

· 论著 ·

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌主动外排耐药机制的研究

高晓宽 刘宝 金魁 程君 李家斌 周树生

【摘要】 目的 了解重症监护病房(ICU)耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的感染状况,探讨 MRSA 的主动外排机制。方法 从 ICU 102 株金黄色葡萄球菌中筛选出 80 株 MRSA,检测其最低抑菌浓度(MIC)。设计 norA、qacA、qacB、qacJ 4 种主动外排基因的引物,进行聚合酶链反应(PCR)扩增和电泳分析;用奥美拉唑进行协同抑制试验,分析试验前后药敏结果的变化。结果 MRSA 的检出率为 78.4%;对万古霉素和替考拉宁的敏感性均为 100.0%,而对其他 19 种抗生素(苯唑西林、青霉素、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、头孢西丁、亚胺培南、哌拉西林三唑巴坦、阿奇霉素、红霉素、氟喹诺酮、克林霉素、阿米卡星、庆大霉素、左氧氟沙星、加替沙星、环丙沙星)耐药。norA、qacA、qacB、qacJ 4 种基因的检出率分别为 67.5% (54/80)、15.0% (12/80)、21.2% (17/80)、11.2% (9/80);奥美拉唑与左氧氟沙星合用较单用左氧氟沙星可降低 MIC 值。结论 ICU 患者感染 MRSA 严重且呈多重耐药;MRSA 存在 norA、qacA、qacB、qacJ 主动外排基因,奥美拉唑可抑制其主动外排作用。

【关键词】 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 最低抑菌浓度; 多重耐药; 主动外排; 奥美拉唑

A study on the active efflux system in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* GAO Xiao-lan*, LIU Bao, JIN Kui, CHENG Jun, LI Jia-bin, ZHOU Shu-sheng. * Intensive Care Unit, Anhui Province Hospital, Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui, China
Corresponding author: LIU Bao

【Abstract】 Objective To explore the status of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in an intensive care unit (ICU), and investigate the active efflux mechanism of MRSA. Methods Eighty isolates were identified as MRSA among 102 strains of *Staphylococcus aureus* collected, and then the minimal inhibitory concentration (MIC) were determined. The 4 primers of active efflux gene were designed to amplify the 80 clinical isolates respectively by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were analyzed by electrophoresis in order to grasp the situation of the existence of the four genes (norA, qacA, qacB and qacJ). Omeprazole inhibition test was used to observe the changes in the susceptibility of MRSA to antibiotics. Results The detection rate of MRSA was 78.4%. The sensitivity rate of MRSA to both vancomycin and teicoplanin was 100.0%, while to other antibiotics (oxacillin, benzylpenicillin, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidime, ceftiaxone, cefepime, cefoxitin, imipenem, piperacillin and tazobactam, azithromycin, erythromycin, chloramphenicol, clindamycin, amikacin, gentamicin, levofloxacin, gatifloxacin, ciprofloxacin) MRSA was multi-drug resistant. The detection rates of norA, qacA, qacB and qacJ were 67.5% (54/80), 15.0% (12/80), 21.2% (17/80) and 11.2% (9/80), respectively. Combined use of omeprazole and levofloxacin could lower MIC value. Conclusion The infection of MRSA in ICU is serious. MRSA is multi-drug resistant and possesses active efflux genes norA, qacA, qacB and qacJ. Omeprazole can inhibit the activity of the active efflux genes.

【Key words】 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Minimal inhibitory concentration; Multi-drug resistant; Active efflux gene; Omeprazole

感染是重症监护病房(ICU)住院患者常见的并发症之一,也是导致危重患者死亡最常见和最重要的原因之一,而危重患者更易发生院内感染^[1],其中尤以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)多重耐药的状况日益突出^[2]。目前只有糖肽类等极少数药物

对MRSA敏感,而2003年美国报道了2例耐万古霉素的MRSA^[3],以致临床上在治疗MRSA感染的用药选择上面临着极大的压力。研究MRSA的耐药机制成为热点课题之一^[4]。现已明确MRSA耐药与mecA基因编码的青霉素结合蛋白(PBP_{2a})相关,但不足以解释MRSA的多重耐药性,随着对主动外排系统(存在于胞膜的一种蛋白,通过质子泵驱动,可将药物主动排出胞外)研究的深入,现认为主动外排机制在其中更为重要^[5]。国外最早报道MRSA耐唑诺酮的主动外排机制与norA基因相关,此后也有qacA、qacB的报道,但针对qacJ的文献较少。本研

