

## • 基础实验研究论著 •

## 多重实时荧光 PCR 检测甲氧西林耐药葡萄球菌的方法学研究

陈 军<sup>1</sup>, 张越文<sup>2</sup>, 倪斌君<sup>2</sup>, 钱子煜<sup>2</sup>, 赵雪涛<sup>2△</sup>

(1. 黄浦区疾病预防控制中心分子生物学实验室, 上海 200023;

2. 徐汇区疾病预防控制中心微生物检验科, 上海 200237)

**摘要:**目的 建立多重实时荧光 PCR 方法对医源性感染标本中的耐甲氧西林葡萄球菌进行快速检测, 为院内葡萄球菌感染的监测提供技术方案。方法 通过对金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因片段(*nuc*)、葡萄球菌共有的基因片段(*tuf*)和甲氧西林耐药性基因片段(*mecA*)的序列进行比对, 设计能同时检测金黄色葡萄球菌和葡萄球菌属及其耐药基因的引物和探针序列, 通过检测标准菌株和实际采集标本, 对方法进行评估。结果 *nuc* 和 *tuf* 片段设计采用标准菌株验证方法准确性, 未发现假阳性和假阴性结果; *mecA* 片段与分离培养鉴定检测结果一致; 对于混合标本, 应结合 PCR 法和分离培养法的结果, 对病原菌耐药状况进行分析。结论 该方法检测时间短, 适用于医疗机构对医源性感染的快速分析。

**关键词:**聚合酶链反应; 甲氧西林; 葡萄球菌; 耐药性, 细菌; 医源性感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)12-1531-03

Evaluation of multiplex realtime fluorescence PCR detection for methicillin-resistant *Staphylococcus*Chen Jun<sup>1</sup>, Zhang Yuewen<sup>2</sup>, Ni Binjun<sup>2</sup>, Qian Ziyu<sup>2</sup>, Zhao Xuetao<sup>2△</sup>

(1. Laboratory of Molecular Biology, Huangpu Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200023, China;

2. Department of Microbiology Laboratory, Xuhui Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200237, China)

**Abstract: Objective** To establish multiplex realtime fluorescence polymerase chain reaction (PCR) for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* in nosocomial infection samples to provide fast and accurate method to monitor nosocomial infection.

**Methods** Alignment of *tuf* and *mecA* of *Staphylococcus* and *nuc* of *Staphylococcus aureus* was performed to design primer and probe labeled with FAM/HEX/ROX to detect strains and nosocomial samples. Differences of culture and PCR detection results were analyzed. **Results** *Nuc* and *tuf* realtime PCR was verified by detecting strains. *MecA* realtime PCR was agreement with culture method. It was necessary to anatomize details of realtime PCR and culture results for the detection of mixed samples. **Conclusion** Multiplex realtime PCR could be applied for rapid analysis of nosocomial infection.

**Key words:** polymerase chain reaction; methicillin; *Staphylococcus*; drug resistance, bacterial; nosocomial infection

葡萄球菌属是医源性感染中最常见的病原菌之一<sup>[1]</sup>。葡萄球菌属中的金黄色葡萄球菌因为具有血浆凝固酶、热休克毒素、肠毒素等各类致病因子, 所以具有较强的致病性, 常见于各类创伤感染和人类皮肤黏膜正常携带, 其他的葡萄球菌如表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌等一般聚居于人体鼻腔和皮肤表面, 并随着人类的活动, 黏附于各类与人体活动有关的物体表面。

随着抗菌药物的使用, 耐受甲氧西林的葡萄球菌占比也越来越高, 尤其是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)近年来多见于文献报道。因为葡萄球菌多为混合聚集, 故与金黄色葡萄球菌混杂的其他凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)也已经成为引起某些感染的重要的病原菌。实时荧光 PCR 技术近年来被广泛应用于各类传染性病原体的检测, 该方法具有快速、灵敏的特点, 本研究尝试建立多重实时荧光 PCR 方法对 MRSA、甲氧西林耐药 CNS(MRCNS)进行快速检测。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 本次实验用菌株包括金黄色葡萄球菌(ATCC 25923、ATCC 27217、ATCC 29213、ATCC 33591、ATCC 6538), 表皮葡萄球菌(ATCC 12228)等 20 种菌株; 采集上海市徐汇区某医疗机构 5 例创面感染患者(标设为 A、B、C、D、E)的医源性

