to Horner's syndrome and compensatory hyperhidrosis[J]. Neurosurgery, 2010, 67(3): 652-656.
[4] Cho H M, Lee D Y, Sung S W. Anatomical variation of rami communications in the upper thoracic sympathetic trunk[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2005, 27(2): 320-324.
[5] Scognamillo F, Serventi F, Attene F, *et al*. T2-T4 sympathectomy versus T3-T4 sympathicotomy for palmar and axillary hyperhidrosis [J]. Clin Auton Res, 2011, 21(2): 97-102.
[6] 涂远荣, 杨劼, 刘彦国. 中国手汗症微创治疗专家共识[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2011, 27(8): 499-451.
[7] Lai Y T, Yang L H, Chio C C, *et al*. Complications in patients with palmar hyperhidrosis treated with transthoracic endoscopic sympathectomy[J]. Neurosurgery, 1997, 41(1): 110-113.

(**收稿**:2013-02-27;**修回**:2013-04-17)
(编辑 王小寒)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1758-03

荧光定量聚合酶链反应检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 mecA 基因的表达水平及临床应用

杨 晏,李 科,王忠诚 (400014 重庆,重庆市急救医疗中心检验科)

[**摘要**] **目的** 探讨荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)mecA 基因的表达水平及临床价值。**方法** 系统研究了 FQ-PCR 法检测 MRSA mecA 基因的灵敏度、重复性、定量范围和扩增效率。采用 FQ-PCR 法检测临床分离的103株金黄色葡萄球菌,并与传统 PCR 法和苯唑西林纸片扩散法检测结果相比较。**结果** FQ-PCR 法检测 MRSA mecA 基因的批内 *CV* 为3.1%,批间 *CV* 为4.7%,灵敏度 1.0×10^3 拷贝数/mL,定量范围(1.0×10^3 ~ 1.0×10^6) 拷贝数/mL,扩增效率84.8%。与传统 PCR 法相比较,FQ-PCR 法检测 MRSA mecA 基因的 *Kappa* 值为0.95,敏感度94.9%,特异度99.1%,阳性预测值97.4%,阴性预测值98.3%。103株金黄色葡萄球菌中,FQ-PCR 法检出 mecA 基因阳性37株、阴性66株,mecA 基因的表达水平为(3.72 ± 2.83)$\times10^5$拷贝数/mL,表达阳性率35.9%;苯唑西林纸片扩散法检出 MRSA 27株、MSSA 76株,MRSA 阳性率26.2%,FQ-PCR 法的检出率显著高于苯唑西林纸片扩散法($P<0.01$)。**结论** FQ-PCR 是一种敏感、特异的定量检测 MRSA mecA 基因的方法,在 MRSA 的快速、准确鉴定中具有重要的临床应用价值。

[**关键词**] 荧光定量聚合酶链反应;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;mecA 基因;表达水平
[**中图法分类号**] R394.3;R378.11;R446.5 [**文献标志码**] A

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methcillin-resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA)是导致医院和社区感染的重要病原菌之一。金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药由其染色体上的 mecA 基因介导,可以多种方式插入到其他的葡萄球菌染色体和质粒中,导致耐药性的扩散。近年来,世界各地 MRSA 临床分离率呈逐年增高的趋势[1]。因此,快速、准确地检测 MRSA,对患者进行早期治疗和感染预防具有十分重要的临床意义[2-3]。目前,MRSA 的主要检测方法有表型检测法和传统 PCR 法[4-5],但前者如苯唑西林纸片扩散法、微量肉汤稀释法和琼脂筛选法易受培养温度、pH 和渗透压的影响,后者却易被污染、假阳性高且结果难以定量。荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)以荧光标记探针进行核酸定量分析,其扩增和检测同步进行。为此,我们采用 FQ-PCR 法检测 MRSA mecA 基因的表达水平,探讨 MRSA 快速鉴定的临床价值。现将结果报告如下。

[**通信作者**] 王忠诚,电话:(023)63692006,E-mail:zgcgwg@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130625.1250.005.html(2013-06-25)

1 材料与方法

1.1 菌株来源与鉴定

我院细菌室2012年3月至2013年2月分离并保存的金黄色葡萄球菌共103株,其中 MRSA 38株、甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)65株。脑膜炎奈瑟氏菌、肺炎链球菌、肠球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、肺炎支原体及白色念珠菌等对照菌株共52株。样本主要来源于血液、痰液、清洁尿、引流液、鼻咽拭子及伤口分泌物等。细菌培养分离严格按全国临床检验操作规程进行,再用 VITEK-32 全自动细菌鉴定仪鉴定。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC 43300、ATCC 29213 和大肠埃希菌 ATCC 25922(卫生部临床检验中心)。其中,MRSA 的鉴定参照文献[6],在获得的金黄色葡萄球菌分离株中,通过传统 PCR 法检测 mecA 与 femB 基因。若 mecA 与 femB 基因均为阳性判为 MRSA;若 mecA 基因为阴性,femB 基因为阳性则判为 MSSA。

