

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.13.003

实时荧光定量聚合酶链反应快速检测 MRSA 的应用研究*

汪文明¹, 简 芳², 陈 林¹, 刘利航¹, 周 靖¹, 杨 夕^{1△}

1. 重庆市南川区人民医院检验科, 重庆 408400; 2. 重庆宏仁一医院急诊科, 重庆 408400

摘要:目的 研究实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的临床应用。方法 收集 2017 年 1 月至 2018 年 12 月重庆市南川区人民医院患者体液标本分离培养的 446 例金黄色葡萄球菌,采用实时荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因和 *mecA* 基因。结果 446 例金黄色葡萄球菌均检出 *nuc* 基因,符合率为 100.00%。经全自动细菌培养鉴定出的 96 例 MRSA 中均检出 *mecA* 基因,检出符合率为 100.00%。在全自动细菌培养鉴定及药敏分析仪上检出的甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌中有 2 例检测到 *mecA* 基因,其检测正确率为 97.96%(96/98)。结论 实时荧光定量 PCR 检测 MRSA 耗时短,正确率高,用于临床快速鉴定 MRSA 有明显优势。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; *nuc* 基因; *mecA* 基因; 聚合酶链反应

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)13-1801-04

Evaluation of the application of real-time fluorescence quantitative PCR for rapid detection of MRSA*

WANG Wenming¹, JIAN Fang², CHEN Lin¹, LIU Lihang¹, ZHOU Jing¹, YANG Xi^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Nanchuan District People's Hospital, Chongqing 408400, China;

2. Department of Emergency, Chongqing Hongren First Hospital, Chongqing 408400, China

Abstract: Objective To study the clinical application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods** A total of 446 cases of *Staphylococcus aureus* were collected from body fluid samples from patients in Nanchuan District People's Hospital of Chongqing from January 2017 to December 2018. The *nuc* gene and *mecA* gene of *Staphylococcus aureus* were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** *Nuc* gene was detected in 446 cases of *Staphylococcus aureus*, and the coincidence rate was 100.00%. *MecA* gene were detected in a total of 96 cases which were identified, as MRSA by fully automatic bacterial culture, and the coincidence rate was 100.00%. *MecA* gene was detected in 2 cases of MRSA which were detected by automatic bacterial culture identification and drug sensitivity analyzer, and the detection accuracy was 97.96%(96/98). **Conclusion** Real-time fluorescence quantitative PCR detection of MRSA is time-consuming and accurate, which has obvious advantages in rapid clinical identification of MRSA.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *nuc* gene; *mecA* gene; polymerase chain reaction

金黄色葡萄球菌(SA)在自然界中无处不在,是人类的一种重要病原菌,可引起许多严重感染,也是医院感染和社区感染的重要病原菌之一^[1]。随着抗菌药物的使用,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在导致院内感染的病原菌中所占比例越来越大,呈明显上升趋势,MRSA 检出率不断增加,已成为全球范围内院内感染的重要病原菌,严重威胁人类的健康^[2-4]。目前,*nuc* 基因是 SA 的标志性基因,*mecA* 基因是 MRSA 特有的耐药基因。美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)建议,凡检出 *mecA* 基因的 SA 即可判定为 MRSA。实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检

测 MRSA 与常规细菌培养鉴定相比具有耗时短、正确率高、易于临床应用等特点,其应用于 MRSA 检测能将 SA 的鉴定及 MRSA 的筛选完美结合,达到对 SA 或 MRSA 进行快速检测的目的。本研究采用实时荧光定量 PCR 检测 SA 中的 *nuc*、*mecA* 基因,并与全自动细菌鉴定及分析仪进行比较,以期选择快速准确鉴定 MRSA 的方法,为及早控制院内感染奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2017 年 1 月至 2018 年 12 月在重庆市南川区人民医院就诊患者送检的痰液、血液、

