

## 双重实时荧光 PCR 快速检测 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌方法的建立

倪 勇<sup>1</sup> 孙余婕<sup>2</sup>

**[摘要]**目的:建立一种能快速检测金黄色葡萄球菌,同时能快速鉴别是否具有耐甲氧西林基因的双重实时荧光 PCR 方法。方法:以金黄色葡萄球菌特异 NUC 基因的保守区为靶区域设计特异引物和 TaqMan 荧光探针,同时针对耐甲氧西林特异 MecA 基因设计另一对引物和探针;2 条探针的 5'端标记不同荧光报告基团(FAM 和 HEX),3'端标记荧光淬灭基团,建立双重实时荧光 PCR 方法,检测样本中的金黄色葡萄球菌以及鉴别其是否具有耐甲氧西林基因,并对双重实时荧光 PCR 方法的特异性和灵敏度进行评价。结果:双重荧光 PCR 方法可对金黄色葡萄球菌及耐甲氧西林基因分别进行特异扩增,两者均为阳性时可判为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;金黄色葡萄球菌特异基因特异扩增阳性而耐甲氧西林基因特异扩增阴性可判为甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌;对同种属的表皮葡萄球菌、粪链球菌、藤黄微球菌等病原体均无扩增;双重实时荧光 PCR 方法的灵敏度最低可检测至 100 个菌体。结论:建立的实时荧光 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的方法不仅能实现对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌社区感染和临床感染的监控,同时也可为临床上耐甲氧西林葡萄球菌感染患者的用药提供必要的依据。

**[关键词]** 耐甲氧西林基因金黄色葡萄球菌;双重实时荧光 PCR;快速检测

[中国图书资料分类法分类号] R 378.11

[文献标识码] A

### Research on rapid detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by duplex real-time-PCR

NI Yong<sup>1</sup>, SUN Yu-Jie<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu Anhui 241000;

2. Department of PCR, Center of Clinical Laboratory Medicine, Hefei Anhui 233001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a duplex quantitative real-time PCR assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Methods:** Two pairs of specific primers and TaqMan fluorescent probe were designed according to the conserved region of NUC gene sequences of *Staphylococcus aureus* and MecA gene sequences of MRSA, respectively. The 5' end labeled with different fluorescent reporter groups (FAM and HEX) and the 3' end labeled with fluorescence quenching group were used to detect *Staphylococcus aureus* and identify the gene of MRSA in order to evaluate its sensitivity and specificity. **Results:** The genes of NUC and MecA were specifically amplified in the duplex PCR reaction respectively. The MRSA in the study presented MecA and NUC gene, while methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* strains had only a NUC gene; the same species of *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis* and *Micrococcus luteus* had no specific amplification gene; at least 100 MRSA strains were detected by using this duplex real-time PCR. **Conclusions:** The duplex real-time PCR assay can not only monitor the community and clinical-acquired MRSA infection, but provide necessary basis for pharmacotherapy to MRSA infection patients.

**[Key words]** methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; duplex quantitative real-time PCR; rapid detection

金黄色葡萄球菌在临床上引起鼻腔、口腔黏膜以及皮肤和上皮组织的感染、化脓、引起炎症反应的重要病原菌之一;在兽医临床也是引起各种炎症、败血症、水肿病等病症的罪魁祸首之一。1959 年,甲氧西林的应用控制了产  $\beta$ -内酰胺酶金黄色葡萄球菌株的感染,但时隔 2 年后,在英国就发现了世界

首例耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染病例。MRSA 感染从发现至今几乎遍及全球,已成为医院感染的重要病原菌之一。另一方面,MRSA 近年开始在社区发现,并有一定规模的流行爆发趋势<sup>[1]</sup>。鉴于 MRSA 对人类健康和医疗事业的严重威胁,香港卫生防护中心已于 2007 年初将社区 MRSA 列为法定呈报的传染病。

