

• 论 著 •

测试片法在金黄色葡萄球菌感染快速检测中的应用*

韩善桥,赵晓航[△],石 峰,史成和

(中国人民解放军海军总医院基础医学研究中心,北京 100048)

摘 要:目的 探讨金黄色葡萄球菌测试片在检测临床细菌感染中的应用。方法 以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌和肺炎克雷伯菌等 26 种标准菌株测定测试片的灵敏度和特异性,对测试片检测细菌的最佳培养时间及储存稳定性进行实验。分离培养法细菌鉴定使用全自动微生物分析仪。对测试片法和分离培养法测定临床标本的结果进行分析。结果 金黄色葡萄球菌测试片对纯菌检测灵敏度为 1 CFU/mL,与 24 种非目的菌无交叉反应,24 h 完成测定,25 ℃ 条件存放 2 周无明显影响,使用测试片法检测临床标本结果与分离培养法一致。结论 金黄色葡萄球菌测试片法灵敏度高、特异性强、简单快速,在特殊条件下可用于检测临床标本中的金黄色葡萄球菌。

关键词:金黄色葡萄球菌; 快速测试片; 细菌; 感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)17-2459-03

Application of testing slips for rapid detection of *Staphylococcus aureus* bacterial infections*

Han Shanjiao, Zhao Xiaohang[△], Shi Feng, Shi Chenghe

(Center for Basic Medical Science, Navy General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100048, China)

Abstract: **Objective** To investigate the application of testing slip method for the rapid detection of *Staphylococcus aureus* bacterial infections. **Methods** The specificity and sensitivity of a quick testing slip for *Staphylococcus aureus* were determined by using 26 kinds of standard reference bacterial strains, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. Incubation time and storage stability of the testing slips were tested. Isolation and identification of bacteria were performed by using VITEK auto microbe system. **Results** The detection limit of the quick testing slip was 1 CFU/mL for pure bacterial culture, and the slip had no cross-reaction with 24 non-target strains. Twenty-four hours were required to finish the entire test. There was no significant change when the testing slip was stored at 25 ℃ for 2 weeks. The quick testing slips were used to detect *Staphylococcus aureus* in clinical specimens, and the results were consistent with those of the traditional method. **Conclusion** The quick testing slips were highly sensitive, specific, simple and can be used to detect *Staphylococcus aureus* quickly in clinical specimens.

Key words: *Staphylococcus aureus*; quick testing slip; bacteria; infection

金黄色葡萄球菌存在于人体鼻黏膜、皮肤及肠道等部位,是化脓性感染的常见病原菌之一,除引起疖、痈、脓肿等局部感染,也可引起肺炎、伪膜性肠炎、心内膜炎和脓毒血症等全身感染。金黄色葡萄球菌为侵袭性细菌,能产生肠毒素,对肠黏膜损伤性大,所致肠炎起病急,中毒症状重,主要表现为呕吐、发热、腹泻等,因此,金黄色葡萄球菌快速检测对临床及时诊治具有重要意义。分离培养法鉴定金黄色葡萄球菌操作复杂,检测周期长且需细菌检验人员,难以在实验室之外的特殊环境下进行。用测试片法鉴定金黄色葡萄球菌操作简单,结果准确^[1-4]。金黄色葡萄球菌测试片现应用于食品卫生的检测,用于临床标本的检测尚未见报道。本研究拟在探讨金黄色葡萄球菌测试片在检测临床标本中的应用情况,为在特殊情况下进行金黄色葡萄球菌感染的快速检测提供帮助。

1 材料与方法

1.1 标准菌株来源 金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、无乳链球菌、粪肠球菌、藤黄微球菌、大肠埃希菌、鼠伤寒沙门菌、福氏志贺菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、阪崎肠杆菌、肺炎克雷伯菌、弗氏柠檬酸杆菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、空肠弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌、铜绿假单胞菌、鲍

曼不动杆菌、产单核细胞李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌和嗜水气单胞菌,均购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 检测标本来源 检测标本来自临床,包括尿液 40 份、腹水 15 份、伤口分泌物 20 份。

1.3 仪器与耗材 VITEK2 Compact 全自动微生物分析仪,法国生物梅里埃公司产品。金黄色葡萄球菌测试片购自北京陆桥技术有限责任公司(在有效期内使用)。培养基包括胰蛋白胨大豆肉汤、脑心浸出液肉汤、布氏肉汤、血琼脂平板、巧克力琼脂平板、胰蛋白胨大豆琼脂和 3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂,均购自北京陆桥技术有限责任公司(在有效期内使用)。

