

sing integrated parameters including clinical manifestations, T-SPOT, endoscopy and CT enterography[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10):17578-17589.

[34] VAN SOOLINGEN D, DE HAAS P E, HERMANS P W, et al. Comparison of various repetitive DNA elements

as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8):1987-1995.

(收稿日期:2017-09-12 修回日期:2017-11-12)

• 综 述 •

MRSA 的分子生物学检测方法研究进展*

谢 跃¹综述,魏莲花^{2△}审校

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

摘 要:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是引起院内感染和社区感染的重要病原菌之一。由于 MRSA 感染的治疗选择有限,且传播速度较快,暴发流行的概率较高,现已成为一个全球性的难题,因此,使临床医生在第一时间获得 MRSA 感染的准确信息,对疾病的及时治疗有着重要意义。目前,关于 MRSA 的分子生物学检测方法的研究热点主要集中在高效可靠、成本低廉、简单易行 3 个方面,本文就近年来 MRSA 的分子生物学检测方法的研究现状及发展趋势作一综述。

关键词:MRSA; 分子生物学; 核酸杂交; PCR; 等温扩增

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.029

中图法分类号:R378.11

文章编号:1673-4130(2018)07-0867-04

文献标识码:A

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)自二十世纪六十年代被发现以来,在世界范围内大范围快速传播,防控形势严峻,特别是其多重耐药性给临床治疗带来极大困难^[1],包括医院获得性(HA)-MRSA 和社区获得性(CA)-MRSA 的持续出现,使其对公众健康的威胁日益增加。因此,在 MRSA 的基因结构已被阐明的基础之上,利用分子生物学技术早期、快速、敏感、特异地检测病原体核酸,筛出耐药菌株,对于临床抗菌药物的合理使用、减少耐药甚至是多重耐药菌株的产生和传播具有决定性指导意义^[2-3]。本文现对近年来 MRSA 的分子生物学检验方法中的核酸杂交技术、PCR 技术、等温扩增技术的研究进展介绍如下。

1 核酸杂交技术

1.1 传统核酸杂交技术 已有研究显示, mecA 是 MRSA 的耐药决定基因,只存在于葡萄球菌中,编码与 β-内酰胺类抗菌药物亲和力极低的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a),促进细菌胞壁合成而耐药; femA 是甲氧西林耐药的辅助基因,它只存在于金黄色葡萄球菌。因此, femA 和 mecA 基因联合扩增早在 90 年代已成功用于检测 MRSA。随后,据此设计了针对 mecA 与 femA 的放射性核素、荧光素或酶标记的 DNA 探针用于检测鉴定 MRSA。传统核酸杂交技术有菌落原位杂交、荧光原位杂交等。KIPP 等^[4]通过 16S rRNA 定向原位杂交技术从 1 例 45 岁脑病患者的组织样本和脓液中鉴定出了致病性的 MRSA 变异

体,随后联合用药成功对该患者进行了治疗。OLIVEIRA 等^[5]运用肽核酸荧光原位杂交(PNA-FISH)直接从包含革兰阳性球菌群(GPCC)的阳性血液培养瓶中鉴定金黄色葡萄球菌,这一方法基于荧光标记的 DNA 探针,其靶向金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 的物种特异性序列,用 17 种参考菌株和 48 种临床分离株(包括甲氧西林抗性和甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌菌种、凝固酶阴性葡萄球菌菌种和其他临床相关的与系统发育相关的细菌和酵母菌种)进行的评价显示,该测定具有 100% 的灵敏度、96% 特异度;在含有 87 个 GPCC 血培养阳性标本的临床试验中,从 37 个通过标准微生物学方法鉴定为金黄色葡萄球菌的阳性培养物中鉴定出 36 个,阳性和阴性预测值分别为 100% 和 98%。但也应该指出,传统核酸杂交技术也存在操作繁杂、自动化程度低、操作序列数量少、检测效率低等不足。

1.2 基因芯片技术 基因芯片技术代表了近年来分子生物学技术的最新发展趋势。该技术系指将大量探针分子固定于支持物上后,与带荧光标记的 DNA 或其他生物分子(例如蛋白或小分子)进行杂交,通过检测各个探针分子的杂交信号强度,进而获取样本分子的数量及序列信息。MONECKE 等^[6]将 DNA 芯片用于研究从牛分离的金黄色葡萄球菌中的 144 种不同的靶标基因,包括抗性基因和编码外毒素的基因,测试了来自德国和瑞士的 128 种分离株,从中检

* 基金项目:甘肃省卫生行业科研计划(GSWST2012-04)。

△ 通信作者, E-mail: weilianhua0199@sina.com。

本文引用格式:谢跃,魏莲花. MRSA 的分子生物学检测方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7):867-870.

