

葡萄球菌凝固酶试验玻片法结果最佳判读标准的探讨

刘 琼¹, 丁海榕¹, 郑 荣², 彭凤英¹, 童明华¹

(1 旺旺医院, 湖南长沙 410016; 2 中南大学湘雅二医院, 湖南长沙 410011)

[摘要] **目的** 探讨葡萄球菌凝固酶试验玻片法结果的最佳判读标准。**方法** 对临床标本分离的 70 株葡萄球菌属细菌, 以聚合酶链反应(PCR)法检测葡萄球菌凝固酶基因(金标准), 同时以乳胶凝集法快速检测金黄色葡萄球菌(Slidex Staph Plus), 试管法、玻片法检测葡萄球菌凝固酶。经 VITEK-II 全自动分析仪鉴定细菌到种。**结果** 70 株葡萄球菌属细菌中, PCR 法检测葡萄球菌凝固酶基因 56 株为阳性; Slidex Staph Plus 与 PCR 法相对应的 56 株为阳性; 试管法检测与前 2 种方法相对应的 54 株为阳性, 2 株为假阴性; 玻片法为强阳性; VITEK-II 全自动分析仪鉴定 56 株为金黄色葡萄球菌(与 PCR 法同)。另 14 株菌经鉴定为溶血性葡萄球菌。玻片法以粗大颗粒状或明显大絮片状凝集为血浆凝固酶试验阳性的判断, 其准确度为 80.00%, 假阳性率为 20.00%。**结论** 葡萄球菌凝固酶试验玻片法结果最佳判读标准: 以 10 s 内血浆中呈不可磨散的明显团块状凝集, 液面清亮, 在无菌生理盐水中不凝集为阳性。

[关键词] 葡萄球菌属; 葡萄球菌凝固酶试验; 玻片法; 结果判断; 实验室技术与方法

[中图分类号] R446.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)01-0041-03

The optimal standard for detecting coagulase test of *Staphylococcus* with slide method

LIU Qiong¹, DING Hai-rong¹, ZHENG Rong², PENG Feng-ying¹, TONG Ming-hua¹ (1 Want Want Hospital of Hunan, Changsha 410016, China; 2 The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the optimal standard for detecting coagulase test of *Staphylococcus* with slide method. **Methods** Seventy strains of *Staphylococcus spp.* isolated from clinic were studied, *Staphylococcus* coagulase gene were detected with PCR, *Staphylococcus aureus* were rapidly detected with latex agglutination test, *Staphylococcus* coagulase were detected with test tube and slide methods respectively. The species of bacteria were identified by VITEK-II automatic analyzer. **Results** Among 70 strains of *Staphylococcus spp.*, 56 strains were positive *Staphylococcus* coagulase gene with PCR; the same 56 strains were also positive with latex agglutination test; 54 of which were positive with tube test method, 2 strains were false negative; strong positive were detected with slide method, all these 56 strains were identified as *Staphylococcus aureus* by VITEK-II automatic analyzer (the same as PCR results). The other 14 strains were *Staphylococcus haemolyticus*. The judge of positive of coagulase test with slide method was according to coarse granule or apparent floccule agglutination, the accuracy rate was 80.00%, false positive rate was 20.00%. **Conclusion** The optimal standard of positive results with slide method are as follows: plasma appears apparent ball-like agglutination within 10 seconds, fluid in background should be clear, and there is no agglutination when bacteria strains are mixed in physiological saline.

[Key words] *Staphylococcus spp.*; *Staphylococcus* coagulase test; slide method; judge of result; laboratory technique and methods

[Chin Infect Control, 2009, 8(1): 41-43]

早在 20 世纪 90 年代, 国际上将耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染列为世界上三大感染之

[收稿日期] 2008-07-10

[作者简介] 刘琼(1981-), 女(汉族), 湖南省长沙市人, 主管检验师, 主要从事细菌耐药性监测研究。

[通讯作者] 童明华 E-mail: Supperqiong@sohu.com

一。近年来,致病性凝固酶阴性葡萄球菌的检出率也在逐渐上升^[1]。血浆凝固酶检测,一直是鉴定金黄色葡萄球菌的重要试验。葡萄球菌凝固酶试验方法有 4 种,其中血浆凝固酶试验玻片法因操作简单,结果直观即读,目前常被一些实验室所采用。但在日常工作中及卫生部反馈全国微生物检验质控结果评论中,可以看到有些实验室因血浆凝固酶试验结果判定错误而导致细菌鉴定错误的事例。本实验室结合自身工作中的一些模糊概念重新探讨,进一步明确血浆凝固酶试验玻片法的最佳判读标准,旨在提高凝固酶阳性金黄色葡萄球菌检出率的准确性,避免错误引导临床对抗菌药物的选用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验菌株来源 自本院及中南大学湘雅二医院临床送检的血、伤口分泌物、前列腺液、尿、脓拭子等标本中分离获得 70 株葡萄球菌属细菌。

