

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.09.003

· 论 著 ·

qPCR 快速检测金黄色葡萄球菌及 MRSA 方法的建立及评价

窦宇红, 梁 鸿, 何 玥, 刘和录, 刘 琼, 马彩凤, 李玉霞

(广州医科大学附属深圳沙井医院, 广东 深圳 518104)

[摘要] **目的** 建立 qPCR 法快速检测金黄色葡萄球菌及其 *mecA* 基因, 以期快速精准诊断金黄色葡萄球菌感染及初步判断耐药情况。**方法** 从 NCBI 数据库下载金黄色葡萄球菌 *nuc*、*atl*、*icaB*、*fnbA*、*hla*、*srap* 基因序列用于鉴定标志筛选, *mecA* 基因序列用于 MRSA 标志筛选; 经 DNA MAN 比对后, 选择各基因保守区分别设计 1~2 套引物、探针, 建立单重及双重 qPCR, 用临床分离株及标准菌株筛选出检测性能最好的基因片段作为检测标志物, 建立金黄色葡萄球菌鉴定和耐药双重 qPCR 检测方法, 并进行性能评价。**结果** 经筛选, 金黄色葡萄球菌 *atl* 基因 (CP009361.1:1010217~1010341)、*mecA* 基因 (KF058908.1:1715~1843) 两片段检测性能最优, 将其作为标志物建立双重 qPCR 法。该方法的检测下限均低至 4 copies/反应; 扩增线性范围均达 $2.0 \times 10^{2-8}$ copies/mL。335 份金黄色葡萄球菌 (含 94 份 MRSA) 培养阳性的患者样本中, qPCR 法分别检出 SA 335 份, MRSA 94 份; 95 份金黄色葡萄球菌培养阴性的患者样本中, qPCR 法分别检出 SA 17 份, MRSA 4 份, 经 PCR 产物测序, 与标准菌株同源性均 $\geq 90\%$ 。双重 qPCR 法从样品处理到报告结果 ≤ 2.0 h。**结论** qPCR 法方法简便、快速、灵敏度高、特异性好, 可望提高金黄色葡萄球菌感染的诊断能力并实现快速检测, 为尽早精准治疗赢得时间。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; MRSA; *atl* 基因; *mecA* 基因; 精准诊断; qPCR

[中图分类号] R378.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)09-0764-06

Establishment and evaluation of a quantitative real-time PCR assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

DOU Yu-hong, LIANG Hong, HE Yue, LIU He-lu, LIU Qiong, MA Cai-feng, LI Yu-xia
(Shenzhen Shajing Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Shenzhen 518104, China)

[Abstract] **Objective** To establish a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* (SA) and its *mecA* gene, rapidly and accurately diagnose SA infection as well as preliminarily determine its drug resistance. **Methods** Sequences of *nuc*, *atl*, *icaB*, *fnbA*, *hla*, and *srap* genes of SA were downloaded from NCBI database for screening of markers, and sequence of *mecA* gene was used for screening of methicillin-resistant SA (MRSA); sequence alignment was conducted by DNA MAN, conserved region of each gene sequence was employed for designing primers and fluorogenic probes. Simplex and duplex qPCR were established, and gene sequences with the best detection performance were screened by clinical and standard strains as markers, a duplex qPCR system for identifying SA and drug resistance was developed and evaluated. **Results** The *atl* gene (CP009361.1:1010217-1010341) and *mecA* gene (KF058908.1:1715-1843) possessed the best detection performance, and were used as detection markers in the duplex qPCR system. qPCR system could amplify both targets in a range of $2.0 \times 10^{2-8}$ copies/mL with a strong linear relationship and lower detection limits for both targets reached 4 copies/PCR. Among 335 positive culture specimens for SA (including 94 MRSA) from patients, 335 and 94 specimens were detected SA and MRSA by duplex qPCR respectively; among 95 negative culture specimens for

[收稿日期] 2018-05-16

[基金项目] 深圳市科技研发资金项目 (JCYJ20150402095058885); 深圳市宝安区科技计划 (2014201)

[作者简介] 窦宇红 (1974-), 女 (汉族), 河南省卫辉市人, 副主任检验技师, 主要从事微生物和分子生物学检验。

[通信作者] 刘和录 E-mail: 185766321@qq.com

SA from patients, 17 and 4 specimens were detected SA and MRSA by duplex qPCR respectively, PCR products were sequenced, the homology with standard strain were all $\geq 90\%$. Time from specimen processing to result reporting was ≤ 2.0 hours by duplex qPCR method. **Conclusion** qPCR method is simple, rapid, sensitive, and specific, it's a promising way to improve the diagnostic efficacy of SA infection and achieve the rapid detection, which contributes to the early precision treatment.

