專　欄

低抗藥性抗甲氧苯青黴素 *Staphylococcus aureus* 介紹

陳靖怡　陳逢叡

國家衛生研究院　感染症與疫苗研究所

前　言

金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 可在人體皮膚表面、鼻腔中存在，但也是造成人類感染的主要病原菌之一，可引起菌血症、關節炎、肺炎、中毒休克症候群等致命性的感染疾病，亦可造成較輕微的皮膚或軟組織感染，在世界各地都是備受矚目的醫療問題。1940 年代初期，尚未開始使用青黴素 (penicillin) 的時代，遭 *S. aureus* 嚴重感染的致死率大約八成；用藥後，雖然致死率下降了，但是人類和細菌之間的生死存亡戰就此展開，細菌開始反撲，尤其是多重抗藥性菌株的出現，更造成全球性的威脅。在台灣，抗甲氧苯青黴素 *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 於 1980 年代首度被報導，之後便迅速成長，到 2000 年時，於全台 12 間大型醫療院所中，分離出來的 *S. aureus*，具抗藥性的就有 53~83%。過去 MRSA 主要造成醫院內的感染，其感染對象多帶有醫療相關危險因子如長期住院、手術、血液透析、插管或其他留置性裝置，而被歸類為醫院型 (hospital-associated, HA)-MRSA；1990 年代起則陸續發現不具備上述危險因子的健康孩童亦發生 MRSA 感染，此類 MRSA 則被歸類為社區型 (community-associated, CA)-MRSA。

為了確保 *S. aureus* 感染可以得到適當抗生素的治療及做好感染控制的把關，發展可靠的方法用來偵測 MRSA 是非常重要的。因為傳統的抗生素敏感性測試 (antimicrobial susceptibility tests) 是最簡單及最便宜的分析方法之一，所以一般臨床實驗室大多採用此方法來檢測感染樣本是否為 MRSA 造成的，但是有很多因素包括：接種菌量、細菌的生長狀態、培養的時間、溫度、pH 值及 NaCl 的濃度等都會影響 MRSA 抗藥性的表

現。低抗藥性 (low-level) MRSA 容易在抗生素敏感性測試的方法中被誤判為不具抗藥性，若治療的過程中投以 β-內醯胺類 (lactams) 抗生素則容易造成治療失敗的風險。

抗藥性基因

雖然抗青黴素金黃色葡萄球菌 (penicillin-resistant *S. aureus*) 可以分泌青黴素酶 (penicillinase) 水解青黴素而產生抗藥性，但仍然無法水解甲氧苯青黴素及 oxacillin 而具感受性。當 *S. aureus* 獲得 *mecA* 基因後，可轉譯出青黴素結合蛋白 2a (penicillin-binding protein 2a, PBP 2a)，而獲得抗甲氧苯青黴素及抗 β-內醯胺類抗生素的能力即被稱為 MRSA；反之，不帶有 *mecA* 基因的 *S. aureus* 則稱為 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA)。PBP 2a 為具有胜肽轉移酶 (transpeptidase) 活性的膜蛋白，可催化胜肽交聯 (cross-linking) 反應，形成網狀的肽聚醣 (peptidoglycan) 結構，此為細胞壁合成的最後階段。*S. aureus* 原本俱有的青黴素結合蛋白 (penicillin-binding proteins, PBPs) 亦有此功能，但因 β-內醯胺類抗生素會與胜肽轉移酶的活性位置 (active site) 結合，進行醯化作用 (acylation) 而失去活性，所以導致細胞壁無法正常合成。在此情況下，由於 PBP 2a 的胜肽轉移酶與 β-內醯胺類抗生素的親合性較低，不易結合而失去活性，因此尚具活性的 PBP 2a 擔任起細胞壁合成的工作，故對這類型的抗生素有抗藥性 [1]。

mecA 基因位於 staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) 上，SCC*mec* 為一移動性基因片段，包含有 *mec* 基因複合體及 *ccr* (cassette chromosome recombinases) 基因複合體。*mec* 基因複合體都帶有 *mecA* 基因，有些還帶有完整且反向轉錄的 *mecA* 調控基因 *mecR1-mecI*，這些基因都與抗甲氧苯青黴素抗藥性有關；*ccr* 基因複合體則負責 SCC*mec* 基因片段在染色體上的進出。這兩種基因複合體各自有不同的分型及不同的組合，導致至今有八種不同 SCC*mec* 主型的分別。CA-MRSA 所帶有的 SCC*mec* 不同於 HA-MRSA。一般而言，HA-MRSA 多為 SCC*mec* type I、II 或 III，大多尚帶有 *mecA* 基因以外的抗藥性基因，因此具有多重抗藥性；CA-MRSA 則帶片段較小的 SCC*mec* type IV 或 V，對於非 β-內醯胺類抗生素則較不具抗藥性[2]。除了所帶有的 SCC*mec* 不同外，這兩類 MRSA 的基因型亦有差異。

