

MRSA PBP_{2a}表达的影响因素及 MecA 基因的检测价值

吴本权, 唐英春, 张扣兴, 张天托

(中山医科大学附属第三医院内科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨温度、pH、盐浓度对甲氧西林耐药金葡萄菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus MRSA)青霉素结合蛋白_{2a}(penicillin-binding protein, PBP)表达的影响, 以及 PBP_{2a}编码基因 MecA 的检测价值。【方法】采用聚合酶链式反应(PCR)检测 MRSA 特异性 MecA 基因和美国临床实验室标准委员会(NCCLS)推荐的琼脂板稀释法(32 °C, pH7.2, 40 g/L NaCl 苯唑西林 MIC \geq 4 mg/L)筛选 MRSA。检测 20 株 MRSA 在不同温度、pH、盐浓度时对苯唑西林、头孢唑林和头孢他啶的体外药物敏感性, 测定 MIC 范围, MIC₅₀和 MIC₉₀; SDS-PAGE 分析 10 株 MRSA 膜青霉素结合蛋白(PBP_{2a})在不同培养条件时表达数量的差异, 并进行配对差值的 *t* 检验。【结果】180 株金葡萄菌检测出 MecA 基因阳性 MRSA 56 株, 按琼脂板稀释法检出 52 株 MRSA, 4 株未被检出(苯唑西林 MIC 分别为: 2, 2, 1, 0.5 mg/L), 37 °C、pH 5.2 和 9 g/L NaCl 分别与 32 °C、pH 7.2 和 40 g/L NaCl 条件下诱导 10 株 MRSA, 所表达的 PBP_{2a}含量前后比较差值有显著性($P: 0.02 \sim 0.05, 0.01 \sim 0.005, 0.02 \sim 0.05$)。【结论】不同温度、pH、盐浓度通过诱导耐药蛋白 PBP_{2a}的表达明显影响 MRSA 对苯唑西林、头孢唑林和头孢他啶耐药水平, 而其 MecA 基因却不受培养条件的影响, 可以快速检测 MRSA 感染。

关键词: 蛋白质结合; 甲氧西林抗药性; 葡萄球菌, 金黄色; 聚合酶链反应

中图分类号: R 378.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)02-0157-04

Factor Influencing PBP_{2a} Expression and the Significance of Detecting MecA Gene in MRSA

WU Ben-quan, TANG Ying-chun, ZHANG Kou-xing, ZHANG Tian-tuo

(Department of Internal Medicine, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To investigate effect of culture conditions on PBP_{2a} expression and significance of its MecA gene detected by PCR in MRSA.【Methods】MRSA were identified by their specific MecA gene and agar plate dilution method recommended by NCCLS (32 °C, pH7.2, 40 g/L NaCl, oxacillin MIC \geq 4 mg/L). The antimicrobial activities of oxacillin, cefazolin and ceftazidime against 20 MRSA at different culture conditions were tested and MIC range, MIC₅₀ and MIC₉₀ were counted and the relative amount of PBP_{2a} in 10 MRSA were analyzed by SDS-PAGE. Statistical significance was analyzed with *t*-tests.【Results】56 MRSA were isolated from 180 strains staphylococcus aureus through detecting MecA, but only 52 MRSA were identified using agar plate dilution method and 4 strains were missing for test (MIC of oxacillin 2, 2, 1, 0.5 ug/ml, respectively). In addition, the amount of PBP_{2a} in 10 MRSA at 37 °C, pH5.2 and 9 g/L NaCl were lower than 32 °C, pH7.2, and 40 g/L NaCl ($P: 0.02 \sim 0.05, 0.01 \sim 0.005, 0.02 \sim 0.05$).【Conclusion】The results showed that temperature, pH and concentration of salt have apparent effects on antimicrobial activities of oxacillin, cefazolin and ceftazidime against MRSA, but the detection of MecA gene may be used to diagnose MRSA infection earlier, without influenced by culture conditions.

