

• 论 著 •

3 种金黄色葡萄球菌 β -内酰胺酶检测方法的评价郭鹏豪¹, 王雅丽², 廖康¹, 陈建龙^{1△}

(中山大学附属第一医院: 1. 检验科; 2. 生殖医学中心, 广州 510080)

摘要:目的 对 3 种金黄色葡萄球菌 β -内酰胺酶检测方法进行评价, 为临床实验室选择最佳的检测方法提供依据。方法 选取金黄色葡萄球菌 40 株, 以 BlaZ 基因检测的结果作为 β -内酰胺酶检测的金标准, 对“绝壁”试验、“三叶草”试验、头孢硝噻吩纸片法的检测性能进行评价。结果 40 株金黄色葡萄球菌经 PCR 法检测 20 株 BlaZ 基因为阳性, 20 株为阴性; “绝壁”试验, “三叶草”试验, 头孢硝噻吩纸片法敏感度均为 100.00%, 特异性为 100.00%。结论 3 种检测金黄色葡萄球菌 β -内酰胺酶的方法均有较好的敏感性和特异性, 不同的实验室可以根据具体情况选择其中的一种方法。

关键词:金黄色葡萄球菌; β -内酰胺酶; 方法评价

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.014

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)07-0897-02

Evaluation on detection method of β -lactamase in 3 kinds of *Staphylococcus aureus*Guo Penghao¹, Wang Yali², Liao Kang¹, Chen Jianlong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Center of Reproductive Medicine, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To evaluate the detection methods for β -lactamase in 3 kinds of *Staphylococcus aureus* to provide the basis for clinical laboratories selecting the best detection method. Methods 40 strains of *Staphylococcus aureus* were selected. With the BlaZ gene detection result as the gold standard for β -lactamase detection, the detection performance of the penicillin zone-edge determination, cloverleaf assay, nitrocefin-disk were evaluated. Results 20 strains of *Staphylococcus aureus* were the BlaZ gene positive detected by PCR and 20 strains were negative. The sensitivity of the penicillin zone-edge determination method, cloverleaf assay and nitrocefin-disk were all 100.00% and the specificity were 100.00%. Conclusion Three kinds of β -lactamase detection method have better sensitivity and specificity. So different laboratory can choose one of the method to detect β -lactamase of *staphylococcus aureus* according to the actual situation.

Key words: staphylococcus aureus; β -lactamase; method evaluation

金黄色葡萄球菌是临床上重要的致病菌之一, 可引起皮肤软组织化脓性感染、肺炎、败血症等。青霉素类抗菌药物曾广泛用于葡萄球菌的治疗, 但目前金黄色葡萄球菌对其产生严重的耐药性, 危害青霉素类抗菌药物尤其是对酶不稳定青霉素的临床疗效。 β -内酰胺酶的产生是金黄色葡萄球菌对青霉素类抗菌药物耐药的主要机制之一^[1], 检测金黄色葡萄球菌是否产 β -内酰胺酶对临床药物选择有重要意义。目前金黄色葡萄球菌 β -内酰胺酶的检测方法比较多, 本实验对“绝壁”试验, “三叶草”试验, 头孢硝噻吩纸片法 3 种方法的检测效能进行评价, 为临床实验室选择最佳的检测方法提供依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株 40 株金黄色葡萄球菌来源于中山大学附属第一医院住院或门诊患者无菌体液标本(包括血液、胸腔积液、腹腔积液、分泌物、穿刺液等), 剔除同一患者多次分离的同种菌株。其中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA) 10 株, 苯唑西林敏感青霉素耐药菌株 10 株, 苯唑西林敏感青霉素敏感菌株 20 株。标准产 β -内酰胺酶菌为金黄色葡萄球菌 ATCC29213, 阴性对照菌为金黄色葡萄球菌 ATCC25923。

1.2 仪器与试剂 MH 平板、血平板、头孢硝噻吩纸片购自法国 BioMerieux 公司; 10 U 青霉素购自 OXOID 公司; PCR 引物由 TaKaRa 公司合成; PCR 体系购自 TaKaRa 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定与药敏实验 将待检标本接种于哥伦比亚血

