

凝固酶阴性葡萄球菌主动外排基因 MsrA 的检测分析

金浩¹, 顾兵², 居会祥¹, 孙明忠¹

(¹盐城市第三人民医院检验科, 江苏 盐城 224001; ²南京医科大学第一附属医院医学检验科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 调查凝固酶阴性葡萄球菌(*coagulase negative staphylococci*, CNS)耐药现状, 采用 PCR 分别检测 *mecA* 及 *MsrA* 基因, 探讨主动外排系统在耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(*methicillin resistant coagulase negative staphylococci*, MRCNS)中的耐药机制, 为临床预测 MRCNS 耐药菌株的发展趋势、合理选用抗菌药物进行治疗及预防 MRCNS 的爆发流行提供依据。方法: 收集临床分离的 120 株 MRCNS, 采用 K-B 法作 11 种抗菌药物敏感试验, 并用聚合酶链反应(PCR)分别检测 *mecA* 及 *MsrA* 基因, 并将 3 种结果进行对比分析。结果: 120 株凝固酶阴性葡萄球菌中 *mecA* 基因阳性 79 株, 阳性率 65.8%, *MsrA* 基因阳性 26 株, 阳性率 21.7%, 且 *MsrA* 基因阳性菌株 *mecA* 基因全部呈阳性, 对 9 种抗生素的耐药率也明显高于 *MsrA* 基因阴性组。结论: PCR 检测 *mecA* 及 *MsrA* 基因可快速准确判定耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌, 一旦发现 *MsrA* 基因就应慎用大环内酯类、氟喹诺酮类、克林霉素类、 β -内酰胺类药物。

[关键词] 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌; *mecA* 基因; *MsrA* 基因; PCR

[中图分类号] R378.11

[文献标识码] B

[文章编号] 1007-4368(2012)05-713-03

凝固酶阴性葡萄球菌(*coagulase negative staphylococci*, CNS)是临床实验室分离的最常见的革兰阳性球菌, 耐药菌株不断增多, 且常呈多重耐药, 其耐药性比凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌更为严重^[1-2], 引起全球范围内的广泛关注。本院于 2010 年 6 月~2011 年 5 月分离出各种细菌 1 780 株, 其中凝固酶阴性葡萄球菌 265 株, 检出率 14.9%, 居各种革兰阳性球菌之首。*mecA* 基因只存在于耐甲氧西林的葡萄球菌中, 是其分子标志^[3], 采用 PCR 检测凝固酶阴性葡萄球菌中是否存在 *mecA* 基因是检测耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(*methicillin resistant coagulase negative staphylococci*, MRCNS)的金标准, 具有高度的特异性和灵敏度。近年来, 一系列研究表明, 主动外排机制是细菌产生多重耐药的主要原因^[4], 在凝固酶阴性葡萄球菌中发现的主动外排系统主要为 *MsrA*。为了解 *MsrA* 在凝固酶阴性葡萄球菌多重耐药中的作用, 本研究从 265 株凝固酶阴性葡萄球菌中随机抽取 120 株, 分别采用 K-B 法作 11 种抗菌药物敏感试验及 PCR 法分别检测 *mecA* 及 *MsrA* 基因, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

2010 年 6 月~2011 年 5 月临床分离的凝固酶

阴性葡萄球菌 265 株, 来自盐城市第三人民医院检验科, 从中随机抽取 120 株, 经 API 微生物鉴定系统重新确证, 质控菌株为 ATCC25923。

1.1.2 药敏纸片、试剂及仪器

青霉素(P)、苯唑西林(OX)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、头孢唑林(KZ)、红霉素(E)、左旋氧氟沙星(LEV)、克林霉素(DA)、复方新诺明(SXT)、四环素(MH)、万古霉素(VA)、利奈唑胺(LZD)和 M-H (Mueller-Hinton)琼脂为英国 Oxoid 公司产品, 酚和氯仿为美国 Sigma 公司产品, 溶菌酶、TE-10%SDS、Protease K、10×Buffer、dNTPs、MgCl₂、Taq DNA Polymerase 均为美国 Promega 公司产品, 引物合成由美国 Invitrogen 公司完成。ABI7500 PCR 荧光定量扩增仪为美国 ABI 公司产品, 电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定与常规药敏试验

