

• 论 著 •

多重荧光定量 PCR 法快速鉴定 MRSA 的临床研究*

赵峻英, 席家庄, 谢妮奇, 潘莉娟, 王 杉, 董 剑[△]

重庆市大足区人民医院检验科, 重庆 402360

摘 要:目的 构建 *mecA*、*nuc*、内标基因 3 种基因联合检测的单管多通道 Taqman 探针荧光定量 PCR 法, 用于鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA), 并与传统细菌培养和鉴定方法进行比较, 评估其临床应用价值。**方法** 以 169 例临床标本和经常规细菌培养和 VITEK2 Compact 全自动微生物分析仪鉴定的金黄色葡萄球菌(SA)156 株[其中 MRSA 106 株、甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)50 株]作为研究对象; 用 Primer premier 5.0 和 Beacon Designer 7.0 软件进行 PCR 引物和 Taqman 探针设计, 探针 5' 端分别标记 FAM、Cy5 和 VIC, 3' 端标记 MGB, 用荧光定量 PCR 仪进行检测。169 例临床标本同时也做了常规细菌培养和鉴定。**结果** 169 例临床标本中, 常规方法鉴定出 MRSA 48 例, 检出率为 28.40%; 多重荧光定量 PCR 检测鉴定出 MRSA 53 例, 检出率 31.36%。2 种方法比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。156 例 SA 的检测中, 使用常规方法鉴定出 MRSA 106 例、MSSA 50 例, MRSA 检出率为 67.95%; 多重荧光定量 PCR 检测法鉴定出 MRSA 108 例、MSSA 48 例, MRSA 检出率为 69.23%; 两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 多重荧光定量 PCR 检测法提高了 MRSA 的检出率, 减少了漏检风险, 检测时间较常规方法明显缩短, 可用于临床 MRSA 的快速鉴定。

关键词: 多重荧光定量 PCR; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; Taqman 探针

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.04.004 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2021)04-0402-04 **文献标志码:**A

Clinical study on multiple fluorescence quantitative PCR for the rapid detection of MRSA*

ZHAO Junying, XI Jiazhuang, XIE Niqi, PAN Lijuan, WANG Shan, DONG Jian[△]

Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Dazu District, Chongqing 402360, China

Abstract: **Objective** To establish the method of identifying MRSA with Taqman-fluorescence quantitative PCR based on the detection for *mecA*, *nuc*, endogenous reference gene, which is a three-gene combined detection in a single tube multiple channel, and compare with the traditional bacterial culture and identification method to evaluate its clinical application value for the rapid detection of MRSA. **Methods** A total of 169 clinical samples and 156 SA strains were collected in the study. The SA strains were isolated from clinical samples and confirmed by VITEK2 Compact microbial analyzer. *MecA*, *nuc*, endogenous reference gene PCR primers and Taqman fluorescent probes were designed by using Primer premier 5.0 and Beacon Designer 7.0. FAM, Cy5 and VIC markers were used to label the fluorescent probe at 5' end, and 3' end was labeled with MGB, and the detection was carried out in the fluorescent quantitative PCR instrument, while the 169 cases of clinical samples were also cultured and tested by the traditional method. **Results** The traditional method confirmed 48 cases of MRSA, and the detection rate was 28.40%, while the multiple fluorescent quantitative PCR detected 53 cases of MRSA, and the detection rate was 31.36%. There was no significant difference between traditional method and Taqman-fluorescence quantitative PCR ($P>0.05$). In 156 SA strains, the traditional method confirmed 106 strains of MRSA, and the detection rate was 67.95%, while the multiple fluorescence quantitative PCR detected 108 strains of MRSA, and the detection rate was 69.23%. There is also no significant difference between traditional method and Taqman-fluorescence quantitative PCR ($P>0.05$). **Conclusion** Taqman-fluorescence quantitative PCR improved positive detection rate and reduced the risk of missing detection of MRSA, it is much more time-saving than tradition method, which can be used in rapid clinical identification of MRSA.

