技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)09-1384-02

Vitek-2 药敏卡片检测 MRSA 的准确性评价

张晓恒,夏 云,曹 何,陈宏础,张莉萍
(重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:评价 Vitek 2 AST P535 药敏卡片测定金黄色葡萄球菌对苯唑西林敏感性的准确性。方法:对临床分离的菌株采用 AST P535 药敏卡片和头孢西丁纸片测定对苯唑西林的耐药性,以 PCR 测定 MecA 基因为金标准,评价两种方法的准确性。结果:采用 PCR 共检测 125 株金黄色葡萄球菌,其中 MecA 基因阳性的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant Staphylococcus aureus,MRSA)89 株,mecA 基因阴性的甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(Methicillin susceptive Staphylococcus aureus,MSSA)36 株,以此为标准,在 89 株 MRSA 中用 Vitek-2 AST P535 药敏卡片检测出 81 株,敏感度为 91%,在 36 株 MSSA 中采用 Vitek-2 AST P535 药敏卡片检测出 35 株,特异性为 97.2%;而采用头孢西丁纸片法检测出 MRSA 87 株,敏感度为 97.8%,检出 MSSA 36 株,特异性为 100%。结论:AST P535 药敏卡片测定金黄色葡萄球菌对苯唑西林的敏感性具有良好的灵敏度和特异性,准确性能满足临床需要,同时采用头孢西丁纸片法检测可进一步提高检测的准确性。

【关键词】金黄色葡萄球菌;苯唑西林;Vitek GP535 卡
【中国图书分类法分类号】R446.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-30

Accuracy evaluation of Vitek 2 card for determining MRSA

ZHANG Xiao-heng, et al
(*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Evaluation the diagnostic accuracies of the automated Vitek 2 system for the detection of oxacillin resistance in Staphylococcus aureus strains. *Methods*: The susceptibility of Staphylococcus aureus to Oxacillin were determined by AST P535 card and cefoxitin disk diffusion tests. The validity of the two methods were evaluated by compared the results with the gold standard method of mecA gene determining by PCR. *Results*: The total 125 strains including 89 methicillin resistant Staphylococcus aureus(MRSA) with the positive mecA gene and 36 methicillin susceptive Staphylococcus aureus (MSSA) with the negative mecA gene. Of the 89 MRSA and 36 MSSA strains detected by PCR, 81 strains of MRSA and 35 strains of MSSA were correctly detected by AST P535 cards and 87 strains of MRSA and 36 strains of MSSA were correctly detected by cefoxitin disk diffusion tests. The sensitivity and specificity for Vitek-2 AST P535 card and cefoxitin disk diffusion tests were 91%, 97.5 and 97.8, 100% respectively. *Conclusions*: Detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus strains by using AST P535 cards have good sensitivity and specificity with satisfactory results to addressing clinical diagnostics. Automated Vitek 2 system combined with cefoxitin disk diffusion tests can further improve the detective accuracies.

【Key words】Staphylococcus aureus; Oxacillin; Vitek 2

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant staphylococcus aureus,MRSA)和甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(Methicillin susceptive staphylococcus aureus,MSSA)引起的感染其治疗和预后有较大的差异,因此判断金黄色葡萄球菌对苯唑西林的耐药性具有重要的临床意义。目前越来越多的实验室采用自动化仪器进行细菌的药敏实验,与纸片法药敏试验比较,仪器法具有快速、准确的特点[1]。Vitek-2 仪器上使用的 AST P535 药敏卡片(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)可用于葡萄球菌属、肠球菌属和部分链球菌属细菌的药物敏感性测定。为评价 AST P535 药敏卡片测定金黄色葡萄球菌对关键的指示药物苯唑西林药敏的准确性,本研究采用 PCR 法测定了临床分离的金黄色葡萄球菌的 MecA 基因,并以此结果为金标准,评价 AST P535 药敏卡片与头孢西丁纸片测定 MRSA 的准确性。

作者介绍:张晓恒(1956-),女,副主任技师,
研究方向:细菌耐药性。
通讯作者:张莉萍,女,教授,E-mail: liuzhangcq@yahoo.com。

1 材料与方法

1.1 试验菌株及药敏试验

菌株来自 2007 年 4 月 ~2008 年 10 月本实验室所分离

的临床菌株,经 Vitek-2 GP 卡鉴定为金黄色葡萄球菌。药敏试验用 AST P535 药敏卡片测试金黄色葡萄球菌对苯唑西林的 MIC 值;同时用 K-B 法测试金黄色葡萄球菌对头孢西丁纸片(30 μg,Oxoid)的抑菌环直径。按本室作业指导书进行操作,结果判断按 CLSI2008 版标准[2]。质控菌株为 ATCC29213,ATCC25923。