1.2 主要仪器与试剂

Bact/Alert-3D 全自动细菌培养仪、VITEK-32 全自动细菌鉴

定及药敏检测系统(法国生物梅里埃公司),Gene Cycler™ PCR 仪(美国伯乐公司),FTC-2000 实时荧光定量 PCR 仪(加拿大枫岭生物技术公司),低温高速离心机(美国贝克曼公司)。M-H 琼脂(英国 Oxoid 公司),苯唑西林(OXA,1 μg)纸片(中国药品生物制品检定所),FQ-PCR 试剂盒及 MRSA mecA 基因阳性参考品(上海之江生物科技公司)。

1.3 FQ-PCR 法

引物和探针:MRSA mecA 基因上游引物:5′-AAATATTATTAGCTGATTCAGGTTAC-3′,下游引物:5′-CGTTAATATTGCCATTATTTTCTAAT-3′; *Taq*Man 荧光探针:5′-CAAGGTGAAATACTGATTAAGCCCATTA-3′,以 FAM 作报告基团标记探针 5′,TAMRA 为荧光淬灭基团标记探针 3′,均由上海之江生物科技公司设计与合成。模板 DNA 制备:挑取单个菌落于内含 4.5 mL 灭菌生理盐水的玻璃瓶中,混匀并用浊度仪调整其菌液浓度至 0.5 麦氏单位,将该菌液稀释 10^3 倍后取 100 μL 至含等量裂解液的 0.5 mL EP 管中,混匀,100 ℃煮沸 10 min,15 000 × *g* 离心 5 min,取上清液作为 PCR 反应模板。PCR 扩增:按每个反应取 PCR 反应液 36 μL、*Taq* 酶 0.4 μL 计算,加入一灭菌离心管中,混匀后取 36 μL 于每个扩增管,加模板 DNA 提取液 4 μL,混匀,置 FTC-2000 PCR 仪扩增检测。扩增参数:37 ℃ 2 min、94 ℃ 2 min,1 个循环;93 ℃ 15 s、60 ℃ 60 s,40 个循环。反应结束,仪器自动计算样本中 MRSA mecA 基因的起始浓度(拷贝数/mL)。结果判定:检测结果低于检测下限 1.0×10^3 拷贝数/mL 为 MRSA mecA 基因低表达(阴性),≥1.0×10^3 拷贝数/mL 为高表达(阳性)。

1.4 对比方法

传统 PCR 法:模板 DNA 提取同 FQ-PCR,基因扩增采用 Gene Cycler™ PCR 仪进行。扩增产物经 PAGE 电泳,用紫外透射仪观察目的基因。苯唑西林纸片扩散法:M-H 培养基中含 4% NaCl,纸片中苯唑西林的含量为 1 μg。操作按 CLSI 标准进行。结果判定:抑菌环直径≤10 mm 为耐药,>10 ~ 12 mm 为中介,>12 mm 为敏感。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计处理。测定数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同实验方法结果一致性强度以 Kappa 值表示[7]。阳性率的显著性用配对 χ^2 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

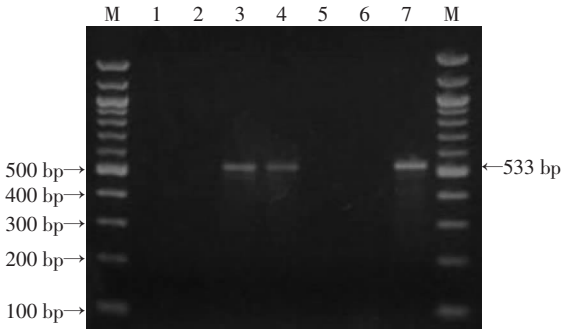
2 结果

2.1 目的基因扩增结果

MRSA mecA 基因阳性参考品提取 DNA 后,用 Gene Cycler™ PCR 仪扩增。其扩增产物经 PAGE 电泳显示在 533 bp 条带处有目的条带,结果见图 1。

