

· 论 著 ·

聚合酶链反应检测 *mecA* 和 *mecI* 及其对葡萄球菌甲氧西林耐药的影响

陈 军¹, 舒明星², 韦超凡³, 赵瑞华²

(1. 湖北省武汉市结核病防治所检验科 430030; 2. 中南大学湘雅医学院微生物学教研室, 长沙 410078; 3. 中南大学湘雅医学院免疫学教研室, 长沙 410078)

摘要:目的 了解葡萄球菌甲氧西林耐药基因 *mecA* 和调节基因 *mecR* 中的抑制基因 *mecI* 在葡萄球菌中的分布, 探讨 *mecA*、*mecI* 和 β -内酰胺酶对甲氧西林耐药性的影响。方法 琼脂稀释法测定 158 株葡萄球菌苯唑西林 MIC; 聚合酶链反应检测 *mecA* 和 *mecI*; 用内切酶 *TruI* 进行 *mecI* 酶切分型。结果 158 株葡萄球菌中, 金黄色葡萄球菌(SA)66 株, 凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)92 株, 葡萄球菌对苯唑西林的总耐药率达 44.3%(70/158)。158 株葡萄球菌中, 检出 *mecA* 阳性 70 株, 其中 SA 8 株, CNS 62 株。70 株 *mecA* 阳性葡萄球菌中, 检出 *mecI* 阳性 12 株, 其中 SA 7 株, CNS 5 株; 88 株 *mecA* 阴性葡萄球菌中未检出 *mecI*。对 *mecA* 阴性、苯唑西林 MIC $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 的菌株进行抑制实验后, 再测定苯唑西林 MIC, 抑制后 MIC 下降 8 倍以上。结论 耐甲氧西林葡萄球菌以 *mecA* 为其主要的甲氧西林耐药决定子; β -内酰胺酶和 *mecI* 基因对葡萄球菌甲氧西林耐药有一定的影响。

关键词: 葡萄球菌属; β 内酰胺酶类; 耐药基因 *mecA*; 抑制基因 *mecI*
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.021 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2011)13-1447-03

Detection of *mecA* and *mecI* by PCR and effect of *mecA* and *mecI* on methicillin resistance of staphylococci
*Chen Jun*¹, *Shu Mingxing*², *Wei Chaofan*³, *Zhao Ruihua*²
(1. Department of Laboratory Medicine, Wuhan TB Control Center, Wuhan 430030, China; 2. Department of Microbiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China; 3. Department of Immunology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of *mecA*, *mecI* and effect of β -lactamase, *mecI* on methicillin resistance in Staphylococci. **Methods** Oxacillin MICs were determined by agar dilution test in 158 staphylococci, *mecA* and *mecI* were amplified by PCR, RFLP analysis of *mecI* was performed by using restriction endonuclease *TruI*. **Results** 158 staphylococci were collected, including 66 *Staphylococcus aureus* (SA) and 92 coagulase-negative staphylococci (CNS). The total resistant rate of oxacillin amounted to 44.3%(70/158). 70 of 158 isolates were *mecA* positive, including 8 SA and 62 CNS. Among 70 *mecA* positive isolates, 12 *mecI* positive staphylococci were detected, including 7 SA and 5 CNS. Among *mecA* negative staphylococci, *mecI* gene was not found. The staphylococci with oxacillin MIC $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ but without *mecA* were inhibited by clavulanic acid (5 $\mu\text{g/mL}$) and the oxacillin MIC decreased 8-fold. **Conclusion** *mecA* could be the resistant determinant of methicillin resistant staphylococci. β -lactamase and *mecI* might have effect on methicillin resistance of SA and CNS.