环节标本, 共计标本 71 例, 相应的环节(包括医务人员的鼻腔、手、病床、白大衣等)采样以数字标识, 患者的标本编号分别为 A1~A15、B1~B12、C1~C16、D1~D13、E1~E15。

**1.2 仪器与试剂** 仪器: Angilent 公司 Strantagene 3000MP 荧光定量 PCR 仪; Vitec-Compact 微生物鉴定及药敏系统由法国生物梅里埃公司生产。试剂与耗材: 细菌培养分离用培养基由科玛嘉生物技术公司提供, Vitec-Compat 微生物鉴定及药物系统专用的 GP 卡片由法国生物梅里埃提供, PCR 用引物与探针及 DNTP 等生化试剂均由上海赛百盛生物技术有限公司合成。

## 1.3 方 法

**1.3.1 葡萄球菌的培养和鉴定** 采用生理盐水涂抹擦拭后分别置于 7.5% 氯化钠肉汤和 3% 氯化钠肉汤进行 12 h 增菌后, 接种于金黄色葡萄球菌显色平板(CHROMAGAR™)和血琼脂平板进行 24 h 分离培养, 如有形态可疑菌落生长, 则进行革兰氏染色, 证实为革兰阳性球菌后, 挑取单个菌落进行 Vitec-Compact 的 GP 卡片进行种属鉴定, AST-GP67 进行药敏鉴定。

**1.3.2 标本核酸提取** 吸取增菌液 100 μL, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液后加入含有 300 unit/mL 溶菌酶的 TE

溶液 100  $\mu\text{L}$ ; 平板生长的菌落则挑取单个菌落加入含有 300 unit/mL 溶菌酶的 TE 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min 后, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min 灭活溶菌酶, 再使用酚-氯仿-异戊醇纯化 DNA 后复溶备用。

**1.3.4 引物探针序列设计** 使用 Mega5.22 软件<sup>[2]</sup> 获取包括金黄色葡萄球菌在内的 15 种临床已发现的葡萄球菌 *tuf* 基因片段序列(EU571042-EU571092)和包括金黄色葡萄球菌在内

的 9 种 *mecA* 片段序列(HE978794-HE978800、AM048802-AM048810)进行同源性比对, 获取较保守的区间作为模板序列, 用 Premier 公司的 Beacon Designer8.0 软件进行序列设计, 选取上、下游引物和探针, 金黄色葡萄球菌基因片段设计为耐热核酸酶 *nuc* 基因片段(Nuc、V01281), 引物及探针序列, 见表 1。

表 1 葡萄球菌属、耐甲氧西林基因、金黄色葡萄球菌引物和探针序列

毒力基因	引物探针序列对	序列(5'~3')*	片段长度(bp)
<i>tuf</i>	<i>tuf</i> -F	GGT GTW GAA ATG TTC CGT AA	74
	<i>tuf</i> -R	ACA CCA CGT AAT AAH GCA	
	<i>tuf</i> -tq	fam-ATG TTG TCA CCA GCT TCA GCG-bhq1	
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -F	CTG CTC AAC AAG TTC CAG	70
	<i>mecA</i> -R	AYC CAA TCA TTG CTG TTA A	
	<i>mecA</i> -tq	hex-ACA ACT TCA CCA GGY TCA ACT CA-bhq1	
<i>nuc</i>	<i>nuc</i> -F	AGT GCA ACT TCA ACT AAA	95
	<i>nuc</i> -R	GGT TGA CCT TTG TAC ATT A	
	<i>nuc</i> -tq	ROX-AAC CGT ATC ACC ATC AAT CGC TT-bhq1	

\*: W 为 A/T 简并, Y 为 C/T 简并, H 为 A/T/C 简并。

**1.3.5 PCR 反应体系与扩增** PCR 反应体系中,  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 5 mmol/L, 上、下游引物浓度各为 250 nmol/L, 探针浓度为 150 nmol/L, dNTP 浓度为 0.2 mmol/L, Taq 酶为 2 IU, 模板 3  $\mu\text{L}$ , 用 ddH<sub>2</sub>O 补足总体积为 30  $\mu\text{L}$ 。扩增条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 1 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 40 个循环; 在 60  $^{\circ}\text{C}$  时同时检测 FAM/HEX/ROX 3 个通道的荧光值, Ct < 35 为阳性, FAM 通道为 *tuf* 片段, HEX 通道为 *mecA* 片段, ROX 通道为 *nuc* 片段。

