

同时间先后获取的痰标本和 BALF 标本所做的细菌学培养结果进行比较,两种样本的培养阳性率没有显著差异,这与叶方等^[12]的研究结果一致。本研究发现,两种样本同时使用比单一标本培养阳性率高,说明两种样本联合检测,有一定临床价值。痰培养与 BALF 培养相互补充使用,意义更大。

阳性病例中有 10 例痰培养阳性,而 BALF 培养阴性,对比临床资料发现,这些患者均在入院第 2 天送检痰标本,治疗 3~15 d 后送检 BALF,此时由于已使用抗生素一段时间,故 BALF 很难培养出病原菌,因此,可以认为抗生素治疗后期似无必要再做 BALF 培养。阳性病例中有 12 例 BALF 培养阳性,而痰培养阴性,这 12 例患者的痰标本送检时间比 BALF 提前 1~4 d,研究表明当痰培养结果阴性,且与临床不符,建议及早做 BALF 培养,可弥补痰培养因标本自身的局限性而导致的漏检。阳性病例中,有 7 例痰与 BALF 共同检出肺炎链球菌,1 例 PICU 的患儿痰培养检出肺炎克雷伯菌,BALF 培养检出铜绿假单胞菌,这 8 例患者的痰标本送检时间比 BALF 提前 1~3 d,研究表明痰培养结果阳性的患者,在短期内做 BALF 培养,结果也是阳性,且病原菌结果的符合率较一致,因此,可以认为前期痰培养结果阳性,并与临床相符,近期内似无必要再行 BALF 培养。

参考文献

[1] 黄宝兴,邓继岩,王红梅等 1 693 例难治性肺炎患儿支气管肺泡灌洗液病原体培养分析[J]. 中国感染控制杂志, 2015,14(6):379-382.

[2] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1180.

[3] 中华医学会儿科学分会呼吸学组儿科支气管镜协作组. 儿科支气管镜术指南(2009 年版)[J]. 中华儿科杂志,

2009,47(10):740-744.

[4] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:中华人民共和国卫生部医政司,2014:637.

[5] 周庭银,倪语星. 临床微生物检验标准化操作[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2010:14-30.

[6] 梁璐,渠巍,陈敏. 重症肺炎患儿支气管肺泡灌洗液病毒检测结果分析[J]. 贵阳医学院学报,2014,39(3):406-408.

[7] Kalawat U,Sharma KK,Reddy PN,et al. Study of bronchoalveolar lavage in clinically and radiologically suspected cases of pulmonary tuberculosis[J]. Lung India,2010, 27(3):122-124.

[8] Cantral DE,Tape TG,Reed EC,et al. Quantitative culture of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of bacterial pneumonia[J]. Am J Med,1993,95(6):601-607.

[9] 宋丽,王秀芳,张艳丽. 儿童重症社区获得性肺炎肺泡灌洗液菌群及药敏分析[J]. 中国实用医药,2014,9(19): 176-177.

[10] 刘琳,张湘燕,高占成. 气道分泌物病原菌培养在呼吸系统感染诊断中的应用价值[J]. 山东医药,2016,56(31): 103-105.

[11] 罗明兴,漆波,范远华,等. 经纤支镜无污染痰标本方法在下呼吸道感染病原学诊断的临床研究[J]. 西部医学, 2012,24(1):65-67.

[12] 叶方,潘卫东,杨志军,等. 两种标本采集方法对 ICU 患者下呼吸道病原学检测的影响[J]. 安徽医学,2015,36 (11):1372-1374.

(收稿日期:2017-06-25 修回日期:2017-09-13)

• 临床研究 •

qPCR 快速检测痰标本中 MRSA 的临床应用*

金 姝,邹玉涵,闫佩毅,朱 卿,张 骥[△]

(上海市普陀区人民医院检验科/安徽医科大学上海普陀临床学院,上海 200060)

摘要:目的 探讨实时荧光定量 PCR(qPCR)法快速检测痰液标本中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的临床应用。方法 痰标本经裂解获取 DNA,应用 qPCR 法检测 mecA 和 Sa442 基因,同时对痰标本进行常规培养鉴定。结果 以痰培养鉴定结果为金标准,在 887 份合格痰标本中,PCR 检测 MRSA 的灵敏度为 95.7%,特异度为 91.2%,阳性预测值为 37.8%,阴性预测值为 99.7%。结论 qPCR 法可用于快速检测痰标本 MRSA,排除 MRSA 的定植和感染。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; qPCR; 细菌培养
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.24.030 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)24-3441-03

