

• 检验仪器与试剂评价 •

VITET 2 Compact AST-GP67 药敏卡检测葡萄球菌耐药的应用评价*

林晓晖,陈慧谊,郭仲辉,陈冬雅,黎毓光
(广州市番禺区中心医院检验科,广东广州 511400)

摘要:目的 了解 VITEK 2 Compact AST-GP67 药敏卡检测葡萄球菌耐药的可靠性。方法 采用头孢西丁纸片法检测 130 株葡萄球菌中耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)的情况,双纸片扩散法(K-B)检测葡萄球菌中红霉素诱导的克林霉素耐药(即 D 试验)情况,将其结果与 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏系统的检测结果(仪器法)进行比对,同时用 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏系统对 130 株葡萄球菌进行多种抗菌药的耐药性检测。结果 仪器法、纸片法检测对 MRSA 的检出率分别为 70.89%和 69.62%,对 MRCNS 的检出率分别为 86.27%和 86.27%。仪器法、K-B 法对红霉素诱导克林霉素耐药的检出率分别为 15.38%和 16.15%,二者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 VITEK 2 Compact AST-GP67 药敏卡能准确、快速检测多种抗菌药耐药性的方法,对 MRS,红霉素诱导克林霉素耐药的判定结果准确可靠,适应大中型医院的临床需求。

关键词:葡萄球菌属; 抗药性,微生物; 甲氧西林抗药性; 红霉素; 克林霉素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)09-1145-03

目前,葡萄球菌是人类感染的重要病原菌之一,其中,耐甲氧西林葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococci, MRS)所造成的院内感染一直是临床普遍关注的问题。万古霉素等糖肽类药物已成为治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)的最后防线,但随着耐万古霉素金黄色葡萄球菌(vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, VRSA)、万古霉素中度耐药金黄色葡萄球菌(vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus, VISA)的相继出现, MRS 的耐药情况不容忽视。因此,对葡萄球菌,尤其是 MRS,快速而正确的鉴定与微生物敏感性试验已成为控制葡萄球菌感染的重要环节。本研究收集了本院 2011 年 2~9 月的葡萄球菌 130 株,采用头孢西丁纸片法检测其 MRS,双纸片扩散法(Kirby-Bauer, K-B)检测其红霉素诱导的克林霉素耐药,其结果与 VITEK2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏系统的检测结果进行对比,同时用 VITEK 2 Compact AST-GP67 药敏卡对其进行多种抗菌药耐药性检测。

1 材料和方法

1.1 菌株 收集本院 2011 年 2~9 月从临床标本分离的葡萄球菌 130 株。K-B 法检测的质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923,最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)法检测的质控菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25913 及粪肠球菌 ATCC29212。

1.2 主要材料及仪器 Mueller-Hinton 琼脂由广州迪景微生物科技有限公司提供,头孢西丁药敏纸片(30 μg/片)、红霉素纸片(15 μg/片)和克林霉素纸片(2 μg/片)均购自英国 OXOID 公司,VITEK 2 Compact AST-GP67 药敏卡为法国生物梅里埃股份有限公司产品。采用法国生物梅里埃股份有限公司的 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定/药敏系统进行细菌鉴定和微生物敏感性试验,以下简称仪器法。

1.3 MRS 的判定 采用头孢西丁药敏纸片(30 μg/片)检测 MRS。将头孢西丁对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径小于 21 mm 判定为 MRSA,≥22 mm 为对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(methicillin-sensitive Staphylococcus aureus, MSSA),头孢西丁对凝固酶阴性的葡萄球菌抑菌圈直径小于 25 mm 为耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(methicillin-resistant coagulase

negative Staphylococcus, MRCNS), ≥ 25 mm 为对甲氧西林敏感的凝固酶阴性的葡萄球菌(methicillin-sensitive coagulase negative Staphylococcus, MSCNS)。

