DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.010
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
20 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0020-03

压电基因传感器阵列检测MRSA的实验研究

刘明华[1],府伟灵[2],陈 鸣[2],黄君富[2],黄 庆[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]ICU;[2]检验科;重庆 400038)

提 要:目的 探讨以压电传感阵列技术检测耐甲氧西林葡萄球菌的可行性。方法 收集临床64株葡萄球菌标本,对其耐药标志基因mecA基因和金黄色葡萄球菌特有基因femA基因扩增后应用压电传感器阵列进行检测,并以PCR电泳检测作参照,与目前采用的常规药物敏感试验进行对比分析。结果 传感器分析与PCR电泳分析结果完全一致。而此两种方法与常规培养加药敏法比较,结果略有差异。所有64株葡萄球菌中,2株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的mecA为阴性;2株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)的mecA为阳性。1株耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)的mecA为阴性;2株甲氧西林敏感凝固酶阴性葡萄球菌(MSCNS)的mecA为阳性。结论 以压电传感阵列技术同时检测femA基因和mecA基因,既可鉴定出是否为金黄色葡萄球菌,又可判断其耐药类型,能为危重病人感染MRSA时的诊断和治疗提供依据。

关键词:耐甲氧西林葡萄球菌;压电晶体;传感器
中图法分类号:R446.5;TP 212.3 文献标识码:A

Detection of methicillin-resistant *Staphylococci aureus* by piezoelectric gene sensor arrays

LIU Ming-hua, FU Wei-ling, CHEN Ming, HUANG Jun-fu, HUANG Qing (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of the detection of methicillin-resistant *Staphylococci aureus* (MRSA) by piezoelectric gene sensor arrays. **Methods** The resistant marker gene mecA and specific gene femA of *Staphylococcus aureus* were detected in 64 collected strains of staphylococcus and the results were compared with those obtained by PCR and conventional antimicrobial susceptibility test. **Results** The results by sensor arrays were identical to those by PCR, but had some differences with those by antimicrobial susceptibility test. Among 64 strains of staphylococcus, 2 strains of MRSA had negative mecA gene, 2 strains of methicillin-susceptible *Staphylococci aureus* (MSSA) showed positive to mecA, 1 strain of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcus (MRCNS) showed negative to mecA, and 2 strains of methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococcus (MSCNS) encoded mecA gene fragment. **Conclusion** With the piezoelectric gene sensor arrays, mecA and femA gene can be detected at the same time, so the instrument provides a rapid diagnosis for MRSA infection.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococci aureus*; piezoelectric crystal; sensor

耐甲氧西林葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococci aureus*,MRSA)是引起危重病人院内感染的主要病原菌之一。近40年来,MRSA在临床分离金葡菌中的比例及耐药程度不断加重,且引起的感染和病死率有逐年增加的趋势。准确而快速的检测是控制其流行的关键,基因检测能有效提高检测的准确性[1,2]。既往基因检测方法较多,但均存在一定缺陷。我们跟踪国内外研究进展,初步构建了临床基因检测的新方法,即压电传感器阵列基因检测系统[3]。在本实验中,我们应用压电晶体传感器阵列,同时检测葡萄球菌的耐药标志mecA基因和金黄色葡萄球菌特有的femA基因,并与其它常用方法进行了对比,以探讨压电传感阵列技术诊断耐甲氧西林葡萄球菌的特异性。

基金项目:国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助面上项目(39870831);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);全军"九五"医学科研计划资助面上项目(98MO94);全军"十五"医学科研计划资助面上项目(01MA180);全军"十五"医学科研计划指令性课题(01LO65);重庆市科委风险投资基金资助项目
作者简介:刘明华(1966-),男,湖北省仙桃市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事临床感染方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754106
通信作者:府伟灵(E-mail:weilingfu@yahoo.com)
收稿日期:2001-10-30;修回日期:2001-12-12

1 材料和方法

1.1 主要仪器

传感器阵列为2×5,其中压电晶体为AT切型,基本频率为10 MHz,晶片直径8.0 mm,金膜电极直径4.5 mm。传感器阵列与晶体振荡电路相连接后置于一屏敝系统之中,而后通过数据采集电路系统将频率数据输入计算机进行储存和分析。

1.2 菌株

标准MSSA菌株ATCC[R] 29213,标准MRSA菌株ATCC[R] 43300,临床收集分离的葡萄球菌64株,其中金黄色葡萄球菌38株,凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)26株,经常规方法和API法鉴定。

1.3 主要试剂

Tris-HCl缓冲液(10 μmol/L,pH=7.9,含0.2 mol/L NaCl);6-巯基己醇(aldrich公司);葡萄球菌溶菌素(Sigma公司),小量基因组DNA抽提试剂盒、Pfu DNA聚合酶、dNTP等均为上海生工公司生产。寡核苷酸引物及探针均由上海生物工程研究所合成,

