

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.024

## 新型国产商业化链球菌药敏板的体外药敏检测性能评估

杜伟鹏<sup>1</sup>, 陈向阳<sup>2</sup>, 吕高原<sup>3△</sup>, 周雨<sup>3</sup>1. 河南省南阳市中心医院检验科, 河南南阳 473003; 2. 河南省郑州市人民医院检验科, 河南郑州 450000;  
3. 郑州安图生物工程股份有限公司, 河南郑州 450016

**摘要:**目的 通过考察国产商业化链球菌药敏板与微量肉汤稀释法对 327 株链球菌进行基本一致性(EA)和分类一致性(CA)的测定结果, 评估该药敏板的检测性能。**方法** 收集 2018—2019 年来源于郑州市中心医院、郑州市人民医院、南阳市中心医院和河南省人民医院的 327 株链球菌属不同种类临床菌株, 采用国产商业化链球菌药敏板与微量肉汤稀释法同时测定药敏试验结果的 EA 和 CA 等。**结果** 新型国产商业化链球菌药敏板的 EA 为 99.53%, 其中头孢曲松等 16 种抗菌药物的 EA 均为 100.00%; 氨苄西林、美罗培南、复方磺胺甲噁唑的 EA 分别为 97.86%、96.94%、97.55%; 红霉素/克林霉素诱导试验的 EA 为 98.17%; 在 CA 方面, 两种方法的 CA 为 97.40%, 非常重大误差为 0.09%, 重大误差为 0.59%, 微小误差为 1.92%。**结论** 新型国产商业化链球菌药敏板与微量肉汤稀释法比较, EA 和 CA 均大于 94.00%, 非常重大误差小于 1.50%, 重大误差小于 3.00%, 体外药敏试验检测性能良好。

**关键词:** 商业化药敏板; 一致性; 性能评估; 链球菌属

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)10-1431-04

**Evaluation of new domestic commercially streptococcus drug sensitive slates for drug sensitivity testing in vitro**DU Weipeng<sup>1</sup>, CHEN Xiangyang<sup>2</sup>, LYU Gaoyuan<sup>3△</sup>, ZHOU Yu<sup>3</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473003, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China; 3. Autobio Diagnostics Co., Ltd, Zhengzhou, Henan 450016, China

**Abstract: Objective** To evaluate the performance of the new commercial Streptococcus drug sensitive slates through examining the result of Essential Agreement (EA) and Categorical Agreement (CA) of 327 streptococcus strains detected domestic commercial streptococcus drug sensitivity plate and micro broth dilution method. **Methods** A total of 327 clinical strains of Streptococcus from Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou People's Hospital, Nanyang Central Hospital and Henan Provincial People's Hospital from 2018 to 2019 were collected, and domestic commercial streptococcal drug sensitivity plates and microdilution method was used to simultaneously determine the EA, CA and so on. **Results** The EA of the new domestic commercial streptococcus susceptibility plate was 99.53%, in which the EA of 16 antibiotics such as ceftriaxone was 100.00%; the EA of ampicillin, meropenem and compound sulfamethoxazole were 97.86%, 96.94% and 97.55% respectively. The EA of erythromycin/clindamycin induction test was 98.17%. In terms of CA, CA of two methods was 97.40%, the very major error was 0.09%, the major error was 0.59%, and the minor error was 1.92%. **Conclusion** Compared with the micro-broth dilution method, EA and CA of the new domestic commercial Streptococcus susceptibility plate are greater than 94.00%, the very major error is less than 1.50%, the major error is less than 3.00%. It has good susceptibility testing performance in vitro.