[Key words] *Staphylococcus aureus*; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA; *atl* gene; *mecA* gene; precision diagnosis; quantitative real-time PCR; qPCR

[Chin J Infect Control, 2018, 17(9): 764 - 769]

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是人类的一种重要病原菌,既可引起严重的社区获得性感染^[1],也可引起严重的医源性感染^[2]。由于其症状与其他细菌感染无明显差异,临床难以针对该菌感染进行早期精准诊断,且其耐药问题日益突出,严重影响治疗效果^[3]。培养法是目前常用的检测方法,也是金标准,但需 2~3 d,甚至更久,其时效性、简便性、灵敏度等均无法满足临床快速精准诊断的需求^[4]。研究通过多重降落聚合酶链反应 (qPCR) 方法检测血流耐甲氧西林 SA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 感染,结果具有高灵敏度与特异度,有利于指导临床使用抗菌药物^[5]。但通过电泳分析 PCR 产物,易造成实验室污染而出现假阳性。沈蕾等^[6]比较上海之江的 MRSA-PCR 快速检测方法,发现除阴性预测值较好外,灵敏度、特异度及阳性预测值均较低^[6]。笔者基于 Taqman 探针技术,同时检测 SA 种属特异性和耐药基因效果较好,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究样本 (1) 随机复苏笔者医院 2015 年 1 月—2017 年 12 月冻存的经生化反应或质谱鉴定为 SA 的菌株 93 株 (含 32 株 MRSA)、凝固酶阴性葡萄球菌 (CNS) 93 株 [含 26 株耐甲氧西林 CNS (MRCNS)] 及金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 和 ATCC 43300 用于引物、探针筛选。(2) 留取同期笔者医院就诊的 SA 感染患者样本 335 份 (含 MRSA 感染 94 份) 及培养阴性的脓性样本 95 份用于诊断评价。

1.2 仪器与试剂 (1) 细菌分离培养基购自郑州安图公司,包括哥伦比亚血琼脂、普通营养琼脂;血培养仪 (BacT/ALERT 3D 120)、细菌鉴定药敏分析仪 (VITEK 2 Compact)、质谱鉴定仪 (VITEK MS)、染色仪 (PREVI[™] Color Gram) 及其配套试剂均购

自法国生物梅里埃公司。(2) 核酸提取仪 (ExPure20) 及其配套磁珠法提取纯化试剂购自深圳市汇研科创公司。(3) 荧光定量 PCR 仪 (Light-Cycler480) 购自德国罗氏公司,多重荧光定量 PCR 体系 (Platinum[™] Multiplex PCR Master Mix) 购自美国赛默飞公司。(4) PCR 产物测序委托 Life technologies 公司完成。

1.3 细菌培养鉴定与 MRSA 检测 增菌、分离及纯化培养、革兰染色、生化鉴定、质谱鉴定、MRSA 检测等均严格按仪器及其配套试剂 SOP 文件操作,按美国临床实验室标准化协会 (CLSI) M100 - S27 标准,将头孢西丁最低抑菌浓度 (MIC) $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 判断为 MRSA^[7]。

1.4 核酸提取与纯化 (1) 纯培养物核酸提取:挑取复苏后的对数生长期纯培养菌落,用生理盐水调成 0.5~1.0 麦氏浊度单位菌悬液,8 h 内完成菌悬液核酸提取。(2) 原始样本核酸提取:各类原始样本接种完毕后,选用对应的核酸提取试剂盒,严格按仪器及配套试剂 SOP 进行操作。(3) 提取纯化后的核酸模板吸入无 DNA 酶 EP 管,冻存于 -86°C 备用。