金黄色葡萄球菌(MRSA)是一种重要的致病菌,而 MRSA 在金黄色葡萄球菌中的分离率已超过 50%^[1],与其相关的致死率及治疗费用显著增加。采用分子生物学方法可以在数小时内对 MRSA 进行诊断^[2-3]。综合性医院 MRSA 的主要标本来源为痰液、创面、血液、中段尿等^[4]。虽然痰液标本较易受到口腔细菌的污染,难以判断定植或致病,但标本获取容易,病人配合,而下呼吸道的肺泡灌洗液标本需要支气管镜检查获取,

且部分病人肺功能差,不适合侵入性检查。因此痰液标本中 MRSA 检测的临床应用值得进一步探讨^[5]。本研究对 887 例痰液标本进行了常规培养和 qPCR 法检测 MRSA,比较了两种检测方法的差异,初步了解 qPCR 法检测痰液标本 MRSA 的优缺点,为该技术的临床应用提供了依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 选取 2015 年 3 月至 2015 年 7 月本院送检痰

* 基金项目:上海市普陀区卫生系统自主创新科研资助项目(普 KW15101)。

[△] 通信作者,E-mail:zhangji196678@aliyun.com。

标本,同时进行细菌培养和 PCR 快速检测。以培养方法为金标准,比较 PCR 快速检测方法的灵敏度、特异性、阳性和阴性预测值。

1.2 仪器及试剂 Tris(三羟甲基氨基甲烷)、Triton X-100、溶菌酶、溶葡萄球菌酶、蛋白酶 K 等均购自生工生物工程股份有限公司;Na2-EDTA、chelex100(弱阳离子螯合树脂)等购自 sigma 公司;UNG 酶和 PCR 反应液 Premix Ex TaqTM(2×) 购自罗氏公司;引物和探针均由上海基康公司合成。

1.3 方法 (1)细菌培养:挑取痰液标本的脓性部分做革兰氏染色,接种于血平板、中国蓝、巧克力平板上,5%CO₂ 35℃ 过夜培养。常规方法鉴定为金黄色葡萄球菌后,用全自动细菌鉴定及药敏分析仪分析鉴定。(2)痰液的裂解处理:痰液初步液化后,离心,沉淀,加入 DNA 提取液,置 56℃ 30 min 后转移至 100℃ 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液 2 μL 用于 PCR 检测。(3)PCR 检测:Sa442 为金黄色葡萄球菌特异性基因^[3],mecA 为 MRSA 的耐药基因,Sa442mecA 和 mecA 均阳性时,可判断为 MRSA 阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。率的比较采用四格表描述,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 种方法阳性率比较 细菌培养阳性率为 5.3%(47/887),qPCR 检测阳性率为 13.4%(119/887),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 qPCR 检测 MRSA 的效能评价 以细菌培养鉴定为金标准,PCR 检测的灵敏度达到 95.7%(45/47),特异度达到 91.2%(766/840),阳性预测值为 37.8%(45/119),阴性预测值达到 99.7%(766/768)。见表 1。

表 1 qPCR 检测 MRSA 的效能评价

方法	常规细菌培养		总计
	阳性	阴性	
qPCR			
阳性	45	74	119
阴性	2	766	768
总计	47	840	887

3 讨 论

肺部感染病人的病原学检测有重要的临床意义。常见的标本来源为痰、肺泡灌洗液、咽拭子等,其中最能准确反应致病病原体的标本是肺泡灌洗液,但获取困难,需要采用支气管镜进行侵入性操作,且部分病人肺功能无法耐受支气管镜检查;而咽拭培养有大量口腔正常菌群影响致病菌的检测;痰标本比肺泡灌洗液容易获取,也可以尽量避免口腔菌群的污染,因此对痰标本的病原体快速检测,能便捷地指导临床治疗。MRSA 在临床分离的金黄色葡萄球菌中比例已超过 50%,主要标本来源为呼吸道,美国临床实验室标准化委员会指出检测 mecA 和其表达的 PBP2a 是预报其对苯唑西林耐药最准确的方法^[6]。使用分子生物学或免疫学方法检测 mecA 基因的速度较常规的细菌培养和鉴定快 12~48 h。