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.007

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(2006KJ325B)

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学附属省立医院 ICU (高晓宽、刘宝、金魁、周树生);安徽医科大学第一附属医院传染科(程君、李家斌)

通信作者:刘宝

究为探索性研究,通过观察本院 ICU 患者 MRSA 的感染状况,探讨主动外排在多重耐药中的作用,报告如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源:2005 年 1 月—2008 年 3 月,从本院 ICU 收集到 102 株金黄色葡萄球菌(金葡菌),其中 77 株取自痰液,11 株取自血液,8 株取自导管,其余为医护人员双手携带。住院患者年龄 14~84 岁。根据 2007 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐的标准鉴定出 80 株 MRSA 用于本研究。MRSA 标准株(*S. aureus* ATCC25923)为本院检验科保存。

1.2 主要试剂:琼脂培养基为英国 Oxiod 公司产品,主动外排基因 *norA*、*qacA*、*qacB*、*qacJ* 引物委托大连宝生物公司合成,聚合酶链反应(PCR)反应体系及相关试剂 dNTP、Taq DNA 聚合酶、标准分子质量 Marker、琼脂糖购于日本 TaKaRa 公司,蛋白酶 K 购于美国 Sigma 公司,50×Tris-乙酸(TAE)电泳缓冲液按照分子克隆标准配制,使用前稀释成 1×TAE。

1.3 MRSA 的鉴定方法

1.3.1 MRSA 表型鉴定:根据 CLSI 标准,在苯唑西林最低抑菌浓度(MIC)>4 mg/L 时可以鉴定为 MRSA。

1.3.2 MRSA 特异性 *mecA* 基因的 PCR 检测鉴定^[6]:MRSA 的引物为 *mecA* 基因文库中 623 bp 的特异性片段,上游引物序列为 5'-AGTTGTAGTTGTCGGGTTT-3',下游引物序列为 5'-AGTGGAACGAAGGTATCATC-3'。反应条件:94℃预变性 3 min,94℃变性 1 min,60℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环后再 72℃延伸 5 min,4℃保存待测。将样本进行琼脂糖凝胶电泳,在 623 bp 处出现荧光条带则为 MRSA。

1.4 MRSA 的 MIC 测定:将 MRSA 菌株接种在 M-H 琼脂培养基上,于恒温孵育箱培养 18 h 后取出,用琼脂稀释法测定每株细菌的 MIC。采用多点接种仪定量接种细菌,计算 50% 的 MIC 和 90% 的 MIC(MIC₅₀、MIC₉₀),根据 2007 年 CLSI 推荐的标准判断细菌对抗菌药物的敏感性,从而计算各种细菌的耐药率(R,%)。

1.5 主动外排基因的 PCR 扩增和电泳分析

1.5.1 PCR 引物的设计:按照 GeneBank 数据库中的主动外排基因序列信息,设计引物并进行评价,以筛选出最佳引物。其中 *norA*、*qacA*、*qacB*、*qacJ* 引物序列见表 1。

表 1 主动外排基因 *norA*、*qacA*、*qacB*、*qacJ* 的引物序列

外排基因	上游引物 5'	下游引物 3'	产物大小 (bp)
<i>norA</i>	TGCAATTCATATGATCAATCC	AGATTGCAATTCATGCTAAATATT	159
<i>qacA</i>	CCATACCAGCTCCAACCT	ATAATGCCAACTACCCCT	771
<i>qacB</i>	ATAATGCCAACTACCCCT	GATAATCCCACCTACTAAA	1 106
<i>qacJ</i>	CAGCAGAAGGATTTACAA	CGTTAAGAAGCACAACAC	239

1.5.2 DNA 模板的制备:挑取单个纯菌落,加入 100 μl 裂解液,55℃水浴消化 2 h,95℃水浴灭活 10 min,离心,上清液即为基因扩增检测的模板。

1.5.3 PCR 扩增:25 μl 反应体系包括 PCR 水 18.675 μl、上游引物 0.1 μl、下游引物 0.1 μl、dNTP 2.0 μl、10×缓冲液 2.5 μl、Taq 酶 0.125 μl、模板 1.5 μl。反应条件:93℃预变性 2 min,93℃变性 30 s;*norA*、*qacA*、*qacB* 52℃复温 30 s,*qacJ* 48.5℃复温 30 s,72℃延伸 45 s,34 个循环后 72℃延伸 5 min,4℃保存待测。