**Key words:** commercial drug sensitive plate; consistency; performance evaluation; streptococcus

链球菌是临床能够分离到的常见致病菌之一<sup>[1]</sup>, 尤其是肺炎链球菌、化脓链球菌、无乳链球菌等, 对于人类, 尤其是儿童的健康存在巨大威胁<sup>[2]</sup>。随着目前广谱抗菌药物在临床中的应用日益增多, 临床上链球菌对于某些抗菌药物的耐药情况也日益严重<sup>[3]</sup>。因

此, 临床分离链球菌属的体外药敏试验检测显得尤为重要。目前, 临床上已经有商业化的链球菌药敏检测试剂, 并且已得到较为普遍的应用, 但是不同厂家或不同方法学之间存在较大差异<sup>[4-6]</sup>。本文通过考察一种国产商业化链球菌药敏板与微量肉汤稀释法对 327

作者简介: 杜伟鹏, 男, 副主任技师, 主要从事医学检验技术方面的研究。△ 通信作者, E-mail: lvgaoyuan@autobio.com。

本文引用格式: 杜伟鹏, 陈向阳, 吕高原, 等. 新型国产商业化链球菌药敏板的体外药敏检测性能评估[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(10): 1431-

株不同种类链球菌的体外药敏试验检测,进而评估该新型商业化链球菌药敏板卡的体外药敏检测性能,期为临床链球菌属引起的感染性疾病提供更合理的用药指导。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 收集 2018—2019 年来源于郑州市中心医院、郑州市人民医院、南阳市中心医院和河南省人民医院的 327 株链球菌属临床菌株,包括肺炎链球菌 107 株,化脓链球菌 41 株,缓症链球菌 51 株,无乳链球菌 55 株,停乳链球菌 7 株,星座链球菌 13 株,咽颊炎链球菌 15 株,草绿色链球菌 8 株,中间链球菌 22 株,血链球菌 8 株。标准菌株:肺炎链球菌(ATCC49619)。

**1.2 仪器与试剂** 上海精科科技公司的酸度计,厦门致微公司的高压灭菌锅,瑞士 METTLER TOLEDO 公司的电子天平,金坛市科析仪器公司的振荡仪,上海跃进公司的恒温培养箱,法国生物梅里埃公司的比浊仪,美国 SIGMA 公司的快速离心机,中国海尔集团的一 20 °C 冰箱,美国 Thermo 公司的移液器,美仑生物科技公司的头孢曲松、利福平、氨苄西林、头孢呋辛、美罗培南、青霉素、氯霉素、头孢噻肟、阿莫西林/克拉维酸、头孢吡肟、四环素、利奈唑胺、替加环素、左氧氟沙星、克林霉素、莫西沙星、甲氧苄啶、复方磺胺甲噁唑、万古霉素、红霉素抗菌药物标准品,购自 Oxoid 公司的 M-H 干粉、脱纤维绵羊血、矿物油,血琼脂平板(郑州安图生物工程股份有限公司),链球菌药敏检测试剂盒(比色/比浊法,郑州安图生物工程股份有限公司),洛阳昊华公司的无水乙醇,国药集团公司的二甲基亚砜。

**1.3 方法** 使用血琼脂平板对质控菌株和临床菌株进行活化,利用 0.85% 生理盐水将各临床菌株制备成 0.5 麦氏单位的菌悬液,根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)《需氧菌的稀释法药敏试验方法》关于链球菌属细菌药敏试验所用培养基制备的规定<sup>[7]</sup>,将 M-H 干粉按照要求的量充分溶解并调节 pH 值至 7.0 左右,121 °C 高温高压灭菌 15 min,灭菌的 M-H 肉汤冷却后,添加 2.5%~5.0% 的脱纤维绵羊血,混匀后备用。分别称取头孢噻肟等 20 种抗菌药物标准品,根据需要考核试剂的各种抗菌药物浓度分布及 CLSI 标准对于肉汤稀释法操作过程的严格规定,使用合适的溶解试剂进行抗菌药物的溶解并加入 96 孔板内,每孔加入 10  $\mu$ L 的 10 倍于检测浓度的抗菌药物溶解液,并使用大型真空干燥箱进行快速干燥处理,保存备用。微量肉汤稀释法操作:取 90  $\mu$ L 加血 M-H 肉汤加入 96 孔酶标板;每种抗菌药物进行 3 次平行试验,将已制得的 0.5 麦氏单位质控菌悬液稀释 200 倍后,各取 10  $\mu$ L 加入酶标板各孔内,滴加 1 滴矿物油液封并置于 35~37 °C 温箱内培养 24 h。待评价链球菌药敏试剂盒操作过程:取出 1 瓶培养液,向其中添加 1 滴显色液和 100  $\mu$ L 菌悬液,混匀后向 120