低抗藥性 MRSA

雖然甲氧苯青黴素已經停產不再使用而以較安定的 oxacillin 取代，但是縮寫“M”RSA 繼續被沿用。低抗藥性 MRSA 抗藥性的表現通常是異質性的 (heterogeneous)，換言之，這些

菌株都帶有 *mecA* 基因，但是在培養的過程中，卻只有其中一小部分的細菌表現抗藥性，因此容易被誤判為不具抗藥性。雖然修改抗生素敏感性測試的方法，如增加培養基 NaCl 的含量、降低培養溫度至 30~35℃ 及增加培養時間等有被提出可以提高抗藥性的表現，但是依然有一些菌株遊走於抗藥性與非抗藥性判讀界線之間，難以利用這些調整而加以區分。根據臨床與實驗室標準協會 (Clinical and Laboratory Standards Institutes, CLSI) oxacillin 的最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 判讀標準為大於等於 4 μg/ml 屬於抗性的 (resistant)；小於等於 2 μg/ml 屬於敏感的 (susceptible)。所以 *S. aureus* 帶有 *mecA* 基因或 oxacillin MIC 大於等於 4 μg/ml 被歸類為 MRSA；而那些帶有 *mecA* 基因但是 oxacillin MIC 小於等於 2 μg/ml，則被歸類為 oxacillin-susceptible (OS)-MRSA 或 borderline (BO)-MRSA。這些低抗藥性 MRSA 的基因型包括 ST45、ST80、ST89 及 ST91 在荷蘭、瑞士、德國及日本被發現，屬於 CA-MRSA，而且對於非 β-內醯胺類抗生素則較不具抗藥性。而在台灣特有的基因型 ST59: SCC*mec* type V 亦發現低抗藥性 MRSA，但對於許多非 β-內醯胺類抗生素仍具有抗藥性，包括氯黴素 (chloramphenicol)、氯林絲菌素 (clindamycin) 及紅黴素 (erythromycin) [3]。造成低抗藥性的原因目前還沒有非常清楚，但是一般認為與 MRSA 的異質性表現有關。在日本有報導指出由於 MecI 蛋白抑制 *mecA* 基因表現因此造成低抗藥性 [4]，但是有很多低抗藥性 MRSA 是不帶有 *mecI* 基因的。

另外，有些 *S. aureus* 其 oxacillin MICs 高達 4~8 μg/ml，但並不帶有 *mecA* 基因，屬於 MSSA 卻容易被誤判成 MRSA，此類 MSSA 被歸類為 borderline oxacillin resistant *S. aureus* (BORSA)。而造成這些 MSSA 提高抗藥性的可能原因有：分泌大量的青黴素酶水解部分的 oxacillin、生產的 PBPs 蛋白對抗生素的結合親和力降低了及細胞增加 PBPs 的產量以應付細胞壁的合成[5]。

鑑定方法

Cefoxitin disc diffusion test

從 2004 年起 CLSI 首次推薦使用 cefoxitin 紙錠擴散法來檢測 MRSA，隨後更建議使用 cefoxitin 以取代 oxacillin，因為其敏感性較高、專一性較高且界線明顯較容易判讀[6]。懸浮菌液至 0.5 McFarland，以棉棒塗抹於 Mueller-Hinton agar 培養基，貼上 30 μg cefoxitin 紙錠，在 35℃ 下培養 24 小時後，以反射光 (reflected light) 直接判讀。判讀標準為抑制圈直徑小於等於 21 mm 屬 oxacillin resistant；大於等於 22 mm 屬 oxacillin susceptible。有很多研究證實此方法鑑別效果很好 [3,7,8,9]，而且便宜容易在一般臨床實

驗室使用。

選擇性培養基 (Selection media)