1.5 引物/探针设计、合成、标记 从 NCBI 数据库,分别下载 SA 耐热核酸酶 (thermonuclease, *nuc*)、自溶素 (autolysin, *atl*)、细胞黏附素 B (intercellular adhesin, *icaB*)、纤维粘连蛋白结合蛋白 A (fibronectin-binding protein, *fnbA*)、 α 溶血素 (alpha hemolysin, *hla*)、富丝氨酸血小板黏附素 (serine-rich adhesin for platelets, *srap*)、青霉素结合蛋白 2a (penicillin-binding protein 2a, *mecA*) 基因序列各 100 条,用 DNA MAN 进行序列比对,用 Primer 5 软件,避开变异区或突变点后,分别设计各基因的引物和探针,每个基因设计 1~2 套,委托 Life technologies 公司合成及标记。SA *nuc*、*atl*、*icaB*、*fnbA*、*hla*、*srap*、*mecA* 基因引物、探针设计及标记结果见表 1。

表 1 SA 各基因引物/探针设计与标记

Table 1 Primer/probe sequence and fluorogenic labeling of each SA gene

基因	引物/探针	序列及标记(5'~3')	Tm(°C)	长度(bp)
<i>nuc</i>	<i>nuc</i> 正向引物 1	GCTGGCATATGTATGGCAAT	56.30	158
	<i>nuc</i> 反向引物 1	GCATTTGCTGAGCTACTTAGAC	57.47	
	<i>nuc</i> 探针 1	FAM-AGGGATGGCTATCAGTAATGTTTCG-HBQ1	60.74	
	<i>nuc</i> 正向引物 2	GCTTAGCGTATATTTATGCTGATG	56.20	
	<i>nuc</i> 反向引物 2	AAGTTGTTTCATGTGTATTGTTAGGTTTA	58.18	
	<i>nuc</i> 探针 2	ROX-CAACTTTAGCCAAGCCTTGACGAAC-HBQ2	62.98	
<i>atl</i>	<i>atl</i> 正向引物 1	TTCGTATCCATTGCATGCTTAAC	57.83	125
	<i>atl</i> 反向引物 1	GGTATGACATTAACCAAGTTGCTC	58.68	
	<i>atl</i> 探针 1	VIC-ACTTACCTGGTACACGTTGACTTGTGG-HBQ1	64.64	
	<i>atl</i> 正向引物 2	GTTATGGTATTTTCGTGTTTGAGTTAG	56.90	
	<i>atl</i> 反向引物 2	AAGTTTATCTTATCTCACATGCCCTA	57.97	
	<i>atl</i> 探针 2	CY5-AACTTTGTTGTTCACTACATCTGCACCTTT-HBQ3	64.08	
<i>icaB</i>	<i>icaB</i> 正向引物 1	TGAGTATCTTGATCATATTGCCTGTA	57.81	124
	<i>icaB</i> 反向引物 1	CGGTGATAATTTAATGCCAGAGC	58.21	
	<i>icaB</i> 探针 1	FAM-TGGATGGTCATCATATTGCAAATGCAGA-HBQ1	63.56	
	<i>icaB</i> 正向引物 2	TGGAATCCGTCCTCCTTA	57.96	
	<i>icaB</i> 反向引物 2	GGCTTGATGAATGACGATAAAATTACC	58.92	
	<i>icaB</i> 探针 2	ROX-AAAGCAGTCACTCCGAACCTCCAATGATTAT-HBQ2	64.73	
<i>fnbA</i>	<i>fnbA</i> 正向引物 1	AAACAATAGAAGAAACGGATTCATC	56.19	118
	<i>fnbA</i> 反向引物 1	TCAATTGGATTGATTCCTCAGA	55.89	
	<i>fnbA</i> 探针 1	VIC-TATTGATATCGATTACCATACTGCTGTGGA-HBQ1	62.01	
	<i>fnbA</i> 正向引物 2	TCCCATCCCAACAACGATCA	59.01	
	<i>fnbA</i> 反向引物 2	ATCTTAGGTACGGCATTAGAAAACA	58.35	
	<i>fnbA</i> 探针 2	CY5-ATTGGGAGCAGCATCAGTATTCTTAGGA-HBQ3	63.81	
<i>hla</i>	<i>hla</i> 正向引物 1	TGCCATTTTCTTTATCATAAGTGACTA	57.32	92
	<i>hla</i> 反向引物 1	TGATATTAATATTA AAAACCGGTACTACAGA	57.11	
	<i>hla</i> 探针 1	FAM-ATCACCTGTTTTTACTGTAGTATTGCTTCC-HBQ1	62.00	
<i>srap</i>	<i>srap</i> 正向引物 1	ATCTAACTCAATGCATCCGTC	57.59	150
	<i>srap</i> 反向引物 1	GTGCCATTATGTTTAGTCACTTCA	57.51	
	<i>srap</i> 探针 1	ROX-ACTGAGATTCACTCGTCTCGTTGTTG-HBQ2	65.47	
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> 正向引物 1	CAATTTGTCTGCCAGTTTCTCC	58.09	129
	<i>mecA</i> 反向引物 1	CTGATGGTATGCAACAAGTCG	57.34	
	<i>mecA</i> 探针 1	CY5-AGTTCTGCAGTACCGATTGCCA-HBQ3	64.67	
	<i>mecA</i> 正向引物 2	CATGAAGATGGCTATCGTGTC	56.59	
	<i>mecA</i> 反向引物 2	CTTTAGCATCAATAGTTAGTTGAATATC	55.28	
	<i>mecA</i> 探针 2	FAM-TGTATGTGCGATTGTATTGCTATTATCGTC-HBQ1	62.24	