细菌鉴定严格按《全国临床检验操作规程》(第 3 版)及 API 微生物鉴定系统操作步骤进行操作, 采用 K-B 法作药物敏感试验, 按 CLSI 2010 年标准判读结果, 质控菌株为 ATCC25923。细菌耐药率的计算: 耐药率=组内耐药菌株数/组内检测总株数×100%。

1.2.2 细菌 DNA 提取

采用改良酚氯仿抽提法提取细菌 DNA, 用

ATCC25923 作为阳性对照,用无菌去离子水作为阴性对照。取适量新鲜转种的细菌至含 1 ml 生理盐水的离心管中,2 500 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀加 20 mg/L 溶菌酶 100 μ l,振荡,37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。15 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 TE-10% SDS 100 μ l,Protease K (10 mg/ml)4 μ l,55 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,煮沸 5 min,加生理盐水 300 μ l,5 mol/L NaCl 5 μ l,饱和酚 200 μ l,氯仿 200 μ l,振荡,15 000 r/min 离心 15 min。取 400 μ l 水相,加 1 ml 预冷无水乙醇置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 30 min,15 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加 75%酒精 400 μ l,洗涤沉淀 1 次,10 000 r/min 离心 10 min,晾干,加 TE 缓冲溶液 60 μ l 溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 细菌 DNA 鉴定

测量细菌 DNA 在 260 nm、280 nm 处吸光度,并经 50 倍稀释后用 0.9%的琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.2.4 引物设计

mecA 参照文献[5]设计引物,上游引物为:5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3',下游引物为:5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3',扩增片段为 533 bp。*MsrA* 参照文献[6]设计引物,上游引物为:5'-GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG-3',下游引物为:5'-AAGTTATATCATGAATAGATTGTC CTGTT-3',扩增片段为 940 bp。

1.2.5 PCR 扩增

mecA 基因测定采用 50 μ l 反应体系:10 \times Buffer 5 μ l,dNTPs(200 μ mol/L)4 μ l,MgCl₂(2 mmol/L) 3 μ l,上下游引物 (10 pmol/L) 各 2 μ l,*Taq* DNA Polymerase(1.5 U)0.3 μ l,无菌去离子水 32.7 μ l,模板 1 μ l。循环参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,

55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 40 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。*MsrA* 基因测定采用 50 μ l 反应体系:10 \times Buffer 5 μ l,dNTPs(200 μ mol/L) 4 μ l,上下游引物(10 pmol/L) 各 0.5 μ l,*Taq* DNA Polymerase(1.5 U)0.3 μ l,无菌去离子水 33.75 μ l,模板 DNA 3 μ l。循环参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 40 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.2.6 PCR 反应产物检测

取 PCR 反应产物 8 μ l,加溴乙锭染色液 6 \times Loading Buffer 1 μ l,混匀,点样于 20 g/L 的琼脂糖凝胶中进行电泳(电压 100 V,时间 40 min)。

1.3 统计学方法

应用 SPSS12.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析。数据用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌 DNA 鉴定结果

所有提取的细菌 DNA 纯度在 1.75~1.90,电泳均可见 DNA 条带。

2.2 120 株凝固酶阴性葡萄球菌对 11 种抗生素的耐药率

120 株凝固酶阴性葡萄球菌按表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*)、溶血葡萄球菌(*S.heamolyticus*)、腐生葡萄球菌(*S.saprophyticus*)和人型葡萄球菌(*S.hominis*)分为 4 组,对青霉素、苯唑西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢唑林、红霉素、左旋氧氟沙星、克林霉素、复方新诺明、四环素等 9 种抗生素的耐药率在 21.5%~98.7%,耐药状况较为严重,万古霉素、利奈唑胺未发现耐药菌株(表 1)。