琼脂平板, 37 °C 培养 24 h 分离纯化, 用 VITEK-II 型全自动微生物分析仪进行菌株鉴定和药敏测定。

1.3.2 PCR 法检测 BlaZ 基因 采用煮沸法提取基因组 DNA。PCR 反应体系 50 μ L, 上游引物(5'-AAGAGATTTGC-CTATGCTTC-3') 1 μ L, 下游引物(5'-GCTTGACCACTTT-TATCAGC-3') 1 μ L, 模板 1.5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, Taq 酶 0.25 μ L, 去离子水 37.25 μ L。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 72 °C 总延伸 10 min。吸取 PCR 扩增产物 2 μ L 加样在 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 电压 150 V, 时间 30 min。经 GoldView 染色后, 于凝胶成像系统上拍照观察。

1.3.3 “绝壁”试验 将 0.5 麦氏比浊的待测菌液涂布于 MH 平板, 平板中央贴上 10 U 青霉素, 37 °C 孵育 24 h 观察结果; 抑菌圈周围“绝壁样”生长为阳性, 否则为阴性。

1.3.4 “三叶草”试验 将 ATCC25923 调为 0.5 麦氏比浊的菌液稀释 10 倍后涂布于血平板, 中央贴上 10U 青霉素, 然后将待测菌株从纸片边缘向外接种一条直线, 37 °C 孵育 24 h 观察结果; 细菌向抑菌圈内凸进生长, 则为阳性。

1.3.5 头孢硝噻吩纸片法 将头孢硝噻吩纸片放在单个的待测菌上, 10 min 内观察纸片有无颜色变化, 由黄色变为红色则为阳性, 否则为阴性。

2 结 果

2.1 PCR 检测结果 PCR 结果显示 10 株 MRSA blaZ 基因

均为阳性,10 株苯唑西林敏感青霉素耐药菌株 blaZ 基因均为阳性,20 株苯唑西林敏感青霉素敏感菌株 blaZ 基因均为阴性。部分菌株 PCR 电泳结果见图 1。

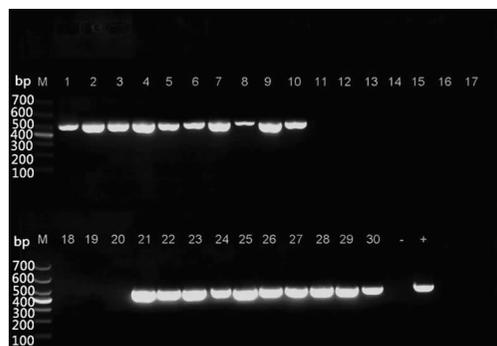
2.2 青霉素最小抑菌浓度(MIC)与 PCR 结果的关系 在 40 株细菌中 20 株青霉素 MIC ≥ 0.25 μg/mL, BlaZ 基因检测均为阳性;20 株青霉素 MIC ≤ 0.12 μg/mL, BlaZ 基因检测均为

阴性。

2.3 3 种检测方法的结果 20 株 PCR 阳性的菌株“绝壁”试验、“三叶草”试验、头孢硝噻吩纸片法检测结果均为阳性,敏感性均为 100.0%。20 株 PCR 阴性的菌株,4 种方法检测结果均为阴性,特异性均为 100.0%。具体结果见表 1。

表 1 3 种 β-内酰胺酶检测方法结果

菌株	“绝壁”试验		“三叶草”试验		头孢硝噻吩纸片	
	阳性(株)	阴性(株)	阳性(株)	阴性(株)	阳性(株)	阴性(株)
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(n=10)	10	0	10	0	10	0
苯唑西林敏感青霉素耐药菌株(n=10)	10	0	10	0	10	0
苯唑西林敏感青霉素敏感菌株(n=20)	0	20	0	20	0	20



M 为 maker;1~10 为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌株;11~20 为苯唑西林敏感青霉素敏感菌株;21~30 为苯唑西林敏感青霉素耐药菌株;“-”为阴性对照,“+”为阳性对照。