* 基金项目: 重庆市科卫联合基金项目(2018MSXM059)。

作者简介: 赵峻英, 女, 主管技师, 主要从事临床微生物检验的相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: dongjian163.com。

本文引用格式: 赵峻英, 席家庄, 谢妮奇, 等. 多重荧光定量 PCR 法快速鉴定 MRSA 的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(4): 402-

Key words: multiple fluorescence quantitative PCR; multiple-resistant *Staphylococcus aureus*; Taqman fluorescence probe

金黄色葡萄球菌(SA)广泛存在于自然界中,是革兰阳性菌的代表,也是人类的一种重要病原菌,可引起严重的感染性疾病。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是 SA 中的独特菌株,对所有青霉素和几乎所有 β -内酰胺类抗菌药物耐药,甚至可能对四环素类、氨基糖苷类、大环内酯类等抗菌药物多重耐药,是引起院内和社区感染的重要病原菌之一,严重威胁人类的健康,成为当今感染医学中的一个难题^[1]。因此,高效、灵敏、准确的 MRSA 检测手段,对于 MRSA 的早期诊断和精准治疗,以及有效预防和控制 MRSA 传播至关重要。本研究拟建立单管多通道的 Taqman 探针荧光定量 PCR 检测法,直接检测患者标本或临床培养的菌株中的 *nuc* 基因及 *mecA* 基因,并传统细菌培养和鉴定方法进行比较,以评估多重荧光定量 PCR 检测法在快速鉴定 MRSA 中的应用价值,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本及菌株来源 收集 2019 年 1—12 月于本院就诊的疑似 MRSA 感染的患者送检标本共 169 例,其中痰液 55 例(32.54%)、尿液 10 例(5.92%)、脓液 43 例(25.44%)、分泌物 46 例(27.22%)、血液 5 例(2.96%)、灌洗液 4 例(2.37%)、棉拭子 6 例(3.55%)。菌株为随机抽取的本院 2014 年 10 月至 2019 年 10 月保存的 SA 共 156 株,均经全自动细菌鉴定仪鉴定,其中 MRSA 106 株(67.95%),甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)50 株(32.05%)。

1.2 仪器与试剂 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定分析系统及配套细菌鉴定卡、5%CO₂ 恒温培养箱,郑州安图生物工程股份有限公司的哥伦比亚血平板、麦康凯、巧克力及其他平板,英国 Oxoid 公司的 K-B 法药敏纸片,SA 质控标准菌株(ATCC25923、ATCC29213)购自重庆市临床检验中心。SLAN-96P 型实时荧光定量 PCR 扩增仪购自上海宏石公司,细菌核酸提取试剂盒由重庆中元汇吉生物技术有限公司提供,三磷酸脱氧核苷酸(dNTPs)、Champagne Taq DNA 多聚酶由北京天根生物技术有限公司生产,PCR 引物及 Taqman 荧光探针由上海捷瑞生物公司合成。

1.3 方法

1.3.1 常规细菌鉴定及药敏试验 严格按照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》对临床送检的 169 例标本进行常规细菌培养、鉴定及药敏试验(以下简称为“常规方法”),采用 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定分析系统及配套细菌鉴定卡。

1.3.2 引物及 Taqman 探针的设计 从 NCBI 网站

获取基因序列,使用 Bioedit 软件进行序列比对,根据比对结果选择保守区域,使用 Primer premier 5.0 和 Beacon Designer 7.0 软件进行 PCR 引物和 Taqman 探针设计,探针 5'端分别标记 Cy5、FAM 和 VIC,3'端标记 MGB,见表 1。

表 1 多重荧光 PCR 引物及探针详情	
基因名称	序列(5'—3')
<i>nuc</i> 基因	上游引物:ATACACCTGAAACAAAGCATCTCTAAAA
	下游引物:ACCTTTGTCAAACCTCGACTTCAAT
	探针: Cy5-TCCTGAAGCAAGTGCATTACGAA-MGB
<i>mecA</i> 基因	上游引物:ACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCA
	下游引物:ATTATATCTCTCGTTACTCATGCCATACA
	探针: FAM-AGCACACCTTCATATGACGTCTATCCA-MGB
内标基因	上游引物:TAGTGATCGCAGTCAGCTGATT
	下游引物:GTAGTCGACATGCAGTTGGTTT
	探针: VIC-CAGGTGACGCGAAGCCAGTAGA-MGB