孔链球菌药敏板每孔加入 100  $\mu$ L 菌悬液,滴加矿物油后盖上盖子置于 35~37 °C 温箱内培养 24 h。两种操作均要求首先进行肺炎链球菌(ATCC49619)的质控,合格后才能进行临床菌株试验。依据 CLSI 文件 M100-S29 标准,对药敏试验结果和敏感性结果进行记录和统计分析。

**1.4 统计学处理** 对两种方法所测得的最小抑菌浓度(MIC)结果及菌株敏感性结果按照菌株分类进行统计学分析,采用 SPSS23.0 统计软件对数据进行分析处理。计数资料以例数或百分率表示,采用  $\chi^2$  检验进行比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。根据 CLSI 的 M52 标准<sup>[7]</sup>进行菌株敏感性比较分析<sup>[8]</sup>;统计出 3 种方法的基本一致性(EA,即不同 MIC 测定方法在  $\pm 1$  个稀释倍数范围内的结果一致性)和分类一致性(CA,即不同方法测定的菌株对抗菌药物敏感性的一致性),另外,对于菌株敏感性,需要进行非常重大误差(VME,即耐药误判为敏感)、重大误差(ME,即敏感误判为耐药)和微小误差(mE,即中介报告为敏感或耐药)结果的测定。美国食品药品监督管理局标准规定指出,CA  $\geq 90\%$ 、EA  $\geq 90\%$ 、VME  $\leq 1.50\%$ 、ME  $\leq 3.00\%$ 、mE  $< 3.00\%$  为可接受范围。

## 2 结果

**2.1 考核试剂盒与微量肉汤稀释法 EA 测定结果** 统计链球菌药敏试剂盒与微量肉汤稀释法的检测结果,对其 EA 进行统计分析,按照 CLSI 标准对于不同方法学结果差异的规定,不同测定方法的 MIC 差值  $\leq 1$  个倍比梯度认为是正确测定值。EA 检测结果见表 1。新型链球菌药敏板与“金标准”微量肉汤稀释法共测定 327 株链球菌的体外药敏检测,在 EA 方面,按照测试结果总量统计,新型链球菌药敏板与微量肉汤稀释结果差异在  $\pm 1$  个稀释倍数内的整体符合结果个数/总结果个数为 6 509/6 540,整体 EA 为 99.53%。对于所涵盖的抗菌药物种类:头孢曲松、利福平、头孢呋辛、青霉素、氯霉素、头孢噻肟、阿莫西林/克拉维酸、头孢吡肟、四环素、利奈唑胺、替加环素、左氧氟沙星、克林霉素、莫西沙星、万古霉素、红霉素的 EA 均为 100.00%;氨苄西林 EA 为 97.86%;美罗培南 EA 为 96.94%;复方磺胺甲噁唑 EA 为 97.55%;红霉素/克林霉素诱导试验 EA 为 98.17%;对于所测临床菌株,随机选取 10 株进行结果重复性测试,检测结果与已测结果一致。

**2.2 考核试剂盒与微量肉汤稀释法 CA 测定结果** 对两种测定方法的体外药敏检测的 CA 进行统计,结果表明,新型链球菌药敏板与“金标准”微量肉汤稀释法测定共进行 327 株链球菌的体外药敏检测,两种方法的整体 CA 为 97.40%,VME 为 0.09%,ME 为 0.59%,mE 为 1.92%。新型链球菌药敏板与“金标准”微量肉汤稀释法的 CA 测定结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 考核试剂盒与微量肉汤稀释法 EA 测定结果

