

• 检验技术与方法 •

国产微量肉汤稀释法药敏试剂检测常见多重耐药菌

范 虹,李彦锋

(四川省乐山市中医医院检验科,四川乐山 614000)

摘 要:**目的** 观察一种国产自动化微量肉汤稀释法药敏试剂检测常见多重耐药菌的准确性和实用性。**方法** 采用珠海迪尔生物有限公司生产的细菌测定系统微量肉汤稀释法(MIC 法)药敏试剂与纸片扩散法(K-B 法)药敏试剂同时对葡萄球菌、大肠埃希氏菌和肺炎克雷伯菌的耐药性菌进行检测。**结果** 63 株葡萄球菌中耐甲氧西林的葡萄球菌(MRS)检测 MIC 法阳性 37 株、阴性 26 株,K-B 法阳性 37 株、阴性 26 株;45 株葡萄球菌中红霉素诱导克林霉素耐药检测 MIC 法阳性 19 株、阴性 26 株,K-B 法阳性 20 株、阴性 25 株;42 株大肠埃希氏菌中产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)检测 MIC 法阳性 30 株、阴性 12 株,K-B 法阳性 30 株、阴性 12 株;53 株肺炎克雷伯菌中产 ESBLs 检测 MIC 法阳性 20 株、阴性 33 株,K-B 法阳性 20 株、阴性 33 株。**结论** 该自动化细菌 MIC 法药敏试剂与经典药敏 K-B 法比较对常见多重耐药菌检测结果一致。

关键词:微量肉汤稀释法; 纸片扩散法; 耐甲氧西林葡萄球菌; 诱导性克林霉素耐药葡萄球菌; 产超广谱 β -内酰胺酶的大肠埃希菌; 产超广谱 β -内酰胺酶的肺炎克雷伯菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2735-02

多重耐药菌医院感染已成为日渐严重的问题,直接影响着医疗质量和患者安全。而准确、简便的检测是否为多重耐药细菌,为临床提供正确的抗感染治疗依据、为多重耐药菌的医院感染控制等,起着十分重要的作用。目前越来越多的国产微生物自动化仪器问世,细菌鉴定加药敏一体化的试剂盒操作方便、价格比进口试剂占有明显优势。因此,为了解该类试剂的可靠性,本实验观察一种国产 MIC 法鉴定药敏板检测耐甲氧西林的葡萄球菌(MRS)、红霉素诱导克林霉素耐药的葡萄球菌、产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌与 CLSI 推荐的 K-B 法(表型确认法)比较,对比结果相关性很好。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 本院 2012 年 1 月至 2012 年 12 月住院和门诊患者的各种培养标本。

1.2 培养基 郑州安图血琼脂平板、麦康凯琼脂平板和 OxoidM-H 琼脂平板。

1.3 试剂 珠海迪尔 DL-96STAPH-葡萄球菌鉴定药敏试剂盒、DL-96E 肠杆菌科细菌鉴定药敏试剂盒;杭州天和生物试剂有限公司的红霉素、克林霉素、头孢西丁、头孢他啶、头孢他啶/棒酸、头孢塞肟、头孢塞肟/棒酸等药敏纸片。

1.4 检测方法 细菌鉴定和药敏按试剂盒说明书操作;葡萄球菌、大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性 K-B 法表型确认检测操作按临床和实验室标准化机构(CLSI)2009 年版标准操作:(1)MRS 检测用头孢西丁纸片检测 *mecA* 基因介导的苯唑西林耐药葡萄球菌,判断标准为金黄色葡萄球菌抑菌环直径小于或等于 21 mm 为 *mecA* 阳性、凝固酶阴性葡萄球菌抑菌环直径小于或等于 24 mm 为 *mecA* 阳性;(2)葡萄球菌中红霉素诱导性克林霉素耐药检测用红霉素纸片和克林霉素纸片贴于涂有被检菌液的 M-H 琼脂表面,相距15~26 mm,红霉素耐药时,临近红霉素抑菌圈一侧克林霉素抑菌圈出现“截平”现象为阳性;(3)产 ESBLs 的大肠埃希氏菌和肺炎克雷伯菌用头孢他啶、头孢他啶/棒酸、头孢噻肟、头孢噻肟/棒酸两组药敏纸片进行表型确证试验,对两组中任何一个药物,在加棒酸后抑菌环与不加棒酸的抑菌环直径相比,增大大于或等于 5 mm 时为 ESBLs 阳性。

1.5 质控菌株 金黄色葡萄球菌 ATCC25923、ATCC43300-*mccA* 阳性;大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

2 结 果

2.1 两种方法检测 MRS 结果比较 见表 1。

表 1 63 株葡萄球菌 MIC 法和 K-B 法 MRS 检测结果(n)

检测方法	MI 法(+)	MIC 法(-)	合计
K-B 法(+)	37	0	37
K-B 法(-)	0	26	26

2.2 两种方法检测葡萄球菌中红霉素诱导性克林霉素耐药结果比较 见表 2。

表 2 45 株葡萄球菌 MIC 法和 K-B 法(D 试验)检测结果(n)

检测方法	MI 法(+)	MIC 法(-)	合计
K-B 法(+)	19	0	19
K-B 法(-)	1	25	26

2.3 两种方法检测大肠埃希菌产 ESBLs 的比较 见表 3。

表 3 42 株大肠埃希菌 MIC 法和 K-B 法 ESBLs 检测结果(n)

