

PCR 法检测耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌的 *mecA* 基因^①

詹文华^{1②} 竹村 弘² 东山 康仁³ 大野 秀明³
松田 淳一² 贺来 满夫² 原 耕平³

(1 中山医科大学附属第一医院外科;广州,510080 2 日本长崎大学附属病院检查部
3 日本长崎大学附属病院第二内科)

提 要 临床标本进行 DNA 抽提后,用聚合酶链反应(PCR)将具有 623 个 bp 的耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA)的 *mecA* 基因扩增,经琼脂糖电泳及 DNA 印迹杂交(southern blot hybridization),并用 ECL3' 寡核苷酸标记增强化学发光进行检测,其结果与 MRSA 常规培养方法作比较。结果显示,73 份临床标本中,15 份常规培养法 MRSA 和 PCR 法 *mecA* 基因均为阳性,另 1 份 *mecA* 基因扩增阳性的标本,常规培养 MRSA 为阴性。作者认为,由于 PCR 对检测 MRSA 的 *mecA* 基因具有快速、较强的特异性和敏感性等特点,作为检测临床标本中的 MRSA 的方法是可行的。

主题词 聚合酶链反应;金黄色葡萄球菌/遗传学;基因,细菌

中图分类号 Q939.9;R446.5

耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)除产生青霉素结合蛋白(PBP_S)以外,尚产生一种低亲和力青霉素结合蛋白 PBP2' 或 PBP2a。业已证明,这种 PBP 的结构基因就是 *mecA*,仅存在于耐药菌株而不存在于敏感菌株。近年发展起来的 PCR 法为鉴定 MRSA 提供一种简单而迅速的方法^[1]。本研究分别用常规培养和 PCR 方法检测 MRSA,比较两种方法检出 MRSA 的敏感性和特异性。

1 材料和方法

1.1 标本取材

住院病人鼻腔、咽部、粪便、伤口脓液及痰液共 73 份,标本来自长崎大学医学院附属病院外科 40 份、ICU19 份、内科 10 份、其他 4 份。采痰用专用标本杯(Elkay products, jnc

美国),其他标本用带拭子专用培养管(日本荣研制)或 Transwab 管(英国)。

1.2 MRSA 常规培养

取上述标本管和标本杯的标本直接涂布于 OPA 葡萄球菌琼脂平板上(becton dickinson, 美国),细菌定量培养以 0.45% 灭菌氯化钠按 10² 和 10⁴ 倍稀释,然后用自动螺旋式定量接种仪接种于 OPA 琼脂平板,35℃ 培养 48h。最小药物抑菌浓度(MIC)以苯唑青霉素(oxacillin) 4μg/ml 以上作为 MRSA 阳性判断标准。

1.3 DNA 提取

全部操作均在超净台内进行。培养菌液以 15 000 r/min,离心 1min。弃上清液后,沉渣用酶-SDS 法抽提 DNA。先加入 200μl 5mmol/L EDTA (pH8.0),混和后加入 20μl 的 5mg/ml achromopetidase,50℃ 保温 5min,分别加入 20μl 的 20%SDS 0.25mol/L NaOH,10μl 5mol/L NaCl 和 200μl 的酚混

① 日中医学协会资助项目;

② 第一作者,1943 年出生,男,教授

合液(各组比例是酚:氯仿:异戊醇=25:24:1),均匀混合,15 000 r/min,离心3min。上清液移入新的微型离心管,加入2倍的乙醇,室温置5min,15 000r/min,离心5min。弃上清液,加入200 μ l洗涤缓冲液(0.25mol/L NaCl,50mol/L Tris-HCl,pH8.0),均匀混合,再加入500 μ l的乙醇,缓慢混合,置室温5min,再15 000r/min,离心5min。弃去上清液,加入500 μ l的70%乙醇,同法离心3min,弃去上清液,沉渣干燥后加入50 μ l无菌双蒸水。

1.4 PCR 检测 MRSA 的 mecA 基因

取上述 DNA 抽提液 10 μ l,分别加入 TTh DNA 多聚酶(ToYoBo,日本)1 μ l(工作浓度 IU/ μ l),缓冲液(随附)5 μ l,dNTP(日本,TakaRa)5 μ l,引物 MRSA 4 A 和 MRSA4B(其核苷酸序列见附表)各 2.5 μ l(DNA synthesizer, Model 380B, Applied Biosystems)及无菌双蒸水 24 μ l。总反应体积为 50 μ l,PCR 扩增片段为 MRSA 的 mecA 基因 5'端的 1321~1943bp,总长度为 623bp。