**2 结果**

**2.1 菌株验证实验结果** 本次实验共检测菌株 20 株, 结果见表 2。5 株金黄色葡萄球菌 *nuc* 阳性, 其余的 15 株葡萄球菌及非葡萄球菌均阴性; 12 株葡萄球菌 *tuf* 片段均为阳性, 非葡萄球菌均为阴性; 无假阳性及假阴性。

**2.2 医源性环节标本检测结果** 71 例医源性标本, 编号为 A1~A15、B1~B12、C1~C16、D1~D13、E1~E15, 标本经增菌后吸取增菌液 100  $\mu\text{L}$ , 进行核酸抽提, 然后 PCR 扩增, 同时分

别采用金黄色葡萄球菌显色平板和血琼脂平板分离培养鉴定, 实时荧光 PCR 检测结果见表 3。检出葡萄球菌感染或污染的标本 26 件, 占 36.6%(26/71); 其中检出 *mecA* 片段 23 例, 占检出葡萄球菌标本的 88.5%(23/26); 检出金黄色葡萄球菌 [*nuc*(+)] 9 例, 占 12.6%(9/71), 金黄色葡萄球菌占检出葡萄球菌标本的 34.6%(9/26)。

表 2 菌株验证实验结果

测试菌	<i>tuf</i>	<i>mecA</i> *	<i>nuc</i>
葡萄球菌属	+	+/-	+
CNS <sup>#</sup>	+	+/-	-
非葡萄球菌属	-	-	-

\*: MRSA 和 MRCNS 的 *mecA* 检测结果为阳性(葡萄球菌属中含 3 株 *mecA* 阳性菌, CNS 中含 6 株 *mecA* 阳性菌), MSSA 和 MSCNS 的 *mecA* 检测结果为阴性; #: CNS 包含溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、克氏葡萄球菌、模仿葡萄球菌等。

表 3 医源性环节标本实时荧光 PCR 检测结果

医源性标本	<i>tuf</i>	<i>mecA</i>	<i>nuc</i>	结果
A2、A4、A7、B10、C2、C3、C4	+	+	+	MRSA 或 MRSA/MSSA+CNS(7 例)
A9、B1~B3、B11、B12、C7、C9、D1~D8	+	+	-	MRCNS(16 例)
E5、E11	+	-	+	MSSA 或 MSSA+MSCNS(2 例)
D12	+	-	-	MSCNS(1 例)
其余标本	-	-	-	无葡萄球菌检出

**2.3 葡萄球菌耐药结果与 *MecA* 片段检测结果比较** 共检出 CNS 20 株、金黄色葡萄球菌 9 株, *mecA* 片段检测结果与分离培养结果一致, 见表 4。

**2.4 医源性环节标本葡萄球菌分离培养结果** 共检出金黄色葡萄球菌阳性标本 9 例, 与 PCR 结果一致; 检出 CNS 阳性标本 20 例其中, 单纯 CNS 阳性 17 例; 在检出的 9 例金黄色葡萄

球菌阳性标本中,有 3 例合并 CNS,而 20 例 CNS 阳性标本中,有 3 例合并金黄色葡萄球菌;从耐药性来看,CNS 的甲氧西林耐药率为 95%(19/20),也超过金黄色葡萄球菌的 78%(7/9)。

表 4 葡萄球菌耐药结果与 *mecA* 片段检测结果比较(n)

耐药结果	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	合计
	阳性	阴性	
甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)	0	2	2
MRSA	7	0	7
甲氧西林敏感 CNS(MSCNS)	0	1	1
MRCNS	19	0	19
合计	26	3	29

