实时荧光 PCR 检测 MRSA 对减少儿科 ICU 病区医院感染的效果观察

戴颖, 汪奇伟, 何书, 张昭

作者单位: 475003 开封, 河南大学淮河医院儿科

作者简介: 戴颖(1971-), 女, 大学本科, 医学学士, 副主任医师, 研究方向: 儿童呼吸系统疾病的诊治。E-mail: dy5280@126.com

[摘要] 目的 观察实时荧光 PCR 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)对减少儿科 ICU 病区医院感染的效果。方法 选取 2011-07~2012-06 实时荧光 PCR 法检测的儿科 ICU 病区标本 856 份, 其结果与分离培养药敏试验法的检测结果进行比较; 另与 2009-07~2010-06 MRSA 医院感染率进行比较。结果 实时荧光 PCR 法与分离培养药敏试验法对金葡萄菌检测的一致率为 100%, 均检测出 33 株金葡萄菌阳性株。实时荧光 PCR 法与分离培养药敏试验法检测 MRSA 的符合率为 93.9%。分离培养药敏试验法检测为阴性而实时荧光 PCR 法检测为阳性的 2 株待检菌的测序结果显示为阳性。利用实时荧光 PCR 法检测 MRSA 后, 医院感染率从 36.4% 下降到 16.7%。结论 实时荧光 PCR 法能更及时、更准确发现 MRSA, 从而早隔离、早治疗, 减少 MRSA 医院感染。

[关键词] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 实时荧光 PCR; 医院感染; 儿科 ICU 病区

[中图分类号] R 378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)06-0538-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.06.14

Reduction of nosocomial infection of MRSA in pediatric intensive care unit by real-time fluorescence PCR

DAI Ying, WANG Qi-wei, HE Shu, et al. Department of Pediatrics, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475003, China

[Abstract] **Objective** To reduce nosocomial infection of methicillin-resistant staphylococcus aureus(MRSA) in pediatric intensive care unit(PICU) by real-time fluorescence PCR. **Methods** From July 2011 to June 2012, 856 specimens in PICU were detected for MRSA by using real-time fluorescence PCR and isolation-culture-K-B paper disk diffusion method. The nosocomial infection rate during the period from July 2009 to June 2010 was compared with that from July 2011 to June 2012. **Results** Thirty-three strains of staphylococcus aureus were identified by culture and real-time fluorescence PCR. Of the 33 clinical isolated staphylococcus aureus, 12 isolates were defined as MRSA by K-B paper disk diffusion method and 14 isolates were defined as MRSA by real-time fluorescence PCR. The two isolates which were defined as positive by real-time fluorescence PCR and negative by K-B paper disk diffusion method were proved to be MRSA positive by sequencing method. Nosocomial infection rates reduced from 36.4%, 37.5% to 16.7%. **Conclusion** The real-time fluorescence PCR can identify MRSA more rapidly and accurately and help reduce the rate of nosocomial infection of MRSA in PICU.

[Key words] Methicillin resistant staphylococcus aureus; Real-time fluorescence PCR; Nosocomial infection; Pediatric intensive care unit(PICU)

随着抗菌药物的广泛应用,致使耐药菌群越来越多,其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)是目前医院感染最常见的致病菌之一,已成为严重威胁着人类健康的“超级细菌”^[1]。为了探讨减少医院感染的发生率,我们利用实时荧光 PCR 法进行 MRSA 检测,观

察该检测方法对减少医院感染发生率的效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集我院 2011-06~2012-06 儿科 ICU 病区(不包括新生儿病区)送检的各种临床标本,剔除同一患者相同部位的重复菌株,共 856 份标本。

1.2 菌株来源 金黄色葡萄球菌(ATCC25923、ATCC29213)标准菌株均购自卫生部临床检验中心。

1.3 主要仪器与试剂 Lightcycler 荧光 PCR 扩增仪购自瑞士罗氏公司;头孢西丁药敏片(30 μg/片)购自英国 Oxoid 公司;M-H 琼脂购自浙江省军区后勤部卫生防疫检验所;MRSA 检测试剂盒购自上海之江生物科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒为上海生物工程公司产品。

1.4 标本的细菌分离培养 采用 GB/478910-2010 法,将临床的 856 株样本用 7.5% NaCl 肉汤作为培养基,在 36 °C 下培养 24 h(分离培养药敏试验)或 6 h(实时荧光 PCR),然后将培养物划线接种到血平皿和 Baird-Parker 平皿上,36 °C 下培养 24 h,挑取可疑菌落行革兰染色镜检和血浆凝固酶试验。

1.5 金葡菌纸片扩散法(K-B 纸片法)药物敏感试验(以下简称药敏试验) 采用 CLSI 推荐的 K-B 纸片法进行,以金葡菌 ATCC 29213 为 MRSA 阳性参考菌,以金葡菌 ATCC 25923 为 MRSA 阴性参考菌及药敏质控菌同时进行检测。