抗菌药物	对比方法		考核试剂盒 EA 测定结果(%)
	MIC 值相差≤1 个倍比梯度(个)	MIC 值相差>1 个倍比梯度(个)	
头孢曲松	327	0	100.00
利福平	327	0	100.00
氨苄西林	320	7	97.86
头孢呋辛	327	0	100.00
美罗培南	317	10	96.94
青霉素	327	0	100.00
氯霉素	327	0	100.00
头孢噻肟	327	0	100.00
阿莫西林/克拉维酸	327	0	100.00
头孢吡肟	327	0	100.00
四环素	327	0	100.00
利奈唑胺	327	0	100.00
替加环素	327	0	100.00
左氧氟沙星	327	0	100.00
克林霉素	327	0	100.00
莫西沙星	327	0	100.00
复方磺胺甲噁唑	319	8	97.55
万古霉素	327	0	100.00
红霉素	327	0	100.00
红霉素/克林霉素	321	6	98.17

表 2 考核试剂盒与微量肉汤稀释法 CA 测定结果[n(%)]

抗菌药物	CA	VME	ME	mE
头孢曲松	317(96.94)	0(0.00)	3(0.92)	7(2.14)
利福平	107(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
氨苄西林	209(95.00)	0(0.00)	2(0.91)	9(4.09)
头孢呋辛	107(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
美罗培南	312(95.41)	1(0.31)	6(1.83)	8(2.45)
青霉素	317(96.94)	0(0.00)	1(0.31)	9(2.75)
氯霉素	308(94.19)	2(0.61)	5(1.53)	12(3.67)
头孢噻肟	320(97.86)	0(0.00)	0(0.00)	7(2.14)
阿莫西林/克拉维酸	101(94.39)	0(0.00)	2(1.87)	4(3.74)
头孢吡肟	322(98.47)	0(0.00)	0(0.00)	5(1.53)
四环素	324(99.08)	0(0.00)	0(0.00)	3(0.92)
利奈唑胺	224(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
替加环素	/	/	/	/
左氧氟沙星	314(96.02)	0(0.00)	2(0.61)	11(3.36)
克林霉素	313(95.72)	1(0.31)	5(1.53)	8(2.45)
莫西沙星	107(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
复方磺胺甲噁唑	101(94.39)	0(0.00)	1(0.93)	5(4.67)
万古霉素	327(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
红霉素	327(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
红霉素/克林霉素	/	/	/	/

注:“/”表示该抗菌药物在 CLSI M100 标准文件中无参考折点。

### 3 讨 论

链球菌常分布于人体的口腔、鼻咽、眼部,少量存在于血液或脑脊液等体液中,常引起肺炎、支气管炎、胸膜炎、脑膜炎、败血症等,尤其是对儿童的健康影响较大<sup>[9]</sup>。另外,随着抗菌药物应用于链球菌感染的治疗日益普遍,链球菌对抗菌药物耐药也逐渐增多<sup>[10]</sup>。

因此,针对链球菌属的体外药敏检测,对于临床用药的指导意义就显得更加重要。

链球菌属耐药性的变迁,全国细菌耐药监测网作为国家级的临床细菌耐药监测机构,出台的全国细菌耐药监测网技术方案也明确规定了链球菌属细菌为必须进行监测的抗菌药物种类,比如对于分离自脑脊液的肺炎链球菌,必须监测青霉素、万古霉素、头孢曲松(或头孢噻肟)、美罗培南等抗菌药物耐药性变迁;对于分离自脑脊液以外的其他标本类型的肺炎链球菌,必须监测青霉素、红霉素、克林霉素、左氧氟沙星或莫西沙星、复方磺胺甲噁唑等抗菌药物的耐药性变迁。因此,对于商业化的链球菌药敏板卡,其能够覆盖的抗菌药物种类必须包含全国细菌耐药监测网技术方案规定的必须监测的抗菌药物种类,并且尽可能地覆盖链球菌属细菌的检测种类。