目前对 MRSA 的常用检测主要是凝固酶试验与药敏试验方法相结合,但检测操作较费时费力,且

[收稿日期] 2011-06-03

[作者单位] 1. 安徽省芜湖市中医院 检验科 241000; 2. 安徽省临床检验中心 PCR 实验室 安徽 合肥 233001

[作者简介] 倪 勇(1971-) 男,主管检验师。

有一定漏检率; 纸片扩散(K-B)法也存在漏检的可能; 由于耐药株中的 PBP<sub>2</sub> 蛋白未必充分表达或表达率较低, 以此为检测目标的乳胶凝集检测存在的问题与 K-B 法同; 自动化药敏检测费用较昂贵。由于目前的方法存在费时费力、漏检等不足, 很可能导致患者病情延误, 不利于制定有效的治疗方案, 甚至导致误诊的可能。利用 PCR 方法检测耐甲氧西林特异性基因 *MecA* 是目前国际认可的“金标准”, 由于其特异灵敏又快速的特点, 非常适合监测和检验 MRSA 和 MRSA 的临床或社区感染情况, 对提供快速有效的临床治疗方案、节省医疗费用具有重大的意义。

本研究旨在建立一种快速、简洁、准确的 PCR 方法来检测金黄色葡萄球菌及确定菌株是否具有对甲氧西林药物耐受的特性, 并对方法进行灵敏度和特异性验证, 完善检测性能, 以期为临床对 MRSA、金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林菌株的检测、监控以及辅助临床用药提供必要的依据。

## 1 资料与方法

1.1 菌株和标本 12 株 MRSA 和 7 株耐甲氧西林表皮葡萄球菌分离自安徽省弋矶山医院和安徽省芜湖市中医医院临床病例; 金黄色葡萄球菌(CMCC 26001)、粪链球菌(CMCC 32221) 菌株均购自中国医学细菌保藏管理中心(CMCC); O1 群霍乱弧菌、O139 群霍乱弧菌、藤黄微球菌阳性核酸由安徽省合肥市疾病预防控制中心提供。

1.2 菌株培养 金黄色葡萄球菌、粪链球菌、MRSA、耐甲氧西林表皮葡萄球菌等菌株的培养和鉴定参照《全国临床检验操作规程》进行, 由本实验室完成。核酸提取用试剂盒购自广州市铂尔生物科技开发有限公司。

### 1.3 荧光 PCR 方法

1.3.1 引物设计与合成 以 Primer Premier 5.0 软件针对公布的金黄色葡萄球菌特异 NUC 基因以及耐甲氧西林 *MecA* 特异基因保守序列分别设计 1 对特异引物和探针, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。特异引物探针序列, NUC 引物 1: CGA TTG ATG GTG ATA CGG TT, NUC 引物 2: TTA GGA TGC TTT GTT TCA GGT, NUC 探针: FAM-CT GAA TGT CAT TGG TTG ACC TTT G-BHQ1; *MecA* 引物 1: GCA ACA AGT CGT AAA TAA AAC ACA, *MecA* 引物 2: CTG CCA CTT TCT CCT TGT TTC, *MecA* 探

针: HEX-CAA ATC CGG TAC TGC AGA ACT CA-TAMRA。NUC 基因和 *MecA* 基因扩增片段长度分别为 124 bp 和 96 bp。

1.3.2 菌液浓度测定 由 BIOM RIE X 生产的 McFarland 标准比浊管(CE 认证) 标定菌液浓度。

1.3.3 样本前处理和核酸提取 样本进行增菌后, 取菌液以核酸提取试剂盒处理提取基因组 DNA, 提取后的 DNA 用于实时荧光 PCR 检测或( $-20 \pm 5$ ) °C 保存待用。

1.3.4 灵敏度实验 根据比浊法测定的金黄色葡萄球菌增菌液浓度, 以空白培养基将菌液 10 倍倍比稀释至  $1.0 \times 10^0$  /ml, 取各浓度菌液提取核酸用于荧光 PCR 检测。

