

# 昆明地区 MRSA 多重耐药情况与 *mecA*、*femA* 基因检测分析

马晓波 陈端 单斌

作者单位: 650032 云南省, 昆明医学院第一附属医院检验科

**【摘要】** 目的 了解昆明地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的耐药现状,分析耐药基因 *mecA*、*femA* 与多重耐药性的相关性。方法 4家医院合作,采用头孢西丁及苯唑西林纸片扩散法鉴定 MRSA;最小抑菌浓度法(MIC法)检测菌株耐药率;PCR法检测 *mecA*、*femA* 基因。结果 2002年至2008年共检出金黄色葡萄球菌2833株,其中MRSA为1916株,7年分离率分别为36.3%、58.8%、66.9%、55.5%、68.4%、76.5%、81.4%;多重耐药率为99.11%。MRSA除对利奈唑胺和万古霉素为100%敏感外,对青霉素类为100%耐药,同时,对环丙沙星、红霉素、克林霉素、利福平、复方新诺明、四环素和庆大霉素也有较高耐药率。随机抽样的239株MRSA中 *mecA* 基因阳性率为87.0%(208/239);*femA* 基因阳性率为100%。*mecA* 阳性菌株的多重耐药率高于 *mecA* 阴性菌株( $P < 0.05$ )。*mecA* 与多重耐药率之间有较好的相关性( $r = 0.6213$ ,  $P < 0.05$ )。结论 昆明地区MRSA的检出率逐年升高且多重耐药现象严重,*mecA* 阳性菌株的多重耐药率高于 *mecA* 阴性菌株,*mecA* 与多重耐药率之间有较好的相关性。

**【关键词】** 抗药性;细菌;药物监测;聚合酶链反应;基因

## Analysis of the *mecA* gene, *femA* gene and the multiresistance situation of MRSA in Kunming

MA Xiao-bo, CHEN Duan, SHAN Bin. Department of Laboratory, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the antibiotic resistance present status for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Kunming. To analyze the correlation between the resistance gene *mecA*, *femA* and the multi-drug resistance. **Methods** MRSA were identified by the cefoxitin and oxacillin disk diffusion methods and the antibiotic resistance rates were detected by the minimum inhibitory concentration (MIC) test and the *mecA* and *femA* gene were monitored by PCR in the four hospital jointly. **Results** From 2002 to 2008, the 2833 *Staphylococcus aureus* strains were detected, in which MRSA was 1916 strains. During the 7 years isolation rates of MRSA were in turn 36.3%, 58.8%, 66.9%, 55.5%, 68.4%, 76.5%, 81.4%. The multi-drug resistance rate of MRSA was 99.11%. Besides, the sensitive rate of MRSA to linezolid and vancomycin was 100%, the drug resistant rate of MRSA to penicillins was 100%. In addition, the drug resistant rates to ciprofloxacin, erythromycin, clindamycin, rifampin, SXT, tetracycline and gentamicin were higher. The positive rate of the *mecA* gene was 87.0% (208/239) and that of the *femA* gene was 100% in 239 MRSA strains randomly sampling. The multi-drug resistant rate of the *mecA* positive strains was higher than that of the *mecA* negative strains ( $P < 0.05$ ). There was correlation between the *mecA* gene and the multi-drug resistance of MRSA ( $r = 0.6213$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The detection rate of MRSA increases with years and the multi-drug resistant status is serious, and the multi-drug resistant rate of the *mecA* positive strains is higher than that of the *mecA* negative strains, there is better correlation between the *mecA* gene and the multi-drug resistant rate.

**【Key words】** Drug resistance, bacterial; Drug monitoring; Polymerase chain reaction; Gene

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 现已成为医院和社区感染的常见病原菌。MRSA 在美国大型教学医院占全部金黄色葡萄球菌感染的60%~80%<sup>[1]</sup>, 在我

国综合性大医院的检出率为70%或更高<sup>[2]</sup>, 且具有感染部位多、多重耐药、临床治疗棘手等特点。本研究对昆明地区MRSA感染及多重耐药性进行调查并检测耐药基因 *mecA*、*femA* 的情况。

## 1 材料和方法

**1.1 菌株来源** 根据美国临床实验室标准化委员会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 2002-2008 年标准, 统一四家医院 (昆医附一院、昆医附二院、省一院、昆明市延安医院) 培养、鉴定及药物敏感性试验的方法, 对 2002 年至 2008 年分离的金黄色葡萄球菌进行监测, 分为 MRSA 及甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)。质控菌株: 大肠埃希菌 ATCC25922, 金黄色葡萄球菌 ATCC25923 及 ATCC43300 均购自卫生部临检中心。