商业化药敏板目前已经在临床体外药敏检测方面有比较普遍的应用<sup>[11]</sup>,但是针对链球菌的体外药敏检测,由于链球菌对于营养物质要求的特殊性,进口和国产的商业化药敏板检测性能参差不齐,不同种类试剂能够检测的链球菌种类差异也较大。目前,国内临床常用的链球菌药敏进口检测试剂盒有法国梅里埃的 GP68 型号和 GP67 型号药敏卡、美国 BD 公司的 PHOENIX SMIC/ID-2 型号药敏卡、美国贝克曼公司的 PC33 型号和 PMIC29 型号及美国赛默飞公司的 Sensititre STP6F 型号药敏卡。法国梅里埃公司的 GP68 只能用来测定肺炎链球菌药敏试验,GP67 只能用来检测无乳链球菌药敏试验,其他种类的链球菌药敏试验均无法进行检测。熊安英等<sup>[12]</sup>对 Vitek-Com-

pact肺炎链球菌 GP68 药敏卡的性能评估指出,GP68 药敏板卡由于检测原理缺陷,对青霉素、头孢曲松、头孢噻肟、美罗培南等药敏试验检测结果出现假耐药情况,需要使用其他方法复核测定结果,GP68 其余抗菌药物测定肺炎链球菌的 EA 和 CA 均 $>90.00\%$ 。美国 BD 公司链球菌专用 SMIC/ID-2 药敏板条能够检测 75 种链球菌的药敏试验,包括了 15 种抗菌药物;美国贝克曼公司 MicroScan AutoScan-4 PC 系列两种板卡能够对链球菌属进行检测,但是不能覆盖氨苄西林、克林霉素、红霉素和四环素的敏感折点,PMIC29 则不能覆盖氨苄西林的敏感折点;美国赛默飞公司的 Sensititre STP6F 能够检测链球菌属药敏试验结果,但是对于  $\beta$ 溶血链球菌的检测,板卡未包含克林霉素,因此需要使用其他方法来进行补充。MITTMAN 等<sup>[13]</sup>对肺炎链球菌 BD Phoenix 与 Vitek 2、MicroScan microstreps 及药敏试验的比较研究指出,BD Phoenix 与 Vitek 2、MicroScan microstreps 与微量肉汤稀释的 EA  $>95.00\%$ , CA 分别为  $95.50\%$ 、 $94.20\%$ 、 $98.70\%$ ,检测性能良好。

另外,考虑到进口药敏检测产品与国产药敏检测产品比较,虽然性能方面能够明显优于国产药敏检测产品,但是其使用成本太高,这也限制了进口试剂在部分临床机构的应用;一旦国产药敏检测试剂能够在产品检测性能方面达到或接近进口产品检测水平,国产药敏检测试剂能在解决临床实际药敏检测问题的同时,明显降低检验科微生物室的成本。

与纸片扩散法和 E test 法比较,商业化药敏板能够与自动化仪器设备进行配套,减少人工操作过程,能够同时检测多种抗菌药物的体外药敏情况,缩短药敏试验结果报告时间,但是菌株检测范围有一定限制,比如厌氧菌、对营养要求苛刻的少见菌目前还没有商业化药敏板实现对其的检测。