1.6 qPCR 扩增及结果判断 (1)qPCR 体系: Multiplex PCR Mix 25.0 μL, 10 μmol 正反引物各 1.0 μL, 10 μmol 探针各 0.3 μL, 模板 20.0 μL, 补水至终体积 50.0 μL。(2)扩增参数: 95°C 预变性 2 min, 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环, 选择 510、580、610、670 nm 通道于 60°C 探测荧光。(3)鉴定结果判断: 鉴定标志物扩增曲线呈“S”形, CT 值 ≤36, 且临界阳性 CT 值 ≥36, 阴性对照 CT 值 ≤40, 判为阳性, 否则判为阴性。(4)MRSA 结果判断: MRSA 及鉴定标志物扩增曲线均呈“S”形, CT 值均 ≤36, 且临界阳性 CT 值均 ≥36, 阴性对照 CT 值均 ≤40, 判为阳性, 否则判为阴性。

1.7 检测下限及扩增线性范围试验 (1)挑取对数

生长期的两个标准株(金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、ATCC 43300)纯培养菌落, 分别用生理盐水调制成浓度约为 3.0 × 10⁸ CFU/mL 的菌悬液, 经 3 次平板倾注法菌落计数均值确定菌悬液浓度, 再用生理盐水稀释菌悬液至 2.0 × 10⁸ CFU/mL 后提取核酸, 以 1 个细菌对应 1 Copy 模板确定模板浓度, 其中, 金黄色葡萄球菌 ATCC 43300 用于 *mecA* 试验, 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 用于其他基因试验。(2)用超纯水, 10 倍梯度稀释核酸模板, 制成 8 个梯度浓度模板, 用于 PCR 扩增, 以能判阳的最低加入模板数作为检测下限; 以线性关系良好的最低和最大浓度作为扩增线性范围。

1.8 基因片段灵敏度、特异度计算 (1)鉴定标志

物灵敏度 = 鉴定基因片段 qPCR 阳性数 ÷ SA 株数 × 100% ; MRSA 标志物灵敏度 = MRSA 基因片段 qPCR 阳性数 ÷ MRSA 株数 × 100% 。 (2) 鉴定标志物特异度 = 鉴定基因片段 qPCR 阴性数 ÷ CNS 株数 × 100% ; MRSA 标志物特异度 = MRSA 基因片段 qPCR 阴性数 ÷ 非 MRSA 株数 × 100% 。

