

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

葡萄球菌 *mecA* 上游調控基因分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-249-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院醫事技術學系暨研究所

計畫主持人：鄧麗珍

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 9 月 29 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

葡萄球菌 *mecA* 上游調控基因分析

Genetic analysis of *mecA* regulator region in oxacillin-resistant staphylococci

計畫編號：NSC 90-2320-B-002-107

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 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

一、中英文摘要

葡萄球菌包含凝固酵素陽性(主要為金黃葡萄球菌)及凝固酵素陰性菌種。金黃葡萄球菌為院內感染重要的細菌，凝固酵素陰性葡萄球菌也引起人類許多的感染。目前所知 methicillin (or oxacillin) 抗藥性葡萄球菌(MRS)產生抗藥性最多數的原因為細菌染色體上多了一段外來 DNA (additional DNA)，稱為 Mec-associated DNA (21 to 67 kb of inserted DNA) 或 staphylococcus cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)，*mecA* 基因的表現受到許多因素影響，導致其抗藥性的表現可為 heterogeneous 或 homogenous。本計劃主要分析臺灣地區 MRS 菌株的 SCC*mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome) 上游結構(*mecRI* 與 *mecI*)及與抗藥之間的關係。發現這些 regulator 有 deletion 或 mutation 時，會影響抗藥的表現。

菌株來源主要為臺大醫院臨床鑑定之 MRS。分三部分探討，第一部分是測定菌株是否含 *mecA* 基因，以確定為 MRS。第

二部分是分析不同抗藥表現型及菌株 SCC*mec* 上游基因型上的相關性。發現具有 mutated *mecI* 及完整 *mecRI* 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 *mecRI* 部分 deletion，抗藥表現就會明顯下降，可推測 *mecRI* 對抗藥表現似乎較 *mecI* 重要。第三部分則是將最具抗藥的 *S. haemolyticus* 做 strain typing (菌株分型)，以脈衝式電泳做精確的分型。

關鍵詞：葡萄球菌、methicillin 抗藥、SCC*mec* 基因結構

Abstract

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) 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 SCC*mec*) inserted in the chromosome. We collected 60 MRS isolates (1998 to 2002) which were isolated from National Taiwan University Hospital. Three major parts were studied.

The first part is confirmation of MRS by amplification of *mecA* gene. The second part is to determine the molecular polymorphism of upstream region of SCC*mec* element including *mecRI* and *mecI* genes. The third part is strain typing of methicillin-resistant *S. haemolyticus* by pulsed field gel electrophoresis. The results revealed that the presence or absence of *mecRI* was correlated with levels of resistance. Molecular typing of methicillin-resistant *S. haemolyticus* isolates by PFGE showed that no clonal spread was observed for the high prevalence of resistance.

Keywords: Methicillin-resistant staphylococci, SCC*mec*

二、緣由與目的

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 MRS (Methicillin resistant *Staphylococcus*)。

MRS 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 *mecRI* 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 *mecRI* 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，*mecRI* 會將此訊息傳遞給 *mecA*，促使 *mecA* 基因表現 (8-15)。由於

mecI 與 *blaI* 相似，*mecRI* 與 *blaRI* 相似，近幾年來，發現 *mecI*、*mecRI*、*mecA* 與 *blaI*、*blaRI*、*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 *Clal* 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

第一部分是第一部分是測定菌株是否含 *mecA* 基因 (Fig.1)，以確定為 MRS。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 μ g~256 μ g/ml) 將菌株分為高抗藥(>128 μ g/ml)及低抗藥(4~64 μ g/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 (Fig.2) 分析 SCC*mec*，大致上分為 Class A, C1, C2。二者相比較後，發現具有 mutated *mecI* 及完整 *mecRI* 的 MRS (Class A)，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 *mecRI* 的菌株，通常對 oxacillin 表現較低的抗藥性(詳如 Table 1)。而由 *mecRI* 大部分 deletion (class C2)，抗藥表現就會明顯下降，可推測 *mecRI* 對抗藥表現似乎較 *mecI* 重要。由於在 *S. haemolyticus* 中，C1 與 C2 特別多，因此我們對這些菌株針對 *mecRI* 進一步定序，以了解 *mecRI* deletion 確實位置。C1 deletion 位置為 968 bp，C2 deletion 位置為 92 bp。第三部分實驗則是將最具抗藥的 *S. haemolyticus* 進行 strain typing (菌株分型)，以脈衝式電泳(PFGE)做精確的分型。可發現有某些 PFGE 較多。由於下游的基因結構差異也可能影響到抗藥表現，此部份結果需進一步的實驗來證實。可利用 *Clal* 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。