1.3.5 实时荧光 PCR 反应体系和循环条件 实时荧光 PCR 反应体系:  $5 \times$  定量 PCR buffer 10  $\mu$ l, dNTP (25 mmol/ $\mu$ l) 0.4  $\mu$ l, Hot Start Taq 酶(5 U/ $\mu$ l) 0.8  $\mu$ l, *MecA* 引物(10 pmol/ $\mu$ l) 各 1  $\mu$ l, *MecA* 探针(10 pmol/ $\mu$ l) 0.5  $\mu$ l; NUC 引物(10 pmol/ $\mu$ l) 各 1.4  $\mu$ l, NUC 探针(10 pmol/ $\mu$ l) 0.8  $\mu$ l; 模板 DNA 用量为 10  $\mu$ l, 重蒸馏水补足体积到 50  $\mu$ l。实时荧光 PCR 反应条件: 95 °C 10 min 1 个循环, 94 °C 15 s; 60 °C 40 s 40 个循环, 并收集 FAM 和 HEX 通道 2 种荧光信号。

根据上述反应体系加入各试剂和 DNA 模板, 并按上述反应条件在 ABI Prism 7300 型仪器上进行扩增反应, 反应结束后, 仪器自动给出 2 种通道荧光信号增长曲线, 根据相应的荧光信号是否呈指数增长及其  $C_t$  值来判断扩增的结果。

## 2 结果

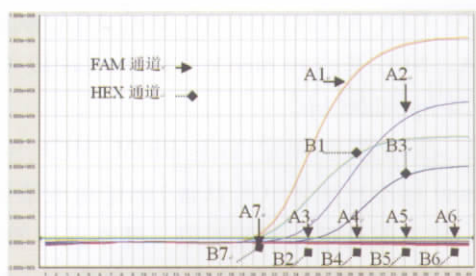
### 2.1 双重实时荧光 PCR 方法检测 MRSA 的特异性

以阳性菌株和特异性菌株提取所得核酸为样本, 上机检测, 验证所建立方法的特异性和对阳性样本的扩增情况, 检测结果见图 1。

特异性实验结果表明, 建立的双重实时荧光 PCR 方法对 MRSA 在 2 个通道都有明显扩增; 除此之外, FAM 通道对金黄色葡萄球菌菌株显示有扩增, 同时 HEX 通道为阴性; 而 HEX 通道对耐甲氧西林表皮葡萄球菌显示有扩增, 同时 FAM 通道即 NUC 基因显示为阴性; 同时方法对其他霍乱弧菌、藤黄微球菌、粪链球菌 2 个通道均无扩增。

### 2.2 双重实时荧光 PCR 方法检测 MRSA 的灵敏度

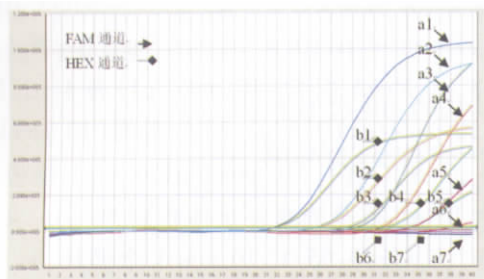
以比浊管方法测定 3 次培养所得 MRSA 菌液浓



A1、B1:MRSA阳性曲线;A2:金黄色葡萄球菌阴性;B2:金黄色葡萄球菌阴性;A3:耐甲氧西林表皮葡萄球菌阴性;B3:耐甲氧西林表皮葡萄球菌阳性;A4、B4、A5、B5、A6、B6、A7、B7分别为粪链球菌、O1群霍乱弧菌、O139群霍乱弧菌、藤黄微球菌,FAM和HEX通道均为阴性曲线