出 2 个 MRSA 分离株。PETER 等^[7]使用物种鉴定芯片检测 MRSA,该芯片应用等位基因特异性杂交的原理,可以用于鉴定单核苷酸多态性(SNP),它由 4 个寡核苷酸探针组成,该测定可以使用常规杂交或使用 Fraunhofer lab-on-a-chip 系统自动化进行,使用后两者将使杂交、洗涤和读出时间从约 2 h 缩短至小于 10 min。需要指出的是,尽管基因芯片技术可以一次性快速地检测分析大量基因序列,但仍然存在着许多难以解决的问题,例如技术成本昂贵复杂、检测灵敏度较低、重复性差、分析范围较狭窄等。这些问题主要表现在样品的制备、探针合成与固定、分子的标记、数据的读取与分析等方面。

2 PCR 技术

2.1 传统 PCR 技术 由于 MRSA 的出现,现已开发了一系列 PCR 方法用于鉴定 MRSA。传统用于诊断 MRSA 感染的临床实验室检测方法是靶向 *mecA* 和 *nuc* 基因的 PCR。挑取菌落并悬浮于 0.5 mol/L NaCl 中,使用 *mecA* 和 *nuc* 特异性引物作为模板 DNA 进行 PCR。本方法具有 97% 特异度和 100% 灵敏度,可在 48 h 内完成。目前已开发了基于 PCR 的试纸测定法用于从临床拭子标本直接检测 MRSA,这种方法的灵敏度和特异度分别达到 94.1% 和 98.3%,成本更低^[8]。CUNY 等^[9]基于葡萄球菌盒染色体 *mec*(SCC*mec*)元件与相邻染色体区连接区域的序列,开发了使用特异性靶向 SCC*mec* 元件的正向引物和特异性靶向 *orfX* 区域的反向引物的具有 100% 特异度的 PCR 方法以检测 MRSA。gDNA 纯化自溶葡萄球菌素处理的葡萄球菌细胞,在 25 μ L PCR 混合物(每种引物 2.5 pmol,每种 dNTP 200 μ mol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, pH=9.0, MgCl₂ 1.5 mmol/L, KCl 500 mmol/L 和 1.3 U rTaq DNA 聚合酶)中将 10 ng gDNA 用作 PCR 模板,在 PCR 仪中进行扩增^[9]。最近,AL-TALIB 等^[10]建立了基于干试剂的热稳定 PCR,通过同时扩增 16S rRNA、*femA*、*mecA* 和 *lukS* 基因,以 100% 的灵敏度和特异度检测 MRSA。将细菌细胞通过煮沸裂解得到 PCR 扩增的模板,使用热稳定的 PCR 试剂,使用此方法的检测限为 10⁶ CFU 和 10 ng 基因组 DNA(gDNA)。需要注意的是,传统 PCR 技术只能进行定性分析,而且与最新 PCR 技术相比,其过程相对复杂,检测灵敏度和特异度相对较低。

2.2 多重 PCR 技术 为了增强 MRSA 检测的特异度和灵敏度,现已基于不同的金黄色葡萄球菌特异性靶基因开发了多种多重 PCR。XU 等^[11]使用多重 PCR 同时检测 4 个基因,即葡萄球菌属的 16S rRNA、金黄色葡萄球菌的 *femA*、编码甲氧西林抗性的 *mecA* 和一个内部对照,可在 4 h 内迅速得到结果。通过与常规方法进行比较,在 DNA 水平上的多重 PCR 测定的分析灵敏度为 10 ng gDNA,用 10 个参考

