

多通道 Taqman-探针荧光定量 PCR 鉴定 MRSA 方法的建立*

陈昌国,李艳君,郭建巍,陈秋圆,刘 敏,马志家,郝秀红,赵强元

(中国人民解放军海军总医院检验科,北京 100048)

摘要:目的 建立基于 *mecA*/*nuc*/*femB* 三基因联合的 Taqman-探针荧光定量 PCR 鉴定耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的方法。方法 以常规检验标本中分离和采用 VITEK 2 Compact 微生物分析仪鉴定为凝固酶阳性的 MRSA 为研究对象,通过 PrimerPremier5.0 和 Beacon Designer 7 软件设计针对 *mecA*/*nuc*/*femB* 特异性 PCR 引物及 Taqman 荧光探针,荧光探针 5'端分别采用 FAM, HEX 及 ROX 标记,3'端采用 BHQ1 标记,在荧光定量 PCR 仪进行检测。结果 ①1 g/dl 凝胶电泳结果显示 *mecA*/*nuc*/*femB* 三个基因引物特异性较好,扩增出的条带分子量与预期分子量一致且未见非特异性扩增;②在单管单通道及单管多通道的 PCR 检测中 *mecA*/*nuc*/*femB* 均获得特异性扩增,且三个基因在单管多通道的 PCR 扩增效果与单管单通道的相类似。结论 成功建立了多通道 Taqman-探针荧光定量 PCR 鉴定 MRSA 的方法, *mecA*/*nuc*/*femB* 三种基因联合检测可有效区分凝固酶阴性和阳性的 MRSA,提高鉴定 MRSA 的准确率。

关键词: Taqman-探针; 荧光定量 PCR; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 基因; 联合检测

中图分类号: Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)03-022-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2016. 03. 007

Establishment of Multi-channel Taqman-Probe Fluorescence Quantitative PCR Identification MRSA Method

CHEN Chang-guo, LI Yan-jun, GUO Jian-wei,

CHEN Qiu-yuan, LIU Min, MA Zhi-jia, HAO Xiu-hong, ZHAO Qiang-yuan

(Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, PLA., Beijing 100048, China)

Abstract: **Objective** To establish the method of identifying MRSA with Taqman-fluorescence quantitative PCR basing on *mecA*/*nuc*/*femB* three gene combined detecting. **Methods** Taking the coagulase positive MRSA, which isolated from the clinical samples and confirmed by VITEK 2 compact microbial analyzer, as the research object, designed *mecA*/*nuc*/*femB* specific PCR primers and Taqman fluorescent probe by bio-software PrimerPremier 5 and Designer Beacon 7, FAM, HEX and ROX markers were used to label the fluorescent probe at 5', and the end of 3' was labeled with BHQ1, detected by fluorescence quantitative PCR instrument. **Results** ①1 g/dl gel electrophoresis results showed that the primer's specificity of *mecA*/*nuc*/*femB* were good, and molecular weight of the amplification band consistent with the expected molecular weight and no non-specific amplification band. ②Three genes were obtained specific amplification in a single tube single channel and single tube multiple channel detection in PCR, and the three gene amplification effect in a single tube single tube single channel and multichannel PCR similar. **Conclusion** Successfully established a method of multi channel Taqman-probe fluorescence quantitative PCR identification of MRSA, *mecA*/*nuc*/*femB* combined detection can effectively differentiate coagulase negative and positive MRSA, improve the accuracy of identification.

Keywords: taqman fluorescence probe; fluorescence quantitative PCR; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; gene; combined detecting

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 于 1961 年首次发现^[1~3], 自上世纪 80 年代暴发流行后它的检出率逐年增加已成为医院感染重要的革兰阳性细菌, MRSA 与乙肝、艾滋病一起成为世界三大最难解决的感染性疾病^[4,5]。中国细菌耐药性监测 (CHINET) 2013 年的资料显示, 金黄色葡萄球菌占分离总菌株数的 9.61%, 其中 MRSA 在金黄色