1.5.4 PCR 产物电泳分析:将扩增的 PCR 产物用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察目的条带的大小。

1.5.5 序列测定和分析:对 PCR 产物进行测序(分别委托宝生物和生工生物公司),所测序列与 GeneBank 提供的相应主动外排基因序列比对分析。

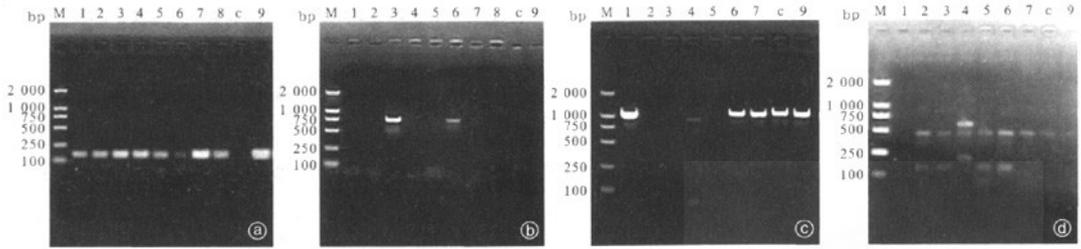
1.6 奥美拉唑抑制试验:取主动外排基因扩增阳性及对照 MRSA 42 株,测出左氧氟沙星加用奥美拉唑(按 20 mg/L 的浓度加入)的 MIC 值,与之前单用左氧氟沙星的 MIC 值进行对比。

2 结果

2.1 MRSA 的收集和检出:102 株金葡菌中,96 株源自住院患者,其中有 3 株来自<14 岁的患者,50 株取自老年患者(≥60 岁),年龄构成比分别为 3.1% 和 52.1%。根据 MRSA 表型的不同,采用琼脂稀释法从 102 株金葡菌中筛选出 MRSA 78 株,检出率 76.5%;而采用特异性 *mecA* 基因 PCR 扩增法验证检出 MRSA 80 株,检出率为 78.4%。

2.2 MRSA 的 MIC 检测(表 2):MRSA 对 21 种抗菌药物的 MIC 结果显示,MRSA 对糖肽类抗生素替考拉宁、万古霉素极为敏感,而对其他 19 种抗生素的敏感性很低。

2.3 主动外排基因 PCR 扩增结果(图 1):对 80 株证实的 MRSA 菌株分别行主动外排基因 *norA*、*qacA*、*qacB*、*qacJ* 的 PCR 扩增,共检出 *norA* 基因 54 株,检出率为 67.5%;共检出 *qacA* 基因 12 株,检出率为 15.0%;共检出 *qacB* 基因 17 株,检出率为



Ⓐ: norA, Ⓑ: qacA, Ⓒ: qacB, Ⓓ: qacJ; M: Marker, 1~9 依次为 MRSA 菌株, c 为阴性对照

图1 主动外排基因扩增电泳图

21.2%；检出 qacJ 基因 9 株，检出率为 11.2%。其中同时存在 norA 和 qacB 基因的有 12 株；同时存在 norA 和 qacA 基因的有 3 株；同时存在 norA、qacA 和 qacB 基因的有 4 株；同时存在 norA 和 qacJ 基因的有 2 株。

表2 80株MRSA的药敏结果

抗菌药物	MIC50(mg/L)	MIC90(mg/L)	耐药菌株(%)
苯唑西林	32	>32	80(100.0)
青霉素	8	>8	80(100.0)
头孢呋辛	128	>128	66(82.5)
头孢噻肟	256	>256	68(85.6)
头孢他啶	32	64	75(93.8)
头孢曲松	256	>256	60(75.0)
头孢吡肟	128	>128	73(91.2)
头孢西丁	128	>128	72(90.0)
亚胺培南	8	64	61(76.2)
哌拉西林三唑巴坦	128	>128	77(96.2)
阿奇霉素	128	>128	71(88.8)
红霉素	64	>64	75(93.8)
氯霉素	16	128	38(47.5)
克林霉素	64	>64	72(90.0)
阿米卡星	128	256	69(86.2)
庆大霉素	128	>128	68(85.0)
左氧氟沙星	32	64	68(85.0)
加替沙星	32	>32	72(90.0)
环丙沙星	32	64	69(86.2)
替考拉宁	4	8	0(0)
万古霉素	1	2	0(0)