商業化的選擇性培養基含有指示劑及抗生素，可以利用不同菌落顏色而快速辨別 *S. aureus*。Yamada 等人選用六種選擇性培養基來探討效果，結果發現培養基添加 cefoxitin 效果最好，如 CHROMagar MRSA、MRSA ID 及 MDRSK，只要培養 24 小時即可得到結果；而添加 ceftizoxime 次之，如 MRSA I-A 及 MEC agar，需要培養 40 小時達到最好結果；添加 oxacillin 效果最差，如 MSO agar，即使培養 40 小時還是無法達到 100%。所以推薦使用添加 cefoxitin 的選擇性培養基當作第一次篩選低抗藥性 MRSA 的方法[9]，雖然含指示劑的特殊培養基提高成本，但是這種方法優勢在於可縮短報告的時間。

PBP 2a 抗體乳膠凝集法 (latex agglutination kit)

因為 *mecA* 基因可以轉譯出 PBP 2a 蛋白，所以萃取 PBP 2a 蛋白，再與含有抗 PBP 2a 單株抗體的乳膠顆粒作用，則可以出現凝集反應。此方法快速 (約 10 分鐘) 而且效果不錯，有 97.6% 的敏感性[7]，但是不適合分析樣品生長在含有 NaCl 的培養基。此外，若樣品產生少量的 PBP 2a 可能會造成凝集反應差或慢的情形，所以需要經驗及操作技術。因此推薦使用 PBP 2a 抗體乳膠凝集法當作第二個篩選低抗藥性 MRSA 的方法 [9]。

分生方法 (molecular methods)

偵測 *mecA* 基因藉由 PCR 方法已被視為“黃金標準”(gold standard) 以鑑定 MRSA，雖然技術繁瑣還需要跑電泳作進一步分析。最近，real-time PCR 方法有被發展來鑑定 MRSA [10]。然而，對很多小的臨床實驗室來說，建立儀器及操作技術是很困難的。

其他方法

CLSI 除了建議使用 cefoxitin 紙錠擴散法及 PBP 2a 抗體乳膠凝集法外，還建議使用 Mueller-Hinton agar 含有 6 μg/ml oxacillin 及 4% NaCl 培養基來鑑定 MRSA。Vitek 2 自動化鑑定系統、E-test 亦有很多人使用。

結　語

S. aureus 帶有很多致病因子 (virulence factors)，可以導致疾病或嚴重感染，又因 MRSA 具抗藥性的關係，常常造成治療上的困難度。在人體皮膚或鼻腔中可能存在 MRSA，但卻沒有任何臨床感染症狀，像這樣可以散佈致病原給他人，而本身不受感染的人稱為帶原者 (carrier)，這些與常人無異的健康帶原者就透過和其他人之間的接觸而傳播 MRSA，所以早期偵測適時隔離可以避免傳染擴大。嚴密監控 MRSA 的存在是必需的，而如

何建立準確、有效、方便、便宜又快速的檢測方法以偵測低抗藥性 MRSA，一直以來是很重要的課題。因為此類型的 MRSA 容易被誤判為 MSSA，當治療低抗藥性 MRSA 感染時，應該避免使用 β-內醯胺類抗生素，因為可能提高治療失敗的風險。平常養成良好的衛生習慣，勤洗手，是預防傳染的最佳方法。

參考文獻

1. Llarrull LI, Fisher JF, Mobashery S: Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new β-lactams that meet the challenge. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:4051-63.
2. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC): Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:4961-7.
3. Chen FJ, Hiramatsu K, Huang IW, et al: Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible *mecA*-positive methicillin-resistant *S. aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;65:351-7.
4. Hiramatsu K: Molecular evolution of MRSA. Microbiol Immunol 1995;39:531-43.
5. Gerberding JL, Miick C, Liu HH, et al: Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:2574-9.
6. Swenson JM, Skov R, Patel J: The cefoxitin disk test-what a clinical microbiologist needs to know. Clin Microbiol Newsl 2007;29:33-40.
7. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, 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;40:2766-71.
8. Matos PD, Schuenck RP, Cavalcante FS, et al: Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different SCCmec types. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010;105:931-4
9. Yamada K, Inuzuka K, Tatsumi N, et al: Evaluation of selection media for the detection of borderline MRSA. J Infect Chemother 2010;16:19-24.
10. Sakai H, Procop GW, Kobayashi N, et al: Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. J Clin Microbiol 2004;42:5739-44.