检测方法	MI 法(+)	MIC 法(-)	合计
K-B 法(+)	30	0	30
K-B 法(-)	0	12	12

2.4 两种方法检测肺炎克雷伯菌产 ESBLs 的比较 见表 4。

表 4 53 株肺炎克雷伯菌 MIC 法和 K-B 法 ESBLs 检测结果

检测方法	MI 法(+)	MIC 法(-)	合计
K-B 法(+)	20	0	20
K-B 法(-)	0	33	33

3 讨 论

临床实验室需要检测的多重耐药菌(MDRO)主要是获得性耐药菌^[1],而此类耐药菌的耐药生理化学机制有以下几点:(1)灭活酶和纯化酶的产生;(2)抗菌药物渗透障碍;(3)药物作用的靶位改变;(4)代谢途径改变等^[2]。目前,葡萄球菌对青霉素和大环内酯类抗菌药物具有 50%以上的耐药率^[3]。已经可以肯定的是,新抗菌药物的开发无法跟上细菌耐药进化的步伐。因此合理使用现有抗菌药物,控制细菌耐药的传播就成为解决细菌耐药问题的关键^[4]。

日常细菌耐药性监测工作中需要一种简便、实用的检测多重耐药菌的实验方法。K-B法是 WHO 推荐的方法,其目的在于技术的简单和可重复性^[5],K-B法还可察觉异型耐药菌株和污染菌株^[6],是比较经典的手工药敏试验方法,但目前不能完全自动化操作,工作量小时手工操作费工费时,而且仅对生长较快的细菌,K-B法药敏试验已经标准化了^[6],但适用范围有限。MIC法是近年来临床微生物实验室应用较多的抗菌药物体外药敏试验方法,其优点是一块板可同时测定多种抗菌药物,但 MIC法试剂成本昂贵。本实验所用的国产自动化细菌测定系统仪器和试剂成本远低于进口仪器,其鉴定药敏试剂板可用于临床 500 多种病原菌的鉴定和抗菌药物 MIC 半定量分析,基本能满足常见的细菌鉴定和药敏试验,其药敏板的设置和配置的报告软件根据 CLSI 标准进行设计,细菌鉴定和药敏试验报告中可同时报告是否有常见 MDRO 菌株的检测结果,不需再用 K-B 法确认;该系统还配有 WHONET 功能,可与 WHO 推荐的细菌耐药性统计 WHONET 软件连接,根据用户的需求,可将检验结果直接导入 WHONET 系统,不需要重新输

• 检验技术与方法 •

3 种提取丙型肝炎病毒 RNA 方法的比较

张宝华¹,王 红²,陈 坤¹

(1. 南京军区福州总医院二部检验科,福建福州 350003;2. 北京总参管理保障部北极寺门诊部,北京 100191)

摘 要:目的 比较 3 种核酸提取方法提取血清丙型肝炎病毒(HCV)RNA 的效率及抗干扰能力。方法 收集 336 例丙型肝炎伴高脂血症、高胆红素血症或高免疫球蛋白血症患者血清,采用 Trizol-氯仿法、异硫氰酸胍法和固相吸附法提取血清中病毒 RNA。以 HCV RNA 荧光定量 PCR 检测结果评价不同提取方法对 HCV 检出率的影响。结果 在高脂血症、高胆红素血症和高免疫球蛋白血症情况下,利用固相吸附法提取的 RNA 模板,定量 PCR 反应的 HCV 检出率均为最高($P<0.05$)。结论 提取血清 HCV RNA 以固相吸附法为佳。

关键词:丙型肝炎病毒; RNA 提取; 聚合酶链反应

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 20. 048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2736-02

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科嗜肝病毒属^[1]。HCV 是非甲非乙型肝炎中导致慢性肝病的主要原因,全球约有 1.7 亿人感染^[2]。HCV 主要经血液和血制品传播,因此,筛查血液及其制品中的 HCV 可有效降低 HCV 的传播概率。本文通过 Trizol-氯仿、异硫氰酸胍、固相吸附法 3 种核酸提取方法对已经确认高血脂、高胆红素和高免疫球蛋白丙型肝炎阳性患者血清进行病毒 RNA 提取,最后对病毒 RNA 荧光定量检测来比较 3 种方法的检出率。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集临床送检的 HCV 阳性血清,经荧光定量 PCR 和酶联免疫测定均符合实验的阳性标本。其中,高血

人,利用 WHONET 软件可及时对日常细菌耐药性监测数据进行回顾性分析,可持续改进药敏实验的质量,保证实验数据的可靠性^[7]。

综上所述,该国产自动化细菌测定系统 MIC 法对葡萄球菌、大肠埃希菌和肺炎克伯菌等 MDRO 检测结果与 K-B 法基本一致,并且操作方便,成本较低,结果可靠,特别适合中小型医院。

参考文献

[1] 马筱玲,鲁怀伟,张艳. 认识细菌的天然耐药和获得性耐药[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(8):762-763.
[2] 倪语星,洪秀华. 细菌耐药性监测与抗感染治疗[M]. 北京:人民军医出版社,2002:26-28.
[3] 李耘,吕媛,薛峰,等. 我国 2009 至 2010 年 MOHNARIN 项目临床分离常见病原菌的耐药监测[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(1):67-87.
[4] 俞云松. 重视细菌耐药检测,提高耐药监测水平[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(1):6-7.
[5] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:896-905.
[6] 李影林. 中华医学检验全书(上卷)[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:1254.
[7] 姚蕾,金少鸿. 抗菌药物纸片法敏感性试验的质量评价与改进[J]. 中国抗生素杂志,2004,29(4):209-213.

(收稿日期:2013-02-05)

脂样本 158 例,高胆红素样本 107 例,高免疫球蛋白样本 71 例。

1.2 试剂 Trizol 购于 Invitrogen 公司,异硫氰酸胍购自南京探求生物技术有限公司,氯仿、无水乙醇、异丙醇等购于西陇化工公司,用于固相吸附的二氧化硅颗粒购买于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