

西安市 MRSA 耐消毒剂基因 qacA/B 的检测 *

李 双 李武平 刘 冰 孙惠英 宋向阳 闫 沛 白艳玲 王 蕾

(第四军医大学西京医院感染管理科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:了解西安市三甲综合医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) qacA/B 基因的携带情况,以便掌握其对消毒剂的耐药情况。**方法:**收集临床分离的 152 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,采用聚合酶链反应检测 qacA/B 基因,并将 qacA/B 基因扩增产物进行测序,测序结果进行比对。**结果:**152 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中有 11 株检出 qacA/B 阳性,qacA/B 携带率 7.2%。测序结果比对发现,4 株 qacA 的基因编码序列同一位点均有一个碱基发生突变(C→T),苏氨酸突变为异亮氨酸。**结论:**该地区临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中 qacA/B 携带率相对较低,但也存在抵抗消毒剂的风险,临床应加强消毒剂使用的管理,阻止 MRSA 的传播,减少感染的发生。

关键词 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 消毒剂 抗性

中图分类号 R378.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)09-1716-03

A Investigation of Disinfectant-Resistant Gene QacA/B in
Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolated from Xi'an's Hospital*

LI Shuang, LI Wu-ping, LIU Bing, SUN Hui-ying, SONG Xiang-yang, YAN Pei, BAI Yan-ling, WANG Lei

(Department of xijing hospital, The Fourth Military Medical University, Shanxi Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the disinfectant-resistant gene qacA/B in meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Xi'an's hospital, in order to know the aureus's sensitivity of disinfectant. **Methods:** A total of 152 MRSA strains were isolated. Polymerase chain reaction (PCR) was implied to analyze the prevalence of gene qacA/B in these stains. Last, taking the positive-qacA/B gene's output into testing the DNA sequence and analyzing. **Results:** Of the 152 MRSA strains, 11 were positive for qacA/B gene. The prevalence of gene qacA/B in these stains was 7.2%. One nucleotide take place missense mutation (C→T) in some site at the coding section of qacA/B gene sequence of 4 strains. **Conclusions:** There were not very high positive percentages of relevant resistant gene qacA/B in MRSA isolated from clinical, but we also take seriously on the phenomenon of disinfectant resistance and make good use of disinfectants to prevent MRSA transferring, even more to decrease the prevalence of infection.

Key Words: Meticillin-resistant Staphylococcus aureus; Disinfectants; Resistance

Chinese Library Classification (CLC) : R378.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1716-03

前言

金黄色葡萄球菌是引起医院感染和社区感染的重要致病菌,尤其是多重耐药菌-耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的出现,给临床治疗带来困难,MRSA 感染的治疗是临床十分棘手的问题之一^[1],且目前 MRSA 的高分离率(占金葡菌 58.1%^[2])使感染率逐年上升,临床通过大量使用消毒剂达到控制 MRSA 传播的目的,然而国内外已经发现携带耐消毒剂基因 qacA/B 的菌株^[3-5],此基因通过表达多重耐药蛋白而介导细菌耐药出现对消毒剂抗性增加现象。为了解西安地区 MRSA 耐消毒剂基因 qacA/B 的携带情况,我们收集了西安 4 所大型综合医院住院患者分离的 152 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,进行 qacA、qacB 通用引物基因检测并测序。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

细菌 DNA 提取试剂盒、DL2000DNA Marker 及 PCR 试剂 2× Mix 购自北京天根生化科技有限公司,qacA/B 扩增引物和 PCR 扩增产物由上海生工生物技术有限公司合成和测序。Vitek-32 全自动细菌鉴定仪(法国 Bio-Merieux 公司)、PCR 仪(德国 Eppendorf 公司)、核酸电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成像系统(美国 BioRad 公司)。

1.2 菌株来源及鉴定

152 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分别来自 2011 年 1 月-6 月西安市四家大型综合三甲医院临床送检的各类标本,有痰液,分泌物,穿刺液等。标准菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

MRSA 的鉴定 细菌培养和鉴定方法按《全国临床检验操作规程》进行细菌培养和初步鉴定,菌株鉴定 梅里埃葡萄球菌鉴定试剂盒(比色法)和 ATB Expression 仪。头孢西丁纸片

* 基金项目 陕西省科学技术研究发展计划项目(20110616-01-07)