Key words: staphylococcus; beta lactamases; *mecA*; *mecI*

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)属于耐甲氧西林葡萄球菌(methicillin resistant staphylococci, MRS), 是引起医院内感染的重要病原菌之一, 对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、红霉素、四环素等多种抗菌剂耐药^[1]。凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase negative staphylococcus, CNS)在上世纪 70 年代以前被视为非致病菌和临床标本中的污染菌, 随着其所导致的医院感染日益增多才逐渐引起重视; CNS 是目前 5 种常见致病菌之一, 感染率达 9%。耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(methicillin resistant CNS, MRCNS)占 CNS 的比例甚至比金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)更高, 耐药性更强。

MRS 对甲氧西林耐药主要是因为其可产生一种能够与 β -内酰胺类抗菌剂结合的青霉素结合蛋白即 PBP2a; PBP2a 由 *mecA* 基因所编码, 而 *mecA* 基因的表达受温度、pH 值、NaCl 浓度等环境因素影响, 也受 *mecR* 和 *blaR* 调控基因的影响。*mecR* 由诱导活化调节子 *mecR1* 和抑制子 *mecI* 组成, *mecI* 编码的 *MecI* 蛋白能与 *mecA* 的操纵子区域结合, 抑制 *mecA* 的转录。因此, 完整的 *mecR* 对 *mecA* 的表达具有负性调节作用。携带 *mecR1* 和 *mecI* 的 MRS 具有缓慢诱导的低水平的甲

氧西林耐药性, 在常规药敏试验中可能表现为敏感。尽管有此调节因子存在, 但许多高耐药株存在多种基因突变或缺失, 从而使 *mecI* 抑制子基因失活; 有些菌株甚至完全缺乏 *mecI* 直至 *mecR1* 的多重基因缺失。国内对 *mecA* 基因研究较多, 但对 *mecR* 在葡萄球菌中的分布及对甲氧西林耐药性的影响报道不多。本研究用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测了 158 株葡萄球菌的 *mecA* 基因和调节基因 *mecR* 中的 *mecI*, 并对 *mecI* 基因进行酶切分型, 以检测可能的突变, 并观察了它们在葡萄球菌的分布及对耐药表型的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

SA 标准菌株 ATCC29213 和 ATCC25923 购自中国药品生物制品检定所, ATCC29213 为琼脂稀释法药敏质控菌株。临床菌株来源于中南大学湘雅一医院、中南大学湘雅三医院、长沙市一医院及武汉市同济医院检验科, 共 158 株, 其中 SA 66 株, CNS 92 株。菌株鉴定按照《全国临床检验操作规程》^[2]进行。

1.2 主要试剂

(1) PCR 试剂: *mecA* 及 *mecI* 基因引物参照文献[3]设计, 由上海生工生物工程公司合成。Taq 酶及主要试剂由上海生工生物工程公司提供。蛋白酶 K、限制性内切酶

HhaI 购自 Promega 公司。限制性内切酶 TruI I 为 MBI Fermentas 公司产品。溶葡萄球菌素为 Sigma 公司产品。(2) 抗菌剂: 苯唑西林、克拉维酸、头孢唑林均购自中国药品生物制品检定所。

1.3 方法 (1) 苯唑西林最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测定: 琼脂稀释法。按照美国临床与实验室标准协会相关标准^[3], 在 MH 琼脂补加 2% 的 NaCl, 以 ATCC29213 为质控菌株, 共有 0.125、0.25、0.50、1、2、4、8、16、32、64、128 μg/mL 共 11 个稀释度。取数个大小一致菌落用生理盐水制成 0.5 麦氏比浊管, 稀释 10 倍后用定量取液器吸取 1 μL 菌液点种到含系列不同浓度抗菌剂平板上, 每点约 10⁴ 个菌, 35℃ 温箱培养 24 h 后观察结果, 以无菌生长的最小浓度为 MIC。每次均用 ATCC29213 作质控。苯唑西林 MIC ≥ 4 μg/mL 为耐药, MIC ≤ 2 μg/mL 为敏感。(2) β-内酰胺酶测定: 碘试管法。(3) PCR 检测 mecA 和 mecI 基因: ①取过夜培养菌液 100 μL (约为 10⁸ CFU) 离心去上清液后或单个菌落直接混悬于双蒸水 50 μL 中, 离心去上清液, 双蒸水洗涤 1 次, 沉淀溶于 50 μL 溶葡萄球菌素 (100 μg/mL), 37℃ 水浴 10 min 后加入 50 μL 蛋白酶 K (100 μg/mL) 和 150 μL 0.1 mol/L Tris (pH7.5), 37℃ 水浴 10 min 后沸水浴 5 min, -20℃ 保存备用。②mecA 基因反应体系为 50 μL, 包括 10×PCR 缓冲液 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μL, 10 mmol/L 引物 1.5 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.3 μL, 灭菌蒸馏水 29.2 μL, 上述葡萄球菌裂解液 5 μL, 加 30 μL 石蜡油覆盖, 高