图 1 部分金黄色葡萄球菌 PCR 法检测 BlaZ 基因电泳图

3 讨 论

金黄色葡萄球菌是社区和医院内获得性感染的常见致病菌,青霉素类抗菌药物曾广泛用于其治疗。近年来随着抗菌药物的大量使用,金黄色葡萄球菌对青霉素类抗菌药物耐药性越来越严重。β-内酰胺酶是金黄色葡萄球菌对青霉素类抗菌药物耐药的主要机制之一。已知的 β-内酰胺酶数量已达 200 余种^[2],其中金黄色葡萄球菌产生的 β-内酰胺酶属于 Ambler 分子分类的 A 类酶,由 BlaZ 基因编码。

目前检测金黄色葡萄球菌 β-内酰胺酶的方法很多,如“绝壁”试验,“三叶草”试验,头孢硝噻吩纸片法以及分子生物学 PCR 等。其中用 PCR 检测 BlaZ 基因的存在与否,是鉴定金黄色葡萄球菌是否产 β-内酰胺酶的金标准^[3],但是 PCR 法实验条件要求较高,需要专业的人员和特定的仪器,限制了其在临床的广泛使用。本实验通过与 BlaZ 基因检测结果进行比对,显示“绝壁”试验,“三叶草”试验,头孢硝噻吩纸片法对于 β-内酰胺酶检测的灵敏度和特异性,均达到 100.0%,高于其他文献“绝壁”试验灵敏度 71.4%，“三叶草”试验灵敏度 67.8%,头孢硝噻吩纸片法灵敏度 35.7%的报道,主要原因可能是菌株来源差别较大有关,文献报道中 197 株金黄色葡萄球菌青霉素 MIC 均 ≤ 0.12 μg/mL^[4]。

虽然“绝壁”试验,“三叶草”试验,头孢硝噻吩纸片法有相同的灵敏度和特异性,但是不同方法所需要的时间成本和经济成本却不同。其中头孢硝噻吩纸片法检测时间最短,“绝壁”试

验,“三叶草”试验则需要 24 h,然而头孢硝噻吩纸片法的经济成本是最贵的。因此,选用何种方法检测金黄色葡萄球菌 β-内酰胺酶需要实验室根据自己的情况进行选择。同时在本实验中 10 株 MRSA 均能够检测出 β-内酰胺酶,说明对于此类菌株耐 β-内酰胺类抗菌药物的机制既有青霉素结合蛋白介导的耐药,又有 β-内酰胺酶的表达,这是由于编码 PBP2a 的 mecA 基因具有 β-内酰胺类抗菌药物诱导性,且在功能上与 β-内酰胺酶的基因密切相关。

另外本实验 40 株菌株青霉素 MIC 根据 CLSI 折点进行判断后,20 株青霉素耐药菌株均能检测出 BlaZ 基因,20 株青霉素敏感的菌株均未检测出 BlaZ 基因,与 BlaZ 基因检测结果有很好的-一致性。与国外文献报道当金黄色葡萄球菌青霉素 MIC 为 0.06 μg/mL 和 MIC 为 0.03 μg/mL 的部分菌株中仍然能够检测到 BlaZ 基因不同^[5],这种不同可能与标本来源不同,文献中所有的菌株来源于牛,所受到的抗菌药物压力较小;也可能与本实验的菌株数较少有关,可以通过加大菌株量进一步来验证 BlaZ 基因检测结果与青霉素 MIC 之间的关系。

参考文献

- [1] 陈艳清,贾建. 头孢硝噻吩纸片法检测 β-内酰胺酶的评价[J]. 中华医院感染学杂志,2004,14(4):437-439.
- [2] Stapleton PD, Shannon KP, French GL. Construction and characterization of mutants of the TEM-1β-lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to β-lactamase inhibitors [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(17): 1881.
- [3] Pitkala V, Salmikivi L, Bredbacka P, et al. Comparison of tests for detection of lactamase producing staphylococci[J]. Clin Microbiol, 2007, 28(17): 2031-2033.
- [4] Kaase M, Lenga S, Friedrich S, et al. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in Staphylococcus aureus[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(6): 614-616.
- [5] Haveria M, Suominen S, Rantalab L, et al. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine intramammary infection[J]. Veterinary Microbiol, 2005, 106(1): 97-102.

(收稿日期:2014-11-10)