

# 实时荧光 PCR 法快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

聂署萍<sup>1</sup> 钟伟传<sup>2</sup> 黄烈<sup>1</sup> 吴润香<sup>1</sup> 朱新建<sup>1</sup> 凌利芬<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:评价一种直接从标本中快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的实时荧光 PCR 方法。方法:临床送检标本中筛选出 46 份金黄色葡萄球菌阳性的标本,进行实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测,并与全自动细菌鉴定仪(VITEK-2Compact)/头孢西丁纸片扩散法进行比较,评价实时荧光 PCR 方法的敏感性 & 特异性。结果:VITEK-2 Compact 分离出金黄色葡萄球菌 46 株,其中 MRSA 12 株,与头孢西丁纸片扩散法结果一致。实时荧光 PCR 法检测出金黄色葡萄球菌 46 株,其中 MRSA 13 株,敏感性 & 特异性分别为 100%(95% CI, 75.75,100),97.06%(95% CI, 85.08, 99.48)。2 种方法有很好的一致性[Kappa = 0.945(95% CI, 0.839, 1.000)]。结论:实时荧光 PCR 法是一种能从标本中直接检测 MRSA 的快速、敏感的方法。

**[关键词]** 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;实时荧光 PCR;医院感染

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.011

**[中图分类号]** R378.1 **[文献标志码]** A

## Rapid detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus by Real-time PCR

NIE Shuping<sup>1</sup> ZHONG Weichuan<sup>2</sup> HUANG Lie<sup>1</sup>  
WU Runxiang<sup>1</sup> ZHU Xinjian<sup>1</sup> LING Lifan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Futian Hospital, Guangdong Medical college, Shenzhen, 518033, China; <sup>2</sup>People's Hospital of New District Longhua Shenzhen)

Corresponding author: HUANG Lie, E-mail:13510300819@126.com

**Abstract Objective:** To evaluate a rapid method for the detection and identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from clinical specimens. **Method:** 46 Staphylococcus aureus positive clinical samples were detected by real-time PCR. VITEK 2 Compact and cefoxitin disk diffusion method were used as golden standard to evaluate the sensitivity and specificity of the real-time PCR method. **Result:** VITEK 2 Compact and cefoxitin disk diffusion method identified 46 Staphylococcus aureus strains, of which 12 strains were MRSA. Real-time PCR detected 46 Staphylococcus aureus, including 13 MRSA. The sensitivity and specificity were 100% (95% CI, 75.75, 100) and 97.06% (95% CI, 85.08, 99.48), respectively. Real-time PCR method showed very good consistency with the reference method[Kappa=0.945(95% CI, 0.839, 1.000)]. **Conclusion:** Real-time PCR method may be a reliable and fast way to detect and identify MRSA directly from the clinical specimen.

**Key words** MRSA; Real-time PCR; Nosocomial infection

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)自 1961 年首次报道后,在全世界迅速蔓延,已成为世界范围

性医院感染的难题<sup>[1-3]</sup>。及时、准确的检测 MRSA 对接触预防感染控制措施的执行及降低医院内 MRSA 感染率至关重要。本研究以全自动细菌鉴定仪(VITEK-2Compact)/头孢西丁纸片扩散法为

<sup>1</sup> 广东医学院附属福田医院(广东深圳,518033)

<sup>2</sup> 深圳市龙华新区人民医院

- [5] 陈永琴,成宇,徐文丽.肝硬化患者血小板和单核细胞参数的变化及意义[J].检验医学,2012,27(11):954-956.
- [6] Kubota A, Okamura S, Omori F, et al. High serum levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with liver cirrhosis and granulocytopenia[J]. Clin Lab Haematol, 1995, 17:61-63.
- [7] Chen B, Ye B, Zhang J, et al. RDW to platelet ratio: a novel noninvasive index for predicting hepatic fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B[J]. PLoS One,

2013, 8:e68780.

