

率^[2]。培养法虽为诊断淋病的常规方法和金标准^[3-4],但操作繁琐耗时,且敏感性较低,不适于快速筛查和早期诊断,适于症状较轻或无症状的患者。直接涂片法使用简单、快速、价廉,可辨识度高,适合基层医院采用。本研究中,男性标本的检出率高于女性标本,在其他地区也存在类似现象的报道^[5],这可能是由于男性患者在急性淋菌性尿道炎时脓性分泌物多,症状明显而就诊。慢性淋病患者实验室检查的敏感性较低,易受与淋病奈瑟球菌形态相似的不动杆菌、莫拉菌等干扰,造成假阳性^[6],故女性患者易出现假阳性^[7]。快速抗原检测法是利用细菌酶反应产生气泡以鉴别是否感染淋病奈瑟球菌,该方法便于肉眼观察,操作时间较培养法短,可作为临床大批量体检标本的初筛。PCR 法是灵敏度高、特异性强的分子生物学检测新技术,对操作环境和人员技术要求高^[8]。在极微量病原体存在时也能检出,可用于抗菌药物使用后的检测,广泛用于尿液等低菌液标本的检测。若直接涂片法提示淋病奈瑟球菌阴性,可考虑采用 PCR 检测,以发挥其独特优势。对于慢性淋病患者,PCR 检测法特异性强、灵敏度高、阳性率高,可作为慢性淋病检测的首选方法。尿液淋病奈瑟球菌快速抗原检测法和涂片法可作为诊断淋病患者的筛查方法,对于需要做微生物敏感性试验的患者建议采用培养法。临床疑诊淋病奈瑟球菌感染时,应根据实际情况选择适合的检测方法,以提高诊断效率,把握

• 检验技术与方法 •

最佳治疗时机。

参考文献

- 王建兰,祝永佳,祝慧华. 2007 年-2010 年淋球菌的检测及结果分析[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(10):2534-2535.
- 王国江. 关于对王文根同道疑问的答复[J]. 中国皮肤性病学杂志,2008,22(1):72-73.
- 安邦邦,孙兆林,凌晓午,等. 4 种方法检测男性尿道分泌物淋菌结果比较分析[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(11):1645-1647.
- Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish[J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165(3):438-455.
- 毛源,王晶. 江苏地区男性与女性 NG、CT 及 UU 感染情况比较[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(19):2350-2351.
- 干迪郁,朱立军,任利珍. 淋病奈瑟菌三种检测方法的评价[J]. 放射免疫学杂志,2012,25(2):107.
- 胡耀华,胡四海. 淋病奈瑟菌检测技术研究进展[J]. 中国热带医学,2009,9(11):2194-2196.
- 孙爱华,范兴丽,孙琦. 淋病、梅毒和尖锐湿疣三联金标试纸条的制备及其应用[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(7):1274-1276.

(收稿日期:2012-12-11)

荧光聚合酶链反应检测在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测中的应用

瞿伟华¹, 陈碧英², 郎立中²

(1. 上海市监狱总医院检验科, 上海 201318; 2. 上海市第七人民医院检验科, 上海 200137)

摘要:目的 探讨荧光聚合酶链反应(PCR)检测在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检测中的应用。方法 收集上海市监狱总医院肺部感染患者的痰液标本,共 3 768 份,分别进行 PCR、纸片扩散抗菌试验、琼脂稀释法检测。结果 采用一般细菌培养分离鉴定与荧光 PCR 检测均检出 103 例金黄色葡萄球菌,阳性率 2.7%。采用纸片扩散抗菌试验检测,检出 57 株 MRSA 阳性;采用琼脂稀释法检测,检出 58 株 MRSA 阳性。采用荧光 PCR 检测,有 58 株 *Meca* 基因扩增呈阳性。结论 荧光 PCR 检测具有快速、简易、稳定、敏感性强、特异性高的特点,可用于 MRSA 的快速鉴定。