1.3.3 核酸的提取 (1)临床标本的处理。相对不浓稠的临床标本(尿液、灌洗液、血液、分泌物等),取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中;相对浓稠的标本(痰液、脓液等),先用等体积 4%NaOH 进行液化后取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中;棉拭子标本,加入 1 mL 生理盐水震荡 5 min 后将液体倒入对应的 1.5 mL 离心管中;以 3 000 r/min 离心 2 min 后,弃 900 μ L 上清液,加入 100 μ L 混匀后的前处理液,盖上离心管盖,涡旋振荡 10 s,瞬时离心;90 $^{\circ}$ C 恒温浴 5 min。(2)菌株标本的处理。挑取 2~3 个菌落或适量菌株标本置于 200 μ L 含细菌前处理液的离心管内;振荡混匀后置于 90 $^{\circ}$ C 恒温浴 5 min。进行核酸提取之前每管添加 2 μ L 内控质粒,按照细菌核酸提取试剂盒说明书使用半自动提取仪进行核酸的提取。提取过程设置未加入标本的阴性对照及加入阳性质粒的阳性对照。

1.3.4 PCR 反应体系及条件 取 24 μ L DNA 反应液、1 μ L 引物探针混合物于 1.5 mL 离心管中,震荡混匀后,加入 25 μ L 核酸提取物、阴性对照或阳性对照,总反应体系为 50 μ L。PCR 反应条件:50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,循环 45 次;收集并检测荧光。荧光通道检测选用 FAM、VIC 和 Cy5 通道。FAM 通道对应 *mecA* 基因,Cy5 通道对应 *nuc* 基因,VIC 通道对应内标基因。

1.3.5 结果判断 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定仪 GP 卡鉴定为 SA,若 AST-GP67 卡头孢西丁筛选试验也呈阳性,即判定为 MRSA。多重荧光定量 PCR 检测结果中,*nuc* 基因和 *mecA* 基因阳性则判定

为 MRSA, *nuc* 基因阳性而 *mecA* 基因阴性则判定为 MSSA, *nuc* 基因阴性则判定为非 SA。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析, 计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法对临床标本的检测结果比较 169 例临床标本中, 常规方法检出 MRSA 48 例, 检出率为 28.40% (48/169); 多重荧光定量 PCR 检出 MRSA 53 例, 检出率为 31.36% (53/169); 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两种方法检测结果一致的共 164 例, 其中 MSSA 64 例, MRSA 48 例, 非 SA 52 例; 两种方法检测结果不一致的为 5 例, 均为 PCR 基因检测为 MRSA, 而常规方法未鉴定出 MRSA。见表 2。

表 2 两种方法对 169 例临床标本的检测结果(<i>n</i>)							
标本类型	<i>n</i>	常规方法			PCR 基因检测		
		MRSA	MSSA	非 SA	MRSA	MSSA	非 SA
痰液	55	11	23	21	14	23	18
脓液	43	16	21	6	16	21	6
分泌物	46	19	18	9	19	18	9
尿液	10	0	0	10	0	0	10
血液	5	1	1	3	1	1	3
灌洗液	4	0	0	4	0	0	4
棉拭子	6	1	1	4	3	1	2
合计	169	48	64	57	53	64	52

2.2 两种方法对 SA 的检测结果比较 156 株 SA 中, 常规方法鉴定出 MRSA 106 株、MSSA 50 株, MRSA 检出率为 67.95% (106/156)。多重荧光定量 PCR 鉴定出 MRSA 108 株、MSSA 48 株, MRSA 检出率为 69.23% (108/156)。两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两种方法结果一致的有 154 例, 其中 MRSA 106 例、MSSA 48 例; 两种方法结果不一致的有 2 例, 均为多重荧光定量 PCR 检测为 MRSA 而常规方法检测为 MSSA。见表 3。