有研究者用普通 PCR 法检测 mecA 基因间接检测痰中 MRSA,分析该方法的敏感性时发现在 5×10^3 CFU 时检测呈阳性^[7]。本实验室 qPCR 检测发现在 3.0×10^3 CFU 仍能够检出,并有较好的线性结果^[8],可以准确地反映 MRSA 的感染或

定植。周俊等^[9]用 qPCR 快速检测 97 份下呼吸道痰液标本,敏感度高,特异度强,操作时间短,与常规培养加药物敏感试验的检测结果具有良好的一致性,进一步分析其阳性预测值 69.4%,阴性预测值 100%,适用于直接快速检测下呼吸道感染标本中的 MRSA。沈蕾等^[10]利用 qPCR 快速检测 124 份痰标本 MRSA,发现其检出 MRSA 的阳性率明显高于培养法。该研究分析显示病人的性别、年龄、住院天数、APACHE II 评分、标本送检时间等在两组中差异均无统计学意义,说明病人的临床情况 & 标本送检时间不影响 PCR 结果,作者认为 PCR 的阳性预测值低的原因很可能是由作为金标准的痰培养结果决定的,由于痰标本中其他菌的生长导致了痰培养假阴性。该研究认为其灵敏度和特异性均不及文献报道的肺泡灌洗液检测结果^[11],因此在检测 MRSA 引起医院感染中的价值有限,但阴性预测值高达 97.5%,在排除 MRSA 感染或定植方面有一定价值。

本研究结果显示 PCR 对 MRSA 的检出率显著高于培养法,因此可以更早地提示标本中 MRSA 菌的存在,此两种方法结果的差异是由于方法本身的灵敏度不同造成的,PCR 法检测灵敏,且不受其他细菌生长的影响。较高的阴性预测值有助于排除 MRSA 感染或定植,减少抗生素应用,降低医疗费用^[12]。qPCR 检测痰液标本中的 MRSA 可以用于临床筛查 MRSA 的定植或感染,对于筛查阳性的病人,有必要进一步评估其临床危害性,采取隔离或治疗措施。

参考文献

[1] 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.

[2] 史小英,陈启荣,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.

[3] Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, et al. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2392-2397.

[4] 王广州,韩东升,汤惠,等. 2011-2014 年某院 CR-AB 及 MRSA 菌株的临床分布及耐药分析[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(11):1525-1527.

[5] 陈秀兰,袁学华,王宇卉. 肺炎患儿痰标本病原菌分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(9):2117-2119.

[6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. M100-S14 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; thirteenth informational supplement [S]. Wayne,PA,USA:NCCLS,2004:30-35.

[7] 刘向群,张杰,肖白,等. 聚合酶链反应直接检测痰中耐甲氧西林葡萄球菌的敏感性[J]. 中华结核和呼吸杂志,2004,27(2):127-129.

[8] 金姝,邹玉涵,同佩毅,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 DNA 提取方法的改进[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(3):303-304.

[9] 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.
- [10] 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.
- [11] Oh AC, Lee JK, Lee HN, et al. Clinical utility of the Xpert MRSA assay for early detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(1): 11-15.
- [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.
- (收稿日期: 2017-07-12 修回日期: 2017-09-25)
- 临床研究 •

放化疗与血清糖类抗原 72-4 水平的相关性研究*

冉 静, 犖伟奇, 陈一超, 何永鹏, 王 霞, 易 琳[△]

(重庆大学附属肿瘤医院/重庆市肿瘤研究所/重庆市肿瘤医院, 重庆 400030)

摘 要:目的 探讨放化疗与部分患者血清糖类抗原 72-4(CA72-4)水平升高之间的关系。方法 选取 2016 年 7 月至 2017 年 3 月于该院就诊并进行 CA72-4 检测的非胃癌等消化系统恶性肿瘤及卵巢癌患者, 分为放化疗组和未经放化疗组, 比较 2 组血清 CA72-4 水平, 以及同一组患者放化疗前后血清 CA72-4 水平差异。结果 经放化疗组患者血清 CA72-4 水平明显高于未经放化疗组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 同一组患者放化疗后血清 CA72-4 水平明显高于放化疗前, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 放化疗是引起部分患者 CA72-4 水平升高的原因。

关键词: CA72-4; 放化疗; 影响因素

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 24. 031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)24-3443-02