速离心片刻后置 PCR 仪中扩增。PCR 条件为 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 52℃ 40 s, 72℃ 60 s, 35 个循环; 72℃ 5 min。取 PCR 产物 10 μL, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后检测位于 533 bp 的片段。③mecI 基因反应体系为 50 μL, 包括 10×PCR 缓冲液 5 μL, 2 mmol/L dNTPs 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μL, 10 mmol/L 引物 3 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.4 μL, 灭菌蒸馏水 26.6 μL, 上述葡萄球菌裂解液 5 μL, 加 30 μL 石蜡油覆盖, 高速离心片刻后置 PCR 仪中扩增。PCR 条件为 94℃ 5 min; 95℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。取 PCR 扩增产物 10 μL, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后检测位于 481 bp 的片段。(4) mecI 基因扩增产物酶切分型: 按产品说明书进行操作。酶切反应体系为 20 μL, 包括灭菌蒸馏水 8 μL, 10×缓冲液 2 μL, 10 U/μL TruI I 0.1 μL, PCR 产物 10 μL。65℃ 水浴箱孵育 2~3 h 后取酶切产物 5 μL, 经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染后观察酶切带型。(5) 抑制试验: 将 mecA 基因阴性、苯唑西林 MIC ≥ 4 μg/mL (表型为耐药) 的菌株用琼脂二倍稀释法分 2 组测定细菌 MIC, 第 1 组测定苯唑西林 MIC, 第 2 组不仅加入苯唑西林, 而且在每个浓度的抗菌剂中均加入终浓度为 5 μg/mL 的克拉维酸 (clavulanic acid, CA), 以观察 β-内酰胺酶对甲氧西林耐药性的影响。选择部分 mecA 基因阳性、β-内酰胺酶阳性或阴性葡萄球菌菌株如上同样检测。

2 结 果

2.1 158 株葡萄球菌苯唑西林 MIC 测定结果 见表 1。

表 1 158 株葡萄球菌苯唑西林 MIC 测定结果

菌种	苯唑西林 MIC(μg/mL)											耐药率 [% (n/n)]
	≥128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	≤0.125	
金葡	6	1	0	1	0	2	8	9	18	14	7	15.1 (10/66)
溶血	17	10	5	1	3	2	1	3	4	6	0	73.1 (38/52)
表葡	4	4	1	1	3	2	1	1	0	0	5	68.2 (15/22)
人型	1	0	1	0	0	0	2	0	1	1	1	28.6 (2/7)
耳	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	50.0 (2/4)
华纳	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	33.3 (1/3)
头	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0 (2/2)
松鼠	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.0 (0/1)
孔氏	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.0 (0/1)
合计	30	16	8	3	7	6	12	15	25	22	14	44.3 (70/158)