关键词:葡萄球菌, 金黄色; 甲氧西林抗药性; 聚合酶链反应; 纸片扩散抗菌试验; 琼脂稀释法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1130-03

随着上海市逐渐步入老年社会,上海市监狱收押人员也呈现出老龄化的趋势,根据上海市监狱总医院微生物实验室近年来的统计,临床痰液细菌的一般培养标本量逐年增加,且致病菌的检出率也不断上升。临床对微生物检验报告的及时、准确性要求不断提高。笔者针对这一情况进行了探索,认为荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)具有快速、简易、稳定的特点,对快速鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA)具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2010 年 9 月至 2012 年 5 月于上海市监狱总医院因肺部感染住院的患者痰液标本,共 3 768 份,同时进行一般细菌培养与荧光 PCR 检测。

1.2 主要仪器与试剂 主要仪器为罗氏 LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 系统。主要试剂为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药基因检测试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司)、苯唑西林(上海源叶生物技术有限公司)、药敏纸片(英国 Oxoid 公司)。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923,由上海市临床检验中心提供。

1.3 纸片扩散抗菌试验 将菌液调至 0.5 MCF(麦氏浊度单位),均匀涂抹于 4 mm 的 Mueller-Hinton 琼脂平板上,采用头孢西丁药敏纸片(30 μ g/片)检测金黄色葡萄球菌,35 °C 孵育 24 h,将头孢西丁对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径小于 21 mm 判定为 MRSA,≥22 mm 为对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌。

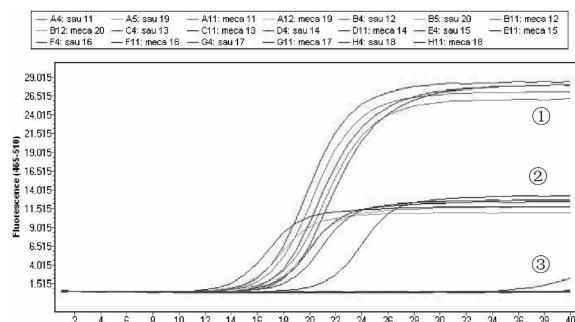
1.4 琼脂稀释法 即最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)法。用含 20 g/L NaCl 的 Mueller-Hinton 琼脂将苯唑西林倍比稀释为 12 个不同浓度并浇注平板。苯唑西林终浓度为 0.13~256.00 μ g/mL。再将菌液调至 0.5 MCF,点种于含药平板,35 °C 孵育 24 h。抑菌圈直径不超过 10 mm 为阳性菌株。

1.5 荧光 PCR (1)核酸裂解:直接在痰液标本中加入其体积 4 倍的 4% NaOH,室温放置 30 min,取 0.5 mL 稀释痰液在离心管中离心 2 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),弃上清液;再加入 0.5 mL 4% NaOH,离心 5 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),弃上清液;加入 1 mL 生理盐水,离心 5 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),弃上清液;在沉淀中加入 50 μ L

DNA 提取液,沸水浴 10 min,充分混匀后离心 5 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),取上清液 4 μ L 进行 PCR 反应。(2)反应模板:取阴、阳性对照品各 100 μ L 置于 1.5 mL 离心管中,分别加入核酸提取液 100 μ L,充分混匀,沸水浴 10 min,离心 5 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),取上清液 4 μ L 进行后续实验。(3)PCR 循环参数的设置:37 $^{\circ}$ C \times 2 min,循环 1 次;93 $^{\circ}$ C \times 15 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C \times 60 s,循环 40 次;单点荧光检测在 60 $^{\circ}$ C,反应体系为 40 μ L。荧光通道选用 FAM。(4)各步骤严格按照操作说明书进行。