引物为:mecA-P1 5′CCAGGAATGCAGAAAGACC 379 bp
mecA-P2 5′TAATGGGACCAACATAACC
femA-P1 5′GTATCCCATGCGGAAGGC 654 bp
femA-P2 5′TGTAAAGGCACCAAACTC
探针为:mecA 5′ HS-$(CH_2)_6$-CCAGGAATGCAGAAAGACC

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

femA 5′ HS-$(CH_2)_6$-TGGCATTGTCATTGGTAGCG

1.4 方法

1.4.1 葡萄球菌对甲氧西林体外敏感试验　　按美国临床实验室标准化委员会 1999 年版抗生素药物敏感试验执行标准, 进行筛选试验和敏感性确认。

1.4.2 探针的固定　　将每个检测池中的金膜以丙酮清洗 3 次, 而后以去离子水清洗 3 次, 氮气吹干, 与电路系统相连接, 在气相中测定其频率直到频率稳定。在 1~10 号检测池各加入 Tris-HCl 缓冲液 90 μl, 测定频率直到稳定。在 1~10 号检测池中加入探针 10 μl(终浓度为 0.5 μmol/L), 其中 1~5 号检测池为 379-mecA 基因探针, 6~10 号检测池为 654-femA 基因探针, 观察 3 h。而后在 1~10 号检测池中加入 1.0 mmol/L 的 6-巯基己醇 10 μl, 观察 1 h。吸净并以去离子水清洗各检测池, 氮气吹干备用。

1.4.3 提取葡萄球菌染色体 DNA　　参照 Tokue[4] 报道的方法稍加改进, 用 DNA 抽提试剂盒提取各株葡萄球菌染色体 DNA。

1.4.4 压电传感器阵列检测扩增产物　　①基因扩增: 反应总体积为 50 μl, 其中 10× PCR 反应缓冲液 5 μl, 10 mmol/L dNTP 1 μl, 20 pmol/μl 引物 P1 1 μl, 20 pmol/μl 引物 P2 1 μl, 50 ng/μl 模板 DNA 3 μl, 灭菌双蒸水 38.5 μl, 5 U/μl Pfu DNA 聚合酶 0.5 μl。在 DNA 扩增仪上按以下条件进行自动化扩增反应: 变性, 94 ℃ 30 s; 退火, 50 ℃ 30 s; 延伸, 72 ℃ 90 s, 共 30 个循环, 最后一个循环的延伸条件为 72 ℃ 5 min。②扩增产物含量测定: Smart-Spectro 3000 型核酸定量仪测 A 值对 DNA 进行定量。③备用传感器阵列与检测系统连接, 气相中测频至稳定, 在 1~10 号检测池各加入 Tris-HCl 缓冲液 90 μl, 测定频率直到稳定。在 1~10 号检测池中加入靶 DNA10 μl(终浓度为 0.5 μmol/L), 其中 1~3 号及 9 号为 379-mecA 扩增产物, 6~8 号和 4 号为 654-femA 扩增产物, 4 和 9 号为处理对照, 5 和 10 号检测池加入 Tris-HCl 缓冲液 10 μl 作空白对照。观察 4 h。④按上述步骤操作分别对 64 株葡萄球菌的全基因组 DNA 扩增后进行传感器检测。记录频率变化及达到相对平衡所需时间, 检测 3 次求平均值。

1.4.5 扩增产物电泳分析　　采用琼脂糖凝胶电泳法, 在含 0.5 μg/ml 溴化乙啶的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 40 min, 以 PCR marker 为分子量标准, 在紫外灯下观察结果并照相。

1.4.6 对常规的培养加药敏法、常规 PCR 分析法、扩增产物传感器分析法进行对比　　对比分析前, 首先根据前期实验的结果(待发表), 认定: 在传感器阵列分析法中, 引起频率显著变化者(检测 mecA 时 ΔF> 150 Hz, 检测 femA 时 ΔF> 180 Hz)可视为阳性, 频率无明显变化者可视为阴性。

2 结果

2.1 葡萄球菌对甲氧西林体外敏感试验, 结果见表 1

表 1　葡萄球菌对甲氧西林敏感试验结果

Tab 1　Results of methicillin susceptibility testing of different strains of staphylococci

	S. aureus	CNS	total
Resistant	17	11	28
Sensitive	21	15	36
Total	38	26	64

2.2 压电传感器阵列检测, 结果见表 2

38 株葡萄球菌的 femA 基因扩增产物与 femA 探针反应后, 频率变化显著, 变化值为 196~248Hz, 杂交时间为 42~56 min; 另外 26 株葡萄球菌在同样引物和条件下扩增后的产物与 femA 探针反应时, 频率无变化。