表 1 120 株凝固酶阴性葡萄球菌对 11 种抗生素的耐药率

(%)

| | P | OX | SAM | KZ | E | LEV | DA | SXT | MH | VA | LZD |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| 表皮葡萄球菌 | 83.6 | 65.5 | 73.2 | 52.8 | 68.9 | 39.2 | 42.7 | 49.1 | 21.5 | 0.0 | 0.0 |
| 溶血葡萄球菌 | 86.8 | 69.7 | 77.5 | 56.6 | 71.6 | 44.3 | 46.5 | 51.6 | 25.0 | 0.0 | 0.0 |
| 腐生葡萄球菌 | 98.7 | 80.8 | 83.7 | 62.5 | 78.6 | 51.9 | 52.1 | 60.2 | 31.6 | 0.0 | 0.0 |
| 人型葡萄球菌 | 83.4 | 63.6 | 75.4 | 58.3 | 72.2 | 43.6 | 55.6 | 56.5 | 30.9 | 0.0 | 0.0 |

P:青霉素 G;OX:苯唑西林;SAM:氨苄西林/舒巴坦;E:红霉素;LEV:左旋氧氟沙星;DA:克林霉素;SXT:复方新诺明;MH:四环素;VA:万古霉素;LZD:利奈唑胺。

2.3 *mecA* 基因检测结果

120 株凝固酶阴性葡萄球菌中 *mecA* 基因阳性 79 株,阳性率 65.8%。

2.4 *MsrA* 基因检测结果

120 株凝固酶阴性葡萄球菌经 PCR 扩增,有 26 株可见一条 940 bp 大小的 DNA 片段,为 *MsrA* 基因

阳性,阳性率 21.7%,其中在表皮葡萄球菌中 *MsrA* 阳性率 27.4%,溶血葡萄球菌中 *MsrA* 阳性率 14.3%,腐生葡萄球菌中 *MsrA* 阳性率 11.1%,人型葡萄球菌由于试验菌株较少,未检出 *MsrA* 基因(表 2)。

2.5 *MsrA* 基因与 *mecA* 基因及耐药表型比较

根据 *MsrA* 基因检测结果分为阳性和阴性两

组,26 株 MsrA 基因阳性菌株 mecA 基因全部阳性,11 种抗生素中除万古霉素、利奈唑胺未发现耐药菌株外,其余 9 种抗生素的耐药率经统计学处理,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 3)。

表 2 120 株凝固酶阴性葡萄球菌中 MsrA 基因分布(株)

| | MsrA | |
|--------|------|----|
| | + | - |
| 表皮葡萄球菌 | 20 | 53 |
| 溶血葡萄球菌 | 5 | 30 |
| 腐生葡萄球菌 | 1 | 8 |
| 人型葡萄球菌 | 0 | 3 |

表 3 120 株凝固酶阴性葡萄球菌 MsrA 基因检测结果及对 11 种抗生素的耐药率 (%、n/n)

| | MsrA | | P 值 |
|-----|---------------|--------------|---------|
| | + | - | |
| P | 100.0 (26/26) | 81.9 (77/94) | 0.019 3 |
| OX | 96.2 (25/26) | 59.6 (56/94) | 0.000 4 |
| SAM | 96.2 (25/26) | 69.1 (65/94) | 0.004 9 |
| KZ | 88.5 (23/26) | 45.7 (43/94) | 0.000 1 |
| E | 96.2 (25/26) | 62.8 (59/94) | 0.001 0 |
| LEV | 69.2 (18/26) | 34.0 (32/94) | 0.001 3 |
| DA | 73.1 (19/26) | 37.2 (35/94) | 0.001 1 |
| SXT | 69.2 (18/26) | 45.7 (43/94) | 0.034 0 |
| MH | 38.5 (10/26) | 19.1 (18/94) | 0.039 3 |
| VA | 0.0 (0/26) | 0.0 (0/94) | 1.000 0 |
| LZD | 0.0 (0/26) | 0.0 (0/94) | 1.000 0 |