1.1.2 质控菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923, 购自卫生部临床检验中心。

1.1.3 仪器与试剂 VITEK-II 微生物鉴定仪、GPI 鉴定卡、乳胶凝集法快速检测金黄色葡萄球菌(Slidex Staph Plus)试剂,均购自法国生物梅里埃公司。

1.1.4 EDTA-K2 抗凝人血浆 取自当日临床标本。

1.2 方 法

1.2.1 细菌培养与鉴定 各类标本按常规接种,置 35℃ 培养 18~24 h,涂片染色为革兰阳性球菌。经触酶、血浆凝固酶试验初步确定为葡萄球菌;再经 VITEK-II 全自动微生物分析系统鉴定到种。

1.2.2 血浆凝固酶试验玻片法 按《全国临床检验

操作规程》^[2]要求操作与判定结果:在 10 s 内血浆凝集,呈明显团块状,液体清亮者为强阳性,用“++”表示;在 10 s 内血浆凝固,呈粗大颗粒状或大絮片状,液体清亮者为阳性,用“+”表示;在 10 s 内血浆凝固,呈细颗粒或明显絮片状,液体清亮或乳浊者为阴性。以上试验均用无菌生理盐水作阴性对照。

1.2.3 血浆凝固酶试验试管法 按《全国临床检验操作规程》^[2]要求操作与判定结果。

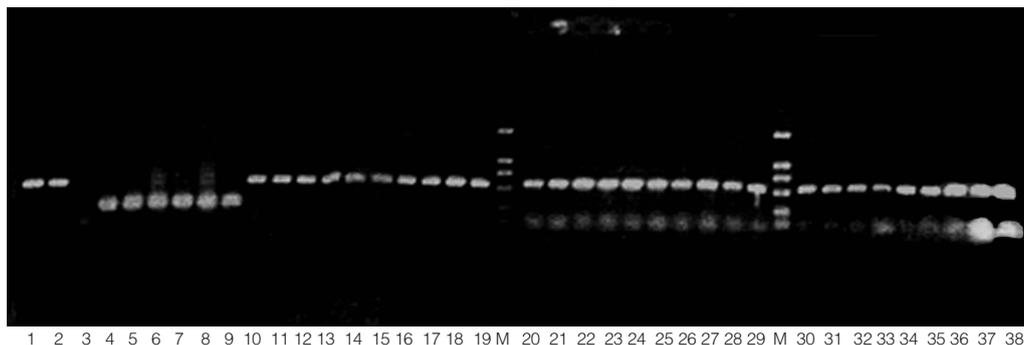
1.2.4 Slidex Staph Plus 按说明书操作。

1.2.5 葡萄球菌凝固酶基因检测 采用聚合酶链反应(PCR)法检测,引物参照 GenBank 公布的血浆凝固酶序列设计:上游引物为 5'-GGCGTTA-AATAGAAGTGGTTCTG-AAGATCCA-3';下游引物为 5'-CTCTTTTTTCGCTTGTGCT-TCAC-TTTTTCT-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成。从过夜纯培养物中提取 DNA,PCR 扩增:94℃ 40 s,62℃ 40 s,72℃ 40 s,共 35 个循环;取扩增产物 15 μL 加至 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 20 min,溴乙锭染色,紫外灯下观察;在 450 bp 处出现荧光区带为阳性结果。

1.2.6 阳性对照 每种方法均以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 标准菌株作阳性对照。

2 结 果

2.1 各种方法检测结果 70 株葡萄球菌属细菌中,PCR 法检测葡萄球菌凝固酶基因 56 株为阳性;Slidex Staph Plus 与 PCR 法相对应的 56 株为阳性;试管法检测与前 2 种方法相对应的 54 株为阳性,2 株为假阴性;VITEK-II 全自动分析仪鉴定 56 株为金黄色葡萄球菌(与 PCR 法同)。见图 1。



1,2 为阳性对照;3 为阴性对照;4~9 为阳性内参;M 为分子 Marker

自下往上分子量分别为 100 bp、250 bp、450 bp、750 bp、1 000 bp、2 000 bp;10~38 为 Slidex Staph Plus 阳性菌株的 PCR 结果