2.4 序列测定结果：根据基因测定结果推定的氨基酸序列显示，MRSA 的 4 种主动外排基因编码的氨基酸与基因库相应的标准序列完全相同。

2.5 奥美拉唑对 MRSA 耐左氧氟沙星的影响 (表3)：在左氧氟沙星各梯度浓度中分别加入奥美拉唑 20 mg/L，测定 MIC 值，结果显示选取的 42 株 MRSA 中有 31 株为主动外排基因阳性株，存在至少一种主动外排基因，除表3中 4 株详细 MIC 值变化外，其余 27 株 MIC 值均降低一个梯度浓度；另有 11 株为无主动外排基因菌株，其 MIC 值基本上无明显变化。

表3 加入 20 mg/L 奥美拉唑对不同基因型耐左氧氟沙星 MRSA 菌株 MIC 值的影响

菌株号	基因型	MIC(mg/L)		左/(奥+左)的 MIC 比值
		奥+左	左	
1	norA	8	32	4
2	norA+qacB	2	>64	>32
3	norA+qacB+qacA	16	64	4
4	norA+qacJ	2	16	8

注：奥为奥美拉唑，左为左氧氟沙星

3 讨论

在第一个耐青霉素酶的 β-内酰胺类抗生素甲氧西林用于临床不久，世界首例 MRSA 于 1961 年被英国的 Jevons^[7] 发现，目前 MRSA 已是医院感染的重要病原菌之一，其中 ICU 是高发区域和疫源地，特别是中间型抗万古霉素金葡萄菌的出现，使金葡萄菌感染所致脓毒症及多器官功能障碍综合征(MODS)的防治成为现代创伤外科和危重病医学面临的棘手难题之一^[8]。闫素英和田虹^[9]在对 126 例综合 ICU 感染患者病原菌分布及抗菌药物敏感性的研究中发现，铜绿假单胞菌居首位，金葡萄菌其次。此次从本院 ICU 分离到的金葡萄菌中，源自住院患者有 96 株，源自医护人员双手携带有 16 株，而从 MRSA 感染患者年龄构成比可以看出，以年龄 ≥60 岁、合并有多种疾病的患者多发。在对金葡萄菌的鉴定中，出现 3 株 mecA 基因阳性而对苯唑西林敏感的菌株，可能是 mecA 基因处于抑制状态或低表达，菌株产生 PBP2a 的量或活性不足，而使该菌株在体外药敏试验中表现出对苯唑西林敏感^[10]。但由于有 mecA 基因的存在，一旦 PBP2a 表达，即有可能转变为苯唑西林耐药。因此本试验中所用菌株为基因扩增法检出的 80 株 MRSA，其检出率为 78.4%，略高于赵晓姬等^[11]报道的 72.2%，可能与 ICU 病源种类不同有关。药敏结果显示，MRSA 对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、大环内酯类、喹诺酮类、氨基糖苷

类、氟霉素、克林霉素的耐药率相当高,只对万古霉素、替考拉宁敏感,与国内最近报道的耐药情况^[12]基本一致。近年来由于糖肽类抗生素的普遍使用,国内已陆续有糖肽类敏感性减少 MRSA 的报道,此次研究中亦出现 2 株敏感性处于界值的菌株。

细菌的主动外排系统是在 1980 年由 Ball 和 McMurry 在研究大肠埃希菌对四环素耐药性时同时发现的。之后学者们对主动外排系统进行了大量的研究,证实了主动外排系统是细菌的正常生理结构,在敏感株中也同样存在。当长期受到环境中底物诱导时,系统的基因被激活,表达增加,外排药物的功能大大增强,因此表现出耐药性。Markham 和 Neyfakh^[13]在 1996 年研究发现,MRSA 耐氟喹诺酮类药物与具有外排功能的 norA 蛋白有关,而且其耐药性可被外排泵抑制剂利血平所抑制。2004 年许飞等^[14]报道,利血平可降低喹诺酮类药物对金葡菌 50% 的诱导耐药率,降低诱导耐药株的 MIC,减少菌株对溴乙啶的外排,认为主动外排是金葡菌耐喹诺酮类抗菌药物的重要机制之一。本研究中通过对 norA、qacA、qacB、qacJ 4 种主动外排基因进行 PCR 扩增,证实 MRSA 中广泛存在主动外排基因,norA 基因占 67.5%,其次为 qacB 21.2%、qacA 15.0%,略低于文献报道的 qacB 38.3%、qacA 16.0%^[15],可能与地域分布的差异性和试验操作过程中的误差有关,但 qacB 的存在明显高于 qacA 的结果与文献报道的结果一致,而 qacJ 的检出率相对较低。