* 基金项目:重庆市南川区科委课题(Cx2018009)。

作者简介:汪文明,男,副主任技师,主要从事病原微生物分子诊断方面的研究。△ 通信作者:E-mail:2068663028@qq.com。

脓液、尿液、伤口拭子等标本分离获得的 SA 446 例,其中痰液 318 例(71.30%),脓液 30 例(6.73%),血液 20 例(4.48%),分泌物 16 例(3.59%),伤口拭子 17 例(3.81%),阴道拭子 7 例(1.57%),其他 38 例(8.52%)。送检科室主要来自儿科、神经外科、呼吸内科、重症监护室(ICU)等。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定分析系统及配套板条(梅里埃公司),美国 ABI STEPone PCR 扩增仪,SA 和 MRSA 核酸 DNA 试剂[泰普生物科学(中国)有限公司],血琼脂平板(重庆庞通公司),质控菌株 SA ATCC 25923 和 ATCC 29213 均来自重庆市临床检验中心,MRSA ATCC 43300 标准菌株来自国家卫生健康委员会临床检验中心。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养与鉴定 严格按《全国临床检验操作规程》(第4版)进行标本接种及分离培养,采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析系统进行菌株鉴定及药敏试验,根据 NCCLS 标准对结果进行判定。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 基因检测 (1)核酸提取:将 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析系统鉴定的 SA 转种于血平皿,37 °C 孵育 16~18 h。挑取 2~3 个菌落置于 500 μL 洗脱液的离心管内,振荡混匀,13 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 100 μL 核酸提取液,加入提取固形物(石英砂),振荡 5 min,瞬时离心,95 °C 温浴 3 min,立即放入冰盒,冰浴 3 min,13 000 r/min 离心 5 min,上清液为 DNA 提取液。(2)PCR 反应体系:取出反应管数(n)×44.3 μL SA-PCR 反应液/mecA-PCR 反应液, n ×0.5 μL Taq DNA Polymerase 和 n ×0.2 μL Uracil N-Glycosylase 加入离心管中并振荡混匀,瞬时离心后,向每一个 PCR 反应管中分装 45 μL,再向准备好的 PCR 反应管中分别加入 5 μL 上清液待测样品、阴性对照样品和阳性对照样品,总反应体系为 50 μL。(3)PCR 扩增:本研究采用泰普生物科学(中国)有限公司的 MRSA 检测试剂盒,以 SA 核酸基因 nuc 的保守片段序列和耐药基因 mecA 序列设计 2 对特异性引物和 2 条特异性探针,针对 mecA 基因的特异性探针用 FAM 荧光素进行标记,针对 nuc 基因的特异性探针用 HEX 荧光素进行标记,分别对应 PCR 仪中的 FAM 通道和 HEX 通道。在 PCR 仪上进行自动化扩增反应,扩增参数为 37 °C, 2 min; 94 °C, 2 min; 94 °C, 15 s, 55 °C, 45 s, 循环 10 次; 94 °C, 15 s, 55 °C, 45 s, 循环 30 次。荧光通道检测选用 FAM 通道和 HEX 通道。

1.3.3 结果判定标准 用(+)表示检测结果为阳性,(-)表示检测结果为阴性。实时荧光定量 PCR 检测结果判定标准见表 1。

1.4 统计学处理 采用 WHO 提供的 WHONET5.6 软件及 SPSS18.0 统计软件进行数据分析处理,计数资料以例数或百分率表示。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测结果判定标准

mecA	nuc	结果判定
(+)	(+)	MRSA
(-)	(+)	MSSA
(+)	(-)	mecA 基因阳性其他菌种(-)
(-)	(-)	SA 阴性(-)

注:MSSA 为甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌

2 结果

2.1 细菌培养鉴定与实时荧光定量 PCR 检测结果分析 在细菌培养鉴定出的 446 例 SA 中,MRSA 96 例,MSSA 350 例。实时荧光定量 PCR 检测出 nuc 基因阳性 446 例,阳性符合率为 100.00%,mecA 基因阳性 98 例,其中细菌培养鉴定结果为 MRSA 的 96 例标本中均检测出 mecA 基因,符合率为 100.00%;培养鉴定结果为 MSSA 的标本中有 2 例检测到 mecA 基因。以 NCCLS 建议的检出 mecA 基因即为 MRSA 为标准,则全自动细菌鉴定和药敏分析仪的检测正确率为 97.96%(96/98)。两种方法检测结果见表 2。