1.2 mecA 基因检测

进入本研究的试验菌株均进行 PCR 测定,方法如下:挑取菌落置入内含有 200 μl 生理盐水的 0.5 ml 离心管内,离心(15 000 r/min)5 min 弃上清液,沉淀中加 50 μl 裂解液(0.5% NP40,50 μg/ml 蛋白酶 K),置 55 ℃保温 1 h 后煮沸 5 min。离心(10 000 r/min)1 min,上清液即为模板。PCR 引物序列[3]P1:5'-GCAATCGCTAAAGAACTAAG-3',P2:5'-AATGG GAC-CAACATAACCTA-3',94 ℃预变性 5 min,94 ℃1 min,53℃ 1 min,72 ℃1 min,循环 30 次,72 ℃延伸 5 min,PCR 扩增产物作 2%琼脂糖凝胶电泳,扩增产物长度为 224 bp,ATCC 29213 为阴性对照,阳性对照 DNA 序列由上海生工生物有限公司提供。

1.3 结果的处理

以 PCR 测定结果为金标准,计算 AST P535 药敏卡片和头孢西丁纸片法检测 MRSA 的敏感性和特异性,并采用四格表卡方检验比较两种方法检测 MRSA 的一致性。

2 结 果

2.1 AST P535 药敏卡片和头孢西丁纸片检测 MRSA 的敏感性和特异性

共测定了 125 株金黄色葡萄球菌,以 PCR 法检测 mecA 基因为金标准,MRSA 为 89 株,MSSA 为 36 株,采用 AST P535 药敏卡片检测结果为 MRSA 81 株、MSSA35 株,计算出敏感性为 91%,特异性为 97.2%;采用头孢西丁纸片检测结果为 MRSA 87 株、MSSA36 株,计算出敏感性为 97.8%,特异性为 100%。表明头孢西丁纸片法检测 MRSA 的敏感性和特异性略好于 AST P535 药敏卡。

2.2 AST P535 药敏卡片和头孢西丁纸片检测 MRSA 和 MSSA 的一致性

头孢西丁纸片法检测 MRSA 是临床常用的方法,也是 CLSI 推荐的 MRSA 筛选方法,本文采用四格表卡方检验比较 2 种方法是否有显著性差异,结果见表 1 和表 2。

从表 1 和表 2 可见,AST P535 药敏卡片不论检测 MRSA 还是 MSSA 均与 CLSI 推荐的头孢西丁纸片法具有良好的一致性,经统计学分析两种方法检测结果无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 AST P535 药敏卡片和头孢西丁纸片检测 89 株 MRSA 的结果比较

	阳性	阴性	合计
头孢西丁纸片	87	2	89
AST P535 药敏卡片	81	8	89

$\chi^2=3.814$,$P=0.100$

表 2 AST P535 药敏卡片和头孢西丁纸片检测 36 株 MSSA 的结果比较

	阳性	阴性	合计
头孢西丁纸片	0	36	36
AST P535 药敏卡片	1	35	36

$\chi^2=1.044$,$P=1.000$

3 讨 论

目前 MRSA 的检测分表型检测和基因检测,检测 mecA 基因或其基因产物 PBP2a 被公认为 MRSA 检测的金标准,但是 mecA 基因检测需要特殊的仪器设备和人员,PBP2a 乳胶试剂成本较高,限制了这 2 种方法的临床应用。表型检测主要是测定菌株对苯唑西林或头孢西丁的耐药性,但对低水平耐药菌株或异质性耐药菌株可能会产生假阴性结果[4]。而对于高产 β-内酰胺酶的菌株采用苯唑西林检测可能会得到假阳性结果[5]。

Vitek-2 上使用的 AST P535 药敏卡片采用苯唑西林筛选和 MIC 值测定两种方法进行 MRSA 的检测,这种检测方法的优势在于快速和自动化。本研究发现 MIC 值可在 10 h 左右得到,而传统的纸片法和琼脂稀释法检测耐药结果则需要 24 h 以上,但值得注意的是用该法测得的苯唑西林 MIC 是经回归分析得到的,而并非真正的 MIC 值。从本文的结果发现,在检测 89 株 mecA 基因阳性的 MRSA 菌株中 AST P535 药敏卡片有 8 株漏检(MIC 值均≤4 mg/L),敏感性为 91%,而头孢西丁纸片法仅有两株漏检,敏感性为 97.2%;原因是头孢西丁是 mecA 基因调节系统的强诱导剂,可增强 mecA 基因的表达,提高低耐水平的 MRSA 菌株的检出[5]。在检测 36 株 mecA 基因阴性的 MSSA 菌株中 AST P535 药敏卡片有 1 株 MIC 值为 8,误判为 MRSA,其特异性为 97.2%,而头孢西丁纸片法全部检测正确,特异性为 100%,对该菌株进一步分析发现为高产 β-内酰胺酶菌株。该菌株因高产青霉素酶而导致苯唑西林 MIC 值增高,而头孢西丁对于高产青霉素酶的稳定性远高于苯唑西林,故抑菌圈直径不会缩小而产生假阳性结果[5]。

