

• 论 著 •

Phoenix™ 100 检测葡萄球菌现状分析

艾 虹¹, 周 莉^{1△}, 艾明华¹, 马 青¹, 朱丽莎¹, 徐 灵¹

(长江大学附属第一人民医院, 湖北荆州 434000)

摘要:目的 了解住院患者血液感染葡萄球菌在 Phoenix™ 100 的生化表型、耐药基因、毒素基因情况。方法 采用 Phoenix™ 100 和聚合酶链反应检测葡萄球菌生化表型, 耐药基因 MecA, 毒素基因 sea、seb、sec、see。结果 Phoenix™ 100 的 46 种生化表型除表皮葡萄球菌 C-CLST 结果阳性外, 其他表型结果与期待值一致, 符合率 95%~99%, 同时检出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 6 株, 携带 MecA 菌 4 株, 产 β-内酰胺酶菌 16 株, 红霉素诱导克林霉素耐药(STAmls)4 株, 携带肠毒基因 5 株。结论 Phoenix™ 100 的 46 种生化表型测定, 有助于了解葡萄球菌区域性生活代谢及流行病学情况, 同时可以发现葡萄球菌生化表型特异的株型。检出耐药基因 MecA 与荧光聚合酶链反应方法结果一致, Phoenix™ 100 在微生物检测方面所具有的自动化程度高, 检测结果快速准确等优点, 是其他方法无法替代的。

关键词:Phoenix™ 100; 葡萄球菌; 耐药基因; 毒素基因; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.045

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1582-02

Analysis of metabolic status of staphylococcus infection by Phoenix™ 100

Ai Biao¹, Zhou Li^{1△}, Ai Minghua¹, Ma Qing¹, Zhu Lisha¹, Xu Ling¹

(No. 1 Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434000, China)

Abstract:Objective To analyze biochemical phenotype, resistance genes, toxin genes of staphylococcus infected in hospitalized patients by Phoenix™ 100. **Methods** Using Phoenix™ 100 machine and polymerase chain reaction method to detect biochemical phenotype, resistance genes MecA, toxin genes sea, seb, sec, see of staphylococcus. **Results** In addition to staphylococcus epidermidis C-CLST being obtained positive results, other 45 biochemical phenotypes were in accordance with expectation values (coincidence rate 95%—99%), moreover, 6 strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains, 4 strains of MecA strains, 16 strains of β-lactam strains, 4 strains of Erythromycin induced by clindamycin resistant bacteria(STAmls) strains, 5 strains of Bowel poison gene strains were detected. **Conclusion** 46 biochemical phenotypes measurement using Phoenix™ 100 machine contribute to understanding metabolism and epidemiology of biochemical phenotype, it could also found specific biochemical phenotype of staphylococcus. The results of resistance genes MecA are according with that by real-time polymerase chain reaction. Phoenix™ 100 is fast and accurate and has high degree of automation.

Key words:Phoenix™ 100; staphylococcus; resistance genes; toxin genes; polymerase chain reaction

目前, 检测葡萄球菌通用的实验方法主要是手工法、仪器法和聚合酶链反应(PCR)法。手工法操作繁琐, 不适合应用于对大批量的标本检测, 也难以应对突发的公共事件^[1]。2013 年 4 月本院新购 1 套 Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统, 随机检测了金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌, 同时检测葡萄球菌耐药基因和毒素基因。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 2013 年 4 月至 2014 年 11 月本院临床分离的葡萄球菌 557 株, 其中金黄色葡萄球菌 243 株, 表皮葡萄球菌 314 株。主要来源于呼吸科、肾内科、ICU、血液科等临床科室, 剔除同一患者的重复分离株。质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 购自卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 Phoenix™ 100 系统及鉴定卡购自美国 BD 公司; PCR 仪购自美国 PE 公司, 凝集成像系统购自 Bio-Rad 公司, 电泳仪购自北京六一仪器厂。PCR 引物购自北京奥科鼎盛生物技术有限公司, 头孢西丁药敏纸片购自英国 Oxoid 公司, 水解酪蛋白(MH)琼脂购自广州迪景, DNA Marker、PCR 试剂购自北京全式金生物技术有限公司, 生产于 TaKaRa 公司。

1.3 方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌检测 按 Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统的操作程序进行检测。

