

论著·基础研究

建立检测血液中 EC、KP、SA 和 MRSA 的多重 PCR 方法

吴许文^{1,2}, 温旺荣^{1△}, 李沛樟², 倪金良², 简仕铭²

(1. 暨南大学附属第一医院检验科, 广东广州 510163; 2. 镜湖医院检验科, 澳门 999078)

摘要:目的 建立快速检测血液中常见致病菌包括大肠埃希菌(EC)、肺炎克雷伯菌(KP)、金黄色葡萄球菌(SA)及耐甲氧西林 SA(MRSA)的多重聚合酶链反应(PCR)方法,有利于败血症的及时治疗。方法 建立多重 PCR 方法对 EC *phoA* 基因、KP *mdh* 基因、SA *femA* 基因和 MRSA *mecA* 基因进行检测,并将 16S rDNA 作为致病菌感染对照。结果 采用建立的多重 PCR 方法进行检测的特异性为 100%, EC 检测限为 2.75×10^2 CFU/mL, KP 为 2.43×10^3 CFU/mL, SA 为 3.13×10^2 CFU/mL, MRSA 为 3.03×10^2 CFU/mL; 用多重 PCR 方法和传统血培养方法对 300 个血标本进行检测,传统血培养方法检测出 187 个血标本内阳性,多重 PCR 方法有 4 个血标本为假阴性,未能被检出。结论 建立的多重 PCR 方法可简便、及时地检测血流感染中的 EC、KP、SA 和 MRSA。

关键词:聚合酶链反应; 脓毒症; 大肠杆菌; 克雷伯菌,肺炎; 葡萄球菌,金黄色; 甲氧西林抗药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.006

中图法分类号:R446.61;R378

文章编号:1673-4130(2019)01-0019-07

文献标识码:A

Development of a multiplex PCR method for the rapid detection of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus

WU Xuwen^{1,2}, WEN Wangrong^{1△}, LI Peizhang², NI Jinliang², JIAN Shiming²

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Jinan

University, Guangzhou, Guangdong 510163, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Kiang Wu Hospital, Macau 999078, China)

Abstract: Objective Septicemia is caused by a variety of pathogenic bacteria, including Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Staphylococcus aureus (especially for methicillin-resistant S. aureus, MRSA), thus to establish a multiplex PCR method for the rapid detection of common pathogenic bacteria in the blood, is in favor of the timely treatment of septicemia. **Methods** The target genes of this assay were *phoA* for E. coli, *mdh* for K. pneumoniae, *femA* for S. aureus and *mecA* for MRSA, and 16S rDNA as pathogen infection control. **Results** A perfect concordance (100%) was observed when the specificity was validated with 20 strains belonging to 15 species pathogens containing target strains and other clinical pathogens. The detection limits of the multiplex PCR method were 2.75×10^2 CFU/mL for E. coli, 2.43×10^3 CFU/mL for K. pneumoniae, 3.13×10^2 CFU/mL for S. aureus and 3.03×10^2 CFU/mL for MRSA. Multiplex PCR method was compared with conventional blood culture method (BCM) by a practical sample test assay with 300 blood specimens. The multiplex PCR method provided nearly concordant results with BCM except a few false-negative results that 4 in total 187 BCM-positive samples could not be determined by PCR method. **Conclusion** We successfully developed a simple, timely multiplex PCR method for detection of E. coli, K. pneumoniae, S. aureus and MRSA in blood stream infection.

Key words: polymerase chain reaction; sepsis; Escherichia coli; Klebsiella pneumoniae; Staphylococcus aureus; methicillin resistance

败血症是由致病菌引起血流感染的一种常见综合征,及时作出诊断是降低患者病死率的关键^[1]。主要是因消化道、呼吸道、伤口感染导致病原体进入血液循环所致^[2-6]。澳门镜湖医院检验科 2010—2016

年相关数据显示,近七年从血液中分离的主要致病菌有大肠埃希菌(EC)40.18%,金黄色葡萄球菌(SA)11.87%和肺炎克雷伯菌(KP)9.48%,其中因滥用抗菌药物而产生的耐甲氧西林 SA(MRSA)占 SA 的

作者简介:吴许文,男,技师,主要从事临床微生物分析及检测方法研究。△ 通信作者, E-mail: alvin_ng@163.com。

本文引用格式:吴许文,温旺荣,李沛樟,等.建立检测血液中 EC、KP、SA 和 MRSA 的多重 PCR 方法[J].国际检验医学杂志,2019,40(1):19-24.

