散法、E-test 法、菌群分析法 (population analysis profiling, PAP)、头孢西丁纸片扩散法及稀释法、乳胶凝集实验检测 PBP<sub>2a</sub> 蛋白, 以及聚合酶链式反应 (PCR) 检测 *mecA* 或 *mecC* 基因等。等离子胶体偶联基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS)、拉曼光谱技术及 DNA 分子探针等技术的发展速度迅猛, 在未来会有很好的应用前景。

K-B 纸片扩散法可通过观察抑菌圈内的单个菌落来检测和识别异质性耐药亚群。抑菌圈内异质性耐药亚群菌落的出现, 主要取决于异质性亚群出现频率。K-B 纸片扩散法作为常规检测方法成本低廉, 操作简便, 在特定种属细菌异质性耐药初筛中具有一定应用价值。E-Test 法与 K-B 纸片扩散法实验原理和结果判读方法类似。该方法结合了纸片扩散法操作方便、结果易读取的技术优势, 可直接获得 MIC 值<sup>[40]</sup>, 在测量万古霉素 MIC 值时重复性良好, 避免了 K-B 纸片扩散法的误差。然而 E-Test 法在鉴定异质性耐药方面同样存在与 K-B 纸片扩散法类似的技术缺陷如检出率低。E-Test 法的另一个缺点是条带价格较为昂贵, 不适合常规筛查使用。

PAP 是目前公认的检测异质性耐药的“金标准”方法<sup>[3]</sup>。这种方法将待测菌株于含不同浓度抗菌药物的固体培养基中培养, 读取梯度培养基上生长的菌落数记作不同抗菌药物浓度下耐药亚群的频率, 作为判断异质性耐药是否存在的指标。目前常以耐药亚群频率  $>10^{-7}$  且 MIC 值高于主要亚群 MIC 值的 8 倍作为判断异质性耐药的标准<sup>[3]</sup>。常规方法在检测 OS-MRSA 时很容易出现漏诊, 而 PAP 可以确

定异质性耐药菌的 MIC 值及耐药频率, 在很大程度上弥补了常规方法的不足。但该方法中不同菌属细菌对不同抗菌药物异质性耐药的定义尚无统一标准, 抗菌药物浓度梯度设置也无标准化要求, 不同实验室间结果一致性缺乏评估标准; 且 PAP 试验操作步骤繁琐, 成本高昂, 不适用于常规开展, 仅适用于确认试验。

菌群分析 - 曲线下面积法 (PAP-AUC) 是一种改良的 PAP 方法。这种方法常被用于验证金黄色葡萄球菌对万古霉素的异质性耐药<sup>[41]</sup>。该方法以 hVISA Mu3 和 Mu50 菌株为对照, 在应用 PAP 法计数菌落时, 绘制万古霉素浓度和相对应活菌落数相关曲线图 (以横坐标为万古霉素的浓度, 纵坐标为万古霉素浓度对应的活菌菌落数) 计算曲线下面积, 即 AUC 值。以受试金黄色葡萄球菌的 AUC 值除以对照 Mu3 株的 AUC 值, 如比值  $\geq 0.9$ , 即可确定金黄色葡萄球菌对万古霉素呈异质性耐药<sup>[42]</sup>。PAP 改良法在鉴定特定细菌异质性耐药方面有较好的应用价值, 制定了针对特定抗菌药物和特定菌属细菌的标准化操作规程。与 PAP 法相同, 该方法也因操作步骤繁琐、费时费力等特点而限制了其在实验室内的常规使用。

头孢西丁纸片扩散法和苯唑西林稀释法是美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的检测方法。头孢西丁纸片扩散法操作简便, 成本低廉, 其敏感性和特异性都较苯唑西林纸片扩散法高, 适合用于临床微生物实验室鉴定 MRSA<sup>[43]</sup>。研究<sup>[44]</sup>证实, 头孢西丁纸片扩散法试验用于 MRSA 表型的检测时表现良好, 特别适用于低水平和异质性耐药 MRSA 的检测, 灵敏度 (100%) 高于其他筛选试验。