1.6 实时荧光 PCR 检测法 (1)模板 DNA 的制备:将增菌 6 h 的肉汤增菌液 1.5 ml 离心收集细菌,将阳性对照品、阴性对照品和各样本的增菌液 100 μl 置于 1.5 ml 灭菌的离心管中,分别加入核酸抽提液 100 μl,充分混匀,沸水浴 10 min,然后以 13 000 r/min 的速度离心 5 min,取上清液备用。(2)PCR 反应体系配制:取 n × 36 μl MRSA 耐药基因核酸荧光 PCR 检测混合液与 0.4 μl 酶(n 为反应管数)振荡混匀数秒,3 000 r/min 瞬时离心。(3)PCR 检测:取上述混合液 36 μl 置于 PCR 管中,然后将阴性对照品、样本、阳性对照品的处理上清液各 4 μl 分别加入各个已有混合液的 PCR 管中,盖好管盖,按以下循环参数进行 PCR 检测。循环参数设置为 37 °C 2 min,94 °C 2 min,循环 1 次;再按 93 °C 15 s,60 °C 60 s,循环 40 次;荧光检测在 60 °C 条件下进行,反应体系为 40 μl。荧光通道检测选用 FAM 通道和 HEX 通道。本研究采用上海之江生物科技有限公司的 MRSA 检测试剂盒,其检测原理为:分别针对金葡菌核酸基因 nuc 的保守片段序列和耐药基因 mecA 序列设计 2 对特异性引物和 2 条特异性探针,其中针对 mecA 基因的特异性探针用 FAM 荧光素进行标记,针对 nuc 基因的特异性探针用 HEX 荧光素进行标记,分别对应 PCR 仪中的 FAM 通道和 HEX 通道。(4)结果判断:用“+”表示检测结果为阳性;用“-”表示检测结果为阴性。实验结果的判断见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 检测结果判断标准

FAM 通道	HEX 通道	结果判断
+	+	MRSA
-	+	金葡菌阳性(非 MRSA 菌株)
+	-	mecA 基因阳性
-	-	金黄色葡萄球菌阴性

1.7 核酸测序法 对于上述两种检测方法检测结果不相符的待检样本,采用核酸测序法进行复核,作为最后的鉴定结果。具体方法是将药敏培养法检测结果与实时荧光 PCR 法检测结果不符的样本进行核酸提取,并利用 mecA 引物进行 PCR 核酸扩增,将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。DNA 回收按试剂盒说明书进行,将回收好的目的 DNA 片段产物送金唯智生物科技有限公司测序,测序结果同数据库中序列进行比对。

2 结果

2.1 两种方法检测金葡菌结果比较 利用实时荧光 PCR、细菌分离培养法检测 856 份怀疑感染患者的样本,从中检测出 33 株金葡菌阳性样本,二者的符合率为 100%。见表 2。

表 2 两种方法检测金葡菌结果比较[株(n)]

检测方法		细菌分离培养法		合计
		阳性	阴性	
实时荧光 PCR	阳性	33	0	33
	阴性	0	823	823
合计		33	823	856

2.2 两种方法检测 MRSA 结果比较 在检出的 33 株金葡菌中,细菌分离培养法检测出 12 株 MRSA 阳性株。实时荧光 PCR 法检测出 14 株 MRSA 阳性株(包括分离培养药敏试验法检测出的 12 株),实时荧光 PCR 法灵敏度更高。见表 3。

表 3 两种方法检测 MRSA 结果比较[株(n)]

检测方法		细菌分离培养法		合计
		阳性	阴性	
实时荧光 PCR	阳性	12	3	15
	阴性	0	18	18
合计		12	21	33

2.3 测序法检测结果 将 2 株分离培养药敏试验法与实时荧光 PCR 法检测不符的样本 PCR 扩增产物克隆入 T 载体,送金唯智生物工程公司测序,2 个样本 PCR 产物测序结果的序列比对结果与 mecA 基

因序列 100% 同源,说明实时荧光 PCR 法检测阳性为真阳性,分离培养药敏试验法结果为假阴性。

2.4 实时荧光 PCR 法对儿科 ICU 病区 MRSA 医院感染的影响 2011-07 ~ 2012-06,我们利用实时荧光 PCR 法监控 MRSA 的发生。为了判断实时荧光 PCR 法能否减少医院 MRSA 的发生,我们以分离培养药敏实验为对照,比较 2009-07 ~ 2011-06 与 2011-07 ~ 2012-06 MRSA 医院感染率。见表 4。