Key words: protein binding; methicillin resistance; staphylococcus aureus; polymerase chain reaction

收稿日期: 1999-11-03

作者简介: 吴本权(1964-), 男, 广东广州人, 硕士, 讲师。

© 2000 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

耐甲氧西林金葡萄菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 呈高度多重耐药, 其感染病死率极高, 早期诊断十分重要, 但目前还没有可靠的鉴定方法^[1]。各地检出的 MRSA 占金葡萄菌的比例相差较大^[2], 常常漏诊, 并因盲目大剂量使用 β -内酰胺抗生素诱导出高度耐药的 MRSA。因此探讨培养条件对 MRSA 耐药性影响及其机制, 寻找理想的诊断方法有重要意义。我们比较不同培养条件对 MRSA 耐药性影响及其对耐药蛋白 PBP_{2a} (Pencillin-Binding-Protein, PBP_{2a}) 的诱导作用, 并就 PBP_{2a} 的编码基因 *MecA* 检测与目前美国临床实验室标准委员会 (NCCLS) 推荐的方法对 MRSA 诊断价值作比较。

1 材料和方法

1.1 菌种

180 株金葡萄菌是从我院 1995 ~ 1997 年住院病人的痰标本中分离, 按 NCCLS 推荐的琼脂板稀释法筛选 52 株 MRSA, MRSA 特异性 *MecA* 基因检测 56 株阳性。

1.2 主要试剂和配制方法

用于 MRSA 鉴定的引物为 *MecA* 基因文库中 623 bp (位置 5'-1321 ~ 1943 bp) 的特异性片段: 序列 1, 5'-AGTTGTAGTTGTCGGGTTTG-3'; 序列 2, 5'-AGTGGAACGAAGGTACATC-3'。LB 培养基 (修改): NaCl 40 g, 酵母浸膏 5 g, 胰蛋白胨 10 g, 蒸馏水 1 L; Mueller Hinton: 牛肉浸膏 2 g, 水解酪蛋白 17.5 g, 淀粉 1.5 g, 蒸馏水 1 L, 苯唑西林 (美国 Sigma 公司), 头孢唑林 (日本藤泽药品工业株式会社), 头孢他啶 (英国葛兰素公司)。Lyostaphin (50 mg/L), 脱氧胆酸钠 (10 g/L) (美国 Sigma 公司), 磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L Na₃PO₄, 10 mmol/L MgCl₂, pH7.2)。

1.3 MRSA 鉴定方法

琼脂板稀释法: 参照 NCCLS 标准, 将保存的 180 株金葡萄菌转种至 LB 培养基培养 24 h, 配成 10¹⁰ CFU/L 的细菌悬液, 沾取 2 μ L 接种在琼脂板上, 苯唑西林 MIC \geq 4 mg/L 为 MRSA。PCR 检测 MRSA 特异性 *MecA* 基因。条件参照文献 [3]。

1.4 体外药物敏感试验

苯唑西林, 头孢唑林, 头孢他啶按对倍稀释法加入不同 pH 和不同盐浓度的 M-H 平板中, 借助多头接种仪接种 20 株 MRSA (10⁷ CFU/L) 至上述平板中, 在 32 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 两种温度中分别孵育 24 h 后观察结果, 测抗生素的抑菌范围及 MIC₅₀ 和 MIC₉₀。

1.5 PBP_{2a} 的诱导

从 L-B 平板挑取单个 MRSA 菌落至 10 mL 不同 pH、不同盐浓度的 LB 液体培养基中在 32 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 两种不同温度中振荡过夜, 再转种至 300 mL 同样条件的 LB 培养基至对数生长期, 离心收集细菌加入葡萄糖菌溶菌素超声粉碎 (20kHz, 10 s, 10 次), 4 000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 上清液 100 000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 60min, 调节膜片浓度 4 mg/L, 加入脱氧胆酸钠 (10 g/L) 10 000 g 离心 10 min, 上清膜蛋白行 SDS-PAGE, 用分光光度扫描仪测定 PBP_{2a} 的相对含量^[4]。

2 结果

2.1 培养条件对 β -内酰胺药物的抗 MRSA 活性的影响

在 32 $^{\circ}$ C, pH7.2, 40 g/L NaCl 时耐药性较强, 苯唑西林, 头孢唑林和头孢他啶的 MIC₅₀、MIC₉₀ 分别为 200, 400, 400, 1 600, 800, 1 600 mg/L。依次改变培养条件后 MIC₅₀、MIC₉₀ 均有不同程度下降 (表 1)。

2.2 MRSA *MecA* 基因的检测价值

PCR 检测 180 株金葡萄菌是否为携带 *MecA* 基因的 MRSA, 结果 56 株金葡萄菌 *MecA* 基因阳性, 按

表 1 不同培养条件对 MRSA 体外药物敏感性的影响

Table 1	Effects of different culture conditions on the antimicrobial susceptibility <i>in vitro</i> of MRSA ($\rho_B / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)								
	Range			MIC ₅₀			MIC ₉₀		
	Oxacillin	Cefazolin	Ceftazidime	Oxacillin	Cefazolin	Ceftazidime	Oxacillin	Cefazolin	Ceftazidime
32 $^{\circ}$ C	50 ~ 800	50 ~ 1600	100 ~ 1600	200	400	800	400	1600	1600
37 $^{\circ}$ C	3.12 ~ 400	6.25 ~ 400	25 ~ 800	50	100	100	400	400	800
NaCl (9 g/L)	1.56 ~ 50	3.12 ~ 100	6.25 ~ 200	3.12	12.5	12.5	25	100	100
pH 5.2	0.39 ~ 3.12	0.78 ~ 12.5	3.12 ~ 25	0.78	1.56	6.25	3.12	6.25	25