葡萄球菌中的平均检出率为 45.2%, MRSA 分离率最高的医院达 72.0%^[6]。有研究指出对手术前病人及住院病人进行 MRSA 筛查, 可以显著降低手术后 MRSA 引起的感染及减少 MRSA 的传播^[7]。那么, 快速有效的 MRSA 检测手段是控制 MRSA 传播的先决条件, 是 MRSA 防治中十分重要的一环, 实现 MRSA 的快速检测对于指导临床 MRSA 的预防和治疗十分有益^[8]。本研究拟建立

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81401311); 首都临床特色应用研究, 立项编号: Z141107006614009; 院内创新基金, 立项编号: CXPY201412。

作者简介: 陈昌国 (1979-), 男, 博士, 主管技师, 从事分子诊断工作, 研究方向: 肿瘤免疫及新型血清肿瘤标志物的研究, Tel: 010-66951224, E-mail: 1234_chen@sina.com。

基于多通道 Taqman-探针荧光 PCR 方法鉴定临床标本来源的金黄色葡萄球菌菌株,现将结果报道如下:

1 材料与方法

1.1 一般资料 依据 2011 年《耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识》^[9]对常规检验标本中的金黄色葡萄球菌菌株进行常规分离和 VITEK 2 Compact 微生物分析仪鉴定。最低抑菌浓度 (MIC) 测定采用琼脂平皿对倍稀释法, ATCC25923 为敏感质控株, BB270 为高耐质控株。MIC 判定标准参照美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 2004 常规标准, 苯唑西林 MIC $\leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 为甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA); 苯唑西林 MIC $\geq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 者为 MRSA。

1.2 仪器与试剂 荧光定量 PCR 仪为上海宏石公司 SLAN-96P Real Time PCR System, SYBR[®] Green QPCR Master Mix 购自天根生物科技有限公司; PCR 引物及 Taqman 荧光探针由奥科生物合成; 将保存菌种从 -80°C 冰箱取出后快速复温, 在哥伦比亚血平板上接种后取菌至 1.5 ml 离心管中, 加入 100 μl 核酸裂解液后室温裂解 15 min, 100°C 恒温金属浴加热 10 min, 室温 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清作为模板。

1.3 引物及 Taqman-探针设计 从 NCBI 网站输入基因名称获取基因序列, 运用生物软件 Beacon Designer 7 和 Primer Premier 5.0 进行 PCR 特异性引物及 Taqman 荧光探针设计, 探针 5' 端分别标记 FAM, HEX 和 ROX, 3' 端标记 BHQ1, 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 按照引物及探针合成单建议的加水量进行处理。

1.4 核酸模板制备 在 1.5 ml Eppendorf 管中加入裂解液 [NaOH, Tris-Hcl (PH8.0), Triton-100, NP-40, Chelex-100, EDTA (PH8.0)] 100 μl , 挑取血平板上的单个菌落置入管内并用无菌吸样枪头反复吹打 3~5 次, 置 100°C 金属浴 10 min, 12

000 r/min 室温离心 5 min, 上清即为 PCR 检测的模板。

1.5 PCR 反应体系及条件 取 2 μl 提取液上清为模板, 以 mecA/nuc/fem B 特异性引物及 Taqman-探针进行荧光定量 PCR 检测, 体系内含 SuperReal PreMix(Probe) 10 μl , 引物 1 μl , 探针 0.5 μl , ddH₂O 视情况补足反应体系, PCR 反应条件为 95°C 5 min; 94°C 10 s, 60°C 40 s, 40 个循环, 收集荧光。

1.6 PCR 产物 电泳 10 μl PCR 产物加 2 μl 6 \times 上样缓冲液, 混匀, 加入凝胶梳齿中, 同时加入 DNA 分子量 Marker (DL2000) 作为标准, 100 v 稳压电泳 20~30 min 置于紫外光下, 观察电泳条带并扫描, 保留照片。

2 结果

2.1 三个基因 PCR 引物扩增结果 见图 1。以 mecA, nuc 及 fem B 特异性引物进行 PCR 反应, 反应结束后将 PCR 扩增产物进行 1 g/dl 凝胶电泳, 未发现杂带并且条带位置与预期一致, mecA 105bp, nuc 154 bp, fem B 183bp, 说明 PCR 引物特异性较好。