Fig. 1. PCR of *mecA* gene from methicillin-resistant *Staphylococcus* strains

Fig. 3 Sequence of *mecR1* and surrounding area for *S. haemolyticus* 38-247 strain

CATCAATATCCTCCTTATATAAGACTAC
 ATTTGTAATATATTACAAATGTAGTATTT
 ATGTCAAATAATGTTATAATTTTTGTG
ATATGGAGGTGTAGAAGGTGTTATC
ATCTTTTTTAATGTTAAGTATAATCA
GTTTCATTGCTCACGATATGTGTAATT
TTTTAGTGAGAATGCTCTATATAAA
ATATACGGTTCTGTTGCAAAGTTGAAT
 TTATAGTATAATTATAACCAAAAGGAGT
 CTTCTGTATGAACTATTCAGATATAAA
 CAATTTAACAAGGATGTTATCACTGTA
 GCCGTTGGCTACTATCTAAGATATGCAT
 TGAGTTATCGTGATATGTCTGAAATATT

Amplification product: 310 bp

Fig. 2. PCR-restriction analysis of *mecI* gene with *MseI* in Class A

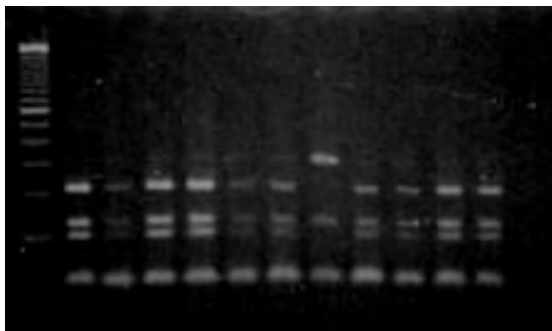


Table 1. Correlation of *MecI*, *MecR1*, and oxacillin MIC in *S. haemolyticus*

MIC (µg/ml)	No. of isolates	MecI	mecI-mecR1 class	MecR1 deletion site
>128	32	-	A (7) C1 (20) C2 (5)	A (mutation) C1: 968 bp C2: 92 bp
64	1	-	C2	92 bp
32	1	-	C2	92 bp
16	5	-	C2	92 bp
8	2	-	C2	92 bp
4	1	-	C2	92 bp
2	7	-	C2	92 bp
1	6	-	C2	92 bp
0.5	1	-	unknown	-
0.25	1	-	A	-
0.125	5	-	C2 (3) Unknown (2)	92 bp

AAGGGAACGTGGTGTAACGTTTCATC
 ATTTAACGGTCTAGCGTTGAGTTCAAG
 AATATGCCCGATTTTATATCAAATTTG
 GAAGAAAAAGCATAAAAAAGCTTATT
 ACAAATGGCGTATTGATGAGACGTACA
 TCAAATAAAAGGAAAATGGAACCTATT
 TATATCGTGCCATTGATACAGAGGGAC
 ATACATTAGATATTTGGTTGCGTAAGCA
 ACGAGATAATCATTTCAGCATATGTATTT
 ATCAAACGTCTCATTAAACAATTTGGT
 AAACCTCAAAGGTAATTACAGATTAG
 GCACCTTCAACGAAGGTCGCAATGGC
 TAAAGTCATTAAAGCTTTTAAACTTAA
 ACCTGACTGTCATTGTACATCGAAAAT
 NTGAACCCCCNC

(blocked and underlined sequence is *UmecR1*)

四、成果自評

- (1) 綜合與上一計劃(主要針對 *S. aureus*) 結果, 已完成 *S. aureus*, *S. haemolyticus*, 少數 *S. epidermidis* 之 *mecR1*, *mecI* (Upstream region of SCCmec) 偵測。
- (2) 已完成 methicillin-resistant *S. aureus*, *S. haemolyticus* 之 Strain typing。
- (3) 已完成部份 methicillin-resistant *S.*

aureus, *S. haemolyticus* 菌株之 *mecRI* 定序。

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 β -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] Kobayashi N et al. 1999. Distribution of insertion sequence-like element IS1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 43:2780-2782.
- [16] Yushida T et al. 1997. Combined use of ribotyping, PFGE typing and IS431 typing in the discrimination of

nosocomial strains of *aureus*. Microbiol. Immunol.
methicillin-resistant *Staphylococcus* 41:687-695.

附件：封面格式

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果 報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※※※※

※

※ 葡萄球菌 *mecA* 上游調控基因分析

※

※

※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※※※

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-249-

執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：鄧麗珍

共同主持人：

計畫參與人員：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院 醫事技術學系

中 華 民 國 92 年 9 月 29 日