- [8] Turhan O, Coban E, Inan D, et al. Increased mean platelet volume in chronic hepatitis B patients with inactive disease[J]. Med Sci Monit, 2010, 16:202-205.
- [9] Ekiz F, Yüksel O, Koçak E, et al. Mean platelet volume as a fibrosis marker in patients with chronic hepatitis B[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25:162-165.

(收稿日期:2014-04-29)

对照,评价实时荧光聚合酶链反应 (polymerase chain reaction,PCR)法直接检测临床标本中 MR-SA 的敏感性 & 特异性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本 收集 2012-03—2012-12 临床送检的各类标本中 46 份经细菌培养检出金黄色葡萄球菌的标本,其中痰 19 份,咽拭子 17 份,伤口分泌物 8 份,血 2 份。

1.1.2 主要试剂和仪器 VETIK-2 Compact 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)、MX3000P 荧光 PCR 扩增仪(安捷伦)、MRSA 耐药基因检测试剂盒(上海之江生物科技有限公司)。头孢西丁纸片规格为 30 μg(OXOID 公司);MH 及羊血琼脂平板购自江门凯林。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定与药敏 临床送检标本经常规培养后用 VITEK-2 Compact 进行细菌的鉴定与药敏试验。革兰阳性球菌鉴定采用 GP 鉴定卡,药敏卡为 AST-GP67。鉴定及药敏试验质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923。结果判断:药敏卡头孢西丁筛查试验阳性,即判断为 MR-SA。

1.2.2 纸片扩散法 纸片扩散法参照 CLSI2011 年推荐的方法进行,结果判断标准为:抑菌圈直径 ≤ 21 mm 为耐药,≥ 22 mm 为敏感。以 ATCC25923 为质控菌株。

1.2.3 实时荧光 PCR 法 临床标本的处理,核酸提取及 PCR 扩增严格按照上海之江生物科技提供的 MRSA 耐药基因检测试剂盒说明书进行。反应体系为 40 μl,其中检测混合液 35.6 μl,酶 0.4 μl,模板 4 μl。每份标本分别加入 2 个反应体系,一份用于检测金黄色葡萄球菌特异性核酸片段(耐热核酸酶基因 nuc)进行金黄色葡萄球菌鉴定,另一份用于检测耐药基因(mecA)进行 MRSA 的鉴定。结果判读:待检样品 Ct ≤ 35,检测结果报告为阳性。分别以 ATCC25923、ATCC29213 为 mecA 基因的阴、阳性对照。

1.3 统计学处理

2 种方法一致性分析采用 Kappa 检验, www.graphpad.com/quickcalcs/Kappa2.cfm。

2 结果

VITEK 2 Compact /头孢西丁纸片扩散法检出 46 株金黄色葡萄球菌,其中 12 株细菌 VITEK 2 Compact 及纸片扩散法头孢西丁筛查试验均为阳性。实时荧光 PCR 法检出 46 株金黄色葡萄球菌,其中 MRSA 13 株。nuc 基因及 mecA 基因扩增曲线见图 1、图 2。mecA 基因平均 Ct 值为:24.96。

2 种方法结果对比见表 1。其中一株细菌实时荧光 PCR 为阳性,Ct 值为 34.62,VITEK 2 Compact 头孢西丁筛查试验阴性,头孢西丁纸片扩散法抑菌圈直径为 23 mm,也为阴性。实时荧光 PCR 法检测 MRSA 敏感性 & 特异性分别为 100% (95%CI, 75.75, 100), 97.06% (95%CI, 85.08, 99.48)。2 种方法有很好的-致性,Kappa=0.945 (95%CI,0.839,1.000)。

表 1 2 种方法检测 MRSA 的结果

|             | VITEK 2 Compact/<br>头孢西丁纸片扩散法 |    |    |
|-------------|-------------------------------|----|----|
|             | 阳性                            | 阴性 | 合计 |
| 实时荧光 PCR 阳性 | 12                            | 1  | 13 |
| 实时荧光 PCR 阴性 | 0                             | 33 | 33 |
| 合计          | 12                            | 34 | 46 |