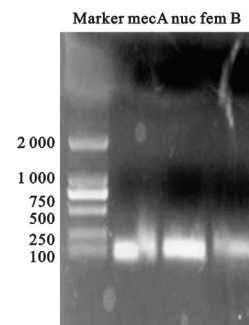


图 1 mecA, nuc 及 fem B PCR 产物凝胶电泳结果

2.2 三个基因单管单通道 PCR 检测结果 见图 2。对 mecA, nuc 及 fem B 在单管中分别进行扩增, 三个基因均获得特异性曲线, 表明引物及 Taqman 探针的特异性及敏感性较好。

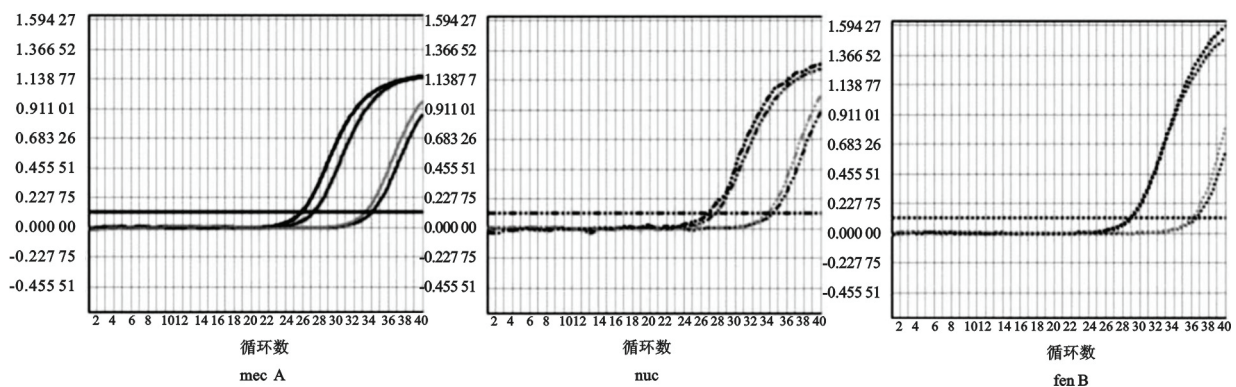


图 2 mecA, nuc 及 fem B 单管 PCR 结果

2.3 三个基因单管单通道检测及单管多通道检测 PCR 检测结果 见图 3。mecA, nuc 在单管单通道(蓝色)及单管多通道(红色)中的 PCR 曲线基本

一致, fem B 在单管多通道中的 PCR 曲线较其在单管单通道中的检测曲线略差, 但是仍能获得有效的扩增曲线。

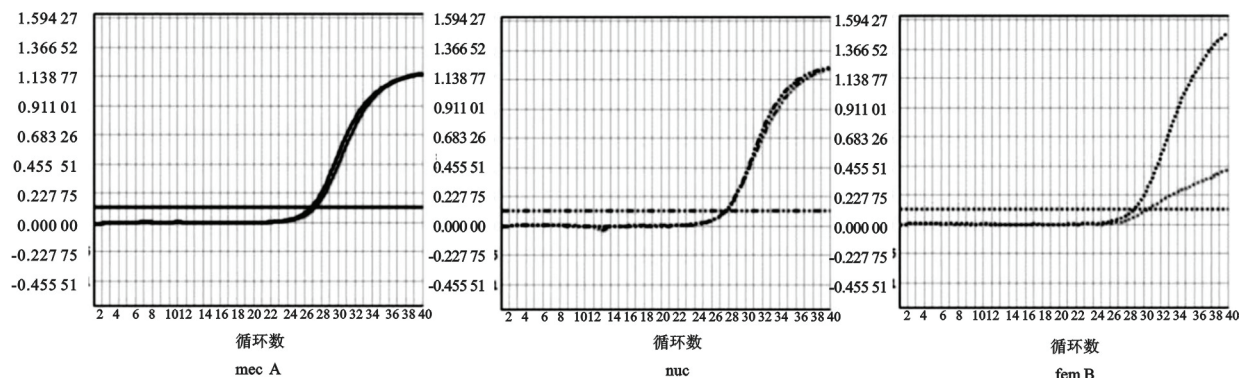


图3 mecA, nuc 及 fem B 单管单通道及多通道 PCR 结果

3 讨论 细菌耐药是各国卫生机构所面临的重要问题之一,而耐药菌株在世界范围内的流行及多重耐药菌株的出现更是严重威胁着人类的健康^[1]。MRSA 作为重要的医院感染和社区感染的病原菌之一,对所有的 β -内酰胺类抗菌药物耐药,且对其他种类的抗菌药物也常表现为交叉耐药是临床抗感染治疗的难题之一。随着 MRSA 的分离率不断上升,快速、准确检测 MRSA 不仅对临床选用合适的抗菌药物,而且对控制 MRSA 传播均具有重要意义^[17]。目前,美国临床与实验室标准学会(clinical laboratory standards institute, CLSI)推荐用于 MRSA 的标准检测方法有:①表型检测法:包括药敏纸片法、苯唑西林(Oxacillin)-盐琼脂筛查法、 β -内酰胺酶检测、E-test 试验(MIC of oxacillin)和肉汤稀释法等;②基因检测法:包括 PCR, 基因探针等方法;③蛋白质检测法^[11,12]。探针法实时荧光定量 PCR 法可以在 2~4 h 内特异、快速的检测 MRSA 株,提高检测灵敏度和特异度,克服以表型特征为基础检测方法的缺点和影响因素^[13~15]。