表 2 两种方法检测结果(n)

细菌培养	n	实时荧光定量 PCR			
		nuc(+)	nuc(-)	mecA(+)	mecA(-)
MRSA	96	96	0	96	0
MSSA	350	350	0	2	348

2.2 两种方法检测 MRSA 结果比较 见表 3。全自动细菌培养鉴定及分析仪检出的 98 例 MRSA 中,实时荧光定量 PCR 检测出 mecA(+)96 例。

表 3 两种方法检测 MRSA 结果比较(n)

实时荧光定量 PCR	细菌培养		
	(+)	(-)	合计
(+)	96	2	98
(-)	0	348	348
合计	96	350	446

2.3 不同类型临床标本 MRSA 检测结果 见表 4。在实时荧光定量 PCR 检测出的 98 例 MRSA 中,痰液标本检出 68 例,占 69.39%,脓液标本检出 9 例,占 9.18%,血液标本检出 6 例,占 6.12%。

表 4 不同类型样本 MRSA 检测结果

标本来源	MRSA 阳性(n)	MRSA 中占比(%)
痰液	68	69.39
脓液	9	9.18
血液	6	6.12

续表 4 不同类型样本 MRSA 检测结果

标本来源	MRSA 阳性(n)	MRSA 中占比(%)
创面分泌物	5	5.11
气管抽吸物	4	4.08
尿液	2	2.04
腹腔穿刺液	1	1.02
其他	3	3.06
合计	98	100.00

3 讨 论

MRSA 具有致病性强、治愈率低、病死率高、传播途径广等特点。近年来,随着抗菌药物的广泛使用,自第 1 例 MRSA 被发现以来,国内外报道均显示 MRSA 的流行趋势越来越严峻。随着抗菌药物的不合理使用,MRSA 的耐药程度和种类日益增多,使临床治疗更加困难。有文献报道,MRSA 在 SA 中的分离率已超过 50%,成为院内感染的主要病原菌,其引起的致死率及治疗费用明显增加^[5]。MRSA 因致病性强且具有多重耐药等特点,已成为临床治疗的难点^[6-7]。MRSA 的耐药机制主要由 mecA 基因编码低亲和力的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)所致,从而使 MRSA 对 β-内酰胺类抗菌药物具有耐药性。NCCLS 指出,检测 mecA 及其表达的 PBP2a 是预报 MRSA 对苯唑西林耐药最准确的方法。采用分子生物学方法检测 mecA 基因可在数小时内对 MRSA 进行诊断,较常规细菌培养和鉴定快 12~48 h^[8-9]。

本研究结果显示,实时荧光定量 PCR 在经培养鉴定证实含有 SA 的 446 例临床标本中检测出 nuc 基因 446 例,符合率为 100.00%,在培养鉴定出的 96 例 MRSA 中均检测出 mecA 基因,符合率为 100.00%,这与周俊等^[10]报道一致。在全自动细菌培养鉴定及药敏分析仪检出的 MSSA 中,有 2 例检测到 mecA 基因,经鉴定为 MRSA。综合分析结果显示,全自动细菌培养鉴定及药敏分析仪检测正确率为 97.96%(96/98)。分析其原因,一方面可能由于菌株的抑菌浓度在临界值附近,使检测结果判断出现偏差;另一方面可能与这些菌株能高度表达 β-内酰胺酶或存在 PBP2a 之外的低亲和力 PBP 有关。本研究结果提示,实时荧光定量 PCR 检测 MRSA 的检出率和正确率均高于全自动细菌鉴定和药敏分析仪,这与文献^[11]报道利用 qPCR 快速检测 MRSA 的阳性率高于培养法的结论一致。由于 PCR 检测灵敏,且不受其他细菌影响,因此,检测 nuc、mecA 基因可及早发现 MRSA,有助于排除 MRSA 感染,减少抗菌药物应用,降低医疗费用^[12]。