1.4 K-B 法检测 采用美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的 K-B 法检测红霉素诱导的克林霉素耐药(即 D 试验)。纸片法微生物敏感检测按 CLSI 2010 标准判读,将 0.5 MCF(麦氏浊度单位)的菌液均匀涂布于 Mueller-Hinton 琼脂平板上,两纸片边缘的距离为 20 mm,35 ℃ 孵育 24 h 后,若靠近红霉素纸片处的克林霉素抑菌环减小,出现截平现象,呈英文大写字母“D”型,判为 D 试验阳性或红霉素对克林霉素具有诱导作用。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,2 种检测方法的比较采用 χ^2 检验及 Kappa 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MRS 检出率 130 株葡萄球菌中检出金黄色葡萄球菌 79 株(60.77%),MRSA 百分比为 69.62%(55/79);凝固酶阴性葡萄球菌 51 株(39.23%),MRSCN 百分比为 86.27%(44/51)。头孢西丁纸片法检出 MRSA 55 株,占 69.62%(55/79);检出 MRSCN 44 株,占 86.27%(44/51)。仪器法检出 MRSA56 株,占 70.89%(56/79);检出 MRCNS 44 株,占 86.27%(44/51),见表 1。分别将仪器法和纸片法对 MRSA 及 MRCNS 检测的 MRS 进行 Kappa 检验,Kappa 值分别为 0.97 及 0.92,提示 2 种方法具有一致性。

表 1 130 株葡萄球菌中对 MRS 检出数(株)及检出率

| 葡萄球菌属(株) | 仪器法(n) | | 纸片法(n) | MRS 检出率(%) |
|----------|--------|------|--------|---------------|
| | 头孢西丁 | 苯唑西林 | 头孢西丁 | |
| MRSA | 55 | 56 | 55* | 69.62 |
| MRCNS | 44 | 43 | 44 | 86.27 |

*:有 1 株金黄色葡萄球菌在头孢西丁纸片法检测中显示为敏感菌株,而仪器法检测显示其为耐药菌株。

2.2 红霉素诱导克林霉素耐药的比较 在仪器法中,有 29 株

* 基金项目:广州市番禺区科信局资助项目(2011-Z-03-01)。

葡萄球菌显示红霉素耐药而克林霉素敏感, D 试验阳性 20 株, 占所测葡萄球菌的 15.38%(20/130)。金黄色葡萄球菌中 D 试验阳性菌株的百分比为 50.00%(10/20), 其中 MRSA 为 50.00%(10/20); 凝固酶阴性葡萄球菌中 MRSCN 的可诱导性耐药为 50.00%(10/20)。在纸片法中, 有 32 株葡萄球菌显示红霉素耐药而克林霉素敏感, 其中 D 试验阳性为 21 株, 占所测葡萄球菌的 16.15%(21/130)。金黄色葡萄球菌 D 试验阳性菌株的百分比为 52.38%(11/21), 其中 MRSA 为 52.38%(11/21); 凝固酶阴性葡萄球菌中 MRCNS 的可诱导性耐药为 47.62%(10/21)。见表 2。

表 2 2 种方法检测葡萄球菌的 D 试验结果比较(n)

| 葡萄球菌属(n) | 仪器法 | | 纸片法 | |
|-----------|---------|----------------|---------|----------------|
| | E-R/C-S | D ⁺ | E-R/C-S | D ⁺ |
| 金黄色葡萄球菌 | 12 | 10 | 15 | 11 |
| 凝固酶阴性葡萄球菌 | 17 | 10 | 17 | 10 |
| 合计 | 29 | 20 | 32 | 21 |

E-R: 红霉素耐药; C-S: 克林霉素敏感; D⁺: D 试验阳性。

2.3 2 种方法检测葡萄球菌红霉素诱导克林霉素耐药的结果

AST-GP67 药敏卡检出金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌中红霉素诱导克林霉素耐药的百分比分别为 50.00% 和 50.00%; 纸片法检出金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌中红霉素诱导克林霉素耐药的百分比分别为 52.38% 和 47.62%。AST-GP67 药敏卡和纸片法检测金黄色葡萄球菌及凝固酶阴性葡萄球菌的 D 试验结果进行 χ^2 检验, P 值分别为 0.82 及 1.00, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 金黄色葡萄球菌及凝固酶阴性葡萄球菌的仪器法与纸片法结果进行 Kappa 检验, Kappa 值分别为 0.90 及 1.00, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。因此, 2 种检测方法的结果具有一致性。