乳胶凝集法检测 PBP<sub>2a</sub> 的原理是通过裂解细菌提取出 MRSA 中的 PBP<sub>2a</sub>, 加入 PBP<sub>2a</sub> 特异性单克隆抗体致敏的乳胶颗粒溶液后出现肉眼可见的特异性凝集现象, 证实 PBP<sub>2a</sub> 存在并以此判断 MRSA 耐药性。试验只需 15 min, 大大缩短了实验室鉴定病原微生物所需的时间, 快速、简便、准确、无需特殊仪器, 非常适合临床微生物实验室快速筛查 MRSA<sup>[45]</sup>。

PCR 法被认为是确认 MRSA (*mecA/mecC*) 的“金标准”。临床通常用头孢西丁纸片扩散法或苯唑西林稀释法来确定 MRSA 的表型, 通过 PCR 检测 *mecA* 和乳胶凝集法检测 PBP<sub>2a</sub> 来验证 MRSA 的基因型。此外, 微液滴数字 PCR 技术 (ddPCR) 是一种基于泊松 (Poisson) 分布原理的核酸分子绝对定

量技术。相较于传统 PCR, ddPCR 最大优势在于不依赖 Ct 值和标准曲线, 而是直接计算模板中的拷贝数, 实现真正意义上的绝对定量和绝对检测精度<sup>[46]</sup>。近年 ddPCR 在病原微生物检测领域得到了广泛应用, 如利用 ddPCR 技术检测幽门螺杆菌对克拉霉素的异质性耐药<sup>[47]</sup>。此项技术也存在与传统 PCR 相同的问题有待完善, 如阈值确定困难、假阳性率高、实验室建设标准高、操作复杂、检测成本高等, 但 ddPCR 技术在细菌异质性耐药检测中的应用仍值得期待。

等离子胶体偶联基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)和拉曼光谱技术都是近些年发展很快的细菌鉴定及耐药检测的新技术。它们的共同特点是在单细胞水平对细菌耐药性进行精准检测。MALDI-TOF MS 利用胶体包裹细菌, 在激光照射下, 通过测定抗菌药物及代谢产物的量来最终确定细菌耐药情况<sup>[48]</sup>。而拉曼光谱技术能够对从样本中直接分离出的致病菌进行逐个检测, 在无损细胞的条件下, 获得单细胞及亚细胞细微化学结构信息, 结合拉曼成像技术可准确测量个体细菌在测试药物作用下的异质性变化, 如药物在菌体中的分布与动力学变化, 药物与单个细菌的相互作用等, 为耐药性的变迁和耐药机制研究提供了便利的工具<sup>[49]</sup>。根据其试验和建模数据, 拉曼光谱技术可在 3 h 内检测到高表达表型, 可检测到的异质性耐药频率低至  $10^{-6}$ 。

#### 4 小结

异质性耐药金黄色葡萄球菌在人源分离株中广泛存在, 实验室漏检也时有发生。对万古霉素、利奈唑胺和苯唑西林异质性耐药株的漏诊, 可能给患者治疗带来严重不良后果。金黄色葡萄球菌异质性耐药亚群发生频率相对较低、耐药机制多样、定义标准尚未建立等因素制约着临床对分离株异质性耐药情况的客观检测和临床意义评估。标准化、便捷的异质性耐药实验室检测技术亟待规范, 新技术的研发迫在眉睫。各种分子生物学技术的广泛应用, 将为异质性耐药株的快速检出和耐药机制的探索提供更多可能。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Goering RV, Swartzendruber EA, Obradovich AE, et al. Emergence of oxacillin resistance in stealth methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* due to *mecA* sequence instability [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(8): e00558-19.
- [2] Liu PL, Xue HP, Wu ZW, et al. Effect of *bla* regulators on the susceptible phenotype and phenotypic conversion for oxacillin-susceptible *mecA*-positive staphylococcal isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(8): 2105-2112.
- [3] El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(1): 191-207.
- [4] Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(8): 479-496.
- [5] Zheng C, Li S, Luo ZY, et al. Mixed infections and rifampin heteroresistance among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(7): 2138-2147.
- [6] Pereira C, Larsson J, Hjort K, et al. The highly dynamic nature of bacterial heteroresistance impairs its clinical detection [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 521.
- [7] Nicoloff H, Hjort K, Levin BR, et al. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(3): 504-514.
- [8] Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(2): 401-427.
- [9] Melter O, Radojević B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*-review [J]. *Folia Microbiol (Praga)*, 2010, 55(6): 548-558.
- [10] Giannouli S, Labrou M, Kyritsis A, et al. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(4): 626-633.
- [11] Mwangi MM, Kim C, Chung M, et al. Whole-genome sequencing reveals a link between  $\beta$ -lactam resistance and synthetases of the alarmone (p)ppGpp in *Staphylococcus aureus* [J]. *Microb Drug Resist*, 2013, 19(3): 153-159.
- [12] Liu RS, Zhang J, Du XL, et al. Clonal diversity, low-level and heterogeneous oxacillin resistance of oxacillin sensitive MRSA [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 661-669.
- [13] Sabat AJ, Pournaras S, Akkerboom V, et al. Whole-genome analysis of an oxacillin-susceptible CC80 *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolate: insights into the mechanisms of cryptic methicillin resistance [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(11): 2956-2964.
- [14] Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA [J]. *J Infect Chemother*, 2007, 13(2): 79