所有 64 株葡萄球菌中, 29 株葡萄球菌的 mecA 基因扩增产物与 mecA 探针反应后, 频率变化显著, 变化值为 165~196 Hz, 杂交时间为 38~52 min; 另外 35 株葡萄球菌在同样引物和条件下扩增后的产物与 mecA 探针反应时, 频率无变化。

表 2　压电传感器阵列检测结果

Tab 2　Detection results of methicillin-resistance and-susceptibility of staphylococcus with piezoelectric sensor arrays

	femA(+)	femA(−)	total
mecA(+)	17	12	29
mecA(−)	21	14	35
Total	38	26	64

2.3 常规 PCR 分析结果

所有 64 株葡萄球菌中, 38 株葡萄球菌的 femA 为阳性, 其中有 17 株 mecA 为阳性, 21 株 mecA 为阴性; 另外 26 株葡萄球菌的 femA 为阴性, 其中有 12 株 mecA 为阳性, 14 株 mecA 为阴性, 结果同表 2。

2.4 传感器分析法与常规培养加药敏法、常规 PCR 分析法进行对比

传感器分析与 PCR 分析比较, 对每株葡萄球菌 mecA 和 femA的检测结果完全一致, 即 PCR 阳性者传感器均能检出, 而传感器法阳性者, 在 PCR 法中均能被证实。

传感器分析与常规培养加药敏法比较: ①对每株葡萄球菌 femA 的检测结果与是否为金黄色葡萄球菌的培养结果完全一致, 即 38 株金黄色葡萄球菌的 femA 均为阳性, 26 株凝固酶阴性葡萄球菌的 femA 均为阴性; ②对每株葡萄球菌 mecA 的检测结果与对甲氧西林敏感试验的结果略有差异。有 2 株 MRSA 的 mecA 为阴性, 2 株 MSSA 的 mecA 为阳性, 有 1 株 MRCNS 的 mecA 为阴性, 2 株 MSCNS 的 mecA 为阳性, 见表 3。

表 3　三种检测法对比之结果差异

Tab 3　Differences among the 3 detection methods on methicillin-resistance and-susceptibility of staphylococcus

Strains No.	Culture and susceptibility testing	piezoelectric arrays	PCR
7 th	MSSA	mecA(+)	mecA (+)
18 th	MRSA	mecA(−)	mecA (−)
27 th	MSCNS	mecA(+)	mecA (+)
39 th	MRSA	mecA(−)	mecA (−)
45 th	MRCNS	mecA(−)	mecA (−)
46 th	MSCNS	mecA(+)	mecA (+)
56 th	MSSA	mecA(+)	mecA (+)

3 讨论

葡萄球菌对 β-内酰胺类抗生素的耐药主要有 3 个原因: 产生大量的与 β－内酰胺类抗生素亲和力极低的青霉素结合蛋白(PBP)2a, 过量生成其他 PBPs 和产生 β－内酰胺酶。其中, 最主要的原因为产生 mecA 编码的 PBP2a, 这种耐药称为固有耐药。现已明确 mecA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

基因只存在于葡萄球菌中，因此，mecA 基因可作为耐甲氧西林葡萄球菌的分子标志[5]。虽然个别的 mecA 阳性葡萄球菌对甲氧西林敏感，但与β－内酰胺类接触后，都可转化为耐β－内酰胺类抗生素菌株。因此一旦发现携带有 mecA 基因，就应视为耐甲氧西林菌对待。femA 基因为金黄色葡萄球菌所特有的 mecA 基因的辅助调控基因，与 mecA 基因协同才能表达对甲氧西林的耐药性。同时检测 femA 基因和 mecA 基因，即可鉴定出是否为金黄色葡萄球菌，又可判断其耐药类型，能为危重病人感染 MRSA 时的诊断和治疗提供依据。

在以前的实验中，我们已经研究证实压电传感器是一种极其灵敏（可达 ng 甚至 pg 级水平）的具有良好稳定性和特异性的检测仪器，可以用于基因检测[3]。在本实验中，我们针对 femA 基因和 mecA 基因的检测，采取了几种不同的方式进行探讨，并将其检测结果与临床常规采用的培养加药敏方法及近年采用的 PCR 分析法进行了对比分析。