2 结 果

采用一般细菌培养分离鉴定与荧光 PCR 检测均检出 103 例金黄色葡萄球菌,阳性率 2.7%。采用纸片扩散抗菌试验检测,检出 57 株 MRSA 阳性;采用琼脂稀释法检测,检出 58 株 MRSA 阳性。采用荧光 PCR 检测,有 58 株 *MecA* 基因扩增呈阳性,见图 1。纸片扩散抗菌试验、琼脂稀释法、荧光 PCR 检测结果的比较见表 1。



① *MecA* 阴性;② 金黄色葡萄球菌阴性;③ 阳性。当某一菌株同时出现①和②种典型的“S”形扩增曲线时,即判定为 MRSA 阳性。

图 1 荧光 PCR 检测的结果

表 1 3 种检测方法获得的结果比较

检测方法	MRSA(n)		阳性率(%)
	阳性	阴性	
纸片扩散抗菌试验	57	46	55.34
琼脂稀释法	58	45	56.34
荧光 PCR	58	45	56.34

3 讨 论

滥用抗菌药使 MRSA 感染率逐年上升。自 2002 年美国报道了第 1 株耐万古霉素金黄色葡萄球菌(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)以来,先后出现 3 株 VRSA^[1]。根据上海市监狱总医院微生物实验室 2004 年 1 月至 2011 年 12 月的统计,该院收治的老年患者逐年增多,金黄色葡萄球菌在痰液中的检出率呈逐年上升趋势,在肺部感染患者中仅次于肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌与肺炎链球菌,居第 4 位,因此,MRSA 已经成为呼吸道感染的主要致病菌,呈高度耐药和多重耐药,除糖肽类抗菌药外,它还对其他抗菌药广泛耐药^[2]。

目前,国内、外检测金黄色葡萄球菌的方法很多^[3]。本实验通过荧光 PCR 检测 MRSA,同时进行一般细菌培养,当其鉴定为金黄色葡萄球菌后,再分别采用纸片扩散抗菌试验、琼脂稀释法检测 MRSA。琼脂稀释法是美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的 MRSA 经典试验,但其操作极为繁琐;纸片扩散抗菌试验快

速、简便,但有一些菌株的耐药性得不到完全表达;荧光 PCR 检测比普通 PCR 更简便,不需要进行基因扩增产物的电泳,也不需基因扩增产物的序列测定分析,痰液标本可直接进行检测,根据扩增曲线直接获得实验结果,24 h 扩增后即可判读结果,而传统的分离培养方法至少需 48 h 才能得到鉴定结果。采用荧光 PCR,MRSA 的检出率与琼脂稀释法、纸片扩散抗菌试验的差异无显著性,但其检测速度更快,能及时提供准确报告,为临床快速筛选 MRSA 具有重要意义。

目前, *MecA* 基因的 PCR 检测是应用较多的 MRSA 鉴定方法, *MecA* 为结构基因,编码性信息素结合蛋白 α (pheromone binding protein α , PBP- α) 蛋白,这种蛋白存在于细胞表面,对 β -内酰胺类抗菌药的亲和力极低,其相对分子质量为 78 000^[4], *MecA* 编码表达 PBP-2 α 需有 β -内酰胺类抗菌药的存在及调控基因 *MecI* 与 *MecRI* 作为辅助诱导因子。*MecI* 与 *MecRI* 是位于 *MecA* 启动子上游的转录调节基因, *MecI* 编码抑制蛋白 *MecI*, *MecRI* 编码产生 PBP-2 α 所必需的 *MecRI* 诱导蛋白。当 *MecRI* 接触到诱导剂(如青霉素)或其他 β -内酰胺类抗菌药时, *MecRI* 与之结合而活化^[5]。另外,辅助基因 *Fem* 作为金黄色葡萄球菌的正常基因位点,也有助于 MRSA 表达高水平的耐药基因^[6-7]。

MRSA 除对甲氧西林耐药外,对其他所有与甲氧西林相同的 β -内酰胺类和头孢菌素类抗菌药均耐药,MRSA 还可通过改变抗菌药的作用靶位,产生修饰酶,降低膜通透性,产生大量对氨基苯甲酸(para-aminobenzoic acid, PABA)等^[8-9],对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类及利福平等均产生不同程度的耐药。