作者简介 李双(1984),硕士研究生在读,研究方向 重症监护与感染控制。

E-mail:shuangli841212@126.com

(收稿日期 2011-09-13 接受日期 2011-10-10)

扩散法，根据美国临床实验室标准化委员会 CLSI(M100-S14)最新方案 30 μg 头孢西丁纸片，抑菌圈直径≤ 21 mm 为 MR-SA。

1.3 DNA 模板制备

参照细菌 DNA 提取试剂盒说明书操作并稍加改良，MR-SA 破除细胞壁采用溶葡萄球菌素法。提取的上清液即为 DNA 模板，于 -80℃ 保存备用。

1.4 PCR 扩增实验

qacA/B 引物根据 Genbank 中基因序列合理设计 A/B 公用引物，具体参数见表 1。PCR 反应条件 25μl 反应体系，热循环参数 93℃ 预变性 2min，然后 93℃ 60s→53℃ 60s→72℃ 60s，35 个循环周期，最后延伸 72℃ 至 5 min，-4℃ 保存。

1.5 扩增产物电泳鉴定

PCR 扩增产物作 1%琼脂糖电泳，电压 120 V，时间 20 分钟，加样 6μl，紫外凝胶电泳成像仪下观察并拍照记录结果。胶切下回收后送上海生工生物技术有限公司测序。

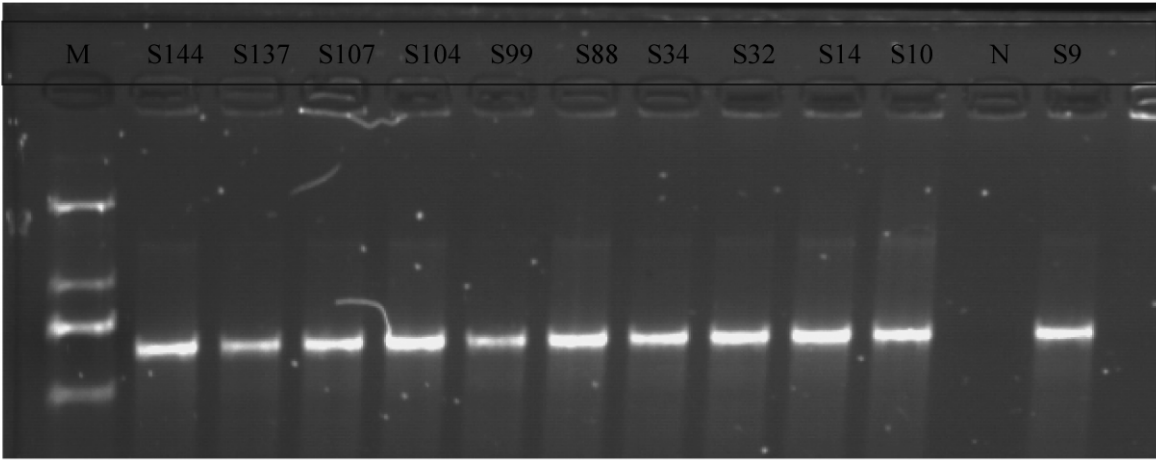
表 1 引物序列、位置和产物大小
Table 1 Primer sequences, location and product size

Primer qacA /B	Sequences (5'-3')	Location	Product size (bp)
Primer F1	tttcagctggtacaattgctg	827	
Primer R1	tgataatcccacctaataagca	1 477	651