1.4 方法

1.4.1 标准菌株复苏 将金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型溶血性链球菌和无乳链球菌等标准菌株按操作说明进行复苏。

1.4.2 测试片定量检测 吸取标本 1 mL 于无纺布棉垫上,待液体吸收后,轻轻盖上薄膜并将边缘推平,将测试片正面平放于温箱中,35 ℃ 培养 24 h,观察结果。

1.4.3 测试片定性检测 揭开测试片薄膜,吸取 1 mL 无菌

* 基金项目:全军医药卫生科研基金课题(CHJ12J025、BWS13J012);国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2013AA041201)。

作者简介:韩善桥,男,副主任技师,主要从事临床微生物学与检验的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: xhztao@126.com。

生理盐水于无纺布棉垫上,待液体吸收后,接种待测标本,盖上薄膜并将边缘推平,将测试片正面平放于温箱中,35℃培养 24 h,观察细菌生长情况。

1.4.4 测试片灵敏度试验 制备金黄色葡萄球菌新鲜菌液,用无菌生理盐水将菌悬液浓度稀释为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 倍,分别吸取不同浓度菌悬液 1.0 mL,接种测试片和胰蛋白胨大豆琼脂平板,35℃培养 24 h,观察培养结果。

1.4.5 测试片特异性试验 制备金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、乙型溶血性链球菌和无乳链球菌等 26 种标准菌株新鲜菌液,用无菌生理盐水稀释成 10^{-5} 倍菌悬液,分别吸取不同标准菌株菌悬液 1.0 mL 接种测试片,35℃培养 24 h,观察细菌生长情况。

1.4.6 标本接种 根据不同标本选择最佳接种方法,35℃培养 24 h。(1)测试片直接接种标本;对于液体标本(尿液、腹水、脑脊液),直接接种标本 1 mL;(2)测试片加无菌生理盐水再接种标本;对于拭子取标本,先将测试片加无菌生理盐水 1 mL,再接种标本;(3)标本经倍比稀释再接种;对于定量实验或标本中细菌数多,应将标本作 10 倍倍比稀释再接种。

1.4.7 测试片最佳培养时间观察试验 将测试片接种金黄色葡萄球菌后,在 35℃温箱分别培养 15、18、24 和 30 h,观察细菌生长情况,选择最佳培养时间。

1.4.8 测试片稳定性试验 将测试片完整包装分别存放在 4℃冰箱、25℃室温和 35℃孵箱 3 个不同温度下,每 7 d 检测 1 次,共检测 2 次。

1.4.9 细菌鉴定 将临床标本分别接种测试片、血琼脂平板或胰蛋白胨大豆琼脂平板,35℃培养 24 h,血琼脂平板或胰蛋白胨大豆琼脂平板生长的细菌,使用全自动微生物分析仪鉴定。

1.4.10 测试片结果判定 测试片出现蓝绿色菌落为金黄色葡萄球菌,为阳性结果;测试片为无色或未见蓝绿色菌落为阴性结果。如果尿液中金黄色葡萄球菌数大于或等于 10^4 CFU/mL,可诊断泌尿道感染。如伤口分泌物中金黄色葡萄球菌数大于或等于 10^3 CFU/mL,表明伤口可能发生细菌感染。对于特殊体液标本(如腹水、脑脊液、关节液),如测试片上有细菌生长,则表明相应部位可能有细菌感染。

2 结 果

2.1 测试片灵敏度试验 金黄色葡萄球菌测试片对其纯菌液检测下限为 1 CFU/mL,当临床标本中金黄色葡萄球菌为大于或等于 1 CFU/mL 时,测试片即可显示阳性结果,见表 1。

表 1 金黄色葡萄球菌测试片灵敏度试验结果(CFU/mL)		
菌液稀释度	平皿计数法	测试片法
10^{-5}	63	61
10^{-6}	44	42
10^{-7}	17	19
10^{-8}	10	7
10^{-9}	2	1

2.2 测试片特异性试验 在被检测的 26 种细菌中,除金黄色葡萄球菌呈蓝绿色菌落,表皮葡萄球菌呈黑色菌落外,其余 24 种非目的菌(粪肠球菌、藤黄微球菌、无乳链球菌、乙型溶血性链球菌、大肠埃希菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、阪崎肠杆菌、弗氏柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、

鼠伤寒沙门菌、福氏志贺菌、空肠弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、嗜水气单胞菌、产单核细胞李斯特菌、蜡样芽孢杆菌)在测试片上均不生长。

