

• 基础实验研究论著 •

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速分型方法的研究^{*}

于静波,勾顺利,薛文成,徐 蕙,孟冬娅[△]

(中国人民解放军沈阳军区总医院检验科,辽宁沈阳 110840)

摘 要:目的 基于聚合酶链反应(PCR)-高分辨率熔解(HRM)曲线分析方法和葡萄球菌蛋白 A(SPA)分型方法,建立一种适用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的快速分型方法。方法 收集临床分离的 71 株 MRSA 作为试验菌株,采用基因测序和 HRM 曲线分析方法对菌株进行 SPA 基因分型。结果 采用基因测序方法,71 株 MRSA 菌株的 SPA 基因分为 4 个型别,分别是 t570、t030、t002 和 t588,以 t570(53 例)为主要型别,其次是 t030 和 t002(均为 7 例)。HRM 分析对 SPA 基因的分型结果与基因测序方法的结果基本一致。结论 PCR-HRM 分析有望成为一种快速、有效的 MRSA 的 SPA 基因分型方法,为医院感染控制提供依据。

关键词:葡萄球菌蛋白 A; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 基因分型; 高分辨率熔解曲线分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)09-1103-02

A study of rapid genotyping method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*^{*}

Yu Jingbo, Gou Shunli, Xue Wencheng, Xu Hui, Meng Dongya[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Military General Hospital of Shenyang Chinese People's Liberation Army, Shenyang, Liaoning 110840, China)

Abstract: **Objective** To establish a rapid genotyping method of for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) based on polymerase chain reaction(PCR)-high resolution melting(HRM) curve analysis and staphylococcal protein A(SPA) classification. **Methods** 71 strains of MRSA clinically isolated were collected as test strains. Gene sequencing and HRM curve analysis were employed to conduct SPA gene typing. **Results** According to gene sequencing method, SPA gene of 71 strains of MRSA was divided into four types, namely t570, t030, t002 and t588. The most predominant type was t570 (74.65%), followed by t030 and t002(both 7 cases). The result of SPA gene typing by HRM analysis were basically consistent with that by gene sequencing. **Conclusion** PCR-HRM analysis is expected to become a fast, efficient genotyping for MRSA SPA gene, providing the basis for hospital infection control.

Key words: staphylococcal protein A; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; genotyping; high resolution melting curve analysis

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)的基因分型方法包括脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、葡萄球菌蛋白 A(staphylococcal protein A, SPA)分型、葡萄球菌染色体 mec 盒(staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec)分型等^[1-2]。SPA 分型是以研究 SPA 基因 X 区域中重复序列的类型和排列顺序为基础。文献报道,SPA 分型与 PFGE、MLST 分型具有较好的一致性^[3]。因此,SPA 分型不仅可以确认短时间、小范围的 MRSA 暴发流行株,还可以用来研究 MRSA 的流行趋势。常规 SPA 分型同其他分子分型一样费时和高成本。本研究探讨建立一种基于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的 SPA 快速分型方法,即 PCR 高分辨率熔解(high resolution melting, HRM)曲线分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2011 年 11 月至 2012 年 4 月临床分离的 71 株 MRSA 作为试验菌株。标本类型包括:呼吸道分泌物、脓液、脑脊液和血液。标本来源于重症监护病房、神经外科重症监护病房、干部病房、呼吸内科重症监护病房等。所有菌株均经头孢西丁实验和 mecA 基因检测,确认为 MRSA。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:LightCycler 480 High

Resolution Melting Master 为瑞士 Roche 公司产品,PCR 试剂、核酸提取试剂盒、引物购自宝生物工程(大连)有限公司。主要仪器:LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.3 引物设计 参照 Harmsen 等^[2]报道的 SPA 基因引物序列,并用引物设计软件 Primer5.0 进行验证,引物序列如下,F: 5'-AGA CGA ATC CTT CGG TGA GC-3', R: 5'-GCT TTT GCA ATG TCA TTT ACT G-3'。

1.4 PCR-HRM 分析 优化后的 PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 4 min,95 ℃ 变性 30s,65 ℃~55 ℃ 退火 30s(每个循环降低 0.5 ℃),72 ℃ 延伸 1 min(收集荧光信号),扩增 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 2 min。PCR 扩增结束后直接运行 HRM 程序:95 ℃ 1 min,40 ℃ 降温 1 min,75 ℃~95 ℃ 连续升温(每上升 1 ℃ 收集 25 次荧光信号),冷却 40 ℃ 10s。使用 LightCycler 480 Gene Scanning Software 分析 HRM 曲线,曲线间相同或不同的判断标准参考文献[2-3]。

1.5 测序及分析 将 PCR 扩增产物委托美国 Invitrogen 生命技术公司纯化、测序。测序结果与 SPA 基因分型数据库(<http://www.ridom.de/spaserver>)公布的重复序列和排列进行比较,确定菌株的 SPA 基因型别。

1.6 结果比对 将菌株的 SPA 基因型别与 HRM 分析的结

^{*} 基金项目:辽宁省科技攻关计划(2011225021)。 作者简介:于静波,女,检验师,主要从事微生物鉴定与耐药机制的研究工作。 [△] 通讯作者,E-mail:mengdongya@hotmail.com。

果进行比较,评估 HRM 分析应用于 SPA 基因分型的准确性及效果。

2 结 果

2.1 MRSA 菌株 SPA 基因的测序分型 71 株 MRSA 菌株 SPA 基因分为 4 个型别,分别是 t570、t030、t002 和 t588,以 t570(53 例)为主要型别,其次是 t030 和 t002(均为 7 例),每型的重复序列见表 1。