本实验中有 1 例纸片扩散抗菌试验检测为阳性的标本,其 *MecA* 基因检测为阴性,这可能与高表达 β -内酰胺酶或存在 PBP-2 α 以外的低亲和力 PBP 有关,笔者将这例金黄色葡萄球菌归为 MRSA,据临床反馈,该患者接受了 β -内酰胺类抗菌药与 β -内酰胺酶抑制剂的联合治疗。58 例荧光 PCR 检测提示 *MecA* 基因阳性的标本中有 1 株采用纸片扩散抗菌试验提示为敏感、1 株中介(结果归入阴性),其可能原因为:*MecI* 作用强而诱导剂作用较弱时, *MecA* 基因处于抑制状态,表达 PBP-2 α 的量很少^[10],这类菌株接触 β -内酰胺类抗菌药诱导剂后, *MecRI* 诱导蛋白与 β -内酰胺类抗菌药结合而活化,活化的 *MecRI* 蛋白破坏 *MecI* 并与 *MecA* 结合,解除了 *MecI* 对 *MecA* 的抑制作用,使 *MecA* 得以活化,菌株迅速激活产生 PBP-2 α 而对 β -内酰胺类抗菌药产生耐药。据临床反馈,这 2 例患者使用 β -内酰胺类抗菌药及 β -内酰胺酶抑制剂联合治疗,均无效。

开展对 MRSA 的检测,对于控制院内感染的流行,指导临床治疗具有重要意义。采用荧光 PCR 鉴定 MRSA 的敏感性、特异性均优于纸片扩散抗菌试验;比琼脂稀释法快速、简易。因此,荧光 PCR 对快速鉴定 MRSA,避免糖肽类抗菌药的滥用具有十分重要的作用。

参考文献

- [1] Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control[J]. Curr Opin Infect Dis, 2005, 18(4): 300-305.
- [2] 姚春艳,府伟灵.葡萄球菌医院感染的耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2004,14(1):104-106.
- [3] 娄金丽,白华,刘立文,等.耐甲氧西林葡萄球菌的临床检测[J].中华医学检验杂志,1996,19(6):36-38.

- [4] Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(11): 3946-3951.
- [5] 陆亚华, 时庭文, 陈虹, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及耐药基因研究[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 7(7): 744-745.
- [6] Oliveira DC, Wu SW, de Lencastre H. Genetic organization of the downstream region of the *mecA* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying different polymorphisms of this region[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(7): 1906-1910.
- [7] 陈智鸿, 范昕建, 吕晓菊. *mecA*、*femA* 基因 PCR 联合扩增法检测

• 检验技术与方法 •

三种检测方法对 HBV 血清标志物的检测比较与质控分析

冯丽珍¹, 石安平², 韩宏枫¹

(武警内蒙古总队医院:1. 检验科; 2. 医务科, 内蒙古呼和浩特 010031)

摘要: 目的 探讨酶联免疫吸附测定(ELISA)、化学发光免疫分析(CLIA)及荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)对 HBV 血清标志物的检测效果, 为临床提供参考。方法 收集 160 例 HBV 感染患者清晨空腹静脉血, 2 h 内采用 ELISA、CLIA 及 FQ-PCR 对 HBV 血清标志物进行检测, 采用成本-效果分析(CEA)进行检测符合率及成本的判定。结果 160 例标本 ELISA、CLIA 及 FQ-PCR 检测的总符合率分别为 96.9% (155/160)、93.8% (150/160) 及 94.4% (151/160), 三者比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。三者检测 1 次的平均成本分别为 425.9、126.3 及 625.6 元。CLIA 检测的成本-效果值低于 ELISA 及 FQ-PCRA 检测($P < 0.05$)。结论 CLIA 检测的应用效果优于 ELISA 及 FQ-PCR。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 化学发光测定法; 聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定; 血清标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.033