2 结果

2.1 SA 培养鉴定与 MRSA 检测结果 2015 年 1 月—2017 年 12 月共分离 SA 335 株,其标本分布与 MRSA 检出率见表 2。

表 2 335 株 SA 标本分布及 MRSA 检出率

Table 2 Specimen distribution and MRSA isolation rates of 335 strains of SA

标本类型	SA(株)	MRSA(株)	检出率(%)
伤口分泌物	139	37	26.62
痰	97	25	25.77
穿刺液	67	27	40.30
血	23	2	8.70
尿	8	3	37.50
脑脊液	1	0	0.00
合计	335	94	28.06

2.2 SA 药物敏感试验结果 94 株 MRSA、241 株甲氧西林敏感 SA(MSSA)及全部菌株药敏试验结果见图 1。355 株金葡菌中 MRSA 与 MSSA 对青霉素、红霉素及克林霉素耐药性差别较大,并且敏感率较低。

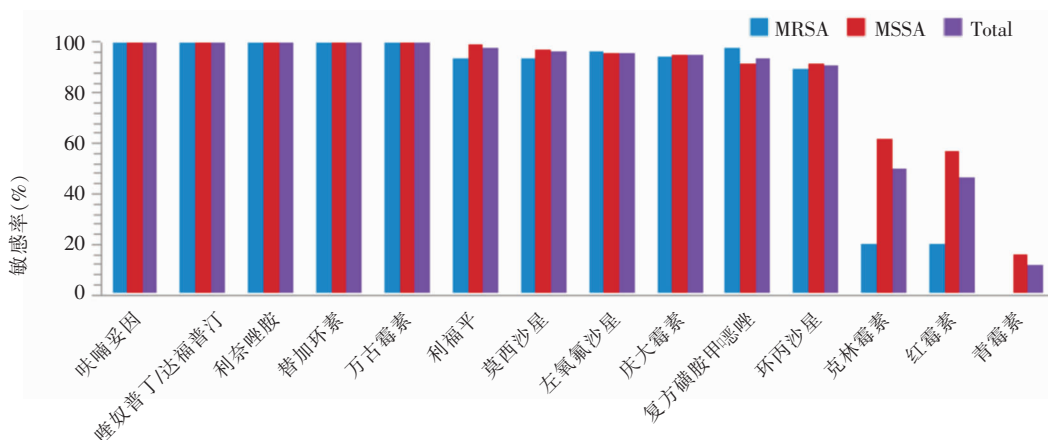


图 1 SA 药物敏感试验结果

Figure 1 Antimicrobial susceptibility testing results of SA

2.3 SA 各基因引物、探针筛选结果 SA *nuc*、*atl*、*icaB*、*fnbA*、*hla*、*srap*、*mecA* 基因引物、探针筛选结果

见表 3。根据扩增效率、检测下限、灵敏度及特异度选择 *atl* 片段 1 及 *mecA* 片段 1 作为检测标志物。

表 3 SA 各基因引物/探针筛选结果

Table 3 Screening results of primer/probe for each SA gene

基因片段	斜率	线性(R ²)	扩增效率	检测下限(Copy/R)	扩增线性(Copy/mL)	灵敏度(%)	特异度(%)
<i>nuc</i> 片段 1	3.23	0.98	0.97	4	2 × 10 ²⁻⁸	97.8(91/93)	100.0(93/93)
<i>nuc</i> 片段 2	3.14	0.96	1.05	4	2 × 10 ²⁻⁸	100.0(93/93)	95.7(89/93)
<i>atl</i> 片段 1	3.16	0.97	1.03	4	2 × 10 ²⁻⁸	100.0(93/93)	100.0(93/93)
<i>atl</i> 片段 2	3.43	0.93	0.94	40	2 × 10 ³⁻⁸	100.0(93/93)	98.9(92/93)
<i>icaB</i> 片段 1	3.18	0.99	1.01	4	2 × 10 ²⁻⁸	100.0(93/93)	100.0(93/93)
<i>icaB</i> 片段 2	3.21	0.98	0.98	4	2 × 10 ²⁻⁸	100.0(93/93)	97.8(91/93)
<i>fnbA</i> 片段 1	3.29	0.96	0.96	4	2 × 10 ²⁻⁸	100.0(93/93)	98.9(92/93)
<i>fnbA</i> 片段 2	3.35	0.97	0.95	40	2 × 10 ³⁻⁸	97.8(91/93)	86.0(80/93)
<i>hla</i> 片段 1	3.22	0.98	1.02	4	2 × 10 ²⁻⁸	97.8(91/93)	100.0(93/93)
<i>srap</i> 片段 1	3.15	0.95	1.04	4	2 × 10 ²⁻⁸	97.8(91/93)	100.0(93/93)
<i>mecA</i> 片段 1	3.16	0.96	1.03	4	2 × 10 ²⁻⁸	100.0(58/58)	99.2(127/128)
<i>mecA</i> 片段 2	3.19	0.99	0.99	4	2 × 10 ²⁻⁸	100.0(58/58)	95.3(122/128)