**1.2 细菌培养及鉴定** 人工培养、鉴定按照《全国临床检验操作规程》进行; 仪器 (VITEK-32 或 VITEK-2) 培养、鉴定及药物敏感检测严格按仪器操作手册说明进行。

**1.3 菌株耐药检测** 采用头孢西丁及苯唑西林纸片扩散法进行 MRSA 耐药检测。①30  $\mu$ g 头孢西丁纸片扩散法, 抑菌圈直径  $\leq 19$  mm (2002 年~2006 年);  $\leq 21$  mm (2007 年~2008 年) 为耐药。②1  $\mu$ g 苯唑西林纸片扩散法, 抑菌圈直径  $\leq 10$  mm 为耐药, 11~12 mm 为中介。

### 1.4 mecA 基因与 femA 基因的检测

**1.4.1 染色体 DNA 提取** 使用细菌基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒 (购自上海华舜生物工程有限公司) 提取表型为 MRSA 的染色体 DNA, 操作严格按说明书进行。

**1.4.2 PCR 扩增** 寡核苷酸引物委托上海生工生物工程有限公司合成, 参照 Vannuffel 等<sup>[3]</sup>报道的寡核苷酸序列。

mecA:

Primer M1: 5'-TGGCTATCGTGTCAATCG-3'

Primer M2: 5'-CTGGAACCTGTTGAGCAGAG-3'

femA:

Primer F1: 5'-CTTACTTACTGGCTGTACCTG-3'

Primer F2: 5'-ATGTCGCTTGTATGTGC-3'

PCR 扩增: 扩增反应总体积为 50  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 5  $\mu$ l; 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ l; 10 mmol/L

4 $\times$ dNTP 1.25  $\mu$ l; 50 Pmol 引物; 模板 DNA 5  $\mu$ l; 1.0 U TagDNA 多聚酶。循环参数为预变性 92  $^{\circ}$ C 3 min 后, 进行 30 个循环, 92  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 3 min。扩增 mecA 基因时以 ATCC25923 为阴性对照, ATCC43300 为阳性对照, 预扩增片段为 310 bp; 扩增 femA 基因时以 ATCC25922 为阴性对照, ATCC25923 为阳性对照, 预扩增片段为 686 bp。

**1.4.3 PCR 扩增产物的电泳分析** 采用琼脂糖凝胶电泳法进行。抽样 4 株扩增阳性的产物测序。

**1.5 统计学处理** 多重耐药 (对三类及三类以上的抗菌药物同时耐药) 统计采用 WHONET5.0。数据统计采用 SPSS13.0, 其中 mecA 阳性菌株与 mecA 阴性菌株的多重耐药率比较应用确切概率法, mecA 基因与多重耐药率的相关性采用相关分析。

## 2 结果

**2.1 监测结果** 7 年共分离金黄色葡萄球菌 2833 株, 其中 MRSA 为 1916 株, 7 年分离率分别为 36.3%、58.8%、66.9%、55.5%、68.4%、76.5%、81.4%。MSSA 为 917 株, 分离率见表 1。

**2.2 药敏结果** 在 1916 株 MRSA 中, 多重耐药株为 1899 株 (99.11%); 1916 株 MRSA 对糖肽类 (万古霉素) 和噁唑烷酮类 (利奈唑胺) 抗菌药物均敏感。1916 株 MRSA 对抗生素类药物体外药物敏感试验结果及地区平均 MIC 值见表 2。

### 2.3 PCR 检测 mecA 与 femA 结果

**2.3.1 mecA 基因阳性率** 随机抽样的 239 株 MRSA 中, 208 株 mecA 基因阳性, 阳性率为 87.0% (208/239); femA 基因全部为阳性, 测序结果与核酸序列数据库 GenBank 对比分析两者核苷酸序列同源性分别为 99%、100% (如图 1)。

**2.3.2 mecA 阳性菌株与 mecA 阴性菌株的多重耐药率比较** mecA 阳性菌株的多重耐药率高于 mecA 阴性菌株, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 3)。

**2.3.3 mecA 基因与多重耐药率的相关性分析** MRSA 中 mecA 基因与多重耐药率之间有较好的相关性 ( $r = 0.6213$ ,  $P < 0.05$ , 表 3)。

表 1 7 年 MSSA、MRSA 的分离率 [株 (%)]

菌名	2002 年	2003 年	2004 年	2005 年	2006 年	2007 年	2008 年
MSSA	142(63.7)	106(41.2)	91(33.1)	186(44.5)	137(31.6)	127(23.5)	128(18.6)
MRSA	81(36.3)	151(58.8)	184(66.9)	232(55.5)	296(68.4)	413(76.5)	559(81.4)