2.2 PCR 检测 mecA 基因 158 株葡萄球菌中共检出 mecA 基因阳性 70 株, 其中 SA 8 株, CNS 62 株; mecA 阴性 88 株, 其中 SA 58 株, CNS 30 株。

2.3 PCR 检测 mecI 基因、产物测序及 TruI I 酶切结果 对 mecA 阳性的 70 株葡萄球菌中, mecI 阳性 12 株, 其中 SA 7 株, CNS 5 株。5 株 CNS 中, 表皮葡萄球菌 1 株, 人型葡萄球菌 1 株, 溶血葡萄球菌 1 株, 头葡萄球菌 2 株。mecA 阴性的 88 株葡萄球菌均未检测到 mecI 基因。选择 1 株 mecI 阳性金葡萄菌株 C41, 对其 mecI 基因扩增产物进行直接测序, 与 pre-MR-SA 菌株 N315 mecI 基因序列进行比较, 证实为所需的特异性片断, 但在 202 位存在 C→T 突变。对 12 株 mecI 阳性葡萄球菌用内切酶 TruI I 进行分型, 7 株 SA 均为 II 型 (即 202 位存在

C→T 突变), 产生 1 个新的酶切位点 (-TTAA-)。5 株 CNS 均为 I 型 (即无新的 TruI I 酶切位点, 与 pre-MRSA 菌株 N315 mecI 基因的酶切型别相同)。

表 2 2 株 mecA 阴性产酶 SA 抑制试验结果

菌株号	β-内酰胺酶	mecA	苯唑西林 MIC(μg/mL)	
			不加 CA	加 CA
C30	+	—	4	0.25
C32	+	—	4	0.25

2.4 抑制试验结果 2 株 β-内酰胺酶阳性 SA C30、C32 为 mecA 基因阴性, 而苯唑西林 MIC 为 4 μg/mL (临界耐药), 加

CA 后,其苯唑西林 MIC 下降至 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (敏感)。结果见表 2。

3 讨 论

MRS 已成为世界范围内的一个公共卫生问题。由于抗菌剂的广泛应用,MRS 的检出率呈增高趋势。1997 年日本报道了对万古霉素耐药的 MRSA,其 MIC 达到 8 $\mu\text{g/mL}$ ^[5]。2006 年在美国发现对万古霉素耐药的葡萄球菌^[6]。由于 MRS 具有多药耐药性和高耐药性,给临床治疗带来了极大困难,成为临床抗细菌感染治疗中的一个难题。

本研究收集的 158 株葡萄球菌中,MRSA 耐药率为 15.1%,MRCNS 耐药率为 65.2%,MRSA 耐药率低于马均宝等^[7]报道的 75.7%,MRCNS 耐药率与其接近,可能与菌株来源、菌种分布不同有关。用 PCR 法对 158 株葡萄球菌进行的 mecA 基因检测结果以及与体外药敏试验结果的比较显示,在 70 株对苯唑西林耐药(MIC $\geq$ 4 $\mu\text{g/mL}$)的葡萄球菌中,有 68 株为 mecA 阳性,检出率为 97.2%(68/70)。在体外药敏试验中对苯唑西林敏感的 88 株菌中,有 2 株为 mecA 阳性,占 2.3%(2/88)。