P:青霉素 G;OX:苯唑西林;SAM:氨苄西林/舒巴坦;E:红霉素;LEV:左旋氧氟沙星;DA:克林霉素;SXT:复方新诺明;MH:四环素;VA:万古霉素;LZD:利奈唑胺。

3 讨论

葡萄球菌是临床上最常见、易引起院内感染的重要病原菌之一。近几年由于免疫抑制剂、广谱及超广谱抗生素等在临床上的广泛使用,使葡萄球菌的临床分离率呈增加趋势,其中尤以凝固酶阴性葡萄球菌增加为主。凝固酶阴性葡萄球菌具有多药耐药特征,常呈多重耐药,本研究结果与文献报道相似^[7]。如此高的耐药率考虑与目前抗生素的不合理使用包括大量滥用抗生素、治疗时间过长、给药方式不合理以及临床医师对凝固酶阴性葡萄球菌的重视程度不够等有关。

近年来的研究发现主动外排机制是细菌产生多重耐药的主要机制,多重耐药菌株中的主动外排系统能够显著降低细胞内抗菌药物的浓度,同时由于主动外排系统转运底物的广泛性,使细菌呈现对多种化学结构完全不同的抗菌药物高度耐药^[8]。

在凝固酶阴性葡萄球菌中发现的主动外排系统主要为 MsrA 基因^[9],它能泵出大环内酯类^[10]、氟喹诺酮类药物,还能诱导克林霉素产生耐药。本研究中 MsrA 阳性组对 9 种抗生素的耐药率明显高于 MsrA 基因阴性组,且 mecA 基因全部阳性,其中尤以头孢唑林、红霉素、克林霉素、左旋氧氟沙星、氨苄西林/舒巴坦差异更为显著。因此,一旦发现 MsrA 基因就应慎用大环内酯类、氟喹诺酮类、克林霉素类、 β -内酰胺类药物。

本研究发现 MsrA 在表皮葡萄球菌中的检出率 27.4%,溶血葡萄球菌中检出率 14.3%,腐生葡萄球菌检出率 11.1%,人型葡萄球菌由于试验菌株较少未检出 MsrA 基因,这可能是不同种葡萄球菌耐药性不同的主要原因,还有待于进一步研究和探讨,为合理选用抗菌药物提供依据。

[参考文献]

- [1] Melo-Cristino J. Antimicrobial resistance in staphylococci and enterococci in 10 Portuguese hospitals in 1996 and 1997[J]. Microb Drug Resist,1998,4(4):319-324
- [2] 金 浩,顾 兵,赵旺胜,等.耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 mecA 基因检测分析 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2006,26(10):906-908
- [3] Alexander BD,Perfect JR. Antifungal resistance trends towards the year 2000[J]. Drugs,1997,54(5):657-678
- [4] Nikaido H. Multidrug efflux pump of gram-negative bacteria[J]. J Bacteriol,1996,178(20):5853-5859
- [5] Murakami K,Minamide W,Wada K,et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction [J]. Clinical Microbiol,1991,29(10):2240-2244
- [6] Lina G,Quaglia A,Reverdy ME,et al. Distribution of genes encoding resistance to macrolides,lincosamides and streptogramins among staphylococci [J]. Antimicrob Agents Chemother,1999,43(5):1062-1066
- [7] 董明驹,史 莉.凝固酶阴性葡萄球菌医院感染及体外耐药监测[J].中华医院感染学杂志,2009,19(3):328-330
- [8] Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance [J]. J Antimicrob Chemother,2005,56(1):20-51
- [9] Ross JI,Eady EA,Cove JH,et al. Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact [J]. Gene,1995,153(1):93-98
- [10] Wondrack L,Massa M,Yang BV,et al. Clinical strains of Staphylococcus aureus inactivates and causes efflux of macrolides [J]. Antimicrob Agents Chemother,1996,40(4):992-998

[收稿日期] 2011-11-02