

• 检验技术与方法 •

实时荧光定量 PCR 与头孢西丁筛选试验在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测中的评价*

徐伟红¹, 张 骏², 徐 斌¹, 刘 杰²

(1. 上海市长宁区同仁医院检验科, 上海 200050; 2. 复旦大学附属华山医院消化病研究所, 上海 200040)

摘要:目的 以实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术检测耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)*mecA* 基因为金标准, 进行与头孢西丁纸片筛选试验的评价。方法 收集各种细菌感染性标本分离到的葡萄球菌, 分别采用 PCR 扩增 *mecA* 法、头孢西丁筛选试验检测 MRSA。结果 RT-PCR 检出金黄色葡萄球菌中携带 *mecA* 基因占 54.55%(66/121)。与 VITEK2 细菌鉴定仪头孢西丁筛选试验的结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。头孢西丁筛选试验敏感度 93.93%, 特异度 81.82%, 阳性预期值 84.93%, 阴性预期值 91.83%。结论 RT-PCR 技术可准确、快速检测 MRSA。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 实时荧光定量 PCR; 头孢西丁筛选试验; *mecA* 基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)14-1921-02

Evaluation of real-time fluorescent quantitative PCR and cefoxitin screening test in detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**

Xu Weihong¹, Zhang Jun², Xu Bing¹, Liu Jie²

(1. Department of Clinical Laboratory, Changning District Tongren Hospital, Shanghai 200050, China;

2. Research Institute of Digestive Diseases, Affiliated Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract:Objective To evaluate the cefoxitin screening test in detecting (MRSA) with the real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR) for detecting *mecA* gene as the golden standard. **Methods** *Staphylococcus aureus* strains isolated from various bacterial infection specimens were collected, which were amplified by RT-PCR and detected by the cefoxitin screening test respectively. The results were compared. **Results** In 121 strains of MRSA, 66 strains carrying *mecA* gene were detected by RT-PCR($P>0.05$), accounting for 54.55%(66/121). There was no statistical difference in the detection results between the cefoxitin screening test and RT-PCR. The sensitivity of the cefoxitin screening test was 93.93%, the specificity was 81.82%, the positive predictive value was 84.93% and negative predictive value was 91.83%. **Conclusion** The RT-PCR technique can accurately and rapidly detect MRSA.

Key words: methicillin-resistant *staphylococcus aureus*; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; cefoxitin screening test; *mecA* gene

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是医院和社区感染的重要病原菌^[1], 对甲氧西林等多种常用抗菌药物耐药, 其主要耐药机制是因 *mecA* 基因编码低亲和力的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)所致。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术(RT-PCR)检测金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因以鉴定 MRSA, 并与 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统的头孢西丁筛选试验进行比较, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 121 株金黄色葡萄球菌来自 2011 年 7 月至 2012 年 6 月本院门诊及住院患者的痰液、脓液、血液、尿液、导管等标本, 去除同一患者同一部位重复菌株。

1.2 仪器与试剂 VITEK-2 全自动微生物分析仪、GN67 药敏板(法国梅里埃公司产品)、FLUOCYCLE 实时定量荧光 PCR 扩增仪(上海科华实验系统有限公司)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药基因检测试剂盒(上海之江生物工程公司产品, 试剂批号: 20130101)。

1.3 头孢西丁筛选试验^[2] 用 VITEK-2 全自动微生物分析仪和 GN67 药敏板, 进行 121 株分离菌株的头孢西丁筛选试验。质控菌株: 金黄色葡萄球菌 ATCC25923、ATCC43300, 由

上海市临床检验中心提供。

1.4 PCR 扩增法检测 *mecA* 基因 严格按照试剂盒要求操作, 对 121 株临床分离的金黄色葡萄球菌进行 *mecA* 基因检测。

1.4.1 PCR 扩增 循环参数设置: 37℃×2 min; 94℃预变性 2 min; 循环 1 次, 再按 93℃变性 15 s, 60℃退火 60 s, 72℃延伸 1.5 min, 循环 40 次; 单点荧光检测在 60℃, 反应体系为 40 μL。荧光通道检测选择: 选用 FAM 通道。严格按照试剂盒要求操作。

1.4.2 结果判断 仪器 Ct 栏无数值显示, 表示检测样品低于检测限, 报告为阴性; 待检样品 Ct≤35, 检测结果报告为阳性; 待检样品 Ct 在 35~40, 需重复测定, 若 Ct 仍在 35~40, 且扩增曲线呈典型的 S 型, 则判断为阳性; 若非典型 S 型曲线, 则判为阴性。

1.5 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件进行处理, 采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光 PPR 扩增法 121 株金黄色葡萄球菌中 66 株检测出 *mecA* 基因, 分离株中 *mecA* 基因携带率为 54.55%。

2.2 头孢西丁筛选试验 121 株金黄色葡萄球菌中, 有 72 株

* 基金项目: 上海市长宁区卫生局资助项目(20114Y02001)。 作者简介: 徐伟红, 女, 副主任技师, 主要从事微生物检验及细菌耐药机制研究。

阳性,MRSA 阳性率为 59.50%。

2.3 实时荧光 PCR 法和头孢西丁筛选试验结果比较。见表 1。

表 1 RT-PCR 法和头孢西丁筛选试验结果比较

头孢西丁筛选试验	RT-PCR		合计
	阳性	阴性	
阳性	62	10	72
阴性	4	45	49
合计	66	55	121
χ^2	—	—	1.786
P	—	—	>0.05