2.3 细菌复活试验 将测试片上的蓝绿色菌落接种到血琼脂平板上,35℃培养 24 h,细菌生长良好。表明测试片上生长的细菌可以保留菌种,进一步做细菌药敏试验及流行病学调查。

2.4 最佳培养时间试验 培养 24 h 后观察结果比较好,见表 2。

表 2 不同培养时间金黄色葡萄球菌在测试片上的检出率		
培养时间(h)	检出例数(<i>n</i>)	检出率(%)
15	0	0.0
18	2	10.0
24	20	100.0
30	20	100.0

2.5 测试片储存稳定性试验 金黄色葡萄球菌均能在培养 24 h 后出结果,与 4℃存放检测菌落数符合率在 92%以上,见表 3。

表 3 不同存放时间和温度对测试片检测结果的影响			
存放时间(<i>d</i>)	存放温度(℃)	检测结果(CFU/mL)	与 4℃检测的符合率(%)
7	4	2.6×10^6	—
	25	2.5×10^6	96.2
	35	2.4×10^6	92.3
14	4	6.2×10^7	—
	25	6.0×10^7	96.8
	35	6.1×10^7	98.4

—:无数据。

2.6 临床标本检测试验 测试片法与分离培养法的阳性结果一致,见表 4。

表 4 测试片法与分离培养法检测临床标本结果比较(<i>n</i>)			
临床标本	<i>n</i>	测试片法阳性数	培养法阳性数
尿液	40	15	15
腹水	15	6	6
伤口分泌物	20	12	12

3 讨 论

传统分离培养法细菌鉴定需要对标本进行培养,待分离出纯菌落后,才能进行细菌鉴定,虽然此方法经典、可靠,但操作复杂、时间长,且需要在有条件的实验室和细菌检验人员才能开展^[5-7]。显色培养基是利用细菌产生的特异酶与相应底物(由产色基团和细菌可代谢物质组成)反应而显色,直接观察菌落颜色进行鉴定^[8-9],但仍需配制培养基和高压灭菌,也不适合在野外和舰船上开展。测试片法鉴定细菌是以纸片、无纺布或冷水可凝胶等替代琼脂作为载体,采用选择性培养基和特异性的酶显色剂作为主要原料,制成的一次性细菌快速鉴定产品^[10]。它是在分离培养法和显色培养基的基础上发展而来的一项新技术,与分离培养法相比,测试片法克服了分离培养法在细菌培养、分离、鉴定等操作中比较复杂(下转第 2463 页)

本院检出的奇异变形杆菌的 ESBLs 基因型以 CTX-M 型为主, AmpC 酶的基因型以 CMY 型为主。

整合子是细菌中的一种可移动性基因元件,在耐药基因的水平转移中起到了至关重要的作用。分析的 20 株奇异变形杆菌中 19 株扩增出 I 类整合子,阳性率(95%)明显高于文献[7] 38.6%的报道。整合的耐药基因产物可导致奇异变形杆菌对氯霉素、三甲氧苄啶、红霉素、链霉素和壮观霉素的耐药。

药敏试验结果提示美罗培南、阿米卡星、氨曲南、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦和头孢他啶可作为对奇异变形杆菌感染治疗的首选用药或经验用药。16 株菌对亚胺培南耐药,与文献[8]报道的主要因产碳青霉烯酶所致耐药的原因不同,均未检出碳青霉烯酶和金属酶,可能与其他机制有关,有待进一步研究。

按 80%的相似度为标准^[9],PFGE 聚类分析中的三个 PFGE 型别的 1~12 号菌株判为同一菌株来源;通过临床调查,分离出奇变形杆菌的这些病患均有住过该病区 ICU 病房的经历,而该 ICU 病房因危重患者多,床位之间的距离未达到一米以上的要求,加之可能的其他感染控制措施的不到位,造成了此次奇异变形杆菌的院内感染。

此次研究结果揭示本院神经内科病区出现奇异变形杆菌的院内感染;均为产 ESBLs 株,其中 SSBL 菌占 50%,携带的耐药基因型为 CTX-M-14 和 CMY-2;I 类整合子的携带率高达 95%;美罗培南、氨曲南、阿米卡星、头孢他啶和加酶抑制剂的抗菌药物可作为首选用药或经验用药;本院分离的耐亚胺培南株与 KPC 和 MBLs 无关;临床科室应加强院内感染控制措施的落实,避免或减少院内感染的发生。

参考文献

[1] 冯福英,胡望平,杨湘越,等.耐头孢西丁革兰阴性杆菌高产

(上接第 2460 页)