图1 MRSA双重荧光PCR检测方法特异性检测

度得到平均值为  $6.44 \times 10^7$  /ml。将其稀释至  $1.0 \times 10^6$  /ml 后再 10 倍倍比稀释至  $1.0 \times 10^0$  /ml,各浓度 DNA 进行荧光 PCR 检测扩增,检测结果见图 2。



a1b1、a2b2、a3b3、a4b4、a5b5分别为  $1.0 \times 10^9$  /ml、 $1.0 \times 10^8$  /ml、 $1.0 \times 10^7$  /ml、 $1.0 \times 10^6$  /ml、 $1.0 \times 10^5$  /ml MRSA 菌液的扩增曲线,两通道均为阳性曲线;a6b6为  $1.0 \times 10^4$  /ml MRSA 菌液的扩增曲线,其中 a6 为弱阳性,b6 为阴性曲线;a7b7 为  $1.0 \times 10^0$  /ml MRSA 菌液的扩增曲线,两通道均为阴性扩增曲线

图2 MRSA双重荧光PCR检测方法灵敏度检测

灵敏度试验结果显示,所建立的双重荧光 PCR 方法对 MRSA 悬液的检测灵敏度为  $1.0 \times 10^2$  /ml;其中 FAM 通道可检测至  $1.0 \times 10^1$  /ml,但荧光值弱,Ct 值为 37.87,后续试验验证后表明 FAM 通道对该浓度的检测结果并不稳定;而双通道对  $1.0 \times 10^2$  /ml 浓度检测结果均稳定。所以,确定该方法对 MRSA 的最低检出限为  $1.0 \times 10^2$  /ml。

### 3 讨论

早在 20 世纪 80 年代末,国外就有研究者用 PCR 来检测表达 PBP2a 的 MecA 基因。随着 PCR 技术尤其是荧光标记技术的发展,MRSA 的检测目前也多采用更为精确的荧光 PCR 方法,检测目的基因主要是 MecA 基因,常用方法如分子信标<sup>[2]</sup>、TaqMan 探针<sup>[3]</sup>等。MecA 基因在所有 MRSA 属中

都存在,序列保守性好,所以不能单独以检测 MecA 基因作为判断是否为 MRSA 的标准,还需考虑辅以凝固酶测试试验或检测金黄色葡萄球菌的其他特异性基因来区分 MRSA 和 MRCoNs。Kilic 等<sup>[4]</sup>结合 MecA、tuf 以及 nuc 3 种基因检测 341 例临床 GPC 阳性标本(包括 230 例耐甲氧西林 CoNS,54 例甲氧西林敏感 CoNS,22 例 MRSA,22 例甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌,13 例非金黄色葡萄球菌属)3 种基因检测特异性和灵敏度均可达到 98% 以上。

本实验所建立的双重实时荧光 PCR 方法检测 MecA 和 NUC 目标特异基因,分别设计 2 对引物和 TaqMan 探针,标记不同的荧光探针,2 种探针均扩增显示阳性时可判断为 MRSA 阳性,其中的单一通道为阳性时只能判断为金黄色葡萄球菌阳性或耐甲氧西林阳性菌株;该方法对其他粪链球菌、霍乱弧菌、藤黄微球菌等致病菌均无扩增;在灵敏度方面,该方法对 MRSA 的最小检出限可达到 100 个菌体/ml。由此,本实验所建立的方法为 MRSA 的鉴别提供了一种简便快速的途径。为了更适合在 MRSA 临床和社区感染的监控、临床诊断、流行病学研究上应用,还需要本研究所建立的方法对来自临床的病例标本进行大样本量的检测,并进行系统的分析和评价,以使本研究所建立的双重荧光 PCR 检测 MRSA 的方法适用于 MRSA 的监控,为辅助诊断和指导临床用药提供更为准确的参考。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Elston DM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Am Acad Dermatol 2007 56(1): 1-16.
- [2] Fang H, Hedin G. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay [J]. J Clin Microbiol 2003 41(7): 2894-2899.
- [3] Wellinghausen N, Siegel D, Gebert S, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* bacteremia and methicillin resistance by real-time PCR in whole blood samples [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009 28(8): 1001-1005.
- [4] Kilic A, Muldrew KL, Tang YW, et al. Triplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci and determination of methicillin resistance directly from positive blood culture bottles [J]. Diagn Microbiol Infect Dis 2010 66(4): 349-355.

( 本文编辑 章新生 )