53.18%。

致病菌在血液循环内会产生各类毒素,引起寒战、发热、休克,甚至死亡。为防止更严重的后果,及时、准确地诊断败血症至关重要。目前,血液细菌培养是诊断败血症的主要方法,但培养和鉴定需 5~7 d 才能得到结果,耗时过长影响了其应用价值,未能达到快速、有效治疗的目的。聚合酶链反应(PCR)技术是一种简单、快速、经济的分子诊断方法^[7]。通过核酸提取、PCR 扩增和分析,一般可在数小时内得到结果,具有很大的潜在应用前景。本研究希望通过建立多重 PCR 方法,对 EC、KP、SA 和 MRSA 同时进行检测,并将 16S rDNA 作为阳性感染对照组,从而提高准确性、降低成本和缩短时间,达到一次性检出血液中的主要致病菌的目的。

1 材料及方法

1.1 菌株来源 本研究所采用菌株包括 EC、KP、SA、MRSA、表皮葡萄球菌(SE)、路邓葡萄球菌(SL)、鲍曼不动杆菌(AB)、铜绿假单胞菌(PA)、普通变形杆

菌(PV)、粪肠球菌(EF)、无乳链球菌(SAg)、创伤弧菌(VV)、停乳链球菌(SDy)、缓症链球菌(SMi)和头状葡萄球菌(SC)均为澳门镜湖医院临床分离菌株。购自美国菌种保藏中心(ATCC)的其他菌株包括 EC(ATCC 25922)、KP(ATCC 700603)、SA(ATCC 29213)、MRSA(ATCC 33591)和 SE(ATCC 12228)。

1.2 培养基与试剂 Mueller-Hinton(M-H)平板、血平板均购自法国生物梅里埃公司,肉汤 LB 培养基为自配,BACTEC™ 培养瓶购自美国 BD 公司。2 × Multiplex PCR Kit 购自 QIAGEN 公司,DL2000 DNA 标志物、Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR Kit 均购自 TaKaRa 公司,DuRed 核酸染料购自泛博生化公司。其他化学试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 参照文献[8-9]设计引物,包括细菌 16S rDNA 基因、EC *phoA* 基因、KP *mdh* 基因、SA *femA* 基因和 MRSA *mecA* 基因。引物由深圳华大基因有限公司合成。引物序列和产物大小见表 1。

表 1 引物序列和产物大小

细菌	目的基因	引物	序列(5'→3')	产物大小(bp)
原核生物	16S rDNA	16S-F	5'-AGAGTTTGATCTCTGGCTGAG-3'	1 500
		16S-R	5'-GGTTACCTTGTTAGGACTT-3'	
EC	<i>phoA</i>	PhoA-F	5'-GTGACAAAAGCCCGACACCATAAATGCCT-3'	903
		PhoA-R	5'-TACACTGTCATTACGTTGCGGATTTGGCGT-3'	
KP	<i>Mdh</i>	Mdh-F	5'-GCGTGGCGGTAGATCTAAGTCATA-3'	364
		Mdh-R	5'-TTCAGCTCCGCCACAAAGGTA-3'	
SA	<i>femA</i>	FemA-F	5'-AAAAAAGCACATAACAAGCG-3'	132
		FemA-R	5'-GATAAAGAAGAAACCAGCAG-3'	
MRSA	<i>mecA</i>	MecA-F	5'-GTAGAAATGACTGAACGTCGATAA-3'	310
		MecA-R	5'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA-3'	

1.3.2 细菌培养及基因组 DNA 提取 将分纯的标准菌株分别接种于 LB 肉汤,37 °C 培养过夜,取 100 μL 菌液 13 000 × g 离心 1 min,弃上清液后加入 50 μL Takara Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR Kit,并按说明书操作提取 DNA,直接用于 PCR 反应。而血流感染的标本可置于血培养瓶 37 °C 培养 4 h 进行预增菌,然后取 500 μL 于离心管 13 000 × g 离心 1 min,弃上清液后加入 50 μL Takara Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR Kit,并按说明书操作提取 DNA,直接用于 PCR 反应。

1.3.3 单一基因 PCR 扩增 根据所设计的引物,在相同条件下以标准菌 EC ATCC 25922、KP ATCC 700603、SA ATCC 29213 和 MRSA ATCC 33591 的 DNA 为模板,分别对其进行 16S rDNA、EC *phoA*、KP *mdh*、SA *femA* 和 MRSA *mecA* 单一基因 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL):2 × QIAGEN Multiplex