的缺点,只需加样培养 24 h,直接观察菌落颜色,即可对细菌作出鉴定,不需配制培养基,操作简单,便于携带,检测时间短,非检验人员均可操作,特别适合在舰船远航及野外环境等特殊情况下开展。但细菌测试片法也存在一定不足,如测试片加样后马上盖上薄膜,液体易溢出;测试片种类比较少,只能检测十几种常见细菌;对于一些混合细菌感染的标本,使用一种测试片不能同时检测和鉴定多种病原菌等。

金黄色葡萄球菌测试片具有良好的特异性,在被测定的 26 种细菌中,除金黄色葡萄球菌呈蓝绿色菌落、表皮葡萄球菌呈黑色菌落外,其余 24 种非目的菌均不生长。金黄色葡萄球菌测试片灵敏度高,对纯菌的检测灵敏度可达 1 CFU/mL,对菌落数目在 1~9 个范围内的菌液,测试片法与平皿法一样均能检测出来。对于一些无菌部位的体液标本,如腹水、脑脊液、关节液等,其检出阳性结果具有一定临床意义。用测试片法与培养法同时检测临床标本 75 份,其检测结果一致。测试片在短时间使用和运输中,无需采取特殊保存措施。因此,在一些特殊情况下,如野外环境训练、抢险救灾开展医疗服务,舰船远航进行卫勤保障,发生食物中毒后指导突发事件的处理等,金黄色葡萄球菌测试片都具有重要的应用价值。

参考文献

[1] 孙霞,许如苏,卢新.金黄色葡萄球菌测试片的检测性能研究[J].

AmPC 酶发生率及基因型与耐药性研究[J].中华医院感染学杂志,2006,16(6):601-604.

- [2] 范建中,董晓勤,王贤军.奇异变形杆菌耐药性和超广谱 β -内酰胺酶基因型研究[J].中国卫生检验杂志,2012,22(2):378-379.
- [3] 石兰峰,钮博.奇异变形杆菌 ESBL 和 AmpC 酶的检测与耐药分析[J].中国厂矿医学,2009,22(1):75-76.
- [4] 陈晓莉,徐元宏,黄颖,等.变形杆菌临床分离株的耐药性分析及其 AmpC 酶的检测[J].安徽医科大学学报,2007,42(4):395-398.
- [5] Yamasaki K, Komatsu M, Abe N, et al. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9): 3267-3273.
- [6] Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and molecular characterization of plasmid mediated AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections in Egyptian hospitals[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 171548.
- [7] 陈奕慧,林红燕. I、II 类整合子在变形菌属中的分布及耐药性研究[J].中华医院感染学杂志,2014,24(3):526-528.
- [8] 胡丽庆,史煜波,孙定河,等.奇异变形杆菌耐药性的 4 年监测及碳青霉烯类耐药株的耐药机制研究[J].中国微生物学杂志,2012,24(7):611-614.
- [9] 陈辉,俞慕华,黄锐敏,等.奇异变形杆菌的脉冲场凝胶电泳分型研究[J].现代预防医学,2008,35(13):2484-2486.

(收稿日期:2015-04-14)



中国卫生检验杂志,2009,19(5):1053-1054,1195.

- [2] 陈德云,陈国雄,巫结冰,等.测试片法快速检验食品中金黄色葡萄球菌的研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(8):1456-1457.
- [3] 袁丹茅,金建潮,陈前进,等.金黄色葡萄球菌快速检测测试片在食品检验中的应用[J].中国卫生工程学,2008,7(5):301-302.
- [4] Silva Bo, Caraviello DZ, Rodrigues AC, et al. Evaluation of petri-film for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples[J]. J Dairy Sci, 2005, 88(8): 3000-3008.
- [5] Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, et al. Microbiology[M]. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1990. 561-587.
- [6] 郁庆福.现代卫生微生物学[M].北京:人民卫生出版社,1995:31-34.
- [7] 李凡,刘晶星.医学微生物学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:63-67.
- [8] 杨自副,陈默燕.定位显色培养基在细菌快速初步鉴定中的应用[J].国际检验医学杂志,2011,32(7):760-762.
- [9] 吴清平,周艳红,蔡芷荷,等.卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用[J].中国卫生检验杂志,2005,15(1):124-126.
- [10] 吴许文,吴清平,张淑红,等.细菌测试片的冷水可凝固剂初步研究和应用[J].微生物学通报,2009,36(11):1783-1788.

(收稿日期:2015-02-28)