注:SA 93 株(含 MRSA 32 株,MSSA 61 株),CNS 93 株(含 MRCNS 26 株,MSCNS 67 株),SA 和 CNS 中耐药株为 58 株,敏感株为 128 株

2.4 qPCR 检测原始样本结果 用检测性能最好的 *atl* 基因片段 1 及 *mecA* 基因片段 1 建立双重 qPCR, 经引物浓度、探针浓度、退火温度、延伸时间等优化后, 检测 430 份原始标本, 结果培养法阳性的 335 份 SA 及 94 份 MRSA 标本, qPCR 检测全部阳性; 95 份 SA 培养法阴性的标本, qPCR 检测 SA 阳性 17 份, MRSA 阳性 4 份, 且经 PCR 产物一代测序, 与标准菌株同源性均 $\geq 90\%$ 。见表 4。

表 4 430 份原始标本常规培养法与 qPCR 检测结果(份)

Table 4 Results of routine culture and qPCR in 430 original specimens(No. of specimens)

检测方法	标本数	SA		MRSA	
		阳性	阴性	阳性	阴性
培养法	430	335	95	94	336
qPCR 法	430	352	78	98	332
qPCR 产物测序*	21	17	-	4	-

*: 培养法阴性、qPCR 法阳性的产物经一代测序, 与标准菌株序列同源性均 $\geq 90\%$

3 讨论

SA 是医院感染和社区获得性感染的重要病原菌^[8]。本研究的鉴定和药敏结果显示, SA 可引起多部位、多系统感染, 甚至颅内感染, 其对青霉素、红霉素等抗菌药物的耐药形势不容乐观, 且 MRSA 的耐药问题依然严峻, 建立快速的检测方法具有现实意义。

既往有多位学者选用不同的基因片段作为标志物, 建立 PCR 方法用于检测 SA 和(或)MRSA, 但效果参差不齐。2006 年温冬青等^[9]学者建立的 MGB 探针法检测 MRSA, 经 20 份标本和 20 株菌株评价, 检测和诊断性能良好。2007 年朱以军等^[10]学者建立的 qPCR 方法检测 MRSA, 经 109 株 SA 评价, 检出率为 33.9%(37/109), 高于苯唑西林纸片扩散法的 24.8%(27/109), 但检测下限为 10^4 Copies/mL。2011 年牟晓峰等^[11]学者建立的 qPCR 方法检测 MRSA, 经 182 株 SA 评价, 其检测和诊断性能也很理想。但上述学者建立的方法不能检测 SA 种属特异基因, 也未进行 MRCNS 验证。由于 MRCNS 中的 *mecA* 基因序列与 MRSA 中的并无差异, 当检测原始标本时, 很可能将 MRCNS 报告成 MRSA 误导临床。2013 年龚玉姣等^[12]建立了双重 PCR 方法检测 MRSA, 能同时扩增种属特异基因 *Coag* 和 *mecA*, 验证 85 株 SA, 结果与培养法一致, 但不能进行实时荧光定量检测, PCR 产物

