

金黄色葡萄球菌中 *mecA* 基因的检测及其耐药相关性*陈小凤, 彭洋, 毕嘉琪, 姚振江[△]

(广东药学院/广东省分子流行病学重点实验室, 广东广州 510310)

摘要:目的 探讨 *mecA* 基因在临床分离金黄色葡萄球菌(SA)中的表达水平与耐药的的关系。方法 收集临床分离的 SA 菌株 186 株,采用纸片扩散法(K-B法)进行药敏试验,并提取 DNA,运用 PCR 扩增 *mecA* 基因。结果 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的检出率为 30.65%(57/186),其中 56 株 MRSA 和 129 株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)中有 10 株检出 *mecA* 基因阳性;除万古霉素、利奈唑胺敏感外,MRSA 对其他抗菌药物耐药率均高于 MSSA,携带 *mecA* 基因的菌株抗菌药物耐药率高于不携带 *mecA* 基因的菌株,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 SA 临床分离菌株中含 *mecA* 基因的菌株对多种抗菌药物耐药,可见 *mecA* 基因在 SA 的耐药机制中发挥着重要作用。

关键词:金黄色葡萄球菌;*mecA* 基因;耐药

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)11-1312-03

Detection of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and its correlation with drug-resistance*Chen Xiaofeng, Peng Yang, Bi Jiaqi, Yao Zhengjiang[△]

(Guangdong Pharmaceutical University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Epidemiology, Guangzhou, Guangdong 510310, China)

Abstract: Objective To investigate the *mecA* gene expression level in clinically isolated *Staphylococcus aureus*(SA) strains and its correlation with drug resistance. **Methods** Clinically isolated 186 SA strains were collected. The K-P method was adopted to conduct the drug sensitivity test. Then DNA of these strains was extracted and the *mecA* gene was amplified by using PCR. **Results**

The detection rate of methicillin-resistant SA(MRSA) was 30.65%(57/186), the positive *mecA* gene was detected in 56 strains of MRSA and 10 strains of methicillin susceptible *S. aureus*(MSSA) among 129 strains of MSSA; except susceptible to vancomycin and linezolid, the resistance rate of MRSA to other antibacterial drugs were higher than that of MSSA, the resistance rate to antibacterial drugs in the strains carrying *mecA* gene was higher than that in the strains without carrying *mecA* gene, the difference between them had statistical significance($P < 0.05$). **Conclusion** Clinically isolated SA strains carrying *mecA* gene are resistant to multiple antibacterial drugs, which indicating that *mecA* gene play an important role in SA drug-resistance mechanism.

Key words: staphylococcus aureus; *mecA* gene; drug resistance

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是当今抗感染治疗的难题,其对包括甲氧西林在内的多种抗菌药物耐药,具有多重耐药性^[1],已引起临床和实验室的广泛关注^[2]。*mecA* 基因是金黄色葡萄球菌(SA)耐药机制中的重要基因,掌握临床分离 SA 耐药性与 *mecA* 基因的关系,能给临床用药提供参考。本研究分析了广州某三甲医院临床分离的 186 株无重复 SA 菌株的来源、耐药监测情况并对其进行 *mecA* 基因检测,以期探讨该基因与 SA 耐药性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 186 株菌株来源于 2012 年 1~12 月广州某三甲医院住院患者各种临床标本中分离的 SA,标本包括痰液、血液、脓液、穿刺液、引流物及胸、腹腔积液等,且无重复分离株,经生物梅里埃全自动细菌鉴定仪(VITEK 2)系统鉴定为 SA。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感性实验 采用纸片扩散法(K-B法)完成 18 种抗菌药物的药物敏感性实验,测试 SA 对抗菌药物的敏感性。实验操作和结果判读严格按照美国临床实验标准化协会(CLSI)2012 年标准。

1.2.2 DNA 模版制备 根据文献^[3]提供的方法,在 LB 肉汤中培养细菌过夜,离心菌液弃上清液加 20 mg/mL 的溶葡萄

球菌酶溶液和 20 mg/mL 的蛋白酶 K 温孵(37 °C, 1 h),然后经苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,乙醇沉淀取上清液得到纯化的 DNA。