葡萄球菌菌株评估分析,其特异度为 100%。MRSA 的诊断评价采用 360 种食源性葡萄球菌分离株进行,其特异度为 99.1%,灵敏度 96.4%,阳性预测值 97.5%,阴性预测值 97.3%^[11]。MCCLURE 等^[12]通过靶标 16S rRNA、*nuc*、*mecA*、*mupA*、*mupB*、*qac* 和 *smr* 这 7 个基因片段的 PCR 扩增,检测鉴别金黄色葡萄球菌,该方法在实验检测中表现出 100.0% 的灵敏度和特异度。ZHANG 等^[13]运用靶向 *mecA* 和 *pvl* 的多重 PCR 方法来鉴定 USA300 和 USA400 CA-MRSA 分离株。BECKER 等^[14]利用 Xpert MRSA Gen 3 系统运用 PCR 技术靶向 *mecA*、*mecC* 及 SCC-*mec-orfX* 连接区域来检测 MRSA,最终 157/160 (98.1% 的特异度)的 MRSA 菌株通过这一新的检测方法得到了正确的分类,另外检测出了所有的 10 个 *mecC* 阳性菌株并分类为 MRSA,150 个 *mecA* 阳性 MRSA 菌株中的 3 个(2.0%)由于缺少 SCC*mec-orfX* 连接区域的扩增被错误分类为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)。上述研究表明,多重 PCR 提供了快速和可靠的方法来鉴定 MRSA 分离株,其同时检测多个靶基因,大大提高了检测的特异度。

2.3 实时荧光定量 PCR 技术(RT-qPCR) 现已建立了对金黄色葡萄球菌进行鉴定的多种 RT-qPCR 方法。*fnbA* 基因(编码纤维蛋白结合蛋白 A)用于 RT-qPCR 以直接从患者的下呼吸道样本中定量检测金黄色葡萄球菌^[15],该方法从细菌样本纯化基因组 DNA,将其作为模板 DNA。但是,该方法可能获得假阴性结果,因为不是每个金黄色葡萄球菌分离株都具有 *fnbA* 基因^[16]。基于 *mecA* 基因位于 SCC*mec* 的事实,开发了 MRSA 特异性单基因座 RT-qPCR 用于从拭子样本直接快速检测 MRSA^[17-18]。将拭子在 1 mL 样本缓冲液中稀释,然后离心,将沉淀在裂解缓冲液中裂解用于 RT-qPCR。该方法有超过 92% 的灵敏度和 99% 的特异度,但可能还需要运用其他方法来确证,因为使用该方法,4.7% 的拭子样本不产生 PCR 产物,5.1% 的拭子样本产生假阳性。MANGA 等^[19]使用 RT-qPCR 检测金黄色葡萄球菌/MRSA,其与参考方法相比,具有 100% 的灵敏度。在 C_q 值低于 30 的情况下,该测定具有 95% 的特异度,而且其结果可在 1.5 h 内获得。总的来说,RT-qPCR 技术具有实时定量监测、快速、灵敏、精确等特点,其扩大了 PCR 的应用范围。

2.4 多重 RT-PCR 技术 现已开发了用于诊断来自临床标本 MRSA 的不同多重 RT-PCR 方法。YADAV 等^[20]设计了基于 SYBR Green I 的多重 RT-PCR,用于从鼻拭子中直接检测 MRSA,在对 72 例鼻拭子进行检测并比较研究后,发现该方法检测 MRSA 的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 84.2%、88.2%、89.0% 和 83.3%。HULETSKY 等^[21]设计了 5 种针对 SCC*mec* 序列的引物、针对 *orfX*

的 1 种引物及 3 种特异性信标探针,将它们组合使用,已成功用于快速多重 RT-PCR 以鉴定来自临床样本的 MRSA,来自细菌细胞纯化的 gDNA 或粗 DNA 提取物均可用作扩增的模板。该方法的灵敏度高,并且其可以从具有 25 CFU 细菌的样本中检测 MRSA,它提供了一种强大的方法来从临床样本中的各种金黄色葡萄球菌中鉴定出 MRSA^[21-22]。通过在多重 RT-PCR 时扩增 16S rRNA 基因,可以提高特异度以减少假阳性结果^[23]。此外,通过同时检测两种金黄色葡萄球菌特异性 DNA 序列,包括 Sa442 DNA 序列和 *coa* 基因,也可以增强多重 RT-PCR 测定诊断的特异度。RENWICK 等^[24]使用 RT-qPCR 同时扩增 *mecA*、*lukF* 和 *lukS* 基因来从临床拭子样本检测 MRSA,其具有 95% 的灵敏度和 99% 的特异度,结果显示两个 PVL 阳性拭子是 MRSA,3 个是 MSSA。多重 RT-PCR 技术结合了多重 RT-PCR 和 RT-qPCR 的优点,具有高特异度、高灵敏度以及简便快捷的特点,有利于 MRSA 快速准确地检出。

3 等温扩增技术

虽然 PCR 已经成功地用于扩增特定的 DNA 片段,但却需要反复的热变性,无法摆脱依赖精良仪器设备的局限,从而限制了其在临床检测中的应用。现已开发了不需要任何热循环仪来改变反应温度的等温扩增技术,其成本较低,可以用于快速扩增特定的 DNA 序列。解旋酶依赖性等温扩增(HDA)是基于解旋酶的双链 DNA 解旋活性来分离链,随后引物退火并且在 DNA 聚合酶作用下延伸。GOLDMEYER 等^[25]将 HDA 技术与一次性扩增子检测设备结合,通过靶向 *nuc* 和 *mecA* 基因来直接从革兰阳性血培养基中检测金黄色葡萄球菌和 MRSA。其对金黄色葡萄球菌的临床诊断灵敏度和特异度可以达到 100.0%,对 MRSA 的检测分别为 100.0% 和 98.0%,检测限为 50 CFU/反应。FRECH 等^[26]使用 HDA 技术从临床拭子样本检测金黄色葡萄球菌,灵敏度和特异度分别为 89% 和 94%。HDA 简单有效,其反应体系仅需 2 条引物,且设计简单,扩增用时 75~90 min,操作简便,不需要昂贵的 PCR 仪,较细菌学、免疫学和 PCR 方法更适于在基层实验室推广应用。环介导等温扩增(LAMP)使用 4~6 个引物,识别靶 DNA 的 6~8 个不同区域,两条引物配合链置换 DNA 聚合酶启动 DNA 合成并形成两个环结构以促进目标 DNA 的随后扩增。CHEN 等^[27]采用 LAMP 技术鉴定 MRSA,在 60 min 内 63 °C 条件下成功扩增了需要检测的 *mecA*、*nuc* 和 *femB* 基因,扩增结果与 PCR 结果相同,特异度与准确度与 PCR 一致,而且更加快捷。LAMP 对于样品处理、操作技术和仪器设备的要求都较低,具有较高的特异性和抗干扰能力,反应体系稳定可靠,在室温下放置 2 周后仍然稳定,其灵敏度较高,扩增快速高效,结果鉴别简便,用肉眼观察或浊

度仪检测沉淀浊度就能判断扩增与否。

4 小 结

综上所述,MRSA 作为一种影响人类健康的重要病原菌,快速、准确地对其检测鉴定,对临床制定正确合理的治疗策略方案极为重要。一方面,相关分子生物学检测方法可针对 MRSA 的特定基因、蛋白进行快速检测,特异度和灵敏度高;另一方面,需要指出的是,尽管已经成功开发了不同的分子诊断技术,包括荧光原位杂交、终点 PCR、RT-PCR、多重 PCR 和等温扩增等,并且用于快速检测包括 MRSA 和 MSSA 的金黄色葡萄球菌,但采用传统的金标准方法如细菌分离培养仍是必要的,以进一步确证检测结果,排除分子生物学检测的假阳性和假阴性。最后,应当注意到不同的分子生物学检测方法在靶向不同的目标时会有不同的灵敏度和特异度,因此,合理的设计检测策略、采用更合理的方法、靶向更合理的目标,有助于直接从临床样本中快速筛选 MRSA,例如最近出现的等温扩增技术已经给研究者提供了检测 MRSA 的更高效、廉价的新方法。

参考文献

- [1] GLEGHORN K, GRIMSHAW E, KELLY E K. New antibiotics in the management of acute bacterial skin and skin structure infections[J]. *Skin Ther Lett*, 2015, 20(5): 7-9.
- [2] 沈立松, 谢国化. 我国分子诊断的现状及其问题[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(7): 473-476.
- [3] 王华梁. 分子诊断——体外诊断技术发展的飞跃[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(7): 477-480.
- [4] KIPP F, ZIEBUHR W, BECKER K, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA directed in situ hybridisation in a patient with a brain abscess caused by small colony variants[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003, 74(7): 1000-1002.
- [5] OLIVEIRA K, PROCOP G W, WILSON D, et al. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(1): 247-251.
- [6] MONECKE S, KUHNERT P, HOTZEL H, et al. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 125(1-2): 128-140.
- [7] PETER H, WIENKE J, BIER F F. Lab-on-a-Chip multiplex assays[M]. *Multiplex Biomarker Techniques*, Springer, New York, 2017.
- [8] EIGNER U, VELDENZER A, FAHR A M, et al. Retrospective evaluation of a PCR based assay for the direct detection of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in clinical specimen [J]. *Clin Lab*, 2012, 58(11/12): 1319-1321.
- [9] CUNY C, WITTE W. PCR for the identification of methi-

- cillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne *orfX* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(10):834-837.
- [10] AL-TALIB H, CHAN Y Y, AL-KHATEEB A, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, by a newly developed dry reagent-based polymerase chain reaction assay [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2014, 47(6):484-490.
- [11] XU B, LIU L, LIU L, et al. A multiplex PCR assay for the rapid and sensitive detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(11):M638-642.
- [12] MCCLURE J A, DELONGCHAMP J Z, CONLY J M, et al. Novel multiplex PCR assay for detection of chlorhexidine-quaternary ammonium, mupirocin, and methicillin resistance genes, with simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(6):1857-1864.
- [13] ZHANG K, MCCLURE J A, ELSAYED S, et al. Novel multiplex PCR assay for simultaneous identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains USA300 and USA400 and detection of *mecA* and Panton-Valentine leukocidin genes, with discrimination of *Staphylococcus aureus* [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3):1118-1122.
- [14] BECKER K, DENIS O, ROISIN S, et al. Detection of *mecA*- and *mecC*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates by the new Xpert mRSA gen 3 PCR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(1):180-184.
- [15] GHODOUSI A, NOMANPOUR B, DAVOUDI S, et al. Application of *fnbA* gene as new target for the species-specific and quantitative detection of *Staphylococcus aureus* directly from lower respiratory tract specimens by real time PCR [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2012, 55(4):490-495.
- [16] O'NEILL E, HUMPHREYS H, O'GARA J P. Carriage of both the *fnbA* and *fnbB* genes and growth at 37 degrees C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates [J]. *J Med Microbiol*, 2009, 58(Pt 4):399-402.
- [17] MEHTA M S, PAULE S M, HACEK D M, et al. Optimization of a laboratory-developed test utilizing roche analyte-specific reagents for detection of *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, and vancomycin-resistant *Enterococcus* species [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(7):2377-2380.
- [18] DANIAL J, NOEL M, TEMPLETON K E, et al. Real-time evaluation of an optimized real-time PCR assay versus Brilliance chromogenic MRSA agar for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical specimens [J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(3):323-328.
- [19] MANGA I, VYLETÉLOVÁ M. A new real-time PCR assay for rapid identification of the *S. aureus*/MRSA strains [J]. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2013, 61(6):1785-1792.
- [20] YADAV M K, KWON S K, HUH H J, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from nasal samples by multiplex real-time PCR based on dual priming AT-rich primers [J]. *Folia Microbiologica*, 2012, 57(1):37.
- [21] HULETSKY A, GIROUX R, ROSSBACH V, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5):1875-1884.
- [22] SÖDERQUIST B, NEANDER M, DIENUS O, et al. Real-time multiplex PCR for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in clinical samples enriched by broth culture. [J]. *Apmis*, 2012, 120(5):427-432.
- [23] KIM J U, CHA C H, AN H K, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(3):1008-1013.
- [24] RENWICK L, HARDIE A, GIRVAN E K, et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine leukocidin directly from clinical samples and the development of a multiplex assay using real-time polymerase chain reaction [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008, 27(9):791-796.
- [25] GOLDMEYER J, LI H, MCCORMAC M, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of methicillin resistance directly from positive blood cultures by isothermal amplification and a disposable detection device [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4):1534-1536.
- [26] FRECH G C, MUNNS D, JENISON R D, et al. Direct detection of nasal *Staphylococcus aureus*, carriage via heli-case-dependent isothermal amplification and chip hybridization [J]. *BMC Res Notes*, 2012, 5(1):430.
- [27] CHEN C, ZHAO Q, GUO J, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, (MRSA) using simultaneous detection of *mecA*, *nuc*, and *femB* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Curr Microbiol*, 2017, 74(8):965-971.