1.3.2 血浆凝固酶试验 采用试管法, 兔血浆试管内加入 0.85% 灭菌生理盐水 0.5 mL, 再加入培养 24 h 后的金黄色葡萄球菌肉汤培养物 0.5 mL, 振荡摇匀, 置 35 ℃ 温箱内, 3~4 h 后观察凝固结果, 同时以已知葡萄球菌及肉汤作为对照。

1.3.3 基因检测 (1)煮沸法制备 DNA 模板。在 Eppendorf 管中加入 300 μL ddH₂O, 挑取平板菌落于 Eppendorf 管中磨匀, 煮沸 15 min, 11 000 r/min 离心 1 min。取上清 100 μL 作为模板, 于 -20 ℃ 保存备用。(2)单一 PCR 分别检测毒素基因及耐药基因。反应体系总量为 25 μL, 其中 10× PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP 2 μL, 上下游引物各 1 μL, Taq 酶 0.25 μL, 模板 2 μL, 加无菌蒸馏水至 25 μL。主要 PCR 阳性产物委托上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序, 结果与 GenBank 数据库进行比对^[2]。

2 结 果

2.1 生化表型

2.1.1 金黄色葡萄球菌生化表型 金黄色葡萄球菌生化表型

结果活跃,代谢反应阳性期待值指标为 C-DGUA、C-THY、R-DEX、C-MAA、C-DFRU、M-PHOT, 阳性结果符合率 100.0%; 其他期待值结果不定。见表 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”。

2.1.2 表皮葡萄球菌生化表型 表皮葡萄球菌生化表型结果活跃度不高, 代谢反应阳性期待值指标为 R-DEX、S-URE、C-DFRU、M-PHOT, 阳性结果符合率为 100.0%; 其他期待值结果不定。见表 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”。

2.2 耐药菌株检测 Phoenix™ 100 随机抽样 10 株金黄色葡萄球菌, 检出耐药株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MESA)6 株, 携带葡萄球菌耐药基因 MecA 菌 4 株, 产 β -内酰胺酶菌 8 株, 红霉素诱导克林霉素耐药(STAmls)菌 2 株。随机抽样 10 株表皮葡萄球菌, 检出耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MESE)7 株, 产 β -内酰胺酶菌 8 株, STAmls 菌 2 株。

2.3 药敏试验结果 243 株金黄色葡萄球菌对青霉素的耐药率最高(97.6%), 其他依次为红霉素(76.1%)、庆大霉素(35.0%), 而对利福平(19.5%)、达福普汀(12.2%)、呋喃坦啶(10.7%)的耐药率较低。未见对万古霉素、利奈唑胺耐药菌株。

2.4 毒素基因及耐药基因检测结果 随机测定 10 株金黄色葡萄球菌, 共检出 MecA 阳性 4 株(40.0%), 肠毒素基因阳性 5 株(50.0%)其中携带 sea 基因 4 株(80.30%), 1 株同时携带 sea、sec 基因, 未检出携带 see 和 seb 基因菌株。主要 PCR 产物测序结果经 GenBank 比对证实, 同源性均超过 98.0%。

3 讨 论

本研究结果显示, Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统在葡萄球菌鉴定中有 46 种生化表型, 金黄色葡萄球菌 C-3MGA、C-DMNT、R-MAL、C-IMN 结果在期待值阳性一侧(占 80.0% 以上), 表皮葡萄球菌 C-DGUA、C-KGA、R-MAL 结果在期待值阳性一侧(占 80.0% 以上), 上述结果对葡萄球菌鉴定没有影响, 但作为葡萄球菌区域性生活代谢环境调查时, 具有一定意义, 可进行流行病学分析。C-CLST 10 株表皮葡萄球菌结果阳性与期待值结果不符, 没有影响到表皮葡萄球菌鉴定结果(符合率 95.0%), 其他生化表型结果与期待值基本一致, 符合率 95.0%~99.0%。Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统在葡萄球菌鉴定中抽样检出 MRSA 菌 6 株, 携带 MecA 菌 4 株, 产 β -内酰胺酶菌 8 株, STAmls 菌 2 株。抽样检出 MESE 菌 7 株, 产 β -内酰胺酶菌 8 株, STAmls 菌 2 株。其中携带 MecA 菌 4 株, 与 PCR 法一致, MecA 菌的表达水平可能与 MRSA 对 β -内酰胺类抗菌药物耐药程度相关^[3]; 耐药株 MESA、MESE 菌检出率高于其他报道^[4], 可能与地区差异有关。葡萄球菌是血源性感染的主要致病菌, 其中某些金黄色葡萄球菌可产生肠毒素。肠毒素的特点是耐热性较强, 并且对蛋白酶不敏感, 环境一旦被金黄色葡萄球菌污染极易引起疾病的爆发。金黄色葡萄球菌肠毒素引起的中毒以 a 型居多, b 型次之, c 型及 e 型少见, 本研究中对金黄色葡萄球菌进行产毒培养, 有 5 株检出肠毒素, 并且 4 株为 a 型肠毒素^[5]。Phoenix™

