几种检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌方法的评价

戴忠红
(怀化市第三人民医院,湖南 怀化 418000)

摘 要: 目的 对三种检测耐甲氧西林葡萄球菌方法的可靠性和临床实用性进行评价。 **方法** 以 PCR 检测金黄色葡萄球菌甲氧西林决定因子 A(mecA)为金标准,按临床实验室标准化委员会(CLSI)操作规程用苯唑西林纸片扩散法、头孢西丁纸片扩散法、苯唑西林琼脂稀释法对临床分离的 155 株金黄色葡萄球菌进行检测。 **结果** 155 株金黄色葡萄球菌经 mecA 基因检测,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)为 61.9%(96/155);头孢西丁纸片扩散法检测 MRSA 的敏感性和特异性均为 100%;苯唑西林纸片扩散法的敏感性为 95.8%,特异性为 91.5%;苯唑西林琼脂稀释法的敏感性为 100%,特异性为 98.3%;头孢西丁纸片扩散法优于苯唑西林纸片扩散法和苯唑西林琼脂稀释法。 **结论** 头孢西丁纸片扩散法操作简便、敏感性高、特异性好、结果可靠,可作为医院微生物实验室日常工作中检测耐甲氧西林葡萄球菌的常规方法。

关键词: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 苯唑西林纸片扩散法; 头孢西丁纸片扩散法; 苯唑西林琼脂稀释法; mecA 基因

中图分类号:R378.11 **文献标识码:**A **文章编号:**2095-1116(2011)03-0337-03

Evaluation of Several Methods for Detection of Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus

DAI Zhong-hong
(*The Third Hospital of Huai-hua*, *Huaihua*, *Hunan* 418000, *China*)

Abstract: Objective To evaluate the reliability and clinical practicability of three methods in detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA). **Methods** According to the CLSI standard operating instructions, the 155 strains of clinical isolated staphylococcus aureus were tested by the oxacillin disk diffusion test, the cefoxitin disk diffusion test, and the oxacillin agar dilution test. Simultaneously detection by PCR of staphylococcal mecA gene were used as a reference method. **Results** Confirmed by mecA gene, 61.9% (96/155) strains were MRSA. Both sensitivity and specificity of cefoxitin disk diffusion test in the detection of MRSA were 100%, which is superior to the oxacillin disk diffusion test (95.8% and 91.5%) and the oxacillin agar dilution test (100% and 98.3%). **Conclusion** The Cefoxitin disk diffusion test is reliable, simple and convenient for routine detection and confirm of MRSA in the clinical laboratories.

Key words: methicillin-resistant staphylococcus aureus; oxacillin disk diffusion test Cefoxitin disk diffusion test; Oxacillin agar dilution test; mecA gene

金黄色葡萄球菌是引起医院感染的常见病原菌之一,常引起脓疱疮、化脓性关节炎、肺炎等严重的感染。近年来由于抗生素的广泛使用,耐甲氧西林葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)的检出率逐渐增高,并且 MRSA 已不再单纯对甲氧西林耐药,已发展到对 β-内酰胺类、氨基糖甙类、大环内酯类等抗生素多重耐药[1~2]。一旦 MRSA 发生流行将难以控制,造成严重后果,因此如何快速、准确的检测 MRSA 对控制其传播具有重要意义。本文对 MRSA 的三种检测方法进行了比较

收稿日期:2011-02-23
通讯作者:戴忠红,电话:0745-2233157,E-mail:daizhonghong@sina.com.

研究,以寻找适合临床微生物室检测 MRSA 简单而可靠的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本院2009年8月~2010年8月临床分离金黄色葡萄球菌155株。质控菌株包括金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC25923 和 MRSA ATCC43300 均来自中国菌种保藏中心。

1.1.2 试剂 头孢西丁(30 μg/片)和苯唑西林(1 μg/片)纸片为 OXOID 公司产品,MH 琼脂购自杭州微生物试剂厂;苯唑西林购自中诺药业有限公司;DNA 提取试剂盒(批号 12011009)及 2 × PCR Master(批号 20721008)均为上海生工生物工程有限公司产品,mecA 引物设计参照文献[3],序列如下:上游引物 5′-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3′;下游引物 5′-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3′,扩增片段为 533 bp。