NCCLS(32 °C, pH7.2, 40 g/L NaCl, 苯唑西林 MIC ≥ 4 mg/L)标准有4株漏检(苯唑西林 MIC: 2, 2, 1, 0.5 mg/L), MecA 基因检测却不受外界因素的影响^[5], 可以提高低度耐药菌的检出(图1)。



图1 MRSA 特异性 MecA 基因 PCR 检测结果

Fig. 1 The results of specific MecA gene of MRSA detected by PCR

1: control; 2: positive control; 3~16: MRSA; 17: marker; The results of agarose gel electrophoresis of PCR products showed that MecA gene with 623 bp existed in all 56 MRSA and positive control but didn't in negative control

2.3 温度、pH 和盐浓度对 MRSA PBP_{2a}表达的影响
10株 MRSA 在 32 °C, pH7.2, 40 g/L NaCl 诱导的 PBP_{2a}明显高于 37 °C, pH 5.2 及 9 g/L NaCl (表2)。

表2 温度、pH 和盐浓度对 10 株 MRSA PBP_{2a}的诱导作用
Table 2 Inducing effects of temperature pH and salt on PBP_{2a}in 10 strains MRSA

	$\bar{x} \pm s$	<i>t</i>	<i>P</i>
32 °C	11.65 ± 4.00		
37 °C	10.59 ± 2.91	2.616	0.02~0.05
pH 7.2	13.64 ± 4.27		
pH 5.2	7.26 ± 3.40	3.275	0.01~0.005
NaCl(40 g/L)	12.32 ± 3.15		
NaCl(9 g/L)	8.89 ± 4.34	2.368	0.02~0.05

3 讨论

20年代青霉素问世以来,金葡菌逐渐产生水解青霉素的β-内酰胺酶造成抗菌治疗失败,随后人们开发出对β-内酰胺酶稳定的半合成青霉素如苯唑西林和甲氧西林。60年代 Jevons 首次报道耐甲氧西林金葡菌(MRSA)^[6]后,MRSA 对包括甲氧西林在内的所有抗生素耐药,目前只有万古霉素对其敏感^[7],并且 MRSA 的分离率越来越高,呈世界流行。1982年 Yotota 发现 MRSA 除金葡菌具有的 PBP_{1,2,3,4}外,新出现一种 PBP_{2a}(78ku),不同于其

它 PBP,对β-内酰胺抗生素亲合性极低,是 MRSA 耐药的主要原因^[4]。所有 MRSA 都有 PBP_{2a}及其编码基因 MecA, MecA 表达受多种因素的影响,造成 MRSA 耐药的变异。但 MecA 基因的检测不受培养条件的影响^[5],与耐药程度无关^[9],因而受到临床的广泛关注。MRSA 高危多重耐药,其感染病死率极高,美国临床实验室标准委员会推荐的琼脂板对倍稀释法,在 32 °C, pH7.2 和 40 g/L NaCl 培养 24h, 苯唑西林 MIC ≥ 4 mg/L 为 MRSA。由于受种种因素的影响及 MRSA 本身耐药的异质性,对临界点浓度的判断也存在不同的标准,国内报告的分离率差异较大,造成诸多差异的原因是由于培养条件的不同诱导 MRSA 耐药水平的改变。