2.4 16 种抗菌药耐药率的检测 采用仪器法检测 16 种抗菌药(青霉素 G、苯唑青霉素、四环素、红霉素、庆大霉素、环丙沙星、左旋氧氟沙星、克林霉素、复方黄胺甲噁唑、利福平、莫西沙星、呋喃妥因、万古霉素、喹奴普汀/达福普汀、力奈唑啉及替加环素)耐药率。青霉素 G 在葡萄球菌中的耐药率为 100%, 四环素、红霉素在 MRSA 中的耐药率分别为 91.3% 及 88.4%, 而万古霉素、力奈唑啉、替加环素在葡萄球菌中的敏感率均为 100%。

3 讨 论

本研究检测出的葡萄球菌属 MRS 耐药率与马均宝等^[1]报道的 MRSA、MRSCNS 耐药率(分别为 75.7%、65.4%)稍有不同, 这可能与菌株的科室来源、标本采集部位及患者年龄有关。本研究所检测的葡萄球菌属标本来自重症监护病房的比例较大, 且以痰标本为主; 患者以老年人居多, 这些因素导致 MRS 的检出率偏高。仪器法中判断 MRS 有头孢西丁和苯唑西林 2 个指标, 根据 CLSI 2010 微生物敏感性试验的判断标准, 当头孢西丁和苯唑西林同时被用于检测金黄色葡萄球菌或路登葡萄球菌时, 只要其中 1 个菌株耐药, 即可报告为 MRS。实际工作中常以头孢西丁的判断结果为准^[2], 与苯唑西林相比, *MecA* 基因在高浓度头孢西丁存在的条件下更易表达, 因此, 当出现 2 个指标的结果不同时, 仪器的专家系统会给出提示, 此时结合实际情况分析, 不易造成漏检。

另外, 仪器法和头孢西丁纸片法在检测 MRS 时, 纸片法检测中显示为敏感的菌株中, 仪器法对其表现为耐药, 这可能

是由于菌株用于纸片法检测时的生长时间过长, 菌落生长进入衰亡阶段, 使涂布于平板上的菌液浓度下降, 达不到耐药水平。也有仪器法检测中显示为敏感的菌株在纸片法检测中显示为耐药, 其可能原因为: (1) 生长缓慢或延迟表达耐药性的 MRSA, 采用仪器法在 3~4 h 内难以达到检测水平, 易漏报 MRSA; (2) 当菌液浓度处于中介值时, 仪器判断可能出错。

目前, 临床在治疗由 MRS 引起的感染时, 多选用大环内酯类、林可酰胺类和 β (族) 链阳霉素。临床使用克林霉素治疗时, 可能因克林霉素诱导耐药而致治疗失败, 而常规的微生物敏感性试验不能检测可诱导的克林霉素耐药, 从而影响临床对克林霉素的正确选用^[3], 因此, 对红霉素耐药而克林霉素敏感的葡萄球菌株应进行 D 试验, D 试验阳性者, 应报告该菌对克林霉素耐药, 对葡萄球菌进行耐药性检测, 并将结果及时反馈临床。

纸片法检测中金黄色葡萄球菌有 11 例为克林霉素诱导性耐药, 而仪器法检测显示其中 1 例表现为对红霉素和克林霉素同时耐药, 即持续耐药。持续型耐药可用一般的微生物敏感性试验方法检测, 而对红霉素耐药而克林霉素敏感的菌株, 用一般的微生物敏感性试验检测不出来^[4]。仪器法检测可能出现对该菌株的误判, 因仪器鉴定与微生物敏感性试验受多种因素影响(如菌落不纯, 菌悬液浓度不标准, 操作时药敏卡暴露于室温时间过长使部分抗菌药受热而效价下降等), 因此, 操作时应严格按操作规程操作, 减少人为因素的影响。