1.2.3 PCR 检测 *mecA* 基因 参照文献^[4]设计,用 PCR 方法扩增 *mecA* 基因的特异性引物 *mecA*1:5'-TGG CAT TCG TGT CAC AAT CG-3';*mecA*2:5'-CTG GAA CTT GTT GAG GAG AG-3'。扩增反应总体积为 25 μ L;2 \times Taq PCR Master-Mix 12.50 μ L,10 μ mol/L 引物上下游各 1.00 μ L,双蒸水 8.50 μ L,DNA 模板 2.00 μ L。扩增条件:94 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,进行 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 5.00 μ L 点样于 1.50%琼脂糖凝胶中,80 V 电泳 30 min,紫外凝胶成像系统下观察结果并拍照,以标记物 100 bp Ladder II 作为参照,阳性标本可在约 310 bp 处观察到电泳条带。

1.2.4 PCR 产物测序 随机挑取若干株阳性 PCR 扩增产物由上海生工生物工程有限公司进行纯化测序。测序结果经 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行比对确定其均为 *mecA* 基因。

1.3 统计学处理 应用 SPSS20.0 软件进行统计学分析,对相关数据进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 186 株 SA 对 18 种抗菌药物的耐药率比较[株(%)]

抗菌药物	SA(n=186)	MRSA(n=57)	MSSA(n=129)	χ^2	P	mecA+(n=66)	mecA-(n=120)	χ^2	P
庆大霉素	46(24.73)	38(66.67)	8(6.20)	77.643	0.000	38(57.58)	8(6.67)	59.285	0.000
亚胺培南	47(25.27)	47(82.46)	0	142.340	0.000	46(69.70)	1(0.83)	106.931	0.000
环丙沙星	63(33.87)	44(77.19)	19(14.73)	68.865	0.000	46(69.70)	17(14.17)	58.621	0.000
左氧氟沙星	150(80.64)	49(85.96)	101(78.29)	1.490	0.222	54(81.82)	96(80.00)	0.090	0.764
青霉素 G	171(91.94)	57(100.00)	114(88.37)	7.209	0.007	65(98.48)	106(88.33)	5.919	0.015
万古霉素	0	0	0	—	—	0	0	—	—
利奈唑胺	0	0	0	—	—	0	0	—	—
阿莫西林/克拉维酸	48(25.81)	48(84.21)	0	146.420	0.000	47(71.21)	1(0.83)	110.154	0.000
氨苄西林	170(91.4)	56(98.2)	114(88.4)	4.902	0.027	64(97.0)	106(88.3)	4.040	0.044
苯唑西林	57(30.65)	57(100.00)	0	186.000	0.000	56(84.85)	1(0.83)	141.413	0.000
复方新诺明	15(8.06)	15(26.32)	0	36.925	0.000	15(22.73)	0	29.665	0.000
克林霉素	70(37.63)	43(75.44)	27(20.93)	50.044	0.000	42(63.64)	28(23.33)	29.468	0.000
奎奴普丁/达福普丁	4(2.15)	3(5.26)	1(0.78)	3.784	0.052	3(4.54)	1(0.83)	2.788	0.095
利福平	6(3.22)	5(8.77)	1(0.78)	8.098	0.004	5(7.58)	1(0.83)	6.201	0.013
氯霉素	23(12.36)	14(24.56)	9(6.98)	11.281	0.001	14(21.21)	9(7.50)	7.388	0.007
四环素	80(43.01)	45(78.95)	35(27.13)	41.609	0.000	46(69.70)	34(28.33)	29.722	0.000
头孢唑啉	47(25.27)	47(82.46)	0	142.340	0.000	46(69.70)	1(0.83)	106.931	0.000
红霉素	95(51.08)	53(92.98)	42(32.56)	57.761	0.000	53(80.30)	42(35.00)	34.973	0.000

—:此项无数据。

2 结 果

2.1 菌株检出情况 在临床分离的 186 株 SA 中,苯唑西林抑菌环直径小于或等于 10 mm 的 MRSA 有 57 株(30.65%), ≥13 mm 的 MSSA 有 129 株(69.35%)。