本文考核的国产商业化链球菌药敏试剂盒采用比浊法和比色法相结合的检测方法学,板卡为 120 微孔设计,不仅覆盖了全国细菌耐药监测网技术方案规定的必须检测抗菌药物的种类,还能检测替加环素、利福平等共 19 种抗菌药物,各抗菌药物能够检测浓度梯度平均数大于 6 个,实现 2020 年最新版 CLSI 标准折点全覆盖,检测更加精准;考核试剂盒应用改良的特殊链球菌培养基代替了“金标准”微量肉汤稀释法所用的加血培养基( $2.5\% \sim 5.0\%$ 裂解马血或脱纤维绵羊血),使用更加方便;另外,本国产链球菌药敏板能够同时用于肺炎链球菌、 $\alpha$ -溶血和  $\beta$ -溶血链球菌等多种链球菌的药敏试验检测,通用性强。

本文以微量稀释法作为比对标准,研究了一种新型国产商业化链球菌药敏板对于不同种类链球菌的体外药敏检测性能。研究表明,新型链球菌药敏板与

“金标准”微量肉汤稀释法在测定结果的 EA 方面,整体符合结果个数/总结果个数为  $6\ 509/6\ 540$ ,整体 EA 为  $99.53\%$ ,CA 为  $97.40\%$ ,VME 为  $0.09\%$ ,ME 为  $0.59\%$ ,mE 为  $1.92\%$ 。新型链球菌药敏板与“金标准”在测定结果的 CA 方面比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),也能够充分说明新型国产商业化链球菌平板具有良好的体外药敏检测性能,能够满足临床检测的需要。

## 参考文献

- [1] 刘翔腾,王桂兰,罗序锋,等. 儿童社区获得性肺炎病原微生物分布特点分析[J]. 中国当代儿科杂志,2013,15(1): 42-45.
- [2] 郭彩丽,宋春兰,成怡冰. 血液培养联合血液微生物抗体检测在社区获得性肺炎住院儿童诊断中的应用分析[J]. 中国微生物学杂志,2018,30(5):576-579.
- [3] LAI C C,LEE K,XIAO Y,et al. High burden of antimicrobial drug resistance in asia[J]. J Glob Antimicrob Resist,2014,2(3):141-147.
- [4] 王传清,王爱敏,俞蕙,等. 2016 年儿童细菌耐药监测[J]. 中华儿科杂志,2018,56(1):29-33.
- [5] 张小江,张辉,杨启文,等. 世界卫生组织关注的临床重要细菌耐药变迁:北京协和医院 10 年数据分析[J]. 协和医学杂志,2018,9(1):48-53.
- [6] 叶满,文晓君. 2013—2015 年梧州市儿童社区获得性肺炎病原菌和耐药特征调查[J]. 现代预防医学,2017,44(10):1810-1813.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. M52 Verification of commercial microbial identification and antimicrobial susceptibility testing system[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2005.
- [8] 郑业焕,鲁清月,吕高原,等. 青霉素 E-test 法药敏条临床研究[J]. 医药论坛杂志,2017,38(1):48-50.
- [9] 李英,高杰,商亚敏. 2013—2015 年儿童下呼吸道感染分离菌类型及耐药性变迁[J]. 中国病原生物学杂志,2017,12(2):160-164.
- [10] 俞桑洁,高薇,史伟,等. 上呼吸道感染儿童鼻咽部携带肺炎链球菌状况及血清型和耐药性研究[J]. 中国当代儿科杂志,2014,16(10):988-992.
- [11] 吴舒,李慧. 某全自动微生物鉴定药敏分析仪对病原菌的鉴定能力及临床价值[J]. 检验医学与临床,2019,16(23):3530-3533.
- [12] 熊安英,黄韵,马莉,等. 对 VITEK 2-Compact 肺炎链球菌 GP68 药敏卡的性能评估[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(5):558-561.
- [13] MITTMAN S A,HUARD R C,DELLA-LATTA P,et al. Comparison of BD Phoenix to Vitek 2, MicroScan MI-CroSTREP, and E test for Antimicrobial Susceptibility Testing of Streptococcus pneumoniae[J]. J Clin Microbiol,2009,47(11):3557-3561.