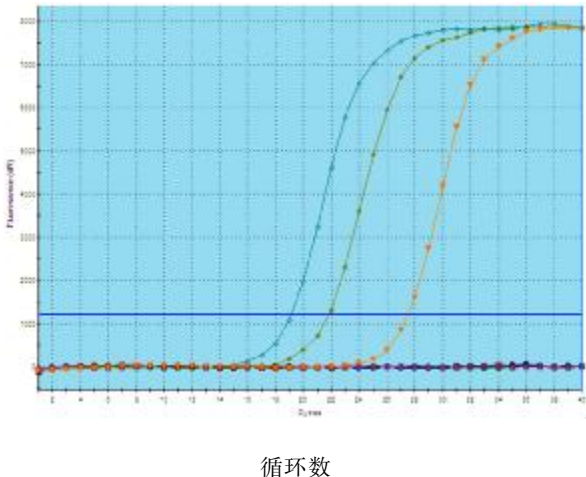


图 1 nuc 基因实时荧光定量 PCR 图

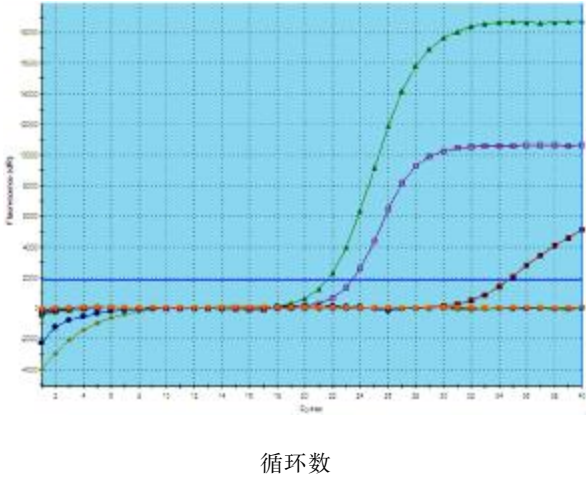


图 2 mecA 基因实时荧光定量 PCR 图

3 讨论

MRSA 是导致医院感染和社区感染的重要病原菌之一,并且其临床分离率呈不断上升趋势<sup>[4]</sup>。MRSA 不仅对 β-内酰胺类抗生素耐药,对大环内酯

类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类等抗生素均高度耐药。糖肽类是临床抗 MRSA 感染治疗的最后一道防线。目前研究认为,MRSA 的耐药机制主要是由于 *mecA* 基因编码产生青霉素结合蛋白 2a (penicillin binding protein, PBP2a), PBP2a 具有与高亲和力 PBPs 相同的青霉素结合基序,但与  $\beta$ -内酰胺类抗生素结合能力较低,能在高亲和性 PBPs 结合  $\beta$ -内酰胺类抗生素失活后,代替 PBPs 维持细菌的生长和存活,从而使 MRSA 表现出耐药性。近年来,由于广谱抗生素尤其是第 3 代头孢菌素的广泛使用,我国 MRSA 发生率逐年上升,高达 50%~70%,部分地区甚至超过 80%<sup>[5]</sup>。而美国、欧洲大部分国家 MRSA 分离率多在 5%~40%,丹麦,瑞士及荷兰甚至低于 1%~3%,与这些国家医院感染控制措施实行较早而且得力有很大关系<sup>[6-7]</sup>。及时、准确地检测出 MRSA 是接触预防感染控制措施有效实施的前提条件。但是直到现在,MRSA 的鉴定依旧依赖于传统的检测技术包括头孢西丁纸片筛选试验,选择性显色培养基或乳胶凝集检测法<sup>[3]</sup>。这些方法均需要分离细菌纯培养菌落,故在采样后 48~72 h 才能获得检测结果,且易受纸片储存条件、平板厚度和培养时间等影响,出现假阴性结果,而且当 PBP2a 低表达时,结果会难以判断<sup>[8]</sup>。