### 3 讨论

金黄色葡萄球菌和 CNS 是医源性感染中最常见的病原菌,其中的 MRSA 传播速度快、影响大,是引起难治性医源性感染的最主要的病原菌之一,已经引起各界普遍关注。葡萄球菌的检测方法主要是分离培养鉴定,因为至少需要 2~3 d,所以该方法对于患者的及时治疗 and 医源性感染的及时发现有一定限制。实时荧光 PCR 法因为具有灵敏、快速、少污染、操作简便的优点,近年来得到广泛的应用<sup>[3]</sup>。本研究采取多重荧光标记的引物、探针设计方案,充分利用实时荧光 PCR 技术的多通道同时检测的特点,对 *tuf*、*nuc*、*mecA* 3 个不同的片段同时进行检测,以便快速了解感染病例和医源性环节标本中的葡萄球菌的分类以及耐药状况,该方法具有准确、快速、方便的优势。

葡萄球菌的耐药可以是固有耐药也可能是获得性耐药,无论是哪一种耐药机制,都有 PCR 检测 *mecA* 基因为阴性,但分离培养法检测却为耐药的报道<sup>[4]</sup>。另一方面,单纯的 *mecA* 基因存在,并不能完全独立表达 PBP2,还有赖于甲氧西林耐药必需因子(*femA*、*femB* 等)<sup>[5]</sup>,因此 PCR 方法 *mecA* 单位点检测甲氧西林耐药有一定的局限性<sup>[6]</sup>,故而美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐将传统的分离培养法和 PCR 法相结合,从表型和基因型两方面确认甲氧西林耐药,以保证结果的准确和可靠<sup>[7-8]</sup>。

多重实时荧光 PCR 方法对采样标本的快速检测能直接对“是否含有葡萄球菌”、“是否含有金黄色葡萄球菌”、“是否有耐药株存在”这 3 个问题得出大致的结论<sup>[9-13]</sup>。MRSA 呈现高度耐药,仅有万古霉素作为可选的治疗药物,但万古霉素对于一般的 MSSA 的治疗效果还不如青霉素等常规药,故而对于金黄色葡萄球菌或者 CNS 是否耐药的判断,是控制感染和决定是否使用万古霉素的关键依据。本研究发现,从创面感染患者医源性环节标本中分离的金黄色葡萄球菌存在 MRSA,不仅如此,分离的 CNS 也是存在着 MRCNS,这不仅对于如何促进伤口愈合和控制医源性感染提出了新的挑战,而且 CNS 中广泛存在的 MRCNS 也要引起临床警惕,尤其是在某些的病例和环节中同时存在 2 种不同的耐甲氧西林葡萄球菌的情况,应在

治疗和感染监测中密切关注。

### 参考文献

- [1] Lowy FD. Staphylococcus aureus infections[J]. N Engl J Med, 1998,339(8):520-532.
- [2] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007,24(8):1596-1599.
- [3] 王艳,叶冬青,李家斌,等. 二重实时 PCR 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J]. 中国抗生素杂志, 2007,32(4):225-228.
- [4] Wolk DM, Picton E, Johnson D, et al. Multicenter evaluation of the Cepheid Xpert methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) test as a rapid screening method for detection of MRSA in nares[J]. J Clin Microbiol, 2009,47(3):758-764.
- [5] Arbefe SS, Zhang K, Kroeger JS, et al. Prevalence and genetic relatedness of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus isolates detected by the Xpert MRSA nasal assay[J]. J Clin Microbiol, 2011,49(8):2996-2999.
- [6] Zhang K, McClure JA, Elsayed S, et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10):5026-5033.
- [7] Rasheed MU, Ahmed Z. Phenotypic methods of greater accuracy to detect the *mecA* gene product for the recognition of MRSA in resource constraint settings[J]. Asian Pacific J Trop Med, 2010,3(9):741-744.
- [8] Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations[J]. Ger Med Sci, 2009,1(2):7.
- [9] Thong KL, Lai MY, Teh CSJ, 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.
- [10] 刘渠,廖灵灵,徐亚军,等. 荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A 方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010,20(4):788-789.
- [11] Banada PP, Chakravorty S, Shah D, et al. Highly sensitive detection of Staphylococcus aureus directly from patient blood[J]. PLoS One, 2012,7(2):e31126.
- [12] 邵彪,陈刚,许蓓蓓,等. TaqMan 探针法荧光定量 PCR 检测食品中金黄色葡萄球菌 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012,22(2):273-275.
- [13] Harris LG, El-Bouri K, Johnston S, et al. Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry[J]. Intern J Artif Organs, 2010, 33(9):568-574.

(收稿日期:2014-02-08)