Taqman-荧光定量 PCR 法由于在上、下游引物外还加入了具有序列特异性的探针使其特异度较染料法(SYBR Green 法)特异度更高,是临床标本检测中常用的方法之一。mecA 基因是 MRSA 特有的耐药基因,在其耐药性中起决定性的作用,来自凝固酶阴性葡萄球菌或肠球菌属,通过转座子或 R 质粒转到原本敏感的金黄色葡萄球菌中,并整合在染色体第 10 节段上,编码具有低亲合力的青霉素结合蛋白即 PBP2a 从而产生耐药性^[1,15],牟晓峰等^[18]建立了基于 mec A 基因的 Taqman-荧光定量 PCR 法并对 182 例临床标本来源的 MSSA 和 MRSA 检测,结果显示该方法敏感度、特异度、阳性预测值及阴性预测值都能够满足科研和临床应用。在本研究中 mecA 引物能够特异性的扩增

到 105 bp 特异性条带,表明针对 mecA 引物的特异度能够满足实验要求;在 PCR 体系中加入 mecA 特异性 Taqman 荧光探针后,单管单通道及单管多通道的 PCR 反应均获得较好的 PCR 扩增曲线。nuc 基因编码耐热核酸酶,不仅是葡萄球菌属所特有的,并且在不同菌株之间具有较高的保守性^[14,15],在检测 mecA 基因同时会选择 nuc 基因作为鉴定金黄色葡萄球菌的辅助基因,本研究中 nuc 的 PCR 引物能够获得 154 bp 特异性条带,在 PCR 体系中加入 nuc 特异性 Taqman 荧光探针后,单管单通道及单管多通道同样获得较满意的 PCR 扩增曲线。近年的研究表明, fem B 基因作为金黄色葡萄球菌所特有的 mecA 基因的辅助调控基因,在与 mecA 基因协同才能表达对甲氧西林的耐药性具有重要的作用。femB(factors essential for the expression of methicillin resistance B)是葡萄球菌属相对保守的基因,被认为是其特异的表达基因,但凝固酶阴性的葡萄球菌(coagulase-negative staphylococci, CNS)不表达该基因,是 MRSA 所特有的甲氧西林耐药必须因子^[16],同时联合检测 femB 基因不仅可快速鉴定出是否为凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌,又可判断其耐药类型,能为 MRSA 的感染诊断和治疗提供一定的依据^[19]。本研究中 femB 的 PCR 引物扩增获得 183bp 的条带,加入 Taqman 荧光探针后虽然单管多通道的扩增曲线较单管单通道扩增效果差,但能够满足后续实验需要。