表 2 1916 株 MRSA 对抗生素类药物体外药物敏感试验结果及地区平均 MIC 值

抗生素类药物	耐药率 (%)	MIC 值 (μg/ml)
青霉素	100.00	-
氨苄西林	100.00	32.00
苯唑西林	100.00	3.78
红霉素	96.90	7.19
环丙沙星	95.20	7.00
克林霉素	95.20	6.75
利福平	87.30	-
氨苄西林/舒巴坦	77.90	24.10
四环素	74.30	-
庆大霉素	65.30	-
复方新诺明	43.00	3.15
利奈唑胺	0	2.05
万古霉素	0	-

表 3 MRSA 中 mecA 阳性菌株与 mecA 阴性菌株的多重耐药率比较

mecA 基因	多重耐药株 (n)	非多重耐药株 (n)	多重耐药率 (%)
阳性	208	0	100.00
阴性	18	13	58.06

(panton-valentine leukocidin, PVL) MRSA 在社区或医院流行, 有研究发现 PVL 可作为社区获得性 MRSA 的分子标志物之一用于新发感染监测<sup>[7]</sup>。从本次昆明地区 MRSA 多重耐药的分析判断, 推测多为医院感染菌株, 而非社区获得性 MRSA, 区分医院或社区获得性 MRSA 尚有待进行葡萄球菌染色体盒 (SCCmec 盒) 的分型及 PVL 的检测。

mecA 基因是 MRSA 的耐药决定基因, 编码合成相对分子质量为  $76 \times 10^3$  的青霉素结合蛋白 2a (PBP2a)。本文研究结果显示随机抽取的 239 株 MRSA 中 mecA 基因阳性率为 87.0%, 比文献报道的 MRSA 中 mecA 基因阳性率为 91.7% 略低<sup>[8]</sup>。mecA 阳性菌株的多重耐药率高于 mecA 阴性菌株, mecA 与多重耐药率之间有良好的相关性。femA 基因是甲氧西林耐药的辅助基因, 也是金黄色葡萄球菌的固有基因, 因此 mecA 和 femA 基因均为阳性, 方能确认为 MRSA。在 239 株 MRSA 中 femA 基因全部为阳性, 说明所选菌株均为金黄色葡萄球菌。femA 基因可以影响 mecA 基因的表达, 其辅助耐药性可能与其表达水平有关。femA 与 mecA 之间具体的相互关联以及敲除 femA 基因是否可使 MRSA 耐药水平降低, 仍有待进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 Wenzel RP, Nettleman MD, Jones RN, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and effective control measures. *Am J Med*, 1991, 91: 221S-227S.
- 2 上海地区细菌耐药性检测协作组. 上海地区细菌耐药性检测. *中国抗感染化疗杂志*, 2002, 2: 1-9.
- 3 Vannuffel P, Laterre PF, Bouyer M, et al. Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *J Clin Microbiol*, 1998, 3: 2366-2368.
- 4 李家泰, Wein AJ, 杨敏. 中国细菌耐药监测研究. *中华医学杂志*, 2001, 81: 8-16.
- 5 Shah PM. The need for new therapeutic agents: what is the pipeline? *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11: S36-S42.

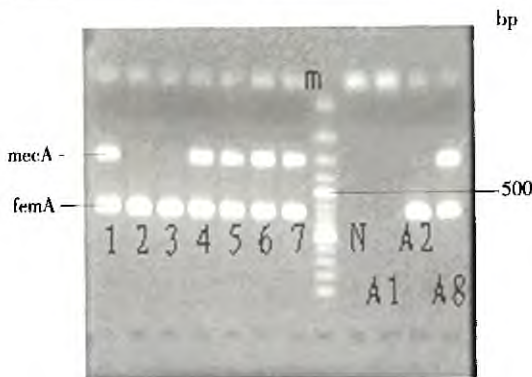


图 1 MRSA 1~7 号 PCR 产物

注: m: marker 为 DL 2 000; N: 阴性对照; A1: ATCC25922; A2: ATCC25923; A8: ATCC43300。MRSA 1~7 号 PCR 产物中, 2 与 3 号仅出现 femA 条带, 说明表型为 MRSA 而基因型为 mecA 阴性, 其余 1、4~7 号均为 mecA 与 femA 双条带, 说明表型与基因型一致