容易造成实验室污染。

本研究对 6 个常用于鉴定的种属特异基因共 10 个片段, 以及 *mecA* 基因 2 个片段进行筛选, 选取检测性能最佳的片段作为标志物建立双重 qPCR 方法, 经 430 份原始标本验证, 不仅能将培养法阳性的 335 份 SA 及 94 份 MRSA 标本全部检测出阳性, 还从 95 份 SA 培养法阴性的标本中, 检出了 17 份标本 SA 及 4 份标本 MRSA 阳性, 且经 PCR 产物一代测序, 与标准菌株同源性均 $\geq 90\%$ 。qPCR 法检测 SA 阳性数多于培养法, 其原因可能是培养法容易受抗菌药物使用、标本运送、接种时机等因素影响, 造成结果阴性。qPCR 法检测 MRSA 阳性数也多于培养法, 其原因可能是部分 SA 已经携带 *mecA* 基因, 但体外实验时, 该基因表达下调或被抑制, 故有学者认为检测 *mecA* 基因应作为 MRSA 判别的“金标准”^[13-14]。本研究方法既可鉴定 SA, 也可检测 MRSA, 与培养法比, 不仅可提高阳性率, 且检测时间 ≤ 2.0 h, 能有效弥补培养法耗时太长的缺点。

本研究组在筛选基因片段作为 qPCR 标志物的过程中发现, 不同的基因, 甚至是同一基因不同片段, 作为检测标志物时均存在差异, 与国外学者^[15-16]结果类似。说明不是每个基因及其片段均适合作为 qPCR 检测标志物, 特别是仅根据 NCBI 或文献等既往资料设计的引物和探针, 由于生物进化、地区分布不同等原因, 基因序列存在 SNP 多态性, 可能导致检测灵敏度和特异性不高。目前, 不同 qPCR 检测试剂盒检测结果不一致, 也可能是由以上原因导致的。所以, 建立分子诊断方法前, 对标志物进行筛选, 有利于提高诊断灵敏度和特异度。

本研究组建立的 qPCR 方法尚未在其他地区或机构进行验证, 其检测性能是否能保持一致, 有待进一步验证。

[参考文献]

- [1] 葛永红, 刘延丽, 玄春花, 等. 儿童重症社区获得性肺部感染的病原菌分布及耐药研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(13): 3077-3079, 3083.
- [2] 姜洪丽, 陈非, 陈晨, 等. 呼吸科重症监护病房患者痰标本分离细菌及其耐药率变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(11): 1030-1034.
- [3] 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): 372-384.
- [4] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 3 版. 上海: 科学技术出版社, 2012.

- [5] 毕艳妮,隋振耿,宋宇,等.多重降落 PCR 检测血流感染产 ES-*BLs* 肠杆菌科细菌与 MRSA 方法的建立和应用[J].中国感染控制杂志,2015,14(10):663-667.
- [6] 沈蕾,骆俊,施宏,等.痰标本甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌培养与聚合酶链反应快速检测方法的比较[J].中国感染与化疗杂志,2015,15(3):260-263.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-seventh informational supplement[S]. CLSI, M100-S27, 2017, 37(1):55-56.
- [8] 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.
- [9] 温冬青,赵锦荣,白玉杰,等.新型 Taq Man-MGB 探针法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J].中华医院感染学杂志,2006,16(6):608-611.
- [10] 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.
- [11] 牟晓峰,赵自云.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.
- [12] 龚玉姣,吴新伟,邱峰,等.应用双重 PCR 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌[J].中国感染控制杂志,2013,12(6):401-403.
- [13] Volkmann H, Schwartz T, Bischoff P, et al. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal waste water using real-time PCR (TaqMan)[J]. J Microbiol Methods, 2004, 56(2): 277-286.
- [14] Ogihara S, Saito R, Sawabe E, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of PCR-based open reading frame typing, multilocus sequence typing, and *Staphylococcus* protein A gene typing[J]. J Infect Chemother, 2018, 24(4): 312-314.
- [15] Pas SD, Fries E, De Man RA, et al. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(8): 2897-2901.
- [16] Saraiva MM, De Leon CM, Santos SC, et al. Accuracy of PCR targeting different markers for *Staphylococcus aureus* identification: a comparative study using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as the gold standard[J]. J Vet Diagn Invest, 2018, 30(2): 252-255.

(本文编辑:左双燕)