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

152 株 MRSA 标本中，qacA/B 基因阳性的菌株 11 株，阳性率 7.2%，产物电泳图见图一。



M:分子量标记，自上而下分别为 2000,1000,750,500bp S:标本阳性 N:阴性对照

图 1 qacA/B 产物电泳图

Fig.1 Products by electrophoresis

2.2 DNA 测序结果

测序结果比对发现 4 株 qacA 的基因编码序列同一位点均

有一个碱基发生突变 (C→T)，相应的苏氨酸变为异亮氨酸。图峰见图二，碱基突变序列见图三：

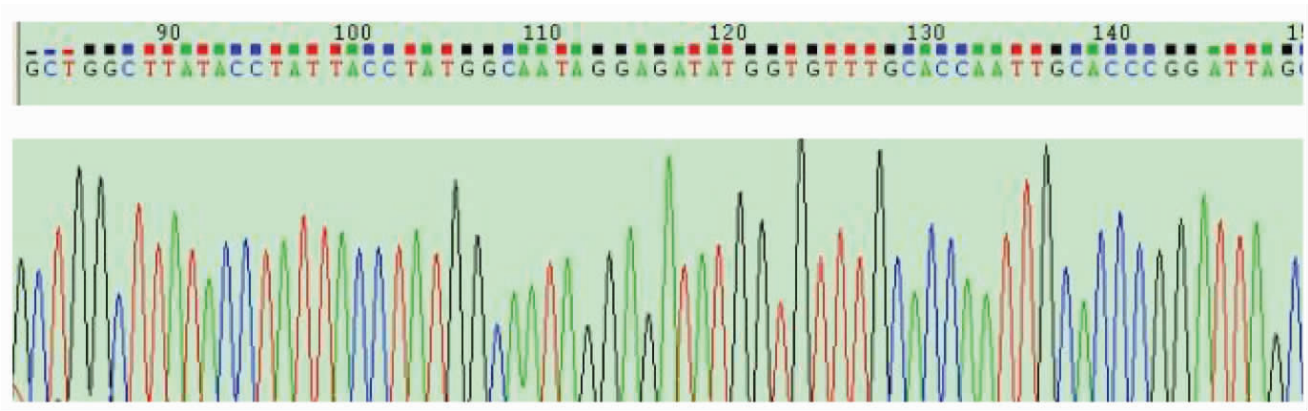


图 2 测序图峰图

Fig.2 DNA sequence peaks

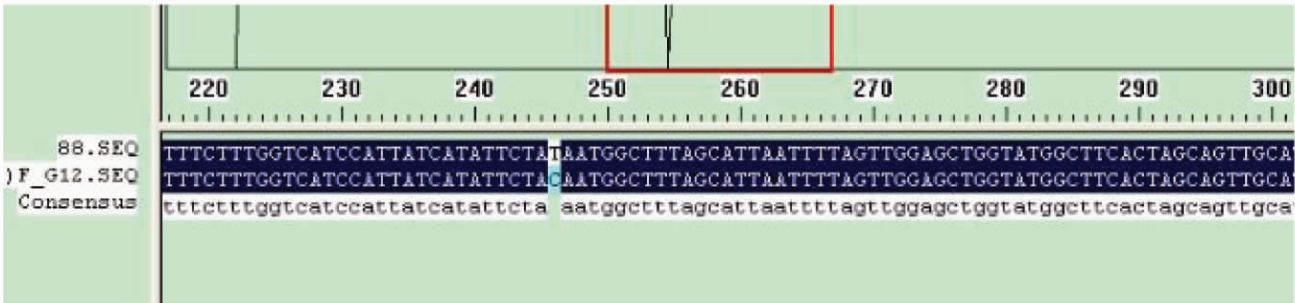


图3 碱基突变序列图

Fig.3 Mutation sequence

3 讨论

金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药是与获得了多重耐药基因有关,同理对耐消毒剂耐药也与抗性基因 qac (quaternary ammonium compounds “季胺类消毒剂耐药基因”) 有关,该抗性基因 qac 转运系统属于 (Major Facilitator Superfamily, MFS),由质粒编码。目前已知引起对该类消毒剂耐药基因有 qacA、qacB、qacC、qacD、qacE、qacEA 1、qacF、qacG、qacH、qacJ10 种,根据抗性情况及 DNA 同源性分为 qacA/qacB 和 qacC/qacD 两大家族^[6]。qacA/B 基因编码的多重耐药外排蛋白能介导对 30 多种结构不同的有机化合物包括单价阳离子化合物(如季胺类化合物和染料)和二价阳离子化合物(如联脒和丙脒脒)耐药^[7],现在发现,与 QacA 不同的是,QacB 仅对单价阳离子化合物耐药,对少数的二价阳离子化合物呈低度耐药^[8]。基因测序和诱变试验研究表明,qacB 与 qacA 基因相比,仅仅是 7 个碱基和第十个跨膜片段 323 位的氨基酸不同,qacA 为天冬氨酸,qacB 为丙氨酸,因此不能用普通 PCR 和 Southern blot 的检测方法对它们进行鉴别,普通 PCR 可以通过测序比对碱基序列区别。