表 4 实时荧光 PCR 法检测对 MRSA 医院感染率的影响

	入院 24 h 内 检出数	入院 24 h 后 检出数	医院感染率 (%)
2009-07 ~ 2010-06	7	4	36.4
2010-07 ~ 2011-06	10	6	37.5
2011-07 ~ 2012-06	10	2	16.7

3 讨论

3.1 有效预防和控制 MRSA 感染的关键是及时、准确地检测出 MRSA,为临床合理使用抗生素提供参考依据。目前检测 MRSA 的方法主要有传统的微生物经典检测法(如苯唑西林-盐平板筛选法、纸片扩散法等)和现代分子生物学检测法(以 PCR 为代表)^[2-4]。国内大部分医疗机构目前多采用基于细菌培养结合药敏试验。

3.2 MRSA 多重耐药是因为具有获得性 mecA 基因,mecA 基因编码青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)为葡萄球菌属青霉素结合蛋白 2(PBP2)的异构体,同样具有转肽酶活性,但与 PBP2 不同的是 PBP2a 与 β -内酰胺类结合力较弱,因此 β -内酰胺类药物不能充分抑制 PBP2a 的转肽酶活性,细菌得以生存^[5]。

3.3 常规分离培养药敏试验中,MRSA 检测常选用苯唑西林纸片扩散法。该方法对实验条件要求相对 PCR 法较低,但该方法最低抑菌浓度在临界值时,检测结果判定容易出现误判。此外存在所谓隐匿型 MRSA。这种隐匿型 MRSA 菌株与 β -内酰胺类抗菌药物接触后,都可转化为甲氧西林耐药菌株。临床上只要检出 mecA 基因,不管其表型是否敏感均应视为甲氧西林耐药菌。因此,应用 PCR 法检测 mecA 基因比头孢西丁纸片扩散法等表型法检测 MRSA 的结果更加可靠。美国临床及实验室标准化研究所(CLSI)推荐无论是检出 mecA 基因还是 PBP2a 均可报告 MRSA 阳性,故直接检测金黄色葡萄球菌(金葡菌)中的耐药基因 mecA 的 PCR 方法被公认为是检测 MRSA 的“金标准”,受到越来越多临床实验室的青睐^[6]。

3.4 本研究的结果也表明实时荧光 PCR 的方法不仅完全检出分离培养药敏试验法中出现的 12 例阳性结果,而且检出分离培养药敏试验法的 2 例假阴性结果,说明该方法具有较高的灵敏性;该方法检测的阴性结果与分离培养药敏试验法一致,说明该方法具有同样的特异性。此外,实时荧光 PCR 法检测 MRSA 可以在 8 ~ 10 h 内得到诊断结果,比常规方法可以提前 2 ~ 3 d。因此实时荧光 PCR 法比分离培养药敏试验法能够更加准确、及时地发现 MRSA,这对于防止 MRSA 在院内的传播具有重要意义。我们初步在儿科 ICU 病区应用实时荧光 PCR 法监控 MRSA,结果表明在应用荧光 PCR 法后:MRSA 的医院感染率从 36.4%、37.5% 下降到 16.7%。结果提示我们实时荧光 PCR 法监控 MRSA,可以做到早发现,从而有利于早隔离、早治疗,降低 MRSA 医院感染的发生率。目前实时荧光 PCR 法监控 MRSA 的方法成本比较高,对其卫生经济学分析有待进一步进行。此外,目前实时荧光 PCR 法监控 MRSA 基本采用的是探针法,如果能够在不降低灵敏性、特异性的前提下,研制出利用 SYBREE 的实时荧光定量 PCR,将会降低检测成本,促进其在临床的推广应用^[7]。

参考文献

- 1 陈其庆. 耐药性引发——美国 MRSA 风波[J]. 中国卫生产业, 2008,5(3):88-90.
- 2 Weist K, Cimbal AK, Lecke C, et al. Evaluation of six agglutination tests for staphylococcus aureus identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant S. aureus (MRSA) [J]. J Med Microbiol, 2006,55(Pt 3):283-290.
- 3 van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, et al. Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) detection; comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSA Select, and CHROM agar MRSA) for use with infection-control swabs [J]. J Clin Microbiol, 2007,45(8):2486-2490.
- 4 朱以军, 李向阳. 荧光实时 PCR 法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007,17(7):898-900.
- 5 杨清宇, 刘荣森. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(4):478-480.
- 6 胡继红, 高振翔, 尹铭芳. 美国 NCCLS 2002 年版抗生素药敏试验操作标准更新内容[J]. 中华检验医学杂志, 2002,25(6):367-369.
- 7 Tan TY, Corden S, Barnes R, et al. Rapid identification of methicillin-resistant staphylococcus aureus from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001,39(12):4529-4531.

[收稿日期 2014-12-15][本文编辑 韦颖]