CLSI 在 2005 年推荐使用头孢西丁检测 MRSA,本文结果显示头孢西丁检测 MRSA 的敏感性和特异性均高于苯唑西林,与 PCR 法的结果极为接近。但经统计学分析 AST P535 药敏卡与头孢西丁纸片法检测无明显差异。我们认为使用 AST P535 药敏卡片检测 MRSA 具有简便、快速的特点,准确性能够满足临床需要,特别是阳性结果可靠性极高,而阴性结果存在少数漏检情况,因此建议临床实验室对于 MIC 值≤4 mg/L 的菌株采用头孢西丁纸片法进行确认。如果将 AST P535 卡片中的苯唑西林换成头孢西丁将进一步提高仪器检测 MRSA 的准确性。

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)09-1386-04

流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较

吴建勇,赵德璋
(重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索运用流式细胞仪来检测细胞凋亡的方法。方法:采用流式细胞仪对 DNA 含量、磷脂酰丝氨酸、线粒体膜电位、钙离子浓度的检测,分析细胞凋亡情况。结果:DNA 含量测定存在一定误差;磷脂酰丝氨酸测定能准确反映细胞早晚期凋亡情况;线粒体膜电位、钙离子浓度测定能准确反映凋亡细胞的生理指标,如果结合形态学分析将更为客观。结论:通过比较实验方法,为将来采用流式细胞仪检测细胞凋亡提供更准确的实验方法。

【关键词】流式细胞仪;细胞凋亡;DNA 含量;磷脂酰丝氨酸;膜电位;钙离子
【中国图书分类法分类号】R329.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-26

Comparison among several methods for apoptosis examination by Flow Cytometry

WU Jian-yong, et al
(*Institute of Life Science, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the methods of using Flow Cytometry to examine the apoptosis. *Methods*: Flow Cytometry was used to examine the DNA content, the phosphatidyl serine, the mitcchondrial membrane potential and the calcium ion, the apoptosis was analyzed. *Results*: The DNA content had some deflexion.The phosphatidyl serine examination can reflect the early and advanced stage apoptosis punctually. The mitcchondrial membrane potential and the calcium ion examination can reflect the physiological index of apoptosis cell. But if combined with morphology the analysis will be more objective. *Conclusion*: Through comparing empirical method, we find more precise methods of using the Flow Cytometry to examine the apoptosis in the future.

【Key words】Flow Cytometry; Apoptosis; DNA content; Phosphatidyl serine; Mitcchondrial membrane potential; Calciumion

以往分析细胞凋亡只是关心细胞是死是活,而现在更加关注细胞到底是怎么死的,因为哪条通路受到了影响,究竟哪个阶段发生了凋亡,应该如何去阻止它。凋亡是一个相当复杂的信号级联,参与其中的蛋白活性起了至关重要的作用[1]。然而,凋亡和坏死的许多特征相互重叠,因此有必要采用两种或更多不同的方法来验证细胞的死亡方式。

流式细胞仪(Flow cytomet,FCM)是一种在功能水平上对单细胞或其它生物粒子进行定量分析和分选的检测手段,流式细胞仪的优点是速度快、精度高、准确性好,当细胞发生凋亡这样缓慢和不一致的过程时,流式细胞仪的检测更为准确[2]。

本研究通过流式细胞仪对细胞 DNA 含量、磷脂酰丝氨酸、

作者介绍:吴建勇(1981-),男,助理实验师,硕士,
研究方向:细胞分子生物学。

参 考 文 献

[1] Eigner U, Schmid A, Wild U, et al. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix systems[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3829-3834.

[2] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement M100-S16. Wayne, Pa: National Commitlee for Clinical and Laboratory Standards 2008.

[3] Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(10): 2240-2244.

[4] Skov R, Smyth R, Larsen A R, et al. Phenotypic detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus by disk diffusion testing and Etest on Mueller-Hinton agar[J]. J. Clin. Microbiol, 2006, 44(12): 4395-4399.

[5] Felten A, Grandry B, Lagrange P H, et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test[J]. J. Clin. Microbiol, 2002, 40(8): 2766-2771.

(责任编辑:冉明会)