2.2 HRM 曲线分析方法的建立及临床分离株的 SPA 基因分型 通过对加入饱和荧光染料的 PCR 产物直接进行 HRM 分析,可得到荧光强度变化率-温度溶解曲线,软件根据曲线的峰形和主峰的起落点、T_m 值判断型别,见表 1 和图 1。71 株 MRSA SPA 分为 4 个型别,而且各型别的菌株与测序分型的菌株完全一致。在不改变曲线形状的条件下,通过对曲线进行放大等调整,并进行相互间的比对,可以将型别间的特征差异在图 1 中清楚显示。

表 1 71 株 MRSA 菌株 SPA 基因分型结果

SPA 型别	重复序列	T _m 值	菌株 [n(%)]
t570	07-23-17-34-17-20-17-12-17-16	84.54±0.09	53(74.65)
t002	26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	84.22±0.15	7(9.86)
t030	15-12-16-02-24-24	83.48±0.08	7(9.86)
t588	08-16-02-24-25	83.15±0.03	4(5.63)

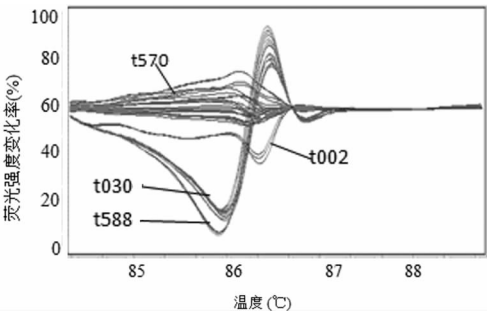


图 1 HRM 曲线分析的 SPA 基因分型

3 讨 论

1987 年 Pickenhahn 等^[4]首次将 SPA 基因多态性分析应用于金黄色葡萄球菌。SPA 基因包括 Fc 结合区、X 区和 C 末端,其中 X 区包含 2~15 个重复序列,重复序列的长度为 21~27 bp,因该区域重复序列的排列顺序及数量不同而具有高度的多态性。以此为据,可以对金黄色葡萄球菌进行分型。目前该数据库确认的重复序列片段有 583 个,SPA 基因型别共 12 121 种,且 SPA 基因分型数据库已经建立 (<http://spaserver.Ridom.de/>),使得各实验室间结果易于比较^[5]。文献报道 SPA 基因分型与 PFGE 分型方法的分辨力相当,与 MLST 分型结果高度一致(95.9%)^[3]。SPA 基因分型可被应用于 MRSA 的流行病学调查。本研究采用具有易操作、成本低等优点的 PCR-HRM 对 MRSA 进行 SPA 基因分型。

该技术是在标准 PCR 试剂的基础上加入可与双链 DNA 结合的饱和性荧光染料^[6-7],在 PCR 扩增后运行 HRM 程序,将 PCR 产物自低温到高温(60℃~95℃)逐步升温,每次升温 0.02℃~0.10℃,在这个过程中,双链 DNA 解链,荧光染料脱落,不再产生荧光信号。以温度作为横坐标,以荧光强度变

化作为纵坐标作图,可获得对应于特定双链 DNA 的特征曲线。因 DNA 序列的长度、GC 含量及碱基互补性差异,每一段 DNA 具有独特的溶解曲线形状。

国外已有应用溶解曲线进行 SPA 基因分型的先例^[8-9],实验中所使用的荧光染料为 SYBR Green I,是一种非饱和荧光染料。由于该染料的非饱和性,在染料与双链 DNA 结合的过程中可能出现不稳定因素,由此导致的荧光强度变化会使 HRM 分析结果出现偏差,他们认为 HRM 曲线分析不能检测出核苷酸序列中单个位点变化的结论。本研究采用 Roche HRM dye(DNA 饱和荧光染料),并对 PCR 反应体系及条件进行了优化,将第 1 个重复序列中仅相差一个碱基的 t570 型与 t002 型区分开。实验中,71 株 MRSA 的 HRM 曲线形成了较为明显的 4 个型别,且均通过与测序分型结果对比,分型符合率为 100%。但由于菌株数量有限,本实验仅检测到 4 个 SPA 基因型别,采用 HRM 曲线分析是否能够实现对所有 SPA 基因型别的区分尚不能下定论,且 HRM 分型中有关分型定义的标准也需要进一步量化研究,不能仅从溶解曲线的大致形状来进行分型,如 t030 近似于 t588。但初步结果为进一步深入研究打下了良好基础。

参考文献

[1] Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome mec, SCCmec type VI[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10): 3457-3459.

[2] Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5442-5448.

[3] Hallin M, Deplano A, Denis O, et al. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of Staphylococcus aureus infections[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 127-133.

[4] Pickenhahn P, Hahn IF, Lenz W, et al. Correlation between enterotoxigenicity, tested by different ELISA-techniques, antibiotic resistance patterns and phage groups of staphylococcus aureus strains[J]. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1987, 266(1/2): 127-136.

[5] Wernitz MH, Swidsinski S, Weist K, et al. Effectiveness of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) carriers at hospital admission to prevent hospital-acquired MRSA infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11(6): 457-465.

[6] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. Clin Chem, 2003, 49(6 Pt 1): 853-860.

[7] Xue WC, Rao XC, Meng DY. Universal PCR coupled with high-resolution melting analysis for rapid detection and identification of microorganism: strategies and perspective[J]. Rev Med Microbiol, 2012, 23(1): 5-8.

[8] Stephens AJ, Inman-Bamber J, Giffard PM, et al. High-resolution melting analysis of the spa repeat region of Staphylococcus aureus[J]. Clin Chem, 2008, 54(2): 432-436.

[9] 王艳海, 张静, 陈卫华, 等. 鄂尔多斯地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型的研究[J]. 内蒙古医学杂志, 2012, 44(4): 390-394.