糖类抗原 72-4(CA72-4)是一种由 CC49 和 B72.3 两株单抗识别的粘蛋白样的高分子量糖蛋白, 相对分子质量为 $(220 \sim 400) \times 10^3$, 常被用作胃癌等消化系统恶性肿瘤及黏液性卵巢癌辅助诊断和疗效监测的标志物, 也可在其他多种肿瘤中表达^[1-3]。但亦有文献显示其对胃癌等灵敏度不高, 易受炎症疾病、药物等多种因素干扰^[4-7]。本院自 2015 年 12 月开展 CA72-4 检测以来, 观察发现 CA72-4 在非胃癌患者中总体阳性率较高, 同时许多患者 CA72-4 水平与病情、疗效评价不一致。进一步观察发现经过放化疗的患者 CA72-4 水平总体较高。而消化道黏膜损伤是放化疗的主要毒副作用之一, 患者行放化疗时的情况与前述 CA72-4 的干扰因素有相似之处。由此合理推测部分患者 CA72-4 水平升高并非因病情进展而是由于放化疗等治疗引起。为研究 CA72-4 水平升高与放化疗等治疗的关系, 回顾性研究 2016 年 7 月至 2017 年 3 月于本院就诊的患者临床资料, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 7 月至 2017 年 3 月于本院就诊并进行 CA72-4 检测的非胃癌等消化系统恶性肿瘤及卵巢癌患者, 分为经放化疗组, 男 25 例, 年龄 (51.2 ± 14.75) 岁, 女 56 例, 年龄 (49.79 ± 10.00) 岁; 未经放化疗组, 男 44 例, 年龄 (59.73 ± 15.68) 岁, 女 26 例, 年龄 (53.5 ± 13.92) ; 以及放化疗前后均进行 CA72-4 检测组, 男 20 例, 年龄 (56 ± 17.66) , 女 25 例, 年龄 (51.12 ± 10.75) 。所有接受过放化疗的患者, CA72-4 水平均在放化疗后 2 月内测定。各组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 离心机(TDZ5-WS), 全自动化学发光仪 MAGLUMI 4000 (深圳市新产业生物医学工程股份有限公司), 糖类抗原 72-4(CA72-4)测定试剂盒(深圳市新产业生物

医学工程股份有限公司)。

1.3 方法 采用全自动双抗体夹心化学发光免疫检测法检测患者血清 CA724(所有血清样本均由 MAGLUMI 4000 及其配套 CA72-4 测定试剂进行检测)并收集患者临床诊疗信息。比较经放化疗组和未经放化疗组血清 CA72-4 水平; 比较 2 组放化疗前后血清 CA72-4 水平。另选取 35 例胃癌患者和 26 例良性胃病患者作 ROC 曲线判断 CA72-4 诊断胃癌效能。

1.4 统计学处理 使用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析。由于各组数据呈非正态分布, 故采用秩和检验对经放化疗组和未经放化疗组数据进行比较; 采用配对秩和检验对放化疗前后数据进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 经放化疗组和未经放化疗组比较 经放化疗组 CA72-4 平均值为 28.70 IU/mL, 中位数 19.77 IU/mL; 未经放化疗组 CA72-4 平均值为 11.13 IU/mL, 中位数 4.77 IU/mL, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 放化疗前后 CA72-4 水平比较 放化疗前 CA72-4 平均值为 8.16 IU/mL, 中位数 2.77 IU/mL($Q = 5.54$); 放化疗后 CA72-4 平均值为 13.25 IU/mL, 中位数 4.48 IU/mL($Q = 13.64$), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 CA72-4 诊断胃癌效能分析 以病理/内镜结果为标准绘制 ROC 曲线, 曲线下面积(AUC)0.634, 灵敏度为 65.70%, 特异度为 65.40%, CA72-4 为 2.27 IU/mL, 小于参考值 6.00 IU/mL; 以 6.00 IU/mL 作为截断值比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 诊断结果一致性不佳($Kappa = 0.180, P = 0.068$), CA72-4 诊断胃癌的灵敏度为 31.43%, 特异度为 88.46%, 阳性预测值为 78.57%, 阴性预测值为 48.94%; 以 2.27 IU/mL 作为截断值比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但诊断结果

* 基金项目: 重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2016jcyjA0103); 重庆市卫生和计划生育委员会医学科科研项目(2013-2-124)。 [△] 通信作者, E-mail: 2923235172@qq.com。