一项 11 个亚洲国家,共 894 株 MRSA 有关消毒剂敏感性及其抗性基因 qacA/B 和 smr 的研究结果显示,在有抗性的菌株中 70.9%测到 qacA/B,仅有 2.5%测到 qacC/qacD^[9]。Noguchi 等 2005 年^[10] MRSA 中 qacA /B 和 qacC 的检出率已分别达 47.9%(198/413)和 3%(14/413),但 Vali^[11]等报道的 qacA / B 基因的检出率(8.3%)。朱健铭^[12]对 221 株 MRSA 中 qacA/B 基因检出 101 株(45.7%),71 株中 qacB 7 株 (9.9%)。本次实验是首次调查西安地区 MRSA 耐消毒剂基因携带情况,共分离出 MRSA 共 152 株,11 株检出 qacA/B 阳性,qacA/B 携带率 7.2% (11/152),与国内外文献报道结果有较大差异^[13,14],推测与地区差异和季胺类消毒剂的使用情况有关(近年来本地区季胺类消毒剂如新洁尔灭,溴己定等使用较少)。

目前认为细菌对消毒剂产生耐药性,可能与消毒剂不规范使用、消毒剂化学成分不稳定、消毒剂应用领域滥用有关^[15]。因此,建议使用消毒剂时,以大剂量一次性杀菌为宜,此外,长时间脱离接触某消毒剂后,对该消毒剂的抗性可能会消失,故应定期更换消毒剂种类、改变作用时间或交替使用。

本次实验使用的 PCR 基因扩增方法简单,通过基因测序保证结果可靠可信,国内外使用 PCR 扩增基因时多数通过提取质粒 DNA,再进行扩增。而金黄色葡萄球菌细胞壁较厚,用一般的方法溶葡萄球菌酶和蛋白酶 K 破壁较为困难,本次试验

使用溶葡萄球菌素去除细胞壁较为容易,省时,价格相对合理。本实验菌株数量较大,具有较好的代表性、可信度和科学性,为该地区细菌耐药性研究和感染控制工作提供有效的证据和参考价值。

参考文献 (References)

[1] 冯莎娜, 齐军. 细菌的耐药性与临床的治疗对策 [J]. 中国医学研究与临床, 2006, 10 (4) : 41-44
Feng Sha-na, Qi Jun. Bacterial resistance and clinical therapeutic strategies [J]. Chinese medical research and clinical, 2006, 10 (4) : 41-44

[2] 张旭华, 庞力. 临床病原菌检出率及抗生素敏感性统计分析 [J]. 检验医学与临床, 2010, 12 (7) : 2565-2568
Zhang Xu-hua, Pang Li. Clinical isolation of pathogens and statistical analysis of antibiotic sensitivity[J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2010, 12 (7) : 2565-2568

[3] Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, et al. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transportation Tn552 among clinical staphylococci [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 2797-2803

[4] Mayer S, Boos M, Beyer A, et al. Distribution of the antiseptic resistance genes qacA, qacB and qacC in 497 methicillin-resistant and susceptible European isolates of Staphylococcus aureus[J]. J Antimicrob Chemother, 2001, 47: 896-897

[5] 王伟, 李彩霞. 浙江、江西地区 MRSA 耐 mecA、qacA/B 基因检测 [J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(9): 961-964
Wang Wei, Li Cai-xia. The testing of gene mecA、qacA/B in Zhengjiang and Jiangxi [J]. Chinese Journal of Hospital Infection. 2005, 15(9): 961-964

[6] Mitchell BA, Brown MH, Skurray. QacA Multidrug efflux pump from Staphylococcus aureus: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(2): 475-477

[7] Paulsen I T, Firth N, Skurray R A. Resistance to antimicrobial agents other than β lactams in the Staphylococcus in human disease [M]. New York:Churchill Livingstone, 1997: 175-212

[8] Noguchi N, Hase M, Kitta M, et al. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistant genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Microbiol Lett, 1999, 172(2): 247

[9] Noguchi N, Hase M, Kitta M, et al. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistant genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus [J]. Microbiol Lett, 1999, 172(2): 247 (下转第 1724 页)