PCR Master Mix 12.5 μL、0.1 μmol/L 引物、模板(Template)1 μL、双蒸馏水(ddH₂O)至 25 μL。经预试验获得的 PCR 反应程序为 95 °C 预变性 15 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 90 s,72 °C 延伸 90 s,进行 35 个循环,72 °C 延伸 10 min,PCR 产物于 4 °C 保存,1.5%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.3.4 多重 PCR 条件优化 为建立快速同时检测多个目标病原体的多重 PCR 方法,将所有引物加到同一个反应里面,PCR 反应体系仍为 25 μL,对 EC ATCC25922、KP ATCC700603、SA ATCC29213 和 MRSA ATCC33591 的 DNA 模板进行多重 PCR 扩增。优化反应条件及体系并进行正交试验,包括调整引物为 0.01~0.20 μmol/L,以 0.02 μmol/L 递增;根据设计的引物退火温度,以 56 °C 为基础,以 2 °C 递加,直至 62 °C,时间 90 s,进行 35 个循环,72 °C 延伸 10 min,PCR 产物于 4 °C 保存,1.5%琼脂糖凝胶电泳

观察结果。

1.3.5 多重 PCR 方法的特异性 采用 Takara Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR Kit 提取试验菌株基因组 DNA, 利用所建立的多重 PCR 方法进行扩增, 验证本方法的特异性。

1.3.6 多重 PCR 方法的灵敏度 测定 EC ATCC 25922、KP ATCC 700603、SA ATCC 29213 和 MRSA ATCC 33591 的菌液浓度并进行 10 倍梯度稀释, 依次 2.75×10^6 至 2.75 CFU/mL 、 2.43×10^6 至 2.43 CFU/mL 、 3.13×10^6 至 $3.13 \times \text{CFU/mL}$ 和 3.03×10^7 至 24.3 CFU/mL , 各稀释度经裂解后取 $1 \mu\text{L}$ 基因组 DNA, 分别进行多重 PCR 扩增, 以确定其检测限。

1.3.7 验证试验 将建立的多重 PCR 方法与传统血培养方法对 300 个血培养样本进行比较, 验证本方法的可靠性。血培养方法为采集血液标本于 BACTEC™ 全自动血培养系统配套培养瓶, 放于 BACTEC9240 血培养仪 37°C 培养直至仪器提示阳性后转种血平板过夜, 后挑取单菌落到 Vitek-2 Compact 微生物鉴定分析仪进行药敏和鉴定试验, 如仪器培养 5 d 无提示阳性则视为阴性。

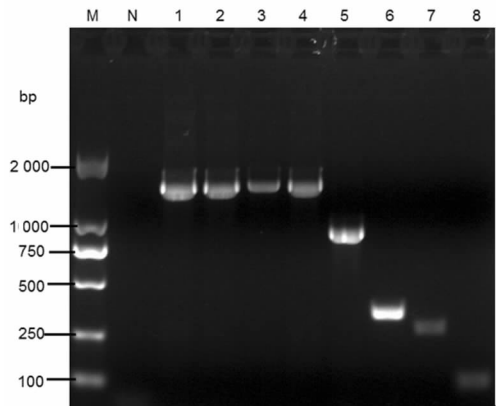
1.3.8 预增菌试验 使用标准菌 EC ATCC25922 配制为 1 个单位菌液^[5] 置于 BACTEC™ 培养瓶, 37°C 培养 1、2、3、4 h 进行预增菌, 并按 Takara Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR Kit 说明书操作提取 DNA, 直接用于 PCR 反应。

2 结 果

2.1 单一基因 PCR 检测结果 以 EC ATCC25922、KP ATCC700603、SA ATCC29213 和 MRSA ATCC33591 为模板, 使用 16S-F/16S-R 引物经扩增后 PCR 产物在 1 500 bp 有 16S rDNA 条带; 使用 PhoA-F/PhoA-R 引物扩增 EC ATCC25922 后 PCR 产物为 903 bp; 使用 Mdh-F/Mdh-R 引物扩增 KP ATCC700603310 后 PCR 产物为 364 bp; 使用 MecA-F/MecA-R 引物扩增 MRSA ATCC33591 后 PCR 产物为 310 bp; 使用 FemA-F/FemA-R 引物扩增 SA ATCC29213 后 PCR 产物为 132 bp, 所有目的扩增条带均清晰。在该反应体系下的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 1。单一基因片段大小与预期结果相符。