采用 2 种方法检测葡萄球菌的诱导性耐药, 其阳性率均为对红霉素耐药而克林霉素敏感的菌株而言。2 种检测方法中 D 试验检测诱导性耐药的阳性率与张海琼等^[5]报道的可诱导耐药的发生率差异较大, 这可能是后者的检测标本主要来自妇幼保健院, 患者以儿童居多, 而本文报道的数据来自综合性医院, 病源不同造成了检测差异。李红凌等^[6]报道的对红霉素耐药而克林霉素敏感的金黄色葡萄球菌中可诱导耐药率与本研究较为接近。红霉素耐药而克林霉素敏感的金黄色葡萄球菌的 D 试验阳性百分比与乔均等^[7]报道的结果相近。

AST-GP67 药敏卡对多种抗菌药耐药性的分析表明, 青霉素 G、四环素、红霉素在葡萄球菌中的耐药率均在 80% 以上。而在 130 株葡萄球菌中并未出现对力奈唑啉、替加环素和万古霉素耐药的菌株, 与国内报道相近^[8-9]。力奈唑啉、替加环素及万古霉素可在其他抗菌药对 MRSA 无效时使用, 对临床治疗 MRS 有重要作用。

参考文献

[1] 马均宝, 崔东岚, 吴智刚, 等. MRSA 与 MRCNS 的临床感染特点及其耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(8): 756-757.

[2] 吴李培, 吴蓉, 周玉贵, 等. 头孢西丁纸片扩散法筛选耐甲氧西林葡萄球菌[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(16): 175-176.

[3] 曹俊敏, 葛荣跃, 杨雪静. VITEK-2 Compact 仪器法检测葡萄球菌属克林霉素诱导性耐药的评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(5): 1089-1091.

[4] Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6): 2777-2779.

[5] 张海琼, 蒋庆军. 葡萄球菌属红霉素诱导克林霉素耐药性检测[J]. 右江民族医学院学报, 2007, 29(1): 85-86.

[6] 李红凌, 罗湘蓉, 陈俐. 葡萄球菌对克林霉素诱导性耐药的检测及分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(9): 1037-1038.

- [7] 乔昀,陈君灏,罗云桃,等. 146 例金黄色葡萄球菌中红霉素对克林霉素诱导耐药分析[J]. 检验医学, 2012, 27(2): 114-117.
- [8] 王辉,陈民钧,倪语星,等. 2006 年中国七家教学医院革兰氏阳性球菌耐药性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 6(31): 623-627.

- [9] 赵春江,王辉,褚云卓,等. 2010 年中国 12 所教学医院革兰阳性球菌耐药性研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(2): 113-120.

(收稿日期: 2012-11-14)

• 检验仪器与试剂评价 •

全自动生化分析仪的检测精密度、正确度评价及参考区间的验证

蒋红君, 蒋 杰, 王 凡

(云南省第一人民医院检验科, 云南昆明 650032)

摘要:目的 采用日本生研 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ MG)试剂评价雅培 Ci16200 全自动生化分析仪检测系统的精密度、正确度及参考区间的验证。方法 参照美国临床实验室标准化协会美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP5-A2 文件,采用英国 RANDOX 公司高、低 2 个水平质控血清作为实验样品,进行检测精密度评价,用简便的正确度评价实验方案进行正确度评价,用 20 个参考值数据进行参考区间验证。结果 以变异系数表示不精密度,实验样品高、低 2 个水平质控血清的批内、批间、日间不精密度均小于基于生物学变异导出的 $\beta 2$ MG 总误差的 1/4(2.25%),总不精密度均小允许总误差的 1/3(3.00%),低于试剂厂商声明的总变异;正确度验证的相对偏差为 0.25%~2.00%,明显小于根据生物学变异导出的 $\beta 2$ MG 允许 TE(9.00%);20 例健康体检人员中有 2 例(10.00%)观测值超过厂商提供的参考区间。结论 采用日本生研 $\beta 2$ MG 试剂在雅培 Ci16200 全自动生化分析仪上检测,提示该系统检测精密度、正确度良好。

