

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2013.06.001

· 论 著 ·

## 应用双重 PCR 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

龚玉姣<sup>1</sup>, 吴新伟<sup>1</sup>, 邱峰<sup>2</sup>, 胡玉山<sup>1</sup>, 张欣强<sup>1</sup>, 杨智聪<sup>1</sup>

(1 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440; 2 广东省中医院, 广东 广州 510120)

**[摘要]** 目的 应用双重聚合酶链反应(PCR)技术,建立金黄色葡萄球菌及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的快速检测方法,指导临床及时、合理使用抗菌药物,防止 MRSA 的扩散。方法 根据金黄色葡萄球菌血浆凝固酶基因 *Coag* 和耐药基因 *mecA* 设计引物,调整 PCR 扩增反应各参数,建立快速、准确扩增 *Coag* 和 *mecA* 基因的双重 PCR 体系;应用双重 PCR 对临床分离鉴定的 85 株金黄色葡萄球菌同时扩增 *Coag* 和 *mecA* 基因片段,并将 PCR 扩增结果与苯唑西林-高盐琼脂筛选试验(OSAS)的结果进行比对。结果 生化常规试验分离鉴定 85 株金黄色葡萄球菌,通过 OSAS 试验,共检出 MRSA 53 株,MRSA 检出率为 62.35%。双重 PCR 快速检测 MRSA,85 株金黄色葡萄球菌均扩增出 *Coag* 基因片段,其中 53 株扩增出 *mecA* 基因片段。双重 PCR 检测 MRSA 的结果与生化常规试验分离鉴定 MRSA 结果一致。结论 双重 PCR 法能快速、同时检测金黄色葡萄球菌血浆凝固酶 *Coag* 基因和耐药基因 *mecA*,有助于及早检出 MRSA,指导临床合理用药,控制 MRSA 传播。

**[关键词]** 金黄色葡萄球菌;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;*mecA* 基因;医院感染;流行病学;聚合酶链反应;抗药性;微生物

**[中图分类号]** R378.1<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)06-0401-03

Application of duplex PCR for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

GONG Yu-jiao<sup>1</sup>, WU Xin-wei<sup>1</sup>, QIU Feng<sup>2</sup>, HU Yu-shan<sup>1</sup>, ZHANG Xin-qiang<sup>1</sup>, YANG Zhi-cong<sup>1</sup> (1 Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China; 2 Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish duplex polymerase chain reaction(PCR) system for fast detecting *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and methicillin-resistant *S. aureus*(MRSA), guiding rational use of antimicrobials in clinical practice, and preventing MRSA spreading. **Methods** Two pairs of primers according to coagulase gene (*Coag*) and drug resistance gene (*mecA*) of *S. aureus* were designed, duplex PCR system was established and applied for amplifying *Coag* and *mecA* in 85 clinical *S. aureus* strains, amplification reaction result was compared with that of oxacillin-salt agar screening (OSAS) test. **Results** Of 85 clinical *S. aureus* isolates, 53 (62.35%) were MRSA detected by OSAS test. All 85 *S. aureus* isolates were detected *Coag* gene fragments by duplex PCR, and 53 of which were also detected *mecA* gene fragments, PCR results were consistent with OSAS test result for detecting MRSA. **Conclusion** Duplex PCR can detect *Coag* and *mecA* of *S. aureus* rapidly and simultaneously, and is helpful for early detection of MRSA, guidance of rational use of antimicrobial agents, and control of MRSA transmission.

**[Key words]** *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *mecA* gene; healthcare-associated infection; epidemiology; polymerase chain reaction; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2013, 12(6): 401-403]

[收稿日期] 2013-05-12

[作者简介] 龚玉姣(1973-),女(汉族),湖南省常德市人,副主任技师,主要从事病原微生物快速检测方法的研究。

[通讯作者] 杨智聪 E-mail:gdgzcdc@21cn.com

金黄色葡萄球菌是医院内外感染的重要病原菌。随着抗菌药物的长期使用和滥用,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染率不断上升,给临床治疗带来了很大困难<sup>[1-2]</sup>。金黄色葡萄球菌耐药基因 *mecA* 可作为 MRSA 鉴定的一项分子标志<sup>[3-4]</sup>。应用双重聚合酶链反应(PCR)法同时扩增金黄色葡萄球菌的凝固酶基因 *Coag* 和耐药基因 *mecA*,能够快速检测金黄色葡萄球菌及其耐药性,为临床实验室快速、准确鉴定 MRSA 提供新的诊断方法,对于临床合理用药具有指导意义。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 85 株金黄色葡萄球菌均分离自广东省中医院就诊患者标本。质控菌株包括金黄色葡萄球菌 ATCC 25923(敏感质控株)、金黄色葡萄球菌 ATCC 43300(耐药质控株)、表皮葡萄球菌 ATCC 12228 和大肠埃希菌 ATCC 25922,均购自卫生部临床检验中心。