我们在不同培养条件下比较苯唑西林,头孢唑林和头孢他啶对 MRSA 的体外抗菌活性,在 32 °C, pH 7.2 和 40 g/L NaCl 时耐药性最强,当培养条件改变为 37 °C, pH 5.2 和 9 g/L NaCl 时耐药性有不同程度下降,特别是 pH 值改变影响最明显,3种抗生素的 MIC₉₀ 分别下降 128 倍、256 倍和 64 倍。培养条件明显影响 MRSA 的诊断。按琼脂板稀释法有 4 株低度耐药菌漏检。MRSA 对β-内酰胺抗生素耐药主要与 MecA 基因编码的 PBP_{2a}有关,本实验显示:耐药性增高的 MRSA 其 PBP_{2a}表达增多,温度、pH 和盐浓度改变所诱导的 PBP_{2a}含量亦不同。MecI 和 MecR1 为 MecA 的操纵基因^[8],理化因素可活化辅助诱导因子 MecR1,致抑制子 MecI 失活, MecA 表达大量 PBP_{2a}, MRSA 耐药水平增高。受培养条件的影响,MRSA 对β-内酰胺耐药呈现不均一性,按 MIC 标准判断,因条件不同出现 MIC 值偏差,可造成 MRSA 漏检,而通过 MecA 基因检测得以确诊。盲目使用β-内酰胺抗生素治疗漏检的 MRSA 则可诱导致命的耐药株,值得临床高度重视。PCR 检测快速简便,特别适用低度耐药菌的诊断。为了避免假阳性或假阴性,必须注意扩增条件的质控,设阳性和阴性对照,严格无菌操作程序。荧光定量 PCR 和巢式 PCR 可提高特异性和敏感性。也有作者提出用 PBP_{2a}单抗准确诊断真正意义的 MRSA (表达 PBP_{2a}),但由于受 MecA 基因活化程度的影响,有时表达极微,难以检出^[9]。

参考文献:

[1] Richard P, Meyran M, Carpentier E, *et al.* Comparaison

(下转封3页)

一个病理过程,也是导致神经系统病变进一步发展的重要环节^[2,3]。国外报道它与神经精神性狼疮明显相关,而且对弥漫性狼疮脑病的诊断更有意义^[4]。文献记载10年的前瞻性研究证实抗神经元抗体诊断弥漫性狼疮脑病敏感性为100%,特异性为86%。本研究方法(免疫组化)的敏感性40%,特异性为93%,虽然其敏感性不及放免法,但更具特异性(在系统性红斑狼疮患者中特异性为93%,在其它患者中特异性为100%)。以人脑为基质的抗神经元抗体检测对临床诊断神经精神性狼疮有很大的帮助,实用性明显优于脑CT、MR等检查方法^[5]。既往抗神经元抗体检测一直沿用SK-N-SH神经胚胎瘤细胞为基质的检测方法,而且在国内未得到开展。这不仅是由于对抗神经元抗体的意义缺少充分的认识,同时也与其检测繁琐有关。我们采用间接免疫荧光的方法大大简化了操作步骤,并能较快取得结果,便于临床推广应用。

参考文献:

- [1] Singer J, Denburg J A. Diagnostic criteria for neuropsychiatric systemic lupus erythematosus [J] . J Rheumatol, 1990, 17: 1397.
- [2] 陈维政, 张乃峥, 蒋明, 等. 抗神经元抗体与神经精神系统性红斑狼疮 [J] . 中华内科杂志, 1990, 29(3): 161.
- [3] West S G. Neuropsychiatric Lupus [J] . Rheum Dis Clin North America, 1994, 20(1): 129.
- [4] West S G, Emlen W, Wener M H, *et al.* Neuropsychiatric lupus erythematosus: a 10-year prospective study on the value of diagnostic tests [J] . Am J Med, 1995, 99(8): 153.
- [5] Bennahum D A, Messner R P, Shoop J D. Brain scan findings in central nervous system involvement by lupus erythematosus [J] . Ann Intern Med, 1994, 81(8): 763.

(编辑 黄小延)

(上接第159页)

of genotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J] . J Clin Microbiol, 1994, 32(3): 613.

- [2] 李家泰, 魏瑾. 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)感染的诊断和治疗 [J] . 中国临床药理学杂志, 1993, 9(2): 97.
- [3] 吴本权, 唐英春, 张扣兴, 等. PBP_{2a}体外诱导与MRSA的耐药关系 [J] . 中山医科大学学报, 1999, 20(3): 198.
- [4] Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephem-resistant *Staphylococcus aureus* [J] . Antimicrob Agents Chemother, 1985, 28(3): 397.
- [5] Serhat U, Joann H, Flokwitsch J E, *et al.* Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J] . J Clin Microb, 1992, 30(7): 1685.
- [6] Jevons M P. "Celbenin"-resistant *Staphylococci* [J] . Br

Med J, 1961, Jan(1): 124.

- [7] Mulligan M E, Murray Leissure K A, Riber R S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management [J] . Am J Med, 1993, 94(3): 313.
- [8] Kobuyushi N, Tuniguchi K, Kojima K, *et al.* Genomic diversity of *mec* regulator genes in methicillin resistance *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [J] . Epidemiol Infect, 1996, 117(2): 289.
- [9] Gerberding J L, Mückc Liu H H, Chamber H F. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* [J] . Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(9): 2574.

(编辑 黄小延)