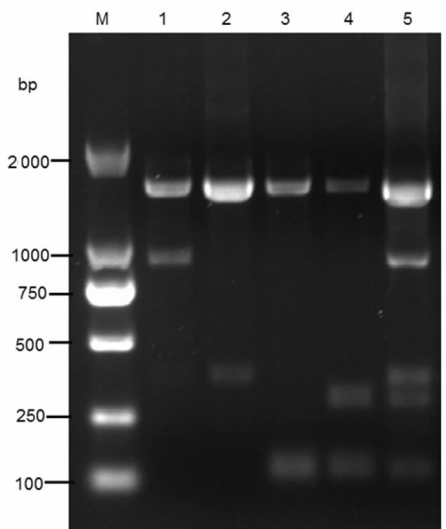
2.2 多重 PCR 条件优化 在单一 PCR 反应体系扩增的基础上优化了多重 PCR 反应体系及条件, 最佳反应体系 ($25 \mu\text{L}$) 为 $2 \times \text{QIAGEN Multiplex PCR Master Mix } 12.5 \mu\text{L}$, 引物终浓度: 16S-F/16S-R 为 $0.06 \mu\text{mol/L}$ ($0.15 \mu\text{L}$)、PhoA-F/PhoA-R 为 $0.01 \mu\text{mol/L}$ ($0.25 \mu\text{L}$)、Mdh-F/Mdh-R 为 $0.02 \mu\text{mol/L}$ ($0.5 \mu\text{L}$)、MecA-F/MecA-R 为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ ($0.25 \mu\text{L}$) 和 FemA-F/FemA-R 为 $0.12 \mu\text{mol/L}$ ($0.3 \mu\text{L}$)、Template $1 \mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O } 7.5 \mu\text{L}$ 。而在 $56 \sim 62^\circ\text{C}$ 的退

火温度实验试验中, 60°C 扩增效果较好, 确定其为最终退火温度。反应条件为 95°C 预变性 15 min 后, 按 $94^\circ\text{C } 30 \text{ s}$ 、 $60^\circ\text{C } 1.5 \text{ min}$ 、 $72^\circ\text{C } 1.5 \text{ min}$ 进行 35 个循环, 然后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。EC ATCC 25922 的 PCR 产物于 1 500、903 bp 有条带, KP ATCC 700603 的 PCR 产物于 1 500、364 bp 有条带, SA ATCC 29213 的 PCR 产物于 1 500、132 bp 有条带, MRSA ATCC 33591 的 PCR 产物于 1 500、310、132 bp 有条带。其多重 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。



注: M 表示 DNA Marker DL2000; N 表示阴性对照; 1 为 EC ATCC25922; 2 为 KP ATCC700603; 3 为 MRSA ATCC33591; 4 为 SA ATCC29213; 5 为 EC ATCC25922; 6 为 KP ATCC700603; 7 为 MRSA ATCC33591; 8 为 SA ATCC29213

图 1 EC、KP、MRSA、SA 单一基因 PCR 电泳结果



注: M 表示 DNA Marker DL2000; 1 为 EC ATCC 25922; 2 为 KP ATCC 700603; 3 为 SA ATCC 29213; 4 为 MRSA ATCC 33591; 5 为 EC ATCC 25922、KP ATCC 700603、SA ATCC 29213 和 MRSA ATCC 33591

图 2 EC、KP、SA、MRSA 多重 PCR 电泳结果

2.3 多重 PCR 的特异性 EC 在 16S rDNA 和 phoA 位置有阳性条带, KP 在 16S rDNA 和 mdh 位置有阳性条带, SA 在 16S rDNA 和 femA 位置有阳性条带, MRSA 在 16S rDNA、mecA 和 femA 位置有阳性条带。其他菌株只有在 16S rDNA 位置出现阳性

条带。表明本研究所建立的多重 PCR 方法具有高度特异性,没有发现假阳性和假阴性结果,特异度为 100%。见表 2。

表 2 多重 PCR 的特异性

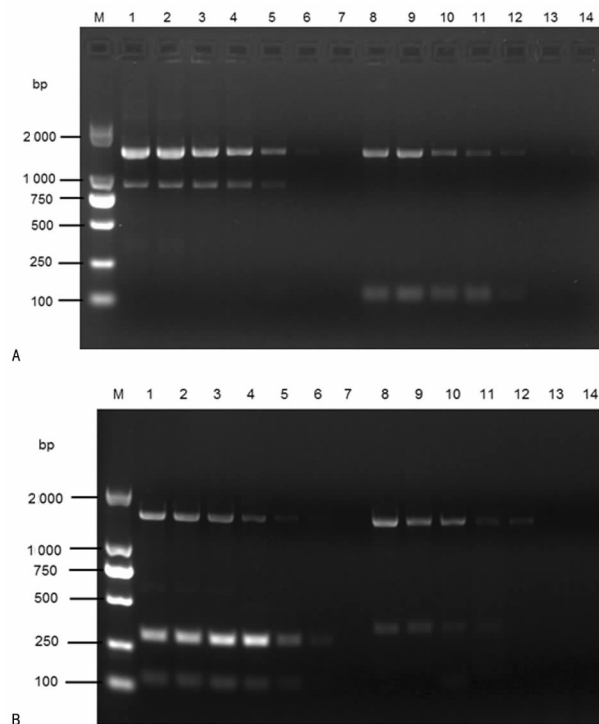
菌株名称	目的基因				
	16S rDNA	PhoA	Mdh	FemA	MecA
EC ATCC 25922	+	+	-	-	-
EC1	+	+	-	-	-
KP ATCC 700603	+	-	+	-	-
KP1	+	-	+	-	-
SA ATCC 29213	+	-	-	+	-
SA1	+	-	-	+	-
MRSA ATCC 33591	+	-	-	+	+
MRSA R1	+	-	-	+	+
SE ATCC 12228	+	-	-	-	-
SE SE1	+	-	-	-	-
SL SL1	+	-	-	-	-
SC1	+	-	-	-	-
AB1	+	-	-	-	-
EF1	+	-	-	-	-
PA1	+	-	-	-	-
PV1	+	-	-	-	-
SAg1	+	-	-	-	-
SDy1	+	-	-	-	-
SMi1	+	-	-	-	-
VV1	+	-	-	-	-