1.2 引物设计与合成 根据编码基因设计 *Coag* 引物(5'-CGAGACCAAGATTCAACAAG-3', 5'-AAAGAA AACCCTCACATCAG T-3')和 *mecA* 引物(5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3', 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'),扩增产物片段分别为 810 bp 和 310 bp。引物序列由上海生物工程股份有限公司合成。

1.3 主要试剂与仪器 Mueller-Hinton 琼脂,购自英国 OXOID 公司;ABI 9700 型 PCR 扩增仪,购自美国 ABI 公司;BIO-RAD Gel Doc XR 凝胶电泳成像系统,购自美国 BIO-RAD 公司。

1.4 MRSA 常规鉴定 根据细菌形态、革兰染色、触酶、血浆凝固酶等生化试验鉴定金黄色葡萄球菌<sup>[5]</sup>;采用苯唑西林-高盐琼脂筛选试验(oxacillin-salt agar screening test, OSAS)检测 MRSA<sup>[6]</sup>。将已鉴定的金黄色葡萄球菌配制成 0.5 麦氏单位的菌悬液,涂布于苯唑西林-高盐琼脂平板(MHA + 4% NaCl + 6 μg/mL 苯唑西林),36℃ 培养 24 h 后对光检查。若平板上长出 >1 个菌落,视为待测菌对苯唑西林耐药。以标准菌株 ATCC 25923 作为阴性质控菌株,以 ATCC 43300 作为耐药阳性质控菌株。

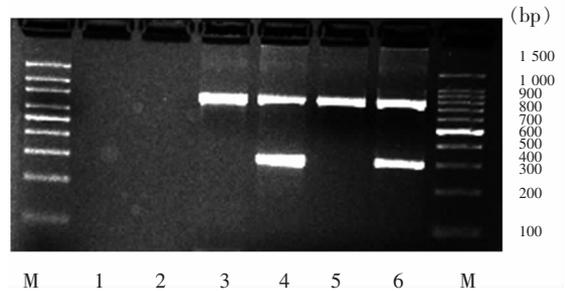
1.5 PCR 检测 MRSA (1)模板制备:经常规生化鉴定的金黄色葡萄球菌转种于血琼脂平皿,36℃ 培养 24 h,挑取单菌落于 7.5% NaCl 肉汤培养 18 h,

再取培养液 5 mL 离心,采用 DNA 提取试剂盒提取金黄色葡萄球菌 DNA。(2)*Coag* 基因和 *mecA* 基因的 PCR 扩增反应体系:2 mmol/L dNTP 2.5 μL, 10×缓冲液 5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5 μL, 2 U/μL Taq 酶 1 μL, 100 mmol/L 的 *Coag* 和 *mecA* 两种引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL, 加纯水至 25 μL。扩增循环条件:95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 39 个循环; 72℃ 5 min 延伸。(3)1.5% 琼脂(含 EB), 95 V 电泳 35 min, 于凝胶成像系统下观察。

## 2 结果

2.1 MRSA 常规鉴定 生化常规试验分离鉴定 85 株金黄色葡萄球菌,均涂布于苯唑西林-高盐琼脂上,检测出 MRSA 53 株,金黄色葡萄球菌对甲氧西林的耐药率为 62.35%。

2.2 双重 PCR 快速检测 MRSA 85 株金黄色葡萄球菌均能扩增出金黄色葡萄球菌 *Coag* 特异性基因片段,片段大小为 810 bp;其中 53 株扩增出大小为 310 bp 的耐甲氧西林 *mecA* 基因片段,与生化常规试验分离鉴定 MRSA 结果一致。见图 1。



M: DNA marker; 1: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; 2: *Escherichia coli* ATCC 25922; 3: *Coag* gene fragments of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 4: *Coag* and *mecA* gene fragments of MRSA ATCC 43300; 5: *Coag* gene fragments of isolated *Staphylococcus aureus*; 6: *Coag* and *mecA* fragments of isolated MRSA

图 1 双重 PCR 扩增金黄色葡萄球菌 *Coag* 基因和 MRSA *mecA* 基因片段产物图

Figure 1 Duplex PCR amplification of *Coag* and *mecA* gene fragments in *S. aureus*