#### 3 讨论

金黄色葡萄球菌中 MRSA 分离率逐年升高, 在 36.3%~81.4% 之间, 与国内近年来报道相似。2001 年上海 9 所医院 MRSA 分离率在 49.4%~80.4% 之间, 同年李家泰报道 14 家医院 MRSA 的分离率为 60.7% 且有地域差别 (33.3%~78.4%), 上海最高<sup>[2, 4]</sup>。

糖肽类抗生素类药物是公认的对革兰阳性菌具有良好抗菌作用的药物<sup>[9]</sup>。所检测的 1916 株 MRSA 对糖肽类 (万古霉素) 和噁唑烷酮类 (利奈唑胺) 抗生素类药物均敏感。MRSA 多重耐药情况严重, 多重耐药率为 99.11%。近年来, 有文献<sup>[6]</sup>报告产杀白细胞素

- 6 McClur JA, Conly JM, Lau V, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination methicillin-susceptible from resistant Staphylococci. J Clin Microbiol, 2006, 44: 1141-1144.
- 7 Gilbert M, MacDonald J, Gregson D, et al. Outbreak in Alberta of community acquired (USA300) methicillin resistant Staphylococcus aureus

in people with a history of drug use, homelessness or incarceration. CMAJ, 2006, 175: 149-154.

- 8 Petinaki E, Kontos F, Miriagou V, et al. Survey of methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci in the hospitals of central Greece. Int J Antimicrob Agents, 2001, 18: 563-566.

(收稿日期: 2009-09-07)

(本文编辑: 尚玮)

## 消 息

### 《实用检验医学》出版新闻发布会报道

中国医师协会检验医师分会网站

金秋十月,桂花飘香。《实用检验医学》主、副编会议暨《实用检验医学》出版新闻发布会于 2009 年 10 月 18 日在处处可闻桂花迷人芳馨的杭州成功、圆满的召开了。《实用检验医学》在总主编丛玉隆教授和 8 位主编的共同努力以及 150 余位检验专家、学者的积极参与下,历经近 3 年的撰写与整理,在人民卫生出版社出版团队的共同打造下,于今年 6 月份已经顺利出版。正如李清照《鹧鸪天》中所赞“何须浅碧深红色,自是花中第一流”,桂花备受人们的喜爱,所以它也成为至高荣誉的代名词了。那么《实用检验医学》的出版也正如“桂花”一样绽放它的光彩和荣耀,是全国检验界的一流专家,一流团队所打造出的一流学术巨作。全书汇聚全国四个直辖市、十七个省的 46 个单位,其中还包括北京大学等 22 所院校以及解放军总医院、三所军医大学、四个军区总院等专家、学者共同撰写的。总主编及 8 位主编皆为本专业国内知名专家、学科带头人,大部分担任全国相关学术组织的主委、副主委等职务。

丛玉隆教授在会上强调:《实用检验医学》撰写的宗旨是汇集本专业全国知名专家写出一部精品,强化一种理念,培养一批人才,组建一个优秀的团队。撰写该著作的指导思想是以医学检验技术为主线,以疾病诊断治疗为目标,以检验临床结合为中心,以服务人类健康为目的。该书的特点:全面、严谨、创新、实用、新颖、权威。全书分上下两册,8 篇共 134 章,涵盖了医学实验室全部工作内容,既有内容的相连性又可独立成册(两个书号),便于满足不同的需求(本书还配备光盘)。

总之,该著作的资料弥足珍贵,主编的精神难能可贵,贯穿于全书的思维模式和工作理念尤为宝贵。检验医学是重要的临床学科之一。相信《实用检验医学》的出版发行将使检验医学在各种疾病的诊治,以及康复和预防工程中发挥更大的作用,推动这一学科的发展,造福于患者和社会。期望《实用检验医学》能一版再版的延续下去,并逐渐做成长版、畅销的精品传世图书,为我国检验医学的发展做出卓越的贡献。

附:总主编及主编简介

总主编丛玉隆教授:中国医师协会检验医师分会会长,《中华检验医学杂志》总编辑,中华医学会检验分会前任主委,《实用检验医师杂志》主编。

主编王鸿利教授:中华医学会医学教育分会主委。

主编仲人前教授:中国临床免疫学会会长,上海检验分会主委。

主编周新教授:多届湖北省检验学会主委,全国血脂学术委员会主委。

主编童明庆教授:中华医学会检验分会副主委,江苏省检验学会主委。

主编王金良教授:多届中华医学会检验学会副主委,天津检验分会主委。

主编李晓军教授:全国全军检验学会委员、江苏检验学会副主委。

主编涂植光教授:多届中华医学会检验分会常委。

主编熊立凡教授:中华医学会血液体液专业委员会委员。