尽管 mecA 基因存在于 MRSA 中,但 mecA 的表达在某些 SA 中受 mecR 负调节,mecR 由诱导活化调节子 mecR1 和抑制子 mecI 组成,MecI 蛋白的结构和作用也已逐渐阐明^[8]。研究认为表型耐药 MRSA 应发生 mecI 缺失或突变;即使 mecI 无突变,但在 mecA 的操纵子区(推测的 MecI 蛋白结合位点)存在突变,从而使 mecI 不能发挥对 mecA 转录的抑制作用,导致甲氧西林耐药性的表达。少数 mecI 及操纵子区无突变的 mecA 阳性 SA 为 pre-MRSA,即在常规药敏试验中对甲氧西林或苯唑西林表现为敏感。Chen 等^[9]报道美国纽约地区分离的 MRSA 菌株,住院患者以 SCCmecIV 为主,该型缺乏 mecI 基因;门诊患者以 SCCmecII 为主,该型具有 mecI 基因。本研究中,8 株 mecA 阳性 SA 的苯唑西林 MIC 为 16 $\mu\text{g/mL}$ 至大于 128 $\mu\text{g/mL}$,均为耐药株,其中 7 株为 mecI 阳性,占 87.5%(7/8),与潘军等^[10]报道的 SCCmecIII 型占 89.0%一致(SCCmecIII 型包含 mecI 基因)。7 株 SA 的 mecI 扩增产物经 TruI 酶切均为 II 型,说明在 202 位有 C $\rightarrow$ T 突变,与余方友等^[11]的报道一致。该突变导致在 mecI 阅读框的中部产生 1 个终止密码子,导致 MecI 蛋白不完整,从而失去对 mecA 的抑制作用,甲氧西林耐药能完全表达。这些结果提示在 MRSA 中,往往存在 mecI 抑制基因的缺失或突变,以使甲氧西林耐药性能充分表达。在 MRCNS 中,mecI 抑制基因缺失占 91.9%(57/62),只有 5 株有 mecI 抑制基因,5 株 CNS 的 mecI 扩增产物经 TruI 酶切均为 I 型。Hisata 等^[12]报道日本健康小儿中,MRCNS 以 SCCmecIV 为主,该型缺乏 mecI 基因,与本研究 mecI 抑制基因缺失为主相一致。胡红焱等^[13]报道 MRCNS 的 mecI 抑制基因缺失占 28.6%,低于本研究的 91.9%。

尽管 PBP2a 为葡萄球菌耐甲氧西林的主要原因,并且已证实甲氧西林耐药性不是通过失活抗菌剂实现的,但在少数葡萄球菌菌株中发现其耐药性是由于大量产生了 β -内酰胺酶所

致。研究表明,当葡萄球菌能产生大量 β -内酰胺酶时,可以微弱水解耐酶青霉素(如苯唑西林、甲氧西林),从而产生耐药。本研究有 2 株 SA 对苯唑西林 MIC 为 4 $\mu\text{g/mL}$,处于临界耐药,但 mecA 阴性,加 5 $\mu\text{g/mL}$ β -内酰胺酶抑制剂 CA 后,再测定苯唑西林 MIC,发现 MIC 都下降了至少 8 倍,表明 β -内酰胺酶在部分临界耐药株中有一定的作用。

参考文献

- [1] Martin A,Cunha ML. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects[J]. Microbiol Immunol,2007,51(9):787-795.
- [2] 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,2006:755-762.
- [3] Kobayashi N,Taniguchi K,Kojima K, et al. Genomic diversity of mec regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*[J]. Epidermis Infect,1996,117(2):289-295.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory Standards; Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M100-S8[S]. Wayne Pa:NCCLS,1998.
- [5] Hiramatsu K,Hanaki H,Ino T, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility[J]. J Antimicrob chemother,1997,40(1):135-136.
- [6] Appelbaum PC. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Microbiol Infect,2006,12(Suppl 1):16-23.
- [7] 马均宝,崔东岚,吴智刚,等. MRSA 与 MRCNS 的临床感染特点及其耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(8):756-757.
- [8] Safo MK,Ko TP,Musayev FN, et al. Structure of the MecI repressor from *Staphylococcus aureus* in complex with the cognate DNA operator of mec[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun,2006,62(4):320-324.
- [9] Chen L,Mediavilla JR,Oliveira DC, et al. Multiplex real-time PCR for rapid *Staphylococcal* cassette chromosome mec typing[J]. J Clin Microbiol,2009,47(11):3692-3706.
- [10] 潘军,刘文恩,张运丽,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 基因分型及 PVL 基因研究[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(17):2541-2544.
- [11] 余方友,陈增强,刘存丽,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 mecI 基因的检测及多态性研究[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(7):794-797.
- [12] Hisata K,Kuwahara-Arai K,Yamanoto M, et al. Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococci* among Healthy Japanese Children[J]. J Clin Microbiol,2005,43(7):3364-3372.
- [13] 胡红焱,梁慧,刘丽萍,等. mecA、mecI 和 mecR1 基因在耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌中的分布与变异[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(3):301-303.

(收稿日期:2011-03-07)