M: 标记物(100 bp Ladder II); 1: 阴性对照; 2: mecA 阳性对照(测序证实); 3~7: mecA 阳性 PCR 产物。

图 1 部分临床分离株 mecA 基因 PCR 扩增电泳图

2.2 186 株 SA 对 18 种抗菌药物的耐药率比较 药敏试验结果显示,186 株 SA 中只有 4 株对 18 种抗菌药物敏感,仅占全部临床分离菌株的 2.15%,186 株 SA 对左氧氟沙星、阿莫西林/克拉维酸、克林霉素、青霉素类(青霉素 G、氨苄西林)、红霉素、四环素的耐药率较高,表明 SA 对这几类抗菌药物耐药情况较为普遍。MRSA 对多类抗菌药物耐药率较高,对青霉素 G、苯唑西林高达 100.00%,呈多重耐药特征;而 MSSA 的耐药率相对较低,二者比较差异有统计学意义(P<0.05),未发现耐万古霉素、利奈唑胺的 SA。mecA 阳性(+)临床分离菌株除对万古霉素、利奈唑胺敏感外,对庆大霉素、亚胺培南、

环丙沙星、青霉素 G、阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林、苯唑西林、复方新诺明、克林霉素、利福平、氯霉素、四环素、头孢唑啉、红霉素的耐药性均高于 mecA 阴性(-)菌株,二者比较差异有统计学意义(P<0.05);mecA- 的菌株均对复方新诺明、万古霉素、利奈唑胺敏感,见表 1。

2.3 mecA 基因检测结果及菌株分布情况 186 株 SA 中检出 mecA 基因阳性 66 株,主要分布在神经内科(15 株)、综合科(14 株)和 ICU(7 株)等科室;标本类型包括痰液 47 株、各种脓液 11 株、血液 3 株和其他 5 株。在 57 株 MRSA 中,56 株携带 mecA 基因,占 98.25%;部分临床分离株 mecA 基因 PCR 产物电泳结果见图 1。只有 1 株 MRSA 临床分离菌株未检测到 mecA 基因;而在 129 株 MSSA 中有 10 株(7.75%)携带 mecA 基因,二者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 141.413, P < 0.05$)。

3 讨 论

目前,SA 是引起临床感染的重要病原菌之一,特别是 MRSA 感染,正以惊人的速度在世界范围内蔓延和流行,且具有多重耐药的特点。MRSA 产生的主要原因是由于 SA 通过 mecA 基因大量表达一种青霉素结合蛋白 2a(PBP2a),使其与 β-内酰胺类抗生素不能结合而产生耐药。有研究发现,mecA 基因是 SA 通过转座机制获得的外来基因,且 SA 较易获得此基因,故检测 mecA 基因可作为 MRSA 鉴定的“金标准”[5]。有研究发现,不同的 MRSA,虽然检测 mecA 基因阳性,但其耐药程度却不尽一致[6-8]。因此,进一步研究 MRSA 耐药的分子机制,减少糖肽类抗生素的使用成为当前研究治疗 MRSA 感染的亟待解决的问题。

本研究结果显示,在临床分离的 186 株 SA 中,苯唑西林抑菌环直径小于或等于 10 mm 的 MRSA 有 57 株(30.65%), ≥13 mm 的 MSSA 有 129 株(69.35%)。低于文献[9-10]报道的 MRSA 在 50.0% 以上水平。186 株 SA 临床分离 MRSA 的

检出率为 30.65%，药敏结果显示，MRSA 对多种抗菌药物的耐药率均高于 MSSA，且两组间差异有统计学意义，与刘玉枝等^[11]报道相似，可见 MRSA 耐药非常严重，可用于临床治疗的抗菌药物种类越来越少。57 株 MRSA 中，56 株携带 mecA 基因，占 98.25% (56/57)；而在 129 株 MSSA 中有 10 株携带 mecA 基因，与陈庆增等^[12]报道相似，携带 mecA 菌株对 14 种抗菌药物的耐药性均高于不携带 mecA 菌株，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，由此可以发现携带 mecA 基因的在 SA 的耐药机制中发挥重要作用。虽然有 1 株 MRSA 未检出 mecA 基因，但其显示对苯唑西林耐药，可能是由于 β -内酰胺酶及青霉素结合蛋白 (PBPs) 产生过多或 PBPs 的修饰所导致^[13]。而 10 株检出 mecA 基因但对苯唑西林敏感的菌株，有可能与 β -内酰胺类接触后，可转化为耐 β -内酰胺类抗生素菌株，故应把携带有 mecA 基因的菌株，归为 MRSA^[14-15]。因此，采用分子生物学方法检测 mecA 基因的存在情况来鉴定 MRSA 是目前较理想的方法。尽管未发现对万古霉素耐药的菌株，但 186 株 SA 中只有 4 株对 18 种抗菌药物敏感，仅占全部临床分离菌株的 2.15%，提示 SA 临床分离菌株存在严重的耐药性。