相关研究表明,临床上 MRSA 感染的主要部位是下呼吸道,神经外科、呼吸内科、ICU 等是 MRSA 感染

的高发科室,MRSA 分离率最高已达 92.61%^[13]。临床上因采集血液、痰液、分泌物等方便,病原体水平较其他类型标本高等原因而采集较多,因此检测结果的准确性和可靠度较高。本研究相关数据表明,痰液 MRSA 检出例数较多,共 68 例,在本研究检出的 MRSA 中占比达 69.39%,相对于其他报道的痰液 MRSA 高分离率,本研究痰液分离率相对较低,此结果与本研究的采样类型及比例有关。未来应在研究及数据分析基础上扩大各种类型标本的采集量,使数据分析更能体现真实的 MRSA 感染现状,同时大数据分析也能体现重庆市南川区人民医院及本地区的感染状况,有利于院内感染及临床预防控制治疗。

综上所述,MRSA 在呼吸道感染疾病中高发及其传播感染途径提示,院内控制 MRSA 的措施除进行积极的临床治疗和切断传播途径外,切断 MRSA 的传播途径也非常重要,应加强医护人员的操作卫生、病房环境及物品的日常常规消毒,有效控制院内 MRSA 感染。采用实时荧光定量 PCR 检测 nuc、mecA 基因,可快速鉴定 SA 及 MRSA,能及时发现 MRSA 感染,相对于细菌培养鉴定正确率更高,时间更短,能够为医生和患者节约时间,减少临床抗菌药物的不合理使用,以及为患者得到正确的治疗争取时间,为临床抗菌药物的合理使用提供可靠依据。

参考文献

- [1] SOCIETY A T. Infectious diseases society of america. guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(4):388-416.
- [2] ZURITA J, MEJÍA C, GUZMÁN-BLANCO M. Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant staphylococcus aureus in latin america[J]. Braz J Infect Dis, 2010, 14(Suppl 2):S97-106.
- [3] DUMITRESCU O, DAUWALDER O, BOISSET S, et al. Staphylococcus aureus resistance to antibiotics: key points in 2010[J]. Med Sci, 2010, 26(11):943-949.
- [4] 中国细菌耐药监测研究组. 2002—2003 年中国医院和社区获得性感染革兰阳性细菌耐药监测研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3):254-265.
- [5] 徐小玲, 李爱玲, 贾红. 医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的系统评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(2):296-299.
- [6] 中华医学会甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染治疗策略专家组. 中华医学会感染与抗微生物治疗策略高峰论坛: 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌感染的治疗策略——专家共识[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(6):401-416.
- [7] 刘晔华, 王世瑜, 张坚磊, 等. 医院内感染耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分型及临床分析[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(1):71-76.

的体检意识,快速有效地识别存在 ATA 的育龄女性,及时给予干预治疗以尽早改善其妊娠结局。本研究中 ATA 阳性率与其他研究结果有所不同^[14],可能与地区差异有关。

本研究按年龄将不孕组分为 4 个年龄组,各年龄组 ATA 阳性率差异及甲功异常分型构成比差异均无统计学意义($P>0.05$),但是 >35 岁组甲功异常率与其他 3 组差异均有统计学意义($P<0.05$),可能与较多的诊断机会和较长的治疗疗程有关。自身免疫性甲状腺疾病的存在不仅干扰育龄女性机体激素水平,造成月经紊乱,影响生育能力,还可能导致胚胎停止发育、流产、胎儿发育异常等不良妊娠结局。有研究认为,ATA 会影响卵子质量,从而影响辅助生殖妊娠结局^[13]。

本研究发现,山东地区不孕女性甲功异常率较高,需引起高度重视。对于疑似不孕女性,应做到甲状腺疾病早发现、早诊断、早治疗,以免造成不良妊娠结局甚至不良辅助生殖结局。有研究认为,甲功 5 项(TSH、T₃、T₄、FT₃、FT₄)指标联合检测可提高甲功异常诊断的特异性和准确性^[15-17]。山东大学生殖医学研究中心作为生殖专科医院,只用了 3 项(TSH、FT₃、FT₄)指标进行初筛,研究结果可能略有偏移。