1.1.3 主要仪器 Vitek-2 细菌鉴定仪(法国生物—梅里埃公司),DNA 扩增仪为 PE480 型 PCR 热循环仪(美国 PE 公司),GENE GENIUS 图像分析处理系统(美国 Stratagen 公司),电泳仪(北京六一公司)等。

1.2 方法

1.2.1 纸片扩散法 按 CLSI 2005 推荐方法[4]进行,即以抑菌环直径为判断指标,判断标准见表1。

1.2.2 琼脂稀释法 苯唑西林琼脂稀释法按 CLSI 2005 标准[4]进行,以浓度为判断指标,判断标准见表1。

表1 检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的三种标准

方法	金黄色葡萄球菌		
	R	I	S
苯唑西林纸片扩散法	≤10 mm	11~12 mm	≥13 mm
头孢西丁纸片扩散法	≤19 mm	/	≥20 mm
苯唑西林琼脂稀释法	≤2 μg/mL	/	≥4 μg/mL

注:R:耐药;S:敏感;I:中介

1.2.3 mecA 基因检测(PCR) 模板的制备:挑取单个菌落于 LB 液体培养基增菌 18 h,取 1 mL 增菌培养液,10 000 转离心 1 min,尽量吸尽上清液,加入 100 μL 溶葡球菌素(12 U/mL),30℃处理 20 min,然后按照基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,最后用 100 μL 预温处理的洗脱液 TE 洗脱,-20℃保存备用。mecA 的检测:PCR 扩增条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s、57℃退火 30 s、72℃延伸 100 s 循环 30 次,72℃终延伸 10 min。反应体系为:反应总体积为 25 μL:模板 DNA 5 μL、2 × PCR Master 12.5 μL、上、下游引物各 1 μL(引物浓度 25 μmol/L),灭菌去离子水补足。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中,100 V 电泳 45 min,用凝胶成像系统成像。

1.3 统计分析

采用 χ^2 检验,$P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结 果

2.1 mecA 基因检测结果

临床分离的 155 株金黄色葡萄球菌和 ATCC25923、ATCC43300 经 mecA 基因检测,ATCC25923 未检出 mecA 基因,ATCC43300 检出 mecA 基因,155 株中有 96 株 mecA 基因为阳性,59 株 mecA 为阴性(甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌,MSSA),MRSA 检出率为 61.9%。部分菌株 mecA 基因检测结果见图1。

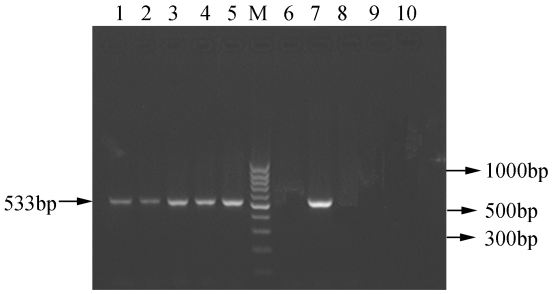

图1 mecA 基因检测结果

1~5:MRSA;M:DNA Maker;6:ATCC25923;7:ATCC43300;8~10:MSSA

2.2 三种检测方法结果比较

其中头孢西丁纸片扩散法的敏感性与特异性均为 100%;苯唑西林纸片扩散法的敏感性为 95.8%,特异性为 91.5%;苯唑西林琼脂稀释法的敏感性为 100%,特异性为 98.3%,$\chi^2 = 0.036$,$P > 0.05$,即三种检测结果无统计学差异。见表2。

表2 三种检测方法结果比较

检测方法	mecA 阳性(96 株)	mecA 阴性(59 株)
苯唑西林纸片扩散法	92(95.8)	54(91.5)
头孢西丁纸片扩散法	96(100.0)	59(100.0)
苯唑西林琼脂稀释法	96(100.0)	58(98.3)