附表 PCR 引物和探针的核苷酸序列和位置

	序列(5'~3')	位置
引物 MRSA-4A	GGTGGTTACAAGGTTACAAG	1321~1340
MRSA-4B	GCATTGTAGCTAGCCATTC	1943~1924
探针 MRSA-4AB	TCAATCTATTAATGATGGT	1709~1728

PCR 在自动变温扩增仪(ASTEC program temp control system PC-700,日本)中进行。变性、退火和延伸温度分别为 94 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C和 72 $^{\circ}$ C,时间均为 1min,共进行 35~40 个循环。PCR 产物用 4%琼脂糖凝胶(1% NuSieve[®],3%SeaKem[®] EM agarose,FMC)在 Mupid-3 电泳仪中电泳,溴化乙锭染色后在 Transilluminator 紫外线照相仪(Polaroid MP-4)进行紫外线照像。每次 PCR 均设 MRSA(临床分离株)阳性和空白对照。电泳标记物为 Marker5(ϕ X174/Hinc I digest,日本和光纯药)。

1.5 DNA 印迹和膜上杂交法确认 mecA 基因

PCR 产物电泳染色后用 0.4mol/L NaOH 作为杂交缓冲液,用 DNA 印迹杂交(Southern blot hybridization)法将 DNA 转移至 Hybond-N 滤膜(Amersham,英国),探针的核苷酸序列见附表。用 ECL3'寡核苷酸标记和检测系统(Amersham,英国)进行增强化学发光法标记、杂交及检测,具体步骤按试剂盒说明书进行。

2 结果

2.1 PCR 检测 MRSA 的特异性

图 1 示电泳溴化乙锭染色及紫外线照像结果。标记物 Marker 5 的第 3 条电泳带分子量为 612bp,临床分离 MRSA 阳性对照菌株(第 3 行)和标本阳性者(第 5、6、8 行)均在 Marker 5 的第 3 条电泳带相约位置。而常规培养为对甲氧苯青霉素敏感金黄色葡萄球菌(methicillin susceptible staphylococcus aureus,MSSA,第 4 行)、绿脓杆菌(第 7 行)、表皮葡萄球菌(第 9 行)均未能发现相似电泳带。为了进一步证实 PCR 产物的电泳带是否确为 mecA,电泳后的琼脂糖凝胶紫外照相后即行 DNA 印迹杂交。图 2 示电泳带与经 ECL 系统杂交后显影相吻合的情况。第 7 行电泳带不甚明显,不能由此判断是否为阳性结果,但经杂交后,可以明确为阳性。



图 1 PCR 产物经溴化乙锭染色的电泳图

1 DNA 标记,2 空白对照,3 MRSA 阳性对照,4 MSSA,5 MRSA,6 MRSA,7 绿脓杆菌,8 MRSA,9 表皮葡萄球菌

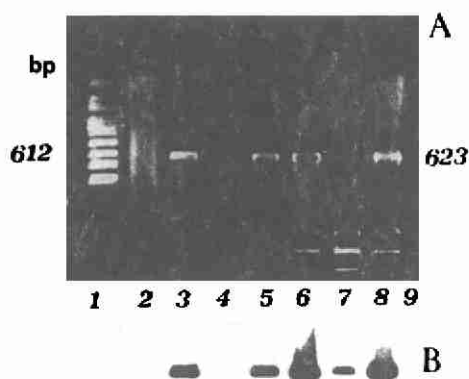


图2 PCR产物DNA印迹杂交

A. PCR产物电泳图, B. DNA印迹杂交增强化学发光显影图。1 DNA标记, 2 空白对照, 3 MRSA阳性对照, 4 MRSA(-), 5 MRSA(+), 6 MRSA(+), 7 MRSA(+), 8 MRSA(+), 9 MRSA(-)

2.2 PCR与常规培养检出MRSA的比较

73份临床标本中,常规培养检出MRSA共15份,菌量自 3×10^2 CFU/ml至 2×10^8 CFU/ml不等。PCR检出mecA阳性共16份标本,其中15份阳性与常规培养方法结果相符合,另1份常规培养MRSA为阴性。常规培养为绿脓杆菌5份,溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、轻型链球菌、产气杆菌各1份,这些标本的PCR结果MRSA均为阴性。