2.2 标准曲线

将 1.0×10^6 拷贝数/mL MRSA mecA 基因参考品以 10 倍递减稀释为(1.0×10^6 ~ 1.0×10^2) 拷贝数/mL,按 FQ-PCR 热循环参数扩增,结果见图 2。当表达量为 1.0×10^3 拷贝数/mL 的参考品扩增至 34.42 个循环时,扩增曲线超出基线形成起翅,因此设置 1.0×10^3 拷贝数/mL 为检测下限。除 1.0×10^2 拷贝数/mL 参考品外,其余参考品荧光强度变化的 Ct(Y)值与其浓度的对数值(X)之间具有良好的线性相关性,$r = 0.99$,线性回归方程 $Y = -3.75X + 45.06$;检测灵敏度为 1.0×10^3 拷贝数/mL,定量检测范围为(1.0×10^3 ~ 1.0×10^6) 拷贝数/mL。根据公式 $E = 10^{-1/S} - 1$(E 为扩增效率,S 为标准曲线斜率)计算,MRSA mecA 基因的扩增效率为 84.8%。



M:100 bp ladder;1、2、5:空白对照;3、4:mecA 基因;6:阴性质控;7:阳性质控

图 1 mecA 基因片段电泳结果

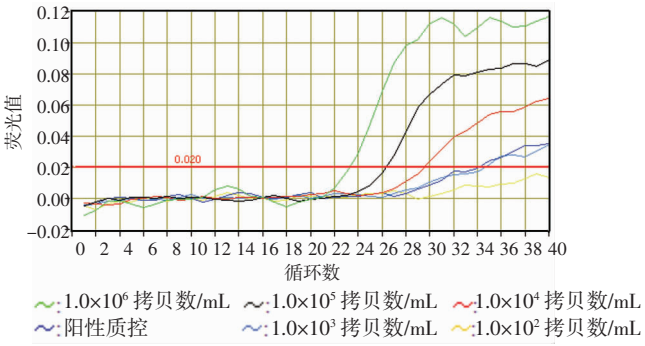


图 2 FQ-PCR 检测 MRSA mecA 基因扩增曲线

2.3 重复性实验

取 1 份 MRSA mecA 基因阳性混合样本提取 DNA,1 次平行扩增 20 份,Ct 值为 29.4 ± 0.9,批内 *CV* 3.1%。该阳性混合样本置 -20 ℃保存,每日测定 2 次,每次做 3 份平行扩增,连续测定 3 d,Ct 值为 30.2 ± 1.4,批间 *CV* 4.7%。

2.4 方法比较

用 FQ-PCR 法对 38 株 MRSA、65 株 MSSA 和 52 株对照菌株进行检测,并与传统 PCR 法相比较,结果见表 1。结果显示,以传统 PCR 法为"金标准",FQ-PCR 法的敏感度为 94.9%,特异度 99.1%,阳性预测值 97.4%,阴性预测值 98.3%。经配对 χ^2 检验,两法检测 MRSA 的结果差异无统计学意义($P > 0.05$),*Kappa* 值为 0.95,表明其检测结果之间具有高度的一致性。因此,在 MRSA 的快速鉴定中,FQ-PCR 法可完全取代要对扩增产物进一步电泳、染色等繁琐步骤且结果难于定量的传统 PCR 法。

表 1 FQ-PCR 法与传统 PCR 法检测 MRSA 的结果比较

FQ-PCR 法	传统 PCR 法	
	阳性	阴性
阳性	37	1
阴性	2	115

2.5 临床标本检测结果

用FQ-PCR法与苯唑西林纸片扩散法对血液、痰液、清洁尿、引流液及创面分泌物等临床样本中分离出的103株金黄色葡萄球菌进行检测，其中苯唑西林纸片扩散法检出MRSA 27株、MSSA 76株，MRSA检出率为26.2%；FQ-PCR法检出mecA基因阳性37株、阴性66株，mecA基因的表达水平为$(3.72 \pm 2.83) \times 10^5$拷贝数/mL，表达阳性率为35.9%。经配对$\chi^2$检验，FQ-PCR法检出率显著高于苯唑西林纸片扩散法（$P<0.01$）。

3 讨论

FQ-PCR主要应用*Taq*酶5′→3′外切酶活性，在常规PCR基础上加入荧光标记探针进行核酸定量分析[8]。本研究结果显示，MRSA mecA基因阳性参考品提取DNA后用传统PCR法扩增，其产物经PAGE电泳显示在533 bp条带处有目的条带。FQ-PCR法检测MRSA mecA基因的批内*CV*为3.1%，批间*CV* 4.7%，灵敏度为1.0×10^3拷贝数/mL，定量范围（1.0×10^3 ~ 1.0×10^6）拷贝数/mL。扩增反应中荧光强度变化的Ct(Y)值与其浓度的对数值(X)之间具有良好的线性相关性，$r=0.99$，线性回归方程 $Y=-3.75X+45.06$，扩增效率为84.8%。