本研究中，以压电传感器阵列进行检测，38 株金黄色葡萄球菌 femA 均为阳性，26 株凝固酶阴性葡萄球菌 femA 均为阴性，符合率达到 100%。以压电传感器阵列检测结果与药物敏感试验相比较，17 株 mecA 阳性的金黄色葡萄球菌中药敏法耐甲氧西林的有 15 株，12 株 mecA 阳性的凝固酶阴性的葡萄球菌中耐甲氧西林的有 10 株；同样，21 株 mecA 阴性的金黄色葡萄球菌中药敏法对甲氧西林敏感的有 19 株，14 株 mecA 阴性的凝固酶阴性的葡萄球菌中对甲氧西林敏感的有 13 株。其结果有少数几株不相符。我们以目前常规应用的 PCR 分析法作为参照，结果表明，两种方法检测的结果具有完全的一致性。传感器基因检测与常规药物敏感试验出现部分结果差异，其原因不在检测误差，而在于其耐药的分子机制上。

mecA 基因阳性的 2 株金黄色葡萄球菌和 2 株凝固酶阴性葡萄球菌对甲氧西林敏感，原因是 mecA 基因的表达受多种因素控制，如 mec Ⅰ 基因、mecR1 基因、blaⅠ 基因、blaR1 基因和 fem 基因等[6]，在基因组中即使存在 mecA 基因，但受其辅助调控基因控制，mecA 基因不一定表达出来。在体外试验中，这部分 mecA 基因没有表达的葡萄球菌可能一时对甲氧西林敏感。Freboug[2] 和 Donald[7] 均报道过 mecA 基因检出与表型不符的菌株，不论基因是否表达，只要有 mecA 就具有潜在的耐药性。由于有 mecA 基因的存在，在一些因素的作用下一旦 PBP2a 表达，该葡萄球菌就会转变为对甲氧西林耐药。对此耐药性菌株，临床上就不再适宜用青霉素类、头孢霉素类、碳青霉烯类和β-内酰胺类酶抑制剂抗生素治疗，目前只有糖肽类抗生素是唯一肯定有效的抗生素[8]。

mecA 基因阴性的 2 株金黄色葡萄球菌和 1 株凝固酶阴性葡萄球菌表现为对甲氧西林耐药，其原因是葡萄球菌发生耐药可由多种机制导致，除 mecA 基因表达外，还可能为β-内酰胺酶的大量产生和 PBP1、PBP2 和 PBP3 与抗生素的亲和力的降低，并增加了 PBP4 或 PBP2 的数量[9]。实验中这 3 株葡萄球菌基因组中虽然缺乏 mecA 基因，但可能出现了后两种情况，因此表现为对甲氧西林耐药[10]。但这些葡萄球菌对β-内酰胺类抗生素或β-内酰胺类抗生素与β-内酰胺酶抑制剂的联合制剂仍然敏感。

从本实验可看出，与其它检测方法相比，应用压电传感器阵列进行临床基因检测将有许多优势，如可以进行 DNA 的液相杂交检测，实时检测，多样品同时检斥，特异性强，无污染等。联合应用基因扩增技术和压电传感技术，可快速、灵敏、特异的同时检测 femA 基因和 mecA 基因，既可鉴定出是否为金黄色葡萄球菌，又可判断其耐药类型，为临床诊断和治疗提供依据。

参考文献：

[1] 郑 波，李家泰. 多重聚合酶链反应检测耐甲氧西林葡萄球菌[J]. 中华医学检验杂志，1999，22(3)：145－148.

[2] Frebourg N B，Nouet D，Lemee L，*et al*. Comparison of ATB Staph，Vitek and E test methods for detection of Oxacilline heteroresistance in staphlococci possesing mecA[J]. J Clin Microbiol，1998，36(1)：52－57.

[3] 刘明华，府伟灵，汪松林，等. 压电基因传感器阵列的初步构建[J]. 第三军医大学学报，2001，23(7)：810－812.

[4] Tokue Y，Shoji S，Saton K，*et al*. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin resistant staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother，1992，36(1)：6－9.

[5] de Lencastre H，de Jonge B L，Matthews P R，*et al*. Molecular aspects of methicillin resistance in staphylococcus aureus[J]. J Antimicrob Chemother，1994，33(1)：7－24.

[6] Keiichi H. Molecular evolution of MRSA[J]. Microbiol Immunol，1995，39(8)：531－543.

[7] Mc Donald C L，Mather W E，Fass R J. Revised interpretation of oxacillic MICs for staphylococcus epidermitis based on mecA detection[J]. Antimicrob Agents Chemother，1995，39(1)：982－985.

[8] Lowy F D. Staphylococcus aureus infection[J]. N Engl J Med，1998，339(8)：520－532.

[9] Henze U U，Berger-Bachi B. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases β-lactam resistance in Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother，1996，40(9)：2 121－2 125.

[10] Chambers H F. Methicillin resistance in staphylococci：molecular and biochemical basis and clinical implications[J]. Clin Microbiol Rev，1997，10(1)：781－791.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net