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1132-02

由于各种因素的影响, 当前国内乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的发病率日益增加。血清中 HBV 感染标志物的检测受试剂质量和检测方法的影响^[1], 目前常规的处理方法是通过严格控制检测条件, 使实验尽可能达到规范化和标准化^[2]。在实际操作中多采用快速酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)一步法, 即标本、包被的抗体或抗原及相应酶标抗体同时在 30 min 内反应完成^[3]。荧光定量聚合酶链反应 (fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR) 也广泛用于肝炎病毒的血清标志物检测^[4-5]。另外, 时间分辨荧光技术、化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)及电化学发光技术也应用于体外诊断^[6]。现将本院 2009 年 10 月至 2012 年 2 月采用 ELISA、CLIA 及 FQ-PCR 对 160 例患者 HBV 血清标志物检测的效果进行对比, 通过成本-效果分析(cost-effectiveness analysis, CEA)进行质控分析, 旨在为临床检测提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 10 月至 2012 年 2 月本院收治的 HBV 感染患者 160 例, 其中, 男 99 例, 女 61 例; 年龄 3 个月至 84 岁, 平均(39.51±5.32)岁; 患者均于清晨空腹采集肝素锂抗凝静脉血, 2 h 内检测完毕。

1.2 主要仪器与试剂 Elecsys 2010 型全自动电化学发光免疫分析仪购自罗氏公司, FQ-PCR 仪为美国 Promega 公司产品。乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、抗乙型肝炎病毒表面抗体(anti-hepatitis B surface antibody, HBsAb)、乙型肝炎病毒 e 抗原(hepatitis B virus e antigen, HBeAg)及抗乙型肝炎病毒 e 抗体(anti-hepatitis B virus e antibody, HBeAb)的证实试剂由罗氏公司提供; ELISA 诊断

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 四川大学学报: 医学版, 2003, 34(4): 663-666.

[8] 孙宏莉, 王辉, 陈民钧, 等. 耐糖肽类抗生素的金黄色葡萄球菌研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(5): 70-73.

[9] 李晓芳, 范昕建. 氧西林金黄色葡萄球菌的耐药基因与耐药性关系[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(3): 140-143.

[10] Petinaki E, Arvaniti A, Dimitracopoulos G, et al. Detection of *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47(3): 297-304.

(收稿日期: 2012-12-05)

试剂为北京万泰生物药业股份有限公司产品; FQ-PCR 试剂盒购自中山医科大学达安基因诊断中心。

1.3 检测方法、符合率及成本判定 各指标检测严格按仪器及试剂盒说明书进行操作。总符合率=(真阴性数+真阳性数)/(真阴性数+假阴性数+真阳性数+假阳性数)×100%。统计每组患者入院后 HBV 检测的直接成本。

1.4 统计学处理 采用 SAS9.0 软件进行统计学分析, 计数资料用 χ^2 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

160 例血标本 ELISA、CLIA 及 FQ-PCR 检测的总符合率分别为 96.9% (155/160)、93.8% (150/160) 及 94.4% (151/160), 三者比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。三者检测 1 次的平均成本分别为 425.9、126.3 及 625.6 元。CLIA 检测的成本-效果值低于 ELISA 及 FQ-PCRA($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 ELISA、CLIA 及 FQ-PCR 检测的 CEA

检测方法	n	成本(元)	符合率(%)	成本/效果值
FQ-PCR	160	625.6	96.9	6.46
ELISA	160	425.9	93.8	4.54
CLIA	160	126.3	94.4	1.34

3 讨 论

CEA 是较为完备的经济评价形式之一, 也是质控分析指标之一, 成本/效果比值越小越好。随着大量新技术、新方法应用于临床检验, 为临床提供快速、准确、有效的检验数据成为检验医学发展的重大问题。目前 HBV 检测主要采用血清学方