—:无数据。

2.4 头孢西丁筛选试验的敏感度 93.93%,特异度 81.82%,阳性预期值 84.93%,阴性预期值 91.83%。

3 讨 论

MRSA 是引发医院感染的常见病原菌之一,具有多重耐药性,患者一旦感染,治疗十分棘手[3]。因此快速鉴定 MRSA,对控制其引起的感染和播散,具有重要意义。

MRSA 是指表达 *mecA* 基因或具有另一种甲氧西林耐药机制如青霉素结合蛋白(PBP)与苯唑西林的亲和力改变的金黄色葡萄球菌[4]。对于 MRSA 菌株,PBP 通常分为 1、2、3、4 种,PBP2a 是 PBP2 的异构体。决定 MRSA 产生 PBP2a 的是一系列具有编码 PBP2a 调节表达功能的 *mec* 基因(*mecA*, *mecI*,*mecRI*) [5]。*mecA* 基因是导致金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药的主要原因。检测 *mecA* 基因或者 *mecA* 表达的 PBP2a 是预报对苯唑西林耐药最准确的方法。有些国家如瑞典、丹麦、荷兰等已将 *mecA* 基因的测定作为 MRSA 的确认试验,将含有 *mecA* 基因的菌株判断为 MRSA。

mecA 基因在金黄色葡萄球菌的耐药机制中发挥重要作用,携带有 *mecA* 基因的 MRSA 耐药严重且呈多重耐药。本实验中检测出携带有 *mecA* 基因的阳性率为 54.55%。高于樊新等 45%(54/120)的检出率[6],但低于耿燕等[7] 69.2%(54/174)的报道。提示本院金黄色葡萄球菌耐药情况不容乐观。

本次实验中有 4 株 *mecA* 基因阳性菌表现为头孢西丁筛选试验阴性,表明这些携带 *mecA* 基因的金黄色葡萄球菌可能是因为 *mecI* 的作用增大,*mecA* 基因处于抑制状态[8]。这类隐匿型或低水平耐药菌株接触 β 内酰胺类抗菌药物诱导剂后,可以使 *mecA* 活化。其治疗中应避免使用 β 内酰胺类抗菌药物。同时有 4 株单 *mecA* 基因呈阳性,这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,这些菌株也应视为 MRSA。

VITEK2 全自动微生物分析仪药敏卡容纳多种抗菌药物,并可根据 CLSI 规则和耐药性推导未在卡内试验的多种抗菌药物的敏感性,为临床提供更多选择。头孢西丁具有诱导产生 PBP2a 的能力,尤其对于低水平耐药的葡萄球菌。而且头孢西丁 MIC 可直接判断敏感或耐药[9]。RT-PCR 技术利用 PCR 扩增,直接检测 *mecA* 基因,是 MRSA 检测的金标准,但一直以来实验影响因素颇多,临床应用有限。本次实验中,RT-PCR 技术 MRSA 发生率 54.55%,头孢西丁筛选试验 MRSA 发生率 59.50%。两种方法的检出率相近。

本次实验显示,头孢西丁筛选试验与 RT-PCR 技术结果相比较,检测 MRSA 灵敏度 93.93%,特异度 81.82%,阳性预期值 84.93%,阴性预期值 91.83%。两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。但 RT-PCR 技术检测 MRSA,整个检测过程历时 2 h,加快了实验时间,同时操作简单快速,成本节约。而 PCR 成品试剂盒的应用也使 MRSA 的快速检测成为可能。可见 RT-PCR 技术完全可取代仪器法头孢西丁筛选试验,准确、快速地检测 MRSA。

参考文献

[1] Plata K,Rosato AE,Wegrzyn G. Staphylococcus aureus as an infectious agent overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity[J]. acta biochimic polonica. 2009,292(4):597-612.

[2] Clinical and laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards For Antimicrobia susceptibility testing[S] Wayne PA, USA:CLSI,2009.

[3] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(5):321-329.

[4] 崔巧珍,戎建荣. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析和 *mecA* 基因检测[J]. 中国微生态学杂志,2010,11(10):998-999.

[5] 吴晶,应春妹,汪雅萍,等. 金黄色葡萄球菌耐药性监测分析[J]. 上海交通大学学报,2011,31(12):1754-1757.

[6] 樊新,岳乔红,杨柳,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因的鉴定分析[J]. 现代检验医学杂志,2007,22(6):66-67.

[7] 耿燕,王香玲,李妙羨,等. 头孢西丁纸片扩散法检测耐甲氧西林葡萄球菌的临床应用[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(3):71-73.

[8] 王敏,范婧,李先平,等. PCR 扩增法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 *mecA* 基因[J]. 广东医学,2008,29(4):566-568.

[9] Swenson JM, Tenover FC. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in Staphylococcus spp [J]. J Clin Microbiol,2005,43(1):3818-3823.

(收稿日期:2014-02-03)

(上接第 1920 页)

[4] 陈玲玲,陶耕. 对三种糖化血红蛋白测定方法的比较[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2004,25(9):1033-1034.

[5] Bose T. Chakraborti, Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: implication for oxidative stress in diabetes mellitus[J]. Biochim Biophys Acta,2008,1780:800-808.

[6] Little RR,Rohlfing CL. Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb

(HbA1c) by 23 methods[J]. Clin. Chem,2008,54:1277-1282.

[7] M. Poitevin,G. Peltre,S. Descroix. Use of quasi-isoelectric buffers as anolyte and catholyte to improve capillary isoelectric focusing performances[J]. Electrophoresis, 2008, 29:1687-1693.

(收稿日期:2014-01-25)