3 讨论

MRSA感染在发达国家已经成为医院内感染的重要问题,日本大学医学部第三外科报告1988年至1991年外科住院患者2136例中,发生MRSA感染者共108例(5.1%),其中食管癌、肝、胆、胰及大肠恶性肿瘤病人发生率较高^[2]。对鼻腔、咯痰、大小便及伤口脓液检出MRSA的病例分别给予适当处理,以防止MRSA感染的发生^[3]。我国MRSA的分离率目前还不算很高^[4],但随着第3代头孢霉素的广泛应用,在可见的将来,MRSA的分离率和感染将会逐渐增高。

迅速和可靠地鉴定MRSA,对于这类感染的及时和恰当治疗是十分必要的。目前常规的MRSA培养和药敏试验最少需48h,而且,MRSA的表现型表达往往是不均一的^[5]。另外,MRSA的耐药性往往受温度、培养基的pH和氯化钠浓度等培养条件的影响,这些因素使得耐药性特别是低度耐药的判断更为复杂。

PCR法检测MRSA属于PBP结构基因(mecA)鉴定法,所需DNA的量很少,可不用放射性物质,结果快速,而且在一般检验室可以进行,因此实用性更强。用现行的最小药物抑菌浓度(MIC)测定法判定为methicillin敏感的菌株中,可含有少数mecA基因阳性菌株,这些菌株对oxacillin和methicillin的MIC往往处于临界值。MIC法判定为耐药的菌株中,也可含有少数mecA基因阴性的菌株,这些菌株的MIC也往往处于临界值。换言之,MIC不能判定的MRSA,用PCR法测可以检出^[6]。本文MIC法检出MRSA阳性15份标本,而PCR检出16份标本可能与此有关。因此,在检测MRSA方面,PCR法比MIC法更敏感,与东山等的研究结果相似^[7]。

由于PCR法是MRSA的mecA基因检测法,而凝固酶阴性的葡萄球菌也可携带mecA基因,因此PCR检测MRSA阳性的菌株,可能含有凝固酶阴性的菌株。其次,由于PCR法的敏感性高,可以出现假阳性,理论上PCR的敏感度随其循环数增加而升高,但过多的循环数易产生假阳性。因此探索合适的循环次数是十分重要的。此外,临床标本中的许多杂质可能抑制DNA聚合酶的活性,如直接用临床标本作PCR循环扩增,标本必须进行除杂质和纯化标本中的DNA等处理,以减低假阴性和假阳性率。

参考文献

- 1 Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. Iden-

- tification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiology, 1991, 29 : 2240
- 2 岩井重富. MRSA 感染症の治療, 消化器外科, 1994, 17 : 83
 - 3 炭山嘉伸, 草地信也. MRSA の検出される無症状性術後患者の管理. 消化器外科, 1994, 17 : 93
 - 4 张扣兴, 唐英春, 饶 宪, 等. 广州地区耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌分离状况及药物敏感性. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13 : 188
 - 5 Knox R, Smith JT. The nature of penicillin resistance in staphylococci. Lancet, 1961, I : 520
 - 6 徳江豊. Polymerase chain reaction を用いた MRSA の判定. 検査と技術, 1991, 19 : 835
 - 7 东山康仁, 古贺宏延, 河野茂, 他. Polymerase chain reaction 法による咽頭ぬぐい液からのメチシリン耐性ブドウ球菌 *mecA* 遺伝子ノ検出. 感染症学雑誌, 1993, 67 : 12
- (1994-05-27 投稿 1995-03-05 修回)

DETECTION OF *mecA* GENE OF METHICILIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS FROM CLINICAL SPECIMENS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Zhan Wenhua¹ Hirtmu Takemura² Junichi Matsuda² Mitsuo KaKu²
Yasuhito Higashiyama³ Hideaki Ohno³ Kohei Hara³

(1 Department of Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080; 2 Department of Laboratory Medicine, 3 Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University, School of Medicine, Japan)

After DNA was extracted from clinical Specimens, a 623bp region of *mecA* gene of methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA) was amplified by polymerase chain reaction and detected by agarose gelelectrophoresis. PCR products were hybridized by Southern blot method and detected by ECL3'-oligolabelling and detection system by using enhanced chemiluminescence. Results were compared with those from conventional culture method for MRSA. Of the 73 clinical specimens, 15 were MRSA positive by conventional culture method and was *mecA* positive by PCR. One was *mecA* positive by PCR, but were MRSA negative by conventional culture. In conclusion, the good specificity and sensitivity of the PCR method for the detection of *mecA* gene employed here suggest the possibility of application of this method for detection of MRSA in clinical specimens.

Subject headings polymerase chain reaction; staphylococcus aureus/genetics; genes, bacterial