100 全自动微生物分析系统联合检测 MecA 等耐药基因和毒素基因^[6], 有利于感染的诊断和预测感染的转归。Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统药敏试验结果显示 243 株金黄色葡萄球菌对青霉素的耐药率最高(97.6%), 而对利福平(19.5%)、达福普汀(12.2%)、呋喃坦啶(10.7%)的耐药率低。未见万古霉素、利奈唑胺耐药菌株^[7-8]。药敏结果略高于其他地区的报道^[9]。

Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统操作时应注意, 鉴定卡加样前制作菌液的菌落一定要选新鲜的优势单个菌落, 这一点是确保鉴定准确性的前提。本研究表明, Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统应用, 有助于实验室的快速诊断, 提高工作效率。而同时检验人员也应加强微生物基础知识和技能的培训, 加深对仪器原理的理解, 严格按仪器操作规程操作, 并做好质量控制工作。本研究证实, Phoenix™ 100 全自动微生物分析系统在微生物检测方面具有自动化程度高, 快速、准确等优点, 能为医药卫生系统、商检、科研等提供一项简便快捷、准确可靠的检测手段, 具有广泛的应用前景。同时也是一种进行感染性疾病控制及流行病学调查的工具。

参 考 文 献

- [1] 都青, 郝爱军, 谌晓燕. 耐甲氧西林葡萄球菌的临床分布特点及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 14(1): 19-20.
- [2] 刘根焰, 黄一宁, 赵旺盛, 等. 金黄色葡萄球菌 sasX、psm-mec、pvl 三种毒力基因的检测与分析[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(10): 744-746.
- [3] 庞超. XK 型自动微生物鉴定药敏分析系统的评价[J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(14): 123-124.
- [4] 王玫, 吴薇, 鲁辛辛. 比较全自动微生物分析仪与基因分析在凝固酶阴性葡萄球菌鉴定中的作用[J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(2): 150-153.
- [5] 乔宁, 喻华, 殷琳, 等. VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析仪性能分析[J]. 淮海医药, 2012, 30(3): 211-213.
- [6] 黄辉, 周建党, 聂新民, 等. MecA 基因在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌对 β -内酰胺类抗生素耐药中的作用[J]. 中南大学学报: 医学版, 2012, 37(6): 567-571.
- [7] 马萍, 张秀梅, 聂庆东, 等. 社区医院与三级综合医院 MSSA 与 MRSA 的耐药率比较[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13): 1610-1612.
- [8] 余方友, 李美兰, 林晓梅, 等. 万古霉素对金黄色葡萄球菌体外抗菌活性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(3): 240-242.
- [9] 李小龙. 葡萄球菌对常用抗生素耐药性调查研究[J]. 中外医学研究, 2013, 21(26): 149-150.

(收稿日期: 2015-02-08)



cardial infarction[J]. N Engl Med, 1995, 333(10): 389.

- [16] 吴梅君. 超敏 C-反应蛋白、同型半胱氨酸、D-二聚体水平与急性冠脉综合征的关系[J]. 浙江实用医学, 2011, 16(5): 333-334.

(收稿日期: 2015-02-15)

(上接第 1581 页)

Evaluation of vulnerable coronary plaques and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by 64-detector multislice computed tomography (MSCT)[J]. Circ J, 2008, 72(4): 618-625.

- [15] Rider PM, Vaughan DE. Hemostatic factors and the risk of myo-