## 3 讨论

金黄色葡萄球菌是医院感染和社区获得性感染

的重要病原菌,可引起败血症、肺炎、伤口化脓和骨髓炎等各种感染性疾病<sup>[7]</sup>。随着抗菌药物的大量使用,MRSA 感染发生率不断上升<sup>[8]</sup>。在伴有基础疾病、长期住院及免疫抑制的人群中,MRSA 有很高的发病率和死亡率<sup>[9]</sup>。魏全珍等<sup>[10]</sup>调查医疗环境中 MRSA 污染状况发现,在重症监护室(ICU)存在 MRSA 感染患者的病区环境中,MRSA 检出率高达 33.33%,这是造成 MRSA 交叉感染或暴发流行的潜在危险。MRSA 感染已引起全世界高度关注<sup>[11]</sup>,快速、准确鉴定 MRSA,对临床治疗 MRSA 感染极其重要。金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药,是由于其产生了一种 PBP2a 蛋白,PBP2a 与  $\beta$ -内酰胺类抗生素亲和力低,能够替代 PBPs 合成细菌细胞壁,从而使细菌产生耐药性<sup>[12]</sup>。*mecA* 即为编码金黄色葡萄球菌产生 PBP2a 蛋白的最主要基因,因此 PCR 检测 *mecA* 基因是目前分子生物学快速鉴定 MRSA 的“金标准”<sup>[13]</sup>,而血浆凝固酶是金黄色葡萄球菌 *Coag* 基因编码的特异性酶<sup>[14]</sup>。

本研究应用双重 PCR 在同一反应体系中同时特异性扩增 *Coag* 基因片段和 *mecA* 基因片段,大肠埃希菌和表皮葡萄球菌扩增结果均为阴性,而金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌均能扩增出相应的特异性基因片段,因此,本方法能检测金黄色葡萄球菌,同时鉴定其是否为 MRSA。运用此分子生物学方法对 MRSA 的检出率与 OSAS 常规检测 MRSA 试验的结果一致<sup>[15]</sup>。我们所建立的多重 PCR 方法不仅能快速检测金黄色葡萄球菌,还能同时检测 MRSA;与传统的细菌分离、鉴定及耐药性检测方法相比,多重 PCR 具有省时、敏感、特异性高和节省费用等多项优点。建立对 MRSA 的 PCR 快速检测体系,用以监测 MRSA 的流行趋势,预防 MRSA 的暴发流行及临床合理用药意义重大。

#### [参考文献]

[1] 岳阳,董玉莹,于芝颖,等. 抗甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌和耐万古霉素肠球菌药物的临床研究进展[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(13): 1131 - 1136.

- [2] Uhlemann A C, Otto M, Lowy F D, *et al.* Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Genet Evol, 2013, 5(3): 378 - 391.
- [3] Bonnstedter K K, Wolter D J, Tenover F C, *et al.* Rapid multiplex PCR assay for identification of USA 300 community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 141 - 146.
- [4] Askari E, Soleymani F, Arianpoor A, *et al.* Epidemiology of *mecA*-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran; A systematic review and meta-analysis[J]. Iran J Basic Med Sci, 2012, 15(5): 1010 - 1019.
- [5] 洪秀华. 临床微生物学检验[M]. 第 2 版. 北京: 科学技术文献出版社, 2005: 189 - 201.
- [6] 吴伟元, 王凌伟, 卢月梅, 等. 三种检测甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌方法的比较[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(2): 306 - 307.
- [7] 喻玲丽, 丁丽丽, 韦艳, 等. 社区获得性和医院获得性 MRSA 感染的差异[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(5): 345 - 347.
- [8] 张正银, 窦蓉, 卜方, 等. 外科重症监护室分离 MRSA 的流行病学研究[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(4): 270 - 273.
- [9] 纪冬梅, 王艳艳, 邓宝凤. 日本老年医院对 MRSA 感染者的管理[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11(4): 319 - 320.
- [10] 魏全珍, 刘丽华, 张惠珍, 等. 医务人员患者及陪护、环境 MRSA 带菌状况调查研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(9): 15 - 18.
- [11] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家委员会. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识[S]. 中华实验和临床感染病杂志, 2010, 4(2): 215 - 223.
- [12] Wang Z, Cao B, Liu Y, *et al.* Investigation of the prevalence of patients co-colonized or infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *enterococci* in China; a hospital-based study[J]. Chin Med J, 2009, 122(11): 1283 - 1288.
- [13] Pillai M M, Latha R, Sarkar G, *et al.* Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction and conventional methods: a comparative study[J]. J Lab Physicians, 2012, 4(2): 83 - 88.
- [14] Chapin K, Musgnug M. Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4324 - 4327.
- [15] Acosta-Pérez G, Rodríguez-Abrego G, Longoria-Revilla E, *et al.* Evaluation of four methods for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens at a regional hospital in Mexico[J]. Salud Public Mex, 2012, 54(1): 1 - 6.