- 86.

- [15] Kim C, Mwangi M, Chung M, et al. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e82814.
- [16] Chung M, Kim CK, Conceição T, et al. Heterogeneous oxacillin-resistant phenotypes and production of PBP2A by oxacillin-susceptible/*mecA*-positive MRSA strains from Africa[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(10): 2804 - 2809.
- [17] Aiba Y, Katayama Y, Hishinuma T, et al. Mutation of RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene promotes heterogeneous-to-homogeneous conversion of  $\beta$ -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(10): 4861 - 4871.
- [18] Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 577 - 601.
- [19] Kondo N, Kuwahara-Arai K, Kuroda-Murakami H, et al. Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under *mec* regulator gene control[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(3): 815 - 824.
- [20] Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin revisited - 60 years later[J]. *Front Public Health*, 2014, 2: 217.
- [21] Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 2836 - 2840.
- [22] Hu QW, Peng HG, Rao XC. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1601.
- [23] Sieradzki K, Tomasz A. Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(2): 527 - 533.
- [24] Nelson JL, Rice KC, Slater SR, et al. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains have impaired acetate catabolism: implications for polysaccharide intercellular adhesin synthesis and autolysis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(2): 616 - 622.
- [25] Villanueva M, García B, Valle J, et al. Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 523.
- [26] 饶一凡, 毛旭虎, 彭华刚, 等. WalK (S221P)突变影响万古霉素中等耐药金黄色葡萄球菌毒力的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(3): 219 - 228.
- Rao YF, Mao XH, Peng HG, et al. Role of WalK (S221P) mutation on virulence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and underlying mechanism[J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2020, 42(3): 219 - 228.
- [27] Howden BP, McEvoy CRE, Allen DL, et al. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR[J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(11): e1002359.
- [28] Dai YY, Chang WJ, Zhao CC, et al. *VraR* binding to the promoter region of *agr* inhibits its function in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(5): e02740 - 16.
- [29] Dai YY, Gao CH, Chen L, et al. Heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* uses the *VraSR* regulatory system to modulate autophagy for increased intracellular survival in macrophage-like cell line RAW264.7[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1222.
- [30] 刘明涛, 李慧, 燕小辉, 等. WalK 突变致异质性万古霉素中介耐药金黄色葡萄球菌生物学特性研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(13): 1964 - 1969.
- Liu MT, Li H, Yan XH, et al. Biological characteristics of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* induced by walk mutation[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2020, 30(13): 1964 - 1969.
- [31] 王敬华, 虞培娟, 沈懿, 等. 耐药异质性利奈唑胺金黄色葡萄球菌筛选及耐药机制分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(17): 3535 - 3538.
- Wang JH, Yu PJ, Shen Y, et al. Detection of heterogeneous linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and study on linezolid-resistance mechanism[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2011, 21(17): 3535 - 3538.
- [32] 虞培娟, 潘扬, 孙兰云, 等. 异质性利奈唑胺耐药金黄色葡萄球菌耐药机制研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(3): 230 - 234, 238.
- Yu PJ, Pan Y, Sun LY, et al. Antibiotic resistance mechanism of heterogeneous linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2013, 38(3): 230 - 234, 238.
- [33] Ikeda-Dantsuji Y, Hanaki H, Nakae T, et al. Emergence of linezolid-resistant mutants in a susceptible-cell population of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5): 2466 - 2468.
- [34] Wang HP, Zhuang HM, Ji SJ, et al. Distribution of *erm* genes among MRSA isolates with resistance to clindamycin in a Chinese teaching hospital[J]. *Infect Genet Evol*, 2021, 96: 105127.
- [35] Hoşbul T, Bozdoğan B, Haznedaroğlu T, et al. Heterogeneous macrolide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: investigation of resistance mechanisms and clonality[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2013, 47(2): 211 - 222.
- [36] 陈东科, 赖惠英, 杨冬梅, 等. 红霉素异质性耐药金黄色葡萄球菌耐药机制及检测方法学的比较[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(48): 3867 - 3871.
- Chen DK, Lai HY, Yang DM, et al. Mechanism of heteroerythromycin resistant *Staphylococcus aureus* and a comparison of detection methods[J]. *National Medical Journal of China*, 2013, 93(48): 3867 - 3871.
- [37] Ernst CM, Peschel A. Broad-spectrum antimicrobial peptide

- resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids[J]. *Mol Microbiol*, 2011, 80(2): 290–299.
- [38] Baltz RH. Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(2): 144–151.
- [39] Cui LZ, Isii T, Fukuda M, et al. An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(12): 5222–5233.
- [40] 张丽, 王贺, 肖盟, 等. Etest 方法与微量肉汤稀释法检测念珠菌属对唑类抗真菌药物的敏感性评价[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(4): 67–70.
- Zhang L, Wang H, Xiao M, et al. Comparison of Etest and broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Candida* species to azoles[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(4): 67–70.
- [41] Fusco DN, Alexander EL, Weisenberg SA, et al. Clinical failure of vancomycin in a dialysis patient with methicillin-susceptible vancomycin-heteroresistant *S. aureus*[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 65(2): 180–183.
- [42] Iyer RN, Hittinahalli V. Modified PAP method to detect heteroresistance to vancomycin among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2008, 26(2): 176–179.
- [43] 陈颖, 周建党, 郭建军, 等. 头孢西丁扩散法检测耐甲氧西林葡萄球菌异质性耐药菌株的评价[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2007, 32(1): 179–182.
- Chen Y, Zhou JD, Guo JJ, et al. Cefoxitin disk diffusion test in the detection of MRS heterogenic drug-resistant strains[J]. *Journal of Central South University(Medical Science)*, 2007, 32(1): 179–182.
- [44] 黄秀荣. 头孢西丁纸片扩散法检测耐甲氧西林葡萄球菌的评价[J]. *中国医药指南*, 2014, 12(9): 22–23.
- Huang XR. Evaluation of cefoxitin disk diffusion method to detect methicillin-resistant *Staphylococcus* [J]. *Guide of China Medicine*, 2014, 12(9): 22–23.
- [45] 任利珍, 干迪郁, 朱立军. 乳胶凝集法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(8): 1020.
- Ren LZ, Gan DY, Zhu LJ. Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by latex agglutination [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2009, 19(8): 1020.
- [46] Selvaraj V, Maheshwari Y, Hajeri S, et al. Development of a duplex droplet digital PCR assay for absolute quantitative detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197184.
- [47] Sun L, Talarico S, Yao LN, et al. Droplet digital PCR-based detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates reveals frequent heteroresistance[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9): e00019–18.
- [48] Dai YC, Li CY, Yi J, et al. Plasmonic colloidosome-coupled MALDI-TOF MS for bacterial heteroresistance study at single-cell level[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(12): 8051–8057.
- [49] Athamneh AIM, Alajlouni RA, Wallace RS, et al. Phenotypic profiling of antibiotic response signatures in *Escherichia coli* using Raman spectroscopy[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(3): 1302–1314.

(本文编辑:翟若南、左双燕)

本文引用格式:韩塔拉,王俊瑞.金黄色葡萄球菌异质性耐药机制及实验室检测技术[J].中国感染控制杂志,2022,21(12):1249–1256. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20222087.

Cite this article as: HAN Ta-la, WANG Jun-rui. Mechanisms and laboratory detection technologies of heteroresistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Chin J Infect Control*, 2022, 21(12): 1249–1256. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20222087.