近年来的研究表明，MRSA具有较强的外界适应能力、定植能力和对β-内酰胺类抗生素的耐受能力，其所致感染的流行病学发生了从过去局限的院内获得型逐渐向社区获得型转化[9]。MRSA通过大量产生与β-内酰胺类抗生素结合力极低的由mecA基因编码的青霉素结合蛋白2a(PBP2a)，抑制金黄色葡萄球菌青霉素结合蛋白(PBPs)的作用，导致该类抗生素不能抑制细胞壁的合成[10]。目前认为mecA基因系MRSA耐药的决定基因，金黄色葡萄球菌一旦获得该基因，将表现为高度耐药和多重耐药[11]。因此以mecA基因为目标基因对MRSA进行快速检测，是控制感染与流行的关键。

本研究采用FQ-PCR法对38株MRSA、65株MSSA和52株对照菌株进行检测，与传统PCR法相比较，其敏感度为94.9%，特异度99.1%，阳性预测值97.4%，阴性预测值98.3%。两法检测MRSA的结果差异无统计学意义（$P>0.05$），*Kappa*值为0.95，检测结果之间具有高度的一致性[7]。对血液、痰液、清洁尿、引流液、鼻咽拭子及伤口分泌物等临床样本中分离的103株金黄色葡萄球菌进行检测，苯唑西林纸片扩散法检出MRSA 27株、MSSA 76株，MRSA检出率为26.2%；FQ-PCR法检出mecA基因阳性37株、阴性66株，mecA基因的表达水平为$(3.72 \pm 2.83) \times 10^5$拷贝数/mL，表达阳性率为35.9%，显著高于苯唑西林纸片扩散法（$P<0.01$）。其中mecA基因阳性而苯唑西林纸片扩散法敏感的8株金黄色葡萄球菌，有5株是抑菌环直径为13 ~ 14 mm的临界型菌株，其他3株为mecA基因阳性但其表型明显为敏感的隐匿型MRSA。表明FQ-PCR法检测mecA基因表达水平较苯唑西林纸片扩散法具有较高的敏感度和特异度。

应用FQ-PCR法检测MRAS mecA基因的表达水平，其模板DNA提取简便，扩增反应可在1.5 h内完成，自动化程度高，省去了传统PCR法要对扩增产物进一步电泳、染色等繁琐步骤，克服了其结果难于定量、表型检测法影响因素较多的局限性，值得临床推广。

参考文献：

[1] 马越，李景云，张新妹，等. 2002年临床常见细菌耐药性监测[J]. 中华检验医学杂志，2004，27(1)：38－45.

[2] Cooper B S, Medley G F, Stone S P, *et al*. Methcillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitals and the community: stealth dynamics and control catastrophes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(27): 10223－10228.

[3] Chambers H F, Deleo F R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(9): 629－641.

[4] Abu-Hujier N S, Sharif F A. Detection of methcillin-resistant Staphylococcus aureus in nosocomial infections in Gaza Strip[J]. Afr J Microbiol Res, 2008, 2: 235－241.

[5] Sajith-Khan A K, Preetha J S, Lakshmi-Sarayu Y, *et al*. Detection of mecA genes of methcillin-resistant Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction[J], Int J Health Rehabil Sci, 2012, 1(2): 64－68.

[6] Kobayashi N, Wu H, Kojima K, *et al*. Detection of mecA, femA, and femB genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction[J]. Epidemiol Infect, 1994, 113(2): 259－266.

[7] 林果为，沈福民. 现代临床流行病学[M]. 上海：复旦大学出版社，2001：56－58.

[8] Moussa I, Shibl A M. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus recovered from outpatient clinics in Riyadh, Saudi Arabia[J]. Saudi Med J, 2009, 30(5): 611－617.

[9] David M Z, Daum R S. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(3): 616－687.

[10] Franklin G F, Bal A M, McKenzie H. Phlebotomy tourniquets and MRSA[J]. J Hosp Infect, 2007, 65(2): 173－175.

[11] Bamberger D M, Boyd S E. Management of Staphylococcus aureus infections[J]. Am Fam Physician, 2005, 72(12): 2474－2481.

（收稿：2013-04-17；修回：2013-05-20）

（编辑 邓强庭）