参考文献

[1] 吴洁.再论甲状腺功能与女性生殖[J].生殖医学杂志,2014,23(5):345-350.
 [2] 严聪吉,张德波,叶素荣.甲状腺疾病患者内分泌和生化指标改变分析[J].中国社区医师,2015,31(5):114-115.
 [3] 杨菁,倪媛,孙伟.甲状腺功能及其相关疾病与女性生殖关系的研究进展[J].中国性科学,2016,25(4):141-144.
 [4] AGHAJANOVA L, LINDEBERG M, CARLSSON I B, et al. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue[J]. Rep Biomed Online, 2009, 3(3): 337-347.
 [5] POPPE K, VELKENIES B, GLINOER D. Thyroid disease and female reproduction[J]. Clin Endocrinol, 2007, 66(3): 309-321.

[6] MECACCI F, PARRETTI E, CIONI R, et al. Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia [J]. J Reprod Immunol, 2000, 46(1): 39-50.
 [7] 张倡志,刘义庆,鞠瑛,等.济南地区体检人群甲状腺功能检测结果分析[J].检验医学与临床,2015,12(8):1105-1106.
 [8] 李秀岩,马文旭,雷娟. A-TG、A-TPO 与不孕不育的相关性分析[J].按摩与康复医学,2013,4(7):123-124.
 [9] 兰旭青,陈志英. a-TG、a-TPO 与不孕不育关系的研究[J].标记免疫分析与临床,2012,19(6):346-348.
 [10] KIM N Y, CHO H J, KIM H Y, et al. Thyroid autoimmunity and its association with cellular and humoral immunity in women with reproductive failures[J]. Am J Reprod Immunol, 2011, 65(1): 78-87.
 [11] 张薛,刘海霞,吕啸舒,等.甲状腺自身免疫致不孕流产的机制[J].国际内分泌代谢杂志,2017,37(5):348-351.
 [12] BALUCAN F S, MORSHED S A, DAVIES T F. Thyroid autoantibodies in pregnancy: their role, regulation and clinical relevance[J]. J Thyroid Res, 2013, 18(4): 182472-182478.
 [13] 齐改梅,张志平,武学清.自身免疫性甲状腺疾病对辅助生殖妊娠结局的影响[J].中国药物与临床,2014,14(11):1556-1557.
 [14] 袁帅,江璐,朱力,等.上海地区 6 112 例健康体检者血清甲状腺激素和甲状腺自身抗体检测结果分析[J].检验医学,2015,30(3):219-223.
 [15] 吴庆永,王晶,高娟,等.甲功五项测定在甲状腺功能诊断中的临床分析[J].实用妇科内分泌杂志,2017,20(4):40-41.
 [16] 付玉华,王瑞清.甲功五项对甲状腺功能紊乱的诊断价值及临床意义研究[J].中国医学创新,2017,26(14):98-101.
 [17] 龚道蓉.甲状腺功能 5 项指标联合检测对甲状腺功能的评价[J].检验医学与临床,2012,9(19):2409-2410.

(收稿日期:2019-01-12 修回日期:2019-04-16)

(上接第 1803 页)

[8] 史小英,陈启容,余新玉,等. ICU 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速监测及防控[J].国际检验医学杂志,2015,36(7):877-879.
 [9] 金姝,邹玉涵,闫佩毅,等. qPCR 快速检测痰标本中 MRSA 的临床应用[J].国际检验医学杂志,2017,38(24):3441-3443.
 [10] 周俊,陈旭,李敏,等.实时荧光定量聚合酶链反应快速检测下呼吸道痰液标本耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的临床应用[J].上海医学,2013,36(1):23-26.
 [11] 沈蕾,骆俊,施宏,等.痰标本甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌培养与聚合酶链反应快速检测方法的比较[J].中国感

染与化疗杂志,2015,15(3):260-263.

[12] DUREAU A F, DUCLOS G, ANTONINI F, et al. Rapid diagnostic test and use of antibiotic against methicillin-resistant staphylococcus aureus in adult intensive care unit [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(2): 267-272.
 [13] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.

(收稿日期:2019-01-14 修回日期:2019-04-18)