本实验针对 MRSA 的三个特异性基因 mecA, nuc 和 femB 设计特异性引物和 Taqman 荧光探针,通过体系优化使得三个基因能够在一个 PCR 管中同时完成进行扩增,通过扩增曲线即可判读结果的阴阳性,联合三个基因可以较好完成 MRSA 的快速鉴定并能够有效区分 MRSA 和 CNS。总

之,多基因联合检测对于精确鉴定凝固酶阳性 MRSA 是一种较好的手段。

参考文献:

- [1] Otter JA, Tosas-Auguet O, Herdman MT, et al. Implications of targeted versus universal admission screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in a London hospital[J]. J Hosp Infect, 2014, 87(3):171-174.
- [2] Cole WH. Performance of the "C. I. G." two-canister carbondioxide absorber[J]. Med J Aust, 1961, 48(1): 124-125.
- [3] Deeny SR, Cooper BS, Cookson B, et al. Targeted versus universal screening and decolonization to reduce healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. J Hosp Infect, 2013, 85(1):33-44.
- [4] Abdulgader SM, Shittu AO, Nicol MP, et al. Molecular epidemiology of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Africa: a systematic review[J]. Front Microbiol, 2015(6):348.
- [5] Hsu LY, Harris SR, Chlebowicz MA, et al. Evolutionary dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* within a healthcare system[J]. Genome Biol, 2015(16):81.
- [6] 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(5):321-329.
- Zhu DM, Wang F, Hu FP, et al. CHINET 2010 surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chin J Infect Chemother, 2011, 11(5):321-329.
- [7] Jog S, Cunningham R, Cooper S, et al. Impact of pre-operative screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by real-time polymerase chain reaction in patients undergoing cardiac surgery[J]. J Hosp Infect, 2008, 69(2):124-130.
- [8] Tacconelli E, De Angelis G, de Waure C, et al. Rapid screening tests for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission: systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(9):546-554.
- [9] 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 2011 年更新版[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2011, 5(3):66-72.
- Committee of Experts on Prevention and Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Experts consensus on prevention and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Infectious Diseases (Electronic Version), 2011, 5(3): 66-72.
- [10] Baines KJ, Simpson JL, Gibson PG. Innate immune responses are increased in chronic obstructive pulmonary disease[J]. PLoS One, 2011, 6(3):e18426.
- [11] Polisen J, Chen S, Cimon K, et al. Clinical effectiveness of rapid tests for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitalized patients: a systematic review[J]. BMC Infect Dis, 2011(11): 336.
- [12] Harbarth S, Hawkey PM, Tenover F, et al. Update on screening and clinical diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(2):110-117.
- [13] Pasanen T, Korkeila M, Mero S, et al. A selective broth enrichment combined with real-time nucA-PCR in the exclusion of MRSA[J]. APMIS, 2010, 118(1):74-80.
- [14] Kilic A, Basustaoglu AC. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles[J]. Res Microbiol, 2011, 162(10):1060-1066.
- [15] 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.
- [16] Akcam FZ, Tinaz GB, Kaya O, et al. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in mecA-positive *Staphylococcus aureus*, and comparison of mecA with femA, femB, femX positivities [J]. Microbiol Res, 2009, 164(4):400-403.
- [17] Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(9):629-641.
- [18] 牟晓峰,赵白云. 实时荧光定量 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌方法的建立与应用评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(19):4185-4187.
- Mu XF, Zhao ZY. Establishment and clinical application of realtime PCR method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. China Journal of Nosocomiology, 2011, 21(19):4185-4187.
- [19] 黄辉,陈颖,安如俊,等. MRSA 中 mecA 及 femB 基因的检测与耐药相关性[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(3):54-56.
- Huang H, Chen Y, An RJ, et al. Assay of genes mecA and femB in MRSA in the expression associated with drug resistance[J]. Journal of Microbiology, 2009, 29(3):54-56.

收稿日期:2015-06-09

修回日期:2016-03-11