- [2] Targowski T, Janda P, Owczarek W, et al. Evaluation of occurrence frequency of circulating p53 protein in serum of patients with chronic obstructive pulmonary diseases and non-small cell lung cancer[J]. Pol Merkur Lekarski, 2010,28(166):265-267
- [3] Sicotte C, Paré G, Morin S, Potvin J, et al. Effects of home telemonitoring to support improved care for chronic obstructive pulmonary diseases[J]. Telemed J E Health, 2011,17(2):95-103
- [4] Spieth PM, Güldner A, Gama de Abreu M, et al. Anesthesia in patients with chronic obstructive pulmonary diseases [J]. Anaesthesist, 2010,59(1):89-97
- [5] Shi XQ, Hu N, Li XY, Huang ZJ, et al. Disease burden of chronic obstructive pulmonary diseases in west rural areas of China, 2004 - 2005 [J]. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2011,45(1):68-72
- [6] Janmeja AK, Mohapatra PR, Kumar M, et al. The impact of "World Health Organization - Government of India guidelines on chronic obstructive pulmonary diseases-2003" on quality of life [J]. Lung India, 2009, 26(4):102-105
- [7] 陆尉萱, 张一杰, 胡波, 等. 应用 St George's 呼吸问卷评价慢性阻塞性肺疾病患者生活质量的价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(4): 195
- Lu Wei-xuan, Zhang Yi-jie, Hu Bo, et al. Application of St George's respiratory questionnaire in evaluating the life quality of Chinese patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2003, 26(4): 195
- [8] Briones AM, Rodríguez-Criado N, et al. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress [J]. Hypertension, 2009, 54(1):142-149
- [9] Aydin U, Ugurlucan M, Gungor F, et al. Effects of atorvastatin on vascular intimal hyperplasia: an experimental rodent model[J]. Angiology, 2009, 60(3):370-377
- [10] Miettinen TA, Gylling H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment [J]. Eur J Clin Invest, 2003, 33(11): 976-982
- [11] Ndrepepa G, Braun S, von Beckerath N, et al. Oxidized low density lipoproteins, statin therapy and severity of coronary artery disease[J]. Clin Chim Acta, 2005, 360(1-2): 178-186
- [12] Ito MK, Talbert RL, Tsimikas S. Statin-associated pleiotropy: possible beneficial effects beyond cholesterol reduction [J]. Pharmacotherapy, 2006, 26(2): 85-97
- [13] Liao JK. Clinical implications for statin pleiotropy [J]. Curr Opin Lipidol, 2005, 16(6): 624-629
- [14] 张秀伟, 朱颖, 张郁青, 等. 阿托伐他汀对吸烟伴慢性肺源性心脏病患者近期心肺事件的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(13): 1084-1085
- Zhang Xiu-wei, Zhu Ting, Zhang Yue-qing, et al. Effect of atorvastatin on smoking in patients with chronic pulmonary heart disease patients with recent cardiopulmonary events[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2010, 30(13): 1084-1085

(上接第 1718 页)

- [10] Sheldon AT Jr. Antiseptic resistant: what do we know and what does it mean [J]. Clin Lab Sci, 2005, 18(3): 181
- [11] Vali L, Davies SE, LL, et al. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61: 524-532
- [12] 朱健铭, 吴康乐. 221 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 qacA/qacB 基因检测及临床意义 [J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 11(18): 1552-1554.
- Zhu Jian-ming, Wu Kang-le. The testing of gene qacA/B in 221 MRSA strains and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Hospital Infection, 2008, 11(18): 1552-1554
- [13] Alam M M, Kobayashi N, Uehara N, et al. Analysis on distribution and genomic diversity of high-level The quality of hospital disinfectants disinfection management genes qacA and qacB in human clinical isolates of Staphylococcus aureus [J]. Microb Drug Resist, 2003, 9(2): 109-121
- [14] Neide H, Tokumaru Miyazaki, et al. The presence of qacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007, 102(4): 539-540
- [15] 张莲英, 孙亚惠. 消毒剂的质量问题是医院消毒管理中不可忽视的重要环节[J]. 中国公共卫生管理, 2002, 18(6): 544-545
- Zhang Lian-ying, Sun Ya-hui. The quality of hospital disinfectants is an important part and can't be ignored in hospital's infection management[J]. China Public Health Management, 2002, 18(6): 544-545