近 20 年来,PCR 等体外核酸扩增技术的快速发展,为临床微生物的检测和鉴定提供了一个新的技术平台。目前已有多种检测 MRSA 的 PCR 诊断产品,如美国 Becton Dickinson 公司的 GeneO-hm MRSA 检测试剂盒、Cepheid 公司的 Xpert MRSA 检测系统等,这些基于靶核酸扩增的分子检测方法被证实是快速、敏感和特异的<sup>[9-11]</sup>。

本试验所选试剂盒是应用实时荧光 PCR 法通过荧光探针分别检测编码 PBP2a 的 *mecA* 基因及金黄色葡萄球菌特异性耐热核酸酶的 *nuc* 基因,从而能直接从标本中快速检测耐 MRSA,大大缩短了检测时间。实时荧光 PCR 法准确的从 46 份培养确诊的阳性标本中检测出金黄色葡萄球菌,其敏感性,特异性均为 100%。VITEK 2 Compact/纸片扩散法检出 MRSA 12 株,而实时荧光 PCR 法检出 MRSA 13 株,检测 MRSA 的敏感性及特异性分别为 100%,97.06%,2 种方法有很好的-一致性(Kappa=0.945)。唯一 1 份标本不相符的原因很可能是该细菌 PBP2a 处于低表达或抑制状态( $C_t$  值为 34.62),从而使其在体外药敏试验中表现为对头孢西丁敏感。但是由于 MRSA 对  $\beta$ -内酰胺类药物的主要耐药机制为 *mecA* 基因编码产生 PBP2a。因此,凡检出 *mecA* 基因即应视为 MRSA,在其治疗过程中仍应该避免  $\beta$ -内酰胺类抗生素的使用,且患

者应采取隔离措施。

实时荧光 PCR 法通过直接对标本中特异性靶基因的扩增,灵敏的检测标本中是否含有金黄色葡萄球菌及其是否携带 *mecA* 基因,具有高灵敏性和高特异性等特点。与传统方法比较,实时荧光 PCR 方法操作简便、快速,能在 2~3 h 内完成检测且结果易判断,可以更好的满足医院感染防控 24 h 内检测患者入院时是否携带 MRSA 的要求,有效控制 MRSA 的传播。

#### 参考文献

- [1] Barber M. Methicillin-resistant staphylococci [J]. 1961, J Clin Pathol 14:385-393.
- [2] Hryniewicz W. Epidemiology of MRSA [J]. Infection, 1999, 27:S13-S16.
- [3] 吴文娟,汤一苇. 医院感染控制中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌筛查现状[J]. 传染病信息, 2009, 22(1): 54-57.
- [4] Abramson MA, Sexton DJ. Nosocomial methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremia: a what costs? [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999, 20:408-411.
- [5] 肖永红;王进;朱燕,等. Mohnarin 2008 年度全国细菌耐药监测 [J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(16):2377-2383.
- [6] Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations [J]. Ger Med Sci, 2009, 7: Doc06.
- [7] Wertheim HF, Vos MC, Boelens HA, et al. Low prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use [J]. J Hosp Infect, 2004, 56:321-325.
- [8] 李耀华,费春荣,叶爱青. 实时荧光 PCR 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的临床评估[J]. 诊断学理论与实践, 2011, 10(5):449-453.
- [9] Podzorski RP, Li H, Han J, et al. MVPlex assay for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in naris and other swab specimens[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46:3107-3109.
- [10] Wren MW, Carder C, Coen PG, et al. Rapid molecular detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44:1604-1605.
- [11] Rossney AS, Herra CM, Brennan GI, et al. Evaluation of the Xpert methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay using the GeneXpert real-time PCR platform for rapid detection of MRSA from screening specimens[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46: 3285-3290.

(收稿日期:2014-05-05)