克拉维酸等 β-内酰胺酶抑制剂的成功应用表明,阻断细菌耐药机制是解决细菌耐药性问题的方法之一。因此,以细菌细胞膜上的外排泵为靶点研制外排泵抑制剂受到重视。从目前的资料来看,以利血平为代表的吡嗪生物碱是目前研究最广泛的外排耐药系统抑制剂,作用剂量一般为 10~20 mg/L,但此剂量对人已经表现出神经毒性,因此,在医学上难以应用。考虑到奥美拉唑为 H⁺-K⁺-ATP 酶抑制剂,此次研究中加入奥美拉唑后发现,MRSA 对左氧氟沙星的 MIC 值有不同程度的下降,提示奥美拉唑能改善含有主动外排基因 norA、qacA、qacB、qacJ 的 MRSA 药物敏感性,但也有 19 株未检出主动外排基因,其耐药可能与膜的通透性改变有关。此次研究中奥美拉唑的最低用量 20 mg/L 并非为临床的可接受量,考虑到临床与体外实验的差异性,对临床上奥美拉唑最大剂量与氟喹诺酮类联合使用是否有抑制 MRSA 的作用,或者是否可以研究一种与奥美拉

唑有类似化学结构而对人体又没有致命副作用的物质来取代,尚有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 沈洪. 急诊危重病合并感染的降阶梯治疗策略. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8): 451-452.
- [2] 李家秦, 李耘, 王进. 中国医院和社区获得性感染革兰阳性球菌耐药性监测研究. 中华医学杂志, 2003, 83(5): 365-374.
- [3] Mongodin E, Finan J, Climo MW, et al. Microarray transcription analysis of clinical Staphylococcus aureus isolates resistant to vancomycin. J Bacteriol, 2003, 185(15): 4638-4643.
- [4] Schumacher MA, Brennan RG. Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors. Mol Microbiol, 2002, 45(4): 885-893.
- [5] Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. Clin Infect Dis, 1998, 27 (Suppl 1): S32-41.
- [6] 杨长顺, 刘文恩. MRSA 耐药机制与分子生物学检测方法研究新进展. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(3): 356-358.
- [7] Eriksen KR. Celbenin, resistant staphylococci. Ugeskr Laeger, 1961, 123: 384-386.
- [8] 姚咏明, 盛志勇. 金黄色葡萄球菌肠毒素与多器官功能障碍综合征. 中国危重病急救医学, 2001, 13(9): 517-519.
- [9] 闫素英, 田虹. 综合重症监护病房医院感染病原菌的调查分析. 中国危重病急救医学, 2009, 21(1): 58-59.
- [10] Rohrer S, Maki H, Berger-Bächi B. What makes resistance to methicillin heterogeneous? J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 8): 605-607.
- [11] 赵晓姬, 张素芬, 潘淑, 等. 216 例葡萄球菌感染分布及耐药性分析. 国际检验医学杂志, 2007, 28(12): 1091-1093.
- [12] 黄妮妮, 刘洁. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染流行病学调查. 中华医院感染学杂志, 2009, 21(1): 47-48.
- [13] Markham PN, Neyfakh AA. Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(11): 2673-2674.
- [14] 许飞, 段德卿, 林耀广. 金黄色葡萄球菌对喹诺酮耐药的主动外排机制的研究. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(6): 403-406.
- [15] Nakaminami H, Noguchi N, Nishijima S, et al. Transduction of the plasmid encoding antiseptic resistance gene qacB in Staphylococcus aureus. Biol Pharm Bull, 2007, 30(8): 1412-1415.

(收稿日期: 2009-03-01)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞: 监护仪 (封二)
- ②广东天普药业: 天普洛安 (插页)
- ③珠海健帆: 血液灌流器 (插页)
- ④天津生化制药: 琥珀氢可 (插页)
- ⑤廊坊爱尔: 炭肾 (插页)
- ⑥德尔格: Smart Care™智能化自动脱机系统 (插页)
- ⑦第一制药: 克倍宁 (封三)
- ⑧天津红日药业: 血必净注射液 (封底)