参考文献：

- [1] 李春辉, 吴安华, 黄昕, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(9): 1032-1035.
- [2] 章杰梅, 张兴, 黄旦华. 五种不同温度下检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的评价[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(2): 303-305.
- [3] Galdiero E, Liguori G, D'Isanto M, et al. Distribution of mecA among methicillin-resistant clinical staphylococcal strains isolated at hospitals in Naples, Italy[J]. Eur J Epidemiol, 2003, 18(2): 139-145.
- [4] Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3411-3414.
- [5] Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: mo-

lecular and biochemical implications[J]. Clin Microbiol, 1997, 10(4): 781-791.

- [6] 陈颖, 宋明胜, 周建党, 等. 葡萄球菌对克林霉素诱导性耐药的检测及耐药性分析[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(12): 1282-1284.
- [7] Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, et al. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(3): 222-235.
- [8] 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测[J]. 中南大学学报: 医学版, 2007, 32(1): 179-182.
- [9] 胡付品, 朱德妹, 汪夏, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 8(5): 321-329.
- [10] 王若飞, 丁天鹏, 李定宪, 等. 196 株金黄色葡萄球菌的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(6): 1431-1466.
- [11] 刘玉枝, 王凤玲, 陈洋, 等. 金黄色葡萄球菌致病毒素基因与耐药性的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(17): 2151-2153.
- [12] 陈庆增, 罗兵, 孙迎娟, 等. mecA 基因在金黄色葡萄球菌中的分布及对耐药性的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(9): 1028-1031.
- [13] Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, et al. Healthcare-associated invasive MRSA infections, 2005-2008[J]. JAMA, 2012, 304(6): 641-647.
- [14] Hegde SS, Shrader TE. FemABX. Family members are novel non ribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drugs targets [J]. J Biol Chem, 2001, 276(10): 6998-7003.
- [15] 谢桂娥, 徐霞, 杨能. mecA 基因 PCR 扩增法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 中国微生态学杂志, 2005, 17(6): 438-441.

(收稿日期: 2013-09-28 修回日期: 2013-11-30)

(上接第 1311 页)

- of mechanically ventilated patients: A meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Crit Care Med, 2007, 35(12): 2843-2851.
- [26] 敖薪, 吕晓玲. 呼吸机治疗中两种加热湿化方法的效果研究[J]. 护士进修杂志, 2010, 25(19): 1733-1735.
- [27] Kelly M, Gillies D, Todd DA, et al. Heated humidification versus heat and moisture exchangers for ventilated adults and children[J]. Anesth Analg, 2010, 111(4): 1072.
- [28] 莫敏, 刘松桥, 杨毅. 热湿交换器和加温湿化器对呼吸机相关性肺炎发生率影响的荟萃分析[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(9): 513-517.
- [29] The American Thoracic Society and the Infectious Diseases Society of America Guideline Committee. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(4): 388-416.
- [30] Bench S. Humidification in the long-term ventilated patient; a

systematic review[J]. Intensive Crit Care Nurs, 2003, 19(2): 75-84.

- [31] Cook D, De Jonghe B, Brochard L, et al. Influence of airway management on ventilator-associated pneumonia: evidence from randomized trials[J]. JAMA, 1998, 279(10): 781-787.
- [32] Kola A, Eckmanns T, Gastmeier P. Efficacy of heat and moisture exchangers in preventing ventilator-associated pneumonia: meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Intensive Care Med, 2005, 31(1): 5-11.
- [33] Kollef MH, Shapiro SD, Boyd V, et al. A randomized clinical trial comparing an extended-use hygroscopic condenser humidifier with heated-water humidification in mechanically ventilated patients [J]. Chest, 1998, 113(3): 759-767.

(收稿日期: 2013-09-15 修回日期: 2013-12-20)