表 3 两种方法对 156 株 SA 的鉴定结果(<i>n</i>)				
PCR 基因检测	常规方法			合计
	MRSA	MSSA	非 SA	
MRSA	106	2	0	108
MSSA	0	48	0	48
非 SA	0	0	0	0
合计	106	50	0	156

3 讨 论

临床抗菌药物的不合理使用, 加速了 SA 向 MRSA 的转变。目前, MRSA 已经成为引起全球院内感

染的重要致病菌之一^[2]。因此, 研究针对 MRSA 快速且特异的检测方法势在必行。许多研究证明, MRSA 的耐药性主要由 *mecA* 基因介导^[3-4], 其转录产物青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)使菌株对 β -内酰胺酶的结合力明显降低, 导致其对 β -内酰胺类抗菌药物耐药, 故 SA 一旦获得 *mecA* 基因, 便可表现为高度和多重耐药, 美国临床实验室标准化委员会建议, 凡检出 *mecA* 基因的 SA 即可判定为 MRSA^[5]。*nuc* 基因编码 SA 的耐热核酸酶, 在不同菌株之间有着较高的保守性, 是 SA 的标志性基因。本研究针对 SA 的特异性基因 *nuc* 基因和 MRSA 的特异性基因 *mecA* 基因以及内标基因设计特异性引物和 Taqman 荧光探针, 通过体系优化使三基因能够同时在 1 个 PCR 管中进行扩增, 通过扩增曲线即可判读实验结果, 可同时快速鉴定 MRSA 或 MSSA。

对临床标本的检测中, 常规方法和多重荧光定量 PCR 对 MRSA 的检出率比较, 差异无统计学意义, 但仍有 5 例标本两种方法的检测结果不符合, 其中 3 例为痰液标本, 2 例为棉拭子标本。将接种这 5 例临床标本的平板取出仔细观察菌落的生长情况, 发现在此 3 例痰液标本的血平板 1 区有 1~3 个溶血菌落生长, 而平板的其他区域均为非溶血的其他优势菌落。2 例棉拭子标本均为鼻咽拭子, 在它们的血平板 1 区和 2 区虽有较多溶血菌落生长, 但整个平板更多的是其他非溶血菌落的生长。SA 是鼻咽部常见的定植菌, 临床治疗中更多地是希望从平板培养结果中获取其他致病菌的信息。对于 PCR 基因检测技术而言, 只要标本中存在微量的 *nuc* 和 *mecA* 基因即可检测出。

对 SA 的检测中, 对于常规方法鉴定出的 106 株 MRSA, 多重荧光定量 PCR 也均检测到 *nuc* 基因和 *mecA* 基因, 二者对 MRSA 检出率的差异无统计学意义。两种方法检测结果不一致的 2 株, 均为多重荧光定量 PCR 检测为 MRSA, 而常规方法鉴定为 MSSA。对此 2 株菌株重新转种培养后分别再次用上述两种方法进行鉴定, 结果和之前一样。这 2 株 SA 可能是含有 *mecA* 基因的隐匿型 MRSA 菌株, 如果以 PCR 技术作为 MRSA 鉴定的“金标准”, 常规方法 MRSA 鉴定的正确率为 98.15% (106/108)。

多重荧光定量 PCR 检测具有便捷、快速的优点, 不仅可以直接检测临床标本, 也可以检测临床分离的菌株, 整个过程仅需 1~2 h, 与常规方法相比时间大大缩短; *nuc* 基因、*mecA* 基因及内控基因 3 种基因能够同时在 1 个 PCR 管中进行扩增, 通过扩增曲线可判定 MRSA、MSSA 和非 SA; 本研究体系只能检测含 *mecA* 基因的 MRSA, 对与 MRSA 耐药机制有关的其他基因, 如 *mecC* 基因^[6], 无法检出; 能同时检测标本中微量的 *nuc* 和 *mecA* 基因, 可发现隐匿型菌株的存在, 减少漏检风险, 但无法区分 MRSA(下转第 411 页)

- cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1): 98-102.
- [12] GYORFFY B, SUROWIAK P, BUDCZIES J, et al. On-line survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e82241.
- [13] HUANG W Y, HSU S D, HUANG H Y, et al. MethHC: a database of DNA methylation and gene expression in human cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D856-D861.
- [14] KARIM M, RANA M S, FRANCOU A, et al. Identification of a Tbx1/Tbx2/Tbx3 genetic pathway governing pharyngeal and arterial Pole morphogenesis[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(6): 1217-1229.
- [15] WANG B, LINDLEY L E, FERNANDEZ-VEGA V, et al. The T box transcription factor TBX2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of normal and malignant breast epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41355.
- [16] BEUKERS W, RAJU K, MASIU S R G, et al. Stratification based on methylation of TBX2 and TBX3 into three molecular grades predicts progression in patients with pTa-bladder cancer[J]. *Mod Pathol*, 2015, 28(4): 515-522.
- [17] CRAWFORD N T, MCINTYRE A J, MCCORMICK A, et al. TBX2 interacts with heterochromatin protein 1 to recruit a novel repression complex to EGR1-targeted promoters to drive the proliferation of breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2019, 38(31): 5971-5986.
- [18] BOYD S C, MIJATOV B, PUPO G M, et al. Oncogenic B-RAF(V600E) signaling induces the T-Box3 transcriptional repressor to repress E-cadherin and enhance melanoma cell invasion[J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(5): 1269-1277.
- [19] ZONG M, MENG M, LI L. Low expression of TBX4 predicts poor prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(8): 4953-4963.
- [20] HORIE M, MIYASHITA N, MIKAMI Y, et al. TBX4 is involved in the super-enhancer-driven transcriptional programs underlying features specific to lung fibroblasts[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(1): L177-L191.
- [21] STEIMLE J D, MOSKOWITZ I P. TBX5: a key regulator of heart development[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 122: 195-221.
- [22] GHOSH T K, APARICIO-SANCHEZ J J, BUXTON S, et al. Acetylation of TBX5 by KAT2B and KAT2A regulates heart and limb development[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114: 185-198.
- [23] ROSENBLUH J, NIJHAWAN D, COX A G, et al. β -Catenin-Driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis[J]. *Cell*, 2012, 151(7): 1457-1473.
- [24] YAN Z, LI Y F, WEI W, et al. High expression level of T-box transcription factor 5 predicts unfavorable survival in stage I and II gastric adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2021-2026.

(收稿日期: 2020-03-23 修回日期: 2020-09-27)

(上接第 404 页)
或 MSSA 是感染还是定植菌。

虽然 MRSA 是感染菌还是定植菌需要通过常规细菌培养以及和临床医生沟通后才能判断, 对 *mecA* 基因以外的其他耐药基因的检测也需后续研究, 但本研究建立的多重荧光定量 PCR 检测法相对于常规方法能更简便、快速、高灵敏、高特异地鉴定临床标本和菌株中的 MRSA, 提高了 MRSA 的检出率, 减少了漏检风险, 对早期院内感染的防控和临床抗菌药物的合理使用具有重要价值。

参考文献

- [1] ROJO A, AGUINAGA A, MONECKE S, et al. *Staphylococcus aureus* genomic pattern and atopic dermatitis: may factors other than superantigens be involved [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2014, 33(4): 651-658.
- [2] DENG Y, LIU J, PETERS B M, et al. Antimicrobial re-

- sistance investigation on *Staphylococcus* strains in a local hospital in Guangzhou, China, 2001 — 2010 [J]. *Microb Drug Resist*, 2015, 21(1): 102-104.
- [3] 李秀, 张彦宏, 李杰, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药机制分析[J]. *山西医药杂志*, 2018, 47(11): 1334-1336.
- [4] BLAZQUEZ B, LLARRULL L I, LUQUE-ORTEGA J R, et al. Regulation of the expression of the β -lactam antibiotic-resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Biochemistry*, 2014, 53(10): 1548-1550.
- [5] 李耀华, 费春荣, 叶爱春. 实时荧光 PCR 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的临床评估[J]. *诊断学理论与实践*, 2011, 10(5): 449-453.
- [6] 李雪寒, 李一荣. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药机制及检测方法研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(5): 586-590.

(收稿日期: 2020-01-05 修回日期: 2020-08-07)