注: +表示阳性; -表示阴性

2.4 多重 PCR 的灵敏度 EC ATCC 25922 的 phoA 基因检测限为 2.75×10^2 CFU/mL, KP ATCC 700603 的 mdh 基因检测限为 2.43×10^3 CFU/mL, SA ATCC 29213 的 femA 基因检测限为 3.13×10^2 CFU/mL, MRSA ATCC 33591 的 mecA 基因检测限为 3.03×10^2 CFU/mL。而 16S rDNA 的检测限 EC ATCC 25922 为 27.5 CFU/mL、KP ATCC 700603 为 2.43×10^2 CFU/mL、SA ATCC 29213 为 3.13×10^2 CFU/mL 和 MRSA ATCC 33591 为 3.03×10^3 CFU/mL。见图 3。

2.5 验证试验 300 份血标本中传统血培养方法测

定阳性标本 187 份,其中 EC 为 116 份, KP 为 24 份, SA(不包括 MRSA)为 4 份, MRSA 为 6 份,其他血液致病菌感染为 37 份。采用多重 PCR 方法检出 16S rDNA 阳性标本 183 份,在 16S rDNA 阳性标本中 phoA 阳性 114 份, mdh 阳性 22 份, femA 阳性 10 份, mecA 阳性 6 份,与传统血培养方法检测败血症感染比较,其准确率为 97.9%(183/187),虽然多重 PCR 方法出现部分假阴性,但超过 95% 血流感染可在约 8 h 检测到,是一种快速检测败血症的方法。见表 3。



注:A 表示多重 PCR 对 EC 和 SA 的灵敏度。M 为 DNA Marker DL2000; 1~7 为 EC ATCC25922,浓度依次为 2.75×10^6 、 2.75×10^5 、 2.75×10^4 、 2.75×10^3 、 2.75×10^2 、27.5、2.75 CFU/mL; 8~14 为 SA ATCC29213,浓度依次为 3.13×10^6 、 3.13×10^5 、 3.13×10^4 、 3.13×10^3 、 3.13×10^2 、31.3、3.13 CFU/mL。B 表示多重 PCR 对 MRSA 和 KP 的灵敏度。M 为 DNA Marker DL2000; 1~7 为 MRSA ATCC33591,浓度依次为 3.03×10^7 、 3.03×10^6 、 3.03×10^5 、 3.03×10^4 、 3.03×10^3 、30.3 CFU/mL; 8~14 为 KP ATCC700603,浓度依次为 2.43×10^6 、 2.43×10^5 、 2.43×10^4 、 2.43×10^3 、 2.43×10^2 、24.3、2.43 CFU/mL

图 3 多重 PCR 的灵敏度

表 3 多重 PCR 方法与血培养方法检测结果比较 (n)

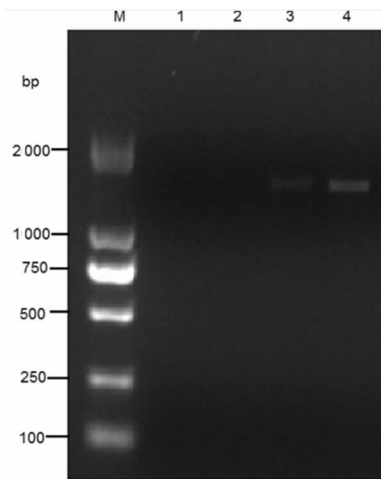
菌株名称	血培养阳性	多重 PCR 阳性					两种方法阳性
		16S rDNA	phoA	mdh	femA	mecA	
EC	116	114	114	-	-	-	114
KP	24	22	-	22	-	-	22
SA(不包括 MRSA)	4	4	-	-	4	-	4
MRSA	6	6	-	-	6	6	6
SE	7	7	-	-	-	-	7

续表 3 多重 PCR 方法与血培养方法检测结果比较 (n)