图 1 Slidex Staph Plus 检测阳性菌株的 PCR 结果

Figure 1 PCR results of positive samples detected with latex agglutination test

2.2 血浆凝固酶试验玻片法 70 株葡萄球菌属细菌中的 56 株 PCR 阳性者,血浆凝固酶试验玻片法强阳性(++) ,大部分在 5 s 内就有明显粗颗粒凝集,见图 2;而另 14 株菌在 10 s 内血浆凝固,呈粗颗粒或明显大絮片状,液体清亮,判为阳性,经 VITEK-II 全自动细菌分析仪鉴定为溶血性葡萄球菌。此 14 株溶血性葡萄球菌在血平板上也呈 β 溶血;而在做玻片法凝集试验时,也有边研磨边呈较清晰的粗颗粒或明显大絮片状凝集,见图 3。如果以其溶血状况貌似,又未准确掌握玻片法凝集试验的判断标准,就易得出错误结果。通过此次试验,我们认识到:葡萄球菌凝固酶试验玻片法应“++”(如图 2)才可判为阳性^[3] ;“+”(如图 3)判为阴性。

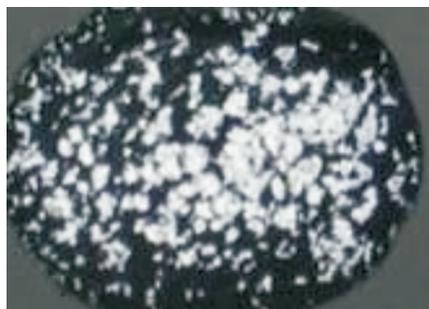


图 2 血浆凝固酶试验玻片法凝固酶阳性

Figure 2 Coagulase positive with slide method of plasma coagulase test



图 3 血浆凝固酶试验玻片法凝固酶阴性

Figure 3 Coagulase negative with slide method of plasma coagulase test

3 讨论

作为金黄色葡萄球菌鉴定的重要试验——血浆凝固酶检测一直沿用至今,经典方法为试管法、玻片法。有些文献资料中对玻片法凝集试验以粗大颗粒或明显凝集者为判断标准,但也有学者认为金黄色

葡萄球菌在血浆中本来就研磨不开有碍观察^[3]。本实验结果显示,试管法准确度较玻片法高,但有假阴性;玻片法以粗大颗粒状或明显大絮片状为标准,假阳性率(20.00%)高,且高于其他文献^[4]。抗凝剂种类与质量、实验温度、血浆纯度、时间以及人为的判断误差,直接影响玻片法结果判读的准确性。使用玻片法检测的关键在于准确掌握判断结果的标准。

本实验中,我们将细菌鉴定到种,观察、比较并确立血浆凝固酶试验玻片法凝集程度最佳标准。Slidex Staph Plus 检测是采用由人类纤维蛋白原和单克隆抗体致敏的蓝色乳胶颗粒,其同时可检测出凝集因子、蛋白 A 以及结合在金黄色葡萄球菌特殊面结构上的群特异性抗原;此方法操作简便,结果快速、准确,敏感性和特异性高^[5],值得推广。PCR 法受条件限制,暂时很难普及。试管法虽较可靠,但因操作繁琐,观察时间长,临床很难用于常规检测。而玻片法因操作简便、快速、结果即得、价廉等优点,常被实验室采用,且日常工作中常将玻片法作为快速筛检金黄色葡萄球菌的重要依据^[3]。准确判断玻片法凝固酶试验的结果,至关重要。如果误将凝固酶阴性葡萄球菌鉴定为金黄色葡萄球菌,将导致鉴定准确性降低。更为重要的是金黄色葡萄球菌与凝固酶阴性葡萄球菌对苯唑西林耐药折点不同,如果将凝固酶阴性葡萄球菌错判为金黄色葡萄球菌甚至 MRSA,将使患者失去对多种抗菌药物的选择而延误治疗,也可能为该患者今后必需的治疗带来易耐药的影响。若将金黄色葡萄球菌错判为凝固酶阴性葡萄球菌,那将给患者带来不堪设想的严重后果^[6]。因此,最常做的、认为最简单而又至关重要的试验,我们不能忽视其判断标准。

[参考文献]

- [1] 李仲兴,郑家齐,李家宏,等. 诊断细菌学[M]. 香港:黄河文化出版社,1992:176-178.
- [2] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:478.
- [3] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 上海:上海科学技术出版社,2007:28-29.
- [4] 马纪平,苏建军,靳景图. 耐甲氧苯青霉素葡萄球菌[J]. 中华医学检验杂志,1996,19(3):186-188.
- [5] 高霞,李卓成,徐小平. 金黄色葡萄球菌凝固酶检测方法的比较评估[J]. 中国感染控制杂志,2005,4(3):257-258.
- [6] 徐建国,梁国栋,邢来君,等. 临床微生物学手册(上册)[M]. 北京:科学出版社,2005:366-367.