3 讨　　论

MRSA 的耐药机制复杂,但由 mecA 基因编码的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)在 MRSA 耐药性产生中的作用已得到确认。因此可通过 PCR 检测 mecA 基因确认 MRSA[5],目前 mecA 基因的检测已成为 MRSA 鉴定的"金标准"。但该法由于设备、试剂、费用及实验室技术人员要求较高等原因,使得该方法在临床微生物实验室的应用受到限制。本文以该法作为金标准在 155 株金黄色葡萄球菌中共检出 96 株 mecA 阳性菌株,分离率为 61.9%,与王玥等[6~7]的报道接近。

苯唑西林琼脂稀释法是 CLSI 推荐检测 MRSA 的经典方法,准确、可靠,但费力、耗时,且成本较高,临床上不宜作为常规方法。苯唑西林纸片扩散法是 CLSI 推荐的用于鉴定 MRSA 的常用方法,该方法操作简便,成本低廉,适合在各级医院开展。本研究中该法对 MRSA 检出敏感性为 95.8%,由于该实验常规培养受多种因素的影响,其特异性(91.5%)低于其他方法,结果的准确性会出现偏差。且在检测 MRSA 时,当抑菌圈直径为 11 ~ 12 mm 时判断为中介,需加做确证实验加以证实。本试验中出现一中介菌株,经证实并非 MRSA,因需加做确证试验,将使报告推迟一天。

头孢西丁属头霉素类抗生素,对葡萄球菌产生的 β-内酰胺酶稳定,与 PBP4 有高亲和性,并且可以诱导 mecA 基因的表达,产生 PBP2a,因此头孢西丁纸片扩散试验可用于检测各种表型的 MRSA,尤其对低水平、异质性耐药菌株具有很高的准确性。本研究头孢西丁纸片扩散法结果与 mecA 基因检测法一致,其敏感性和特异性均为 100%,高于苯唑西林纸片扩散法。该法对 mecA 阳性而苯唑西林表型敏感的 3 株金黄色葡萄球菌以及 mecA 阳性而苯唑西林表型中介的 1 株金黄色葡萄球菌的检测结果与 mecA 基因检测完全一致,进一步证实了头孢西丁纸片扩散法的优越性。当抑菌圈直径≤19 mm 时判断对苯唑西林耐药,≥20 mm 时判断对苯唑西林敏感,没有中介值,因此该法在检测苯唑西林中介的金黄色葡萄球菌时比苯唑西林纸片扩散法更具优越性。

鉴于 MRSA 的严重危害,如能快速鉴定出 MRSA,可使临床及时选择有效的药物治疗,迅速控制 MRSA 所造成的感染,限制其播散,同时也可以减少抗生素的滥用,减缓对糖肽类抗生素敏感性下降甚至耐药葡萄球菌的出现。本文通过对 3 种常见 MRSA 的检测方法进行比较分析结果显示头孢西丁纸片扩散法敏感性和特异性高,是临床检测 MRSA 的可靠方法,并且其操作简便,成本低廉,非常适合在临床微生物实验室中推广应用。

参考文献:

[1] 姜海涛. 矽肺患者金黄色葡萄球菌的临床耐药性分析[J]. 实用预防医学,2010,17(5):1003-1004.

[2] 石宏云,冯　伟,肖勇健,等. 新生儿血培养常见病原菌的分布及药物敏感率分析[J]. 南华大学学报(医学版),2008,36(2):223-224.

[3] 杨长顺,刘文恩,李　宪,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌随机引物 DNA 扩增多态性分型研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(5):601-604.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS documentM100 - S15[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2005, 25(1):1167.

[5] Jemili-Ben Jomaa M, Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Redjeb S. Identification of staphylococcal cassette chromosome mec encoding methicillin resistance in Staphylococcus aureus isolates at Charles Nicolle Hospital of Tunis[J]. Pathol Biol, 2006, 54 (8-9):453-455.

[6] 汪　玥,孙自镛,朱旭慧,等. Mohnarin 2008 年度报告:中南地区细菌耐药监测[J]. 中国抗生素杂志,2010,35(7):520-528.

[7] 王江桥,罗　君,蔡　珠,等. 金黄色葡萄球菌感染的特征及其耐药性[J]. 实用预防医学,2007,14(4):990-992.

(此文编辑　蒋湘莲)