菌株名称	血培养阳性	多重 PCR 阳性					两种方法阳性
		16S rDNA	phoA	mdh	femA	mecA	
SL	2	2	—	—	—	—	2
AB	6	6	—	—	—	—	6
EF	3	3	—	—	—	—	3
PV	6	6	—	—	—	—	6
PA	4	4	—	—	—	—	4
SAg	4	4	—	—	—	—	4
VV	5	5	—	—	—	—	5
合共	187	183	114	22	10	6	183

注：—表示阴性

2.6 预增菌试验 16S-F/16S-R 引物扩增 4 h 的 PCR 产物在 1 500 bp 有 16S rDNA 清晰条带。见图 4。



注：M 表示 DNA Marker DL2000；1 为 1 h；2 为 2 h；3 为 3 h；4 为 4 h

图 4 预增菌试验

2.7 多重 PCR 方法和传统血培养方法检测时间比较 多重 PCR 方法 8.3 h 可得到结果，而传统血培养方法则需等待血培养仪器提示阳性后再进行转种培养和生化鉴定等过程，总时间 60 h 可得到阳性鉴定结果，培养阴性结果则需要 5 d 才可确定为阴性。见表 4。

表 4 多重 PCR 方法和传统血培养方法检测时间比较

检测步骤	多重 PCR 方法	传统血培养方法	
		阳性	阴性
预培养	4 h	12 h	5 d
培养及生化鉴定	—	48 h	—
核酸提取	0.5 h	—	—
扩增及电泳	3.8 h	—	—
总时间	8.3 h	60 h	5 d

注：—表示不需要该步骤

3 讨论

PCR 是简单、实用的分子生物学技术^[7]，通过将

核酸变性、退火和扩增 3 个步骤对 DNA 模板进行复制。该检测技术与常规培养分离细菌的方法比较，具有快速、经济等优点，在临床检验方面具有良好的应用前景，市场上已研发出许多用于检验临床致病菌的 PCR 商品化试剂盒^[12-13]，如德国 Roche 公司的 Light-Cycler SeptiFast MGRADE-test、韩国 SeeGene 公司的 Magicplex Sepsis Real-time PCR 等，均可检测败血症患者血液中的 EC^[2,11]、KP^[12]、SA^[1,8]、沙门菌和志贺菌等多种微生物，但其仪器、设备要求高，试剂成本昂贵。因此，希望透过建立一个可同时检测 EC、KP、SA 和 MRSA 的多重 PCR 方法，缩短血流感染所需的检测时间，以达到尽快查找病因和诊治的目的，同时，通过自行研发以降低检测成本，减轻患者的医疗负担。

引物是影响 PCR 扩增成功的重要一环，因此，选取合适的基因或序列作为目的基因设计引物很重要，从相关文献可知，EC 的检测常会使用到 bfp、eae、stx、AggR、Elt、Est 和 inv 目的基因来分类不同的 EC 菌群^[2,11,16]，亦有研究表明，phoA 基因可作为 EC 通用的分子标记^[8,17]。

HAEGGMAN 等^[18]报道了 KP 管家基因 mdh 编码苹果酸脱氢酶和 gyrA 基因编码旋转酶亚单位 A 用于评价该菌的遗传多样性，其后有学者使用 mdh 作为目的基因对 KP 进行了 PCR 检测^[8,15]。而对 SA 的检测，常用 nuc、sodA 和 femA 作为种特异性目的基因设计引物^[1,14]。随着临床抗菌药物的普及使用和滥用，SA 产生抗药性菌株渐多，其中产生的 MRSA 除对甲氧西林耐药外，对氨基糖苷类、大环内酯类等常用抗生素均具有多重耐药性，可用 PCR 方法检测 SA 的甲氧西林抗性 mecA 基因，以确定该 SA 是否为 MRSA^[10,14]。

本研究选取了 THONG 等^[8]报道的 phoA、mdh、femA 和 mecA 为目的基因，建立了可同时检测血流感染中几种常见致病菌，包括 EC、KP、SA 和 MRSA 的多重 PCR 方法。另外，除上述目标菌外，在多重

PCR 体系中同时加入了针对原核生物保守区 16S rDNA 序列的引物 8F/1492R^[9], 检测其他细菌引起的败血症, 对 EC、KP、SA 和 MRSA 以外的细菌感染作出阳性提示, 以避免漏检。