关键词: $\beta 2$ 微球蛋白; 耐用医疗设备; 精密度; 正确度; 性能评价

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)09-1147-03

检测系统的性能评价是医学实验室 ISO 15189 认可、《医学实验室质量和能力专用要求》^[1]和《医疗机构临床实验室管理办法》(以下简称《办法》)的要求。采用检测系统进行常规工作前,人们应对其分析性能进行验证或分析评价,以证实其能满足预期要求。精密度是检测系统的主要分析性能之一,是进行其他性能评价的基础^[2]。EP5-A2 是临床化学设备和检测系统精密度评价的常用标准^[3-4]。临床实验室不断引进新仪器或更换新试剂,将新仪器或新试剂投入临床使用前,人们需对检测系统进行性能评价。首先要进行精密度性能评价,精密度满足性能要求后再进行正确度、特异性、线性范围、可报告范围、干扰性、参考范围等性能评价或验证。笔者对美国雅培 Ci16200 全自动生化分析仪检测 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ microglobulin, $\beta 2$ MG)的精密度、正确度进行了评价,对参考区间进行了验证,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂 主要仪器为美国雅培 Ci16200 全自动生化分析仪(采用免疫增强速率比浊法)。主要试剂为日本生研 $\beta 2$ MG 试剂(批号为 359121)、配套的校准品与质控品(校准品批号为 330041、289101;高、低 2 个浓度的质控品批号为 299021),以及英国 RANDOX 公司质控血清作为精密度实验样品,低值批号为 795EC,高值批号为 797EC。新鲜血清标本采自本院健康体检人员。

1.2 精密度评价方法 根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)EP5-A2 文件要求进行精密度评价^[5]。

1.3 正确度评价方法 采用简便的正确度实验评价方案(即定值参考物质检测)进行正确度评价^[6]。使用日本生研 $\beta 2$ MG 试剂,用批号为 330041 的校准品校准仪器,再将 2 个批号(批号 330041、289101)的校准品在雅培 Ci16200 全自动生化分析仪上进行双份平衡检测(每个批号设 4 个浓度),将检测结果的平均值与校准品的“标示值”进行比较。

1.4 参考值验证方法 采集 20 位本院健康体检人员的新鲜

血清,男、女各 10 例,均为成年人。在雅培 Ci16200 全自动生化分析仪上进行检测,将测定结果与厂商提供的参考区间进行比较,计算超过参考区间的百分比来判断厂商提供的参考区间是否可接受。

1.5 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,按 EP5-A2 文件中的公式计算批内、批间、日间不精密度(即批内、批间、日间变异系数)以及总不精密度,批内与总不精密度的比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 批内精密度与总精密度的比较 高、低 2 个水平的实验样品的批内精密度 χ^2 计算值分别为 19.53 和 5.20,均小于 χ^2 界值表中自由度为 40 的 95%上限临界值(55.80), $P>0.05$;总精密度 χ^2 计算值为 46.40 和 11.70,均小于 χ^2 界值表中自由度为 66 的 95%上限临界值(79.00), $P>0.05$,批内与总精密度比较,差异无统计学意义。

2.2 精密度实验结果与性能要求的比较 表 1 显示,低值实验样品:批内、批间、日间不精密度分别为 1.52%、1.52%、0.76%,总不精密度为 2.27%;高值实验样品:批内、批间、日间不精密度分别为 0.80%、0.67%、0.27%,总不精密度为 1.07%。高、低值实验样品的批内、批间、日间不精密度均小于基于生物学变异确定的 $\beta 2$ MG 总误差(total error, TE)的 1/4(2.25%),高、低值实验样品的总不精密度均小于基于生物学变异确定的 $\beta 2$ MG TE 的 1/3(3.00%),高、低值实验样品的不精密度均符合性能要求。

2.3 不同批号校准品测定值与“标示值”的比较 2 个批号校准品检测结果与“标示值”的相对偏差为 0.25%~2.00%(表 2),明显小于根据生物学变异导出的 $\beta 2$ MG 允许 TE(9%),正确度验证符合性能要求。

2.4 20 例健康体检人员血清 $\beta 2$ MG 的检测结果 20 例健康体检人员中有 2 例(10.00%)观测值超过厂商提供的参考区间 0.00~2.00 mg/L(表 3),未超过 10.00%,日本生研提供的