

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 抗 methicillin 金黃葡萄球菌之 SCCmec 基因分型

Genetic polymorphism of SCCmec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

計畫編號：NSC 90-2320-B-002-107

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：鄧麗珍 國立台灣大學醫學院 醫事技術學系

計畫參與人員：陳佳慧 國立台灣大學醫學院 醫事技術學系

### 一、中英文摘要

MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) 為重要的院內感染致病菌，本計畫主要分析臺灣地區 MRSA 菌株的 SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome) 結構及與抗藥之間的關係。

菌株來源主要為臺大醫院臨床鑑定之 MRSA。分析 SCCmec 結構前均測定菌株是否含 mecA 基因，以確定為 MRSA。之後分三部分探討，第一部分是將近五年 (1998~2002) 分離出來的 MRSA 做 strain typing (菌株分型)，做為流行病學上的參考。利用 M13、ERIC II 等隨機引子以及利用 insertion sequence--IS256 做 AP-PCR，再以脈衝式電泳做更精確的分型。第二部分是分析不同抗藥表現型及菌株 SCCmec 上游基因型上的相關性。發現具有 mutated mecI 及完整 mecR 的 MRSA，通常對 oxacillin 產生高抗藥性以及表現多抗藥性，mecI 被 deletion 以及具有不完整 mecR 的菌株，通常對 oxacillin 表現較低的抗藥性。而由 mecR 部分 deletion，抗藥表現就會明顯下降，可推測 mecR 對抗藥表現似乎較 mecI 重要。第三部分則是利用 southern blot 觀察 SCCmec 下游基因型與抗藥上的相關。

**關鍵詞：**金黃葡萄球菌、methicillin 抗藥、SCCmec 基因結構

### Abstract

*Staphylococcus aureus* is recognized as one of the most important nosocomial

pathogens. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has been a serious problem since 1980s in Taiwan. The resistance to methicillin is mostly due to an additional large DNA cassette (the staphylococcal cassette chromosome mec, or SCCmec) inserted in the chromosome. We collected 147 MRSA isolates (1998 to 2002) which were isolated from National Taiwan University Hospital. Three major parts were studied. The first part is strain typing by AP-PCR and pulsed field gel electrophoresis. The primers used in AP-PCR include M13, ERIC II and IS256. The second part is to determine the molecular polymorphism of upstream region of SCCmec element including mecRI and mecI genes. The third part is to analyze the polymorphism of downstream region by ClaI-digested hybridization patterns with mecA gene as probe. The results revealed that the presence or absence of mecRI was correlated with levels of resistance. Molecular typing of MRSA isolates by AP-PCR and PFGE showed that the clonal spread was observed for some high-level resistant MRSA isolates.

**Keywords:** Methicillin-resistant *S. aureus*,  
SCCmec

### 二、緣由與目的

金黃色葡萄球菌為人體常見的致病菌，會引起心內膜炎、皮膚炎、尿道炎等疾病，為重要的院內感染致病菌 (1-3)。早期常用青黴素 (Penicillin) 來治療，但近幾十年來發現有許多金黃色葡萄球菌已對 Penicillin 抗藥，甚至產生多抗藥性，在臨

床診治上增加了許多困難度。這類型的細菌，通稱為 MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)。

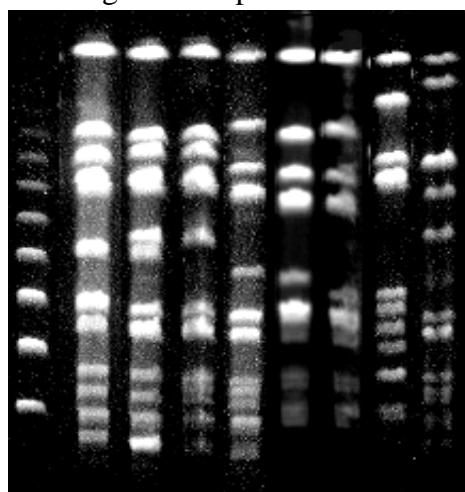
MRSA 抗藥主要機轉為細菌獲得一段外來基因 Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC*mec*)，其中最主要為 *mecA* 基因 (4-7)，當細菌與β-lactams 接觸時，就會促使 *mecA* 基因表現，而 encode 出 PBP2a，與其他青黴素結合蛋白相較，PBP2a 與青黴素(β-lactam 抗生素)的親和力(affinity)極低，抗生素無法與細菌細胞膜上的 transpeptidase 結合，抑制細菌細胞壁的合成而產生抗藥性。在 *mecA* 上游基因之 *mecR1* 及 *mecI* 具有調控 *mecA* 的作用。*mecI* 會 encode 出強烈的抑制物(strong repressor)，抑制 *mecA* 基因表現，故通常抗藥菌株 *mecI* 基因是具有點突變(point mutation)或被刪除(deleted)，使得 *mecA* 基因不再被 *mecI* 基因抑制表現。而 *mecR1* 具有 transducer 的作用，當抗 methicillin 金黃色葡萄球菌接觸到 Penicillin 等 β-lactam 類抗生素時，*mecR1* 會將此訊息傳遞給 *mecA*，促使 *mecA* 基因表現 (8-14)。由於 *mecI* 與 *blaI* 相似，*mecR1* 與 *blaR1* 相似，近幾年來，發現 *mecI*、*mecR1*、*mecA* 與 *blaI*、*blaR1*、*blaZ* 兩抗藥系統彼此間似乎可相互調控。SCC*mec* 的下游結構更是複雜，含有 *IS431*、*dcs*、HVR、linear plasmid 等。有學者利用 *ClaI* 切割，*mecA* 當 probe，進行 hybridization 做初步測試，可得到分型結果。

### 三、結果與討論

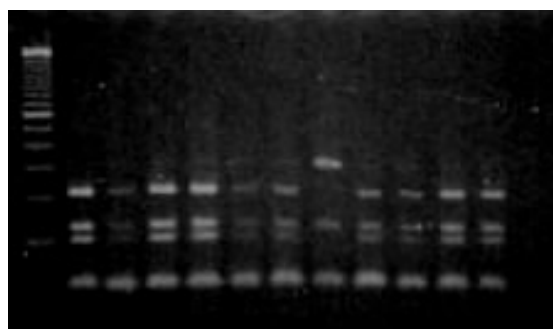
第一部分是將近五年(1998~2002)分離出來的 MRSA 做 strain typing (菌株分型)，做為流行病學上的參考。利用 M13、ERIC II 等隨機引子以及利用 insertion sequence--IS256 做 AP-PCR，再利用脈衝式電泳做更精確的分型。第二部分實驗是從抗藥表現型及菌株基因型上觀察二者之間的相關性。從抗藥表現方面來看，做 oxacillin MIC (0.12 μg~256 μg/ml) 將菌株分為高抗藥(>128 μg/ml)及低抗藥(4~64 μg/ml)，從菌株基因型方面，則是分析 MRSA 上的 SCC*mec*(Staphylococcal Cassette

Chromosome)，利用 PCR、PCR-RFLP 及 Southern blot 分析 SCC*mec*。二者相比較後，發現具有 mutated *mecI* 及完整 *mecR* 的 MRSA，通常對 oxacillin 產生高抗藥性以及表現多抗藥性，*mecI* 被 deletion 以及具有不完整 *mecR* 的菌株，通常對 oxacillin 表現較低的抗藥性(詳如 Table 1)。而由 *mecR* 部分 deletion，抗藥表現就會明顯下降，可推測 *mecR* 對抗藥表現似乎較 *mecI* 重要。第三部分實驗則是觀察 SCC*mec* 的下游結構，利用 *ClaI* 切割，*mecA* 當 probe，進行 hybridization，進一步了解菌株基因體差異與菌株抗藥表現之關係。利用南方墨漬法，發現高抗藥菌株，在 *mecA* 下游區域似乎會被 *ClaI* 切出約 4.3kb 大小的片段，為 type III (DUARTE C. OLIVEIRA etc, AAC, 2000 年)，而低抗藥菌株則通常會被切出約 16kb 大小的片段，為 type I。這二片段之內容物的差異可能影響到抗藥表現，二者的差異性很可能在 pT181 和 pUB110 所包含的基因 (DUARTE C. OLIVEIRA etc, AAC, 2000 年)，此部份結果需進一步的實驗來證實。

#### (I) Pulsed field gel electrophoresis



#### (II) *mecI* PCR and *MseI* restriction analysis



(III) *ClaI* restriction pattern using *mecA* as probe

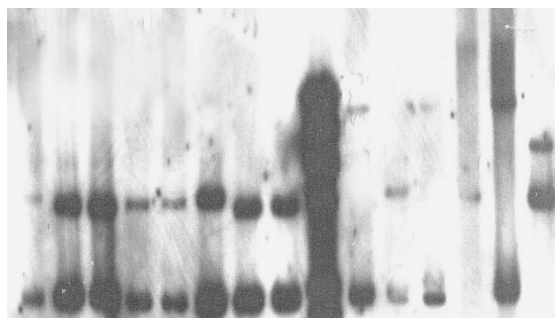


Table1. Correlation of *MecI*, *MecR1*, and oxacillin MIC

MIC( $\mu$ g/ml)	No. of isolates	<i>MecI</i> type 1	<i>MecI</i> type 2	<i>MecR1</i>	<i>MecR1</i> deletion
256	89	81	3	84	4
128	11	8	0	8	3
64	7	3	0	3	4
32	7	0	0	0	7
16	15	0	0	0	15
8	10	0	0	0	10
4	8	0	0	0	8

#### 四、成果自評

- (1) Strain typing: 已完成。
- (2) Upstream region of SCCmec: 已完成。
- (3) Downstream region of SCCmec: 已完成 *ClaI* hybridization 初步分型。

#### 五、參考文獻

[1] Chang SC, Hsu LY, Luh KT et al. 1988. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. J Formosan Med Association 87:157-162.

[2] 陳美伶等 1995. 院內感染病原菌的變遷--某教學醫院十四年之經驗. 中華微生物雜誌 28:203-217.

[3] Chen ML, Chang SC, Pan HJ, et al. 1999. Longitudinal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus*

*aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. J Formosan Med Association 98:426-432.

[4] Hartman BJ and A. Tomasz. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 158:513-516.

[5] Hiramatsu K, Hanaki H., et al. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 40:135-136.

[6] Hiramatsu K. 1995. Molecular evolution of MRSA. Microbiol. Immunol. 39:531-543.

[7] Katayama et al. 2000. A new class of genetic element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 44:1549-1555

[8] Suzuki E et al. 1993. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant clinical strains. Antimicrob Agents Chemother 37:1219-1226.

[9] Kobayashi N et al. 1996. Genomic diversity of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Epidemiol Infect 117:289-295.

[10] Kobayashi N et al. 1998. Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother 42:717-720.

[11] Oliverira DC et al. 2000. Genetic organization of the downstream of the *mecA* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region. Antimicrob Agents

- Chemother 44:1906-1910.
- [12] Katayama Y et al. 2001. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob Agents Chemother 45:1955-1963.
- [13] Ito T. et al. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 45:1323-1336.
- [14] Kobayashi N et al. 2001. Genomic rearrangement of the *mec* regulator region mediated by insertion of *IS431* in methicillin-resistant staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 45:335-338.
- [15] Yushida T et al. 1997. Combined use of ribotyping, PFGE typing and *IS431* typing in the discrimination of nosocomial strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 41:687-695.