血液具有各种复杂的成分, 选取合适的 DNA 提取方法对血流感染标本进行 DNA 提取是 PCR 检测成功与否的另一影响因素。

BANADA 等^[1]用白细胞、血浆和全血标本检测 SA 引起的败血症, 结果发现, 对不同组分的血液标本中细菌 DNA 提取的结果具有差异, 其中全血标本检测阳性率最高。因此, 本研究亦选择了用全血标本对血流感染中的细菌 DNA 进行收集提取; 另外, 细菌因其种类不同, 提取方法的差异也会影响获得细菌 DNA 的量, 本研究选取日本 Takara 公司的 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR Kit 对血中各类细菌进行 DNA 提取, 获得了足够 PCR 试验的 DNA 量。

而根据不同程度的血流感染, 其体内的细菌数量会有差异, 低程度的感染其血液中的细菌浓度较低而未能被提取足够的 DNA 量, 从而影响 PCR 的检测结果显示为假阴性。在验证实验方面, 沈恺妮等^[19]建议, 根据一系列临床及血液学指标变化以提高血培养阳性率。本研究选取了符合的血流感染样本进行试验, 包括发热、心率加快、呼吸急促、白细胞升高、炎症指标上升等, 以便两种方法的比较。

EC 在 116 份血流感染标本中有 2 份、KP 在 24 份血流感染标本中有 2 份未能被 PCR 方法检出, 显示为假阴性结果, 据文献报道, 一般血流感染的成年人血液中的细菌 $<1 \sim 10$ CFU/mL^[5], 所以, 笔者认为, 假阴性结果与标本中细菌浓度较低有关, 在采集患者标本后先进行预培养以提高细菌浓度, 再进行 PCR 检测有利于降低假阴性发生率。本研究结果显示, 95% 以上传统血培养方法阳性的标本与建立的多重 PCR 方法比较, 可获得一致的结果, 对血标本先进行 4 h 的预培养可获得 PCR 方法需要的检测量, 而延长预培养时间亦有利于提高准确率。

4 结 论

本研究研发了一种可诊断败血症的多重 PCR 方法, 可同时对 EC、KP、SA 和 MRSA 4 种目标致病菌进行检测。与传统血培养方法比较, 多重 PCR 方法的特异性为 100%, 准确率为 97.9% (183/187), 而检测所需时间, 多重 PCR 方法为 8.3 h, 传统血培养方法阳性为 60 h, 阴性为 5 d。与传统培养方法比较, 本研究提供了一种高准确率、快速、简单的败血症检验方法。

参考文献

[1] BANADA P P, CHAKRAVORTY S, SHAH D, et al. Highly sensitive detection of *Staphylococcus aureus* di-

rectly from patient blood[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e31126.

- [2] TOBIAS J, VUTUKURU S R. Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*[J]. Microbiol Res, 2012, 167(9): 564-570.
- [3] OSAILI T M, AL-NABULSI A A, OLAIMAT A N, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture and storage of white brined cheese[J]. J Food Sci, 2014, 79(9): 1750-1755.
- [4] MARTIN N G, SADARANGANI M, POLLARD A J, et al. Hospital admission rates for meningitis and septicaemia caused by *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae* in children in England over five decades: a population-based observational study[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(5): 397-405.
- [5] MOHR A, POLZ J, MARTIN E M, et al. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(2): 341-352.
- [6] ZRIOUIL S B, BEKKALI M, ZEROUALI K. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage at the Ibn Rochd University Hospital Center, Casablanca, Morocco[J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(3): 279-283.
- [7] KRISHNA N K, CUNNION K M. Role of molecular diagnostics in the management of infectious disease emergencies[J]. Med Clin North Am, 2012, 96(6): 1067-1078.
- [8] THONG K L, LAI M Y, TEH C S J, et al. Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR[J]. Trop Biomed, 2011, 28(1): 21-31.
- [9] GALKIEWICZ J P, KELLOGG C A. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7828-7831.
- [10] LIU Y, ZHANG J, JI Y. PCR-based approaches for the detection of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Open Microbiol J, 2016, 10(1): 45-56.
- [11] KAMBIRE O, ADINGRA A A, YAO K M, et al. Prevalence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli* isolates from water, sediment, fish, and crab in Aby Lagoon, Côte d'Ivoire[J]. Int J Microbiol, 2017, 2017: 9532170.
- [12] ZIEGLER I, FAGERSTRÖM A, STRÅLIN K, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR assay for detection of pathogen DNA in blood from patients with suspected sepsis[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167883.
- [13] TRÖGER B, HÄRTEL C, BUER J, et al. Clinical relevance of pathogens detected by multiplex PCR in blood of very-low-birth weight infants with suspected sepsis-multiplex study of the German neonatal network[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159821.
- [14] STÖRENBURG E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from(下转第 28 页)

- tang induces apoptosis and inhibits migration of ectopic endometriotic stromal cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194(3):386-394.
- [4] 李书艳,冯卫群. Survivin、PCNA 在子宫内膜异位症组织中的表达及其意义[J]. *河北医科大学学报*, 2013, 34(1): 18-20.
- [5] WANG Y,JIANG L L,WU J F,et al. Protective effect of honokiol against endometriosis in rats via attenuating Survivin and Bcl-2: a mechanistic study [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2016, 62(1):1-5.
- [6] ACIMOVIC M,VIDAKOVIC S,MILIC N,et al. Survivin and VEGF as novel biomarkers in diagnosis of endometriosis[J]. *J Med Biochem*, 2016, 35(1):63-68.
- [7] 张晓玲,邱琳,于晓红,等. 卵巢子宫内膜异位症患者异位和在位内膜中 Survivin 的表达及意义[J]. *中国生育健康杂志*, 2012, 23(1):24-27.
- [8] TAGUCHI A,KOGA K,KAWANA K,et al. Resveratrol enhances apoptosis in endometriotic stromal cells[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 75(4):486-492.
- [9] UEGAKI T,TANIGUCHI F,NAKAMURA K,et al. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) may be effective therapeutic targets for treating endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2015, 30(1):149-158.
- [10] 肖雪莲,韦枝红. 子宫内膜异位症相关性卵巢癌组织中 P53 和 survivin 蛋白表达水平分析[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2016, 30(3):268-269.
- [11] HU C,WANG Z,PANG Z,et al. Guizhi fuling capsule, an ancient Chinese formula, attenuates endometriosis in rats via induction of apoptosis [J]. *Climacteric*, 2014, 17(4): 410-416.
- [12] 彭冬先,何援利,丘立文. 靶向 shRNA 抑制 survivin 基因对子宫内膜异位症裸鼠模型异位内膜 caspase-3 表达的影响[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(2):210-212.
- [13] WANG Y,CHEN H,FU Y,et al. MiR-195 inhibits proliferation and growth and induces apoptosis of endometrial stromal cells by targeting FKN [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(12):2824-2834.
- [14] LI M Q,SHAO J,MENG Y H,et al. NME1 suppression promotes growth, adhesion and implantation of endometrial stromal cells via Akt and MAPK/Erk1/2 signal pathways in the endometriotic milieu [J]. *Hum Reprod*, 2013, 28(10):2822-2831.
- [15] 林善群,高淑平,卢运萍,等. p53 和 survivin 蛋白水平在子宫内膜异位症相关性卵巢癌组织中的表达意义研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(14):1373-1376.
- [16] MEI J,LI M Q,DING D,et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) enhances survival and invasiveness of endometrial stromal cells via the activation of JNK signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(3):431-444.
- [17] SU Y,JIANG Y,SUN S,et al. Effects of HER2 genetic polymorphisms on its protein expression in breast cancer [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39(6):1123-1127.
- [18] CUI Y,NIU M,ZHANG X,et al. High expression of valosin-containing protein predicts poor prognosis in patients with breast carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9919-9927.
- [19] 彭冬先,何援利. 慢病毒介导靶向 survivin 基因的 shRNA 抑制子宫内膜在裸鼠腹腔种植生长[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(2):281-283.
- [20] 蒋萃,许红,王中弥,等. PTEN、Survivin 蛋白在子宫内膜异位症相关的卵巢癌组织中表达的相关性及临床意义 [J]. *中国实用医药*, 2014, 9(15):3-6.
- [21] LIU H Z,HAN X X,LIU J,et al. Effect of taoren Quyu decoction on human endometrial cells and its anti-endometriosis activity in rats [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(7):696-700.
- [22] LU Z,WANG J,ZHENG T,et al. FTY720 inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma by inactivating STAT3 signaling [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(6):783.

(收稿日期:2018-07-30 修回日期:2018-10-06)

(上接第 24 页)

- clinical samples; methods, effectiveness and cost considerations [J]. *Ger Med Sci*, 2009, 7:Doc06.
- [15] SUN Z,CHEN Z,HOU X,et al. Locked nucleic acid pentamers as universal PCR primers for genomic DNA amplification [J]. *PLoS One*, 2008, 3(11):e3701.
- [16] BOTKIN D J,GALLI L,SANKARAPANI V,et al. Development of a multiplex PCR assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *E. coli*, and enteropathogenic *E. coli* strains [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2(1):8.
- [17] DUTTA S,GUIN S,GHOSH S,et al. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56068.
- [18] HAEGGMAN S,LÖFDAHL S,PAAUW A,et al. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Anti Agent Chem*, 2004, 48(7):2400-2408.
- [19] 沈恺妮,蔡倩倩,焦洋,等. 抽取血培养的最佳时机 [J]. *协和医学杂志*, 2015, 6(1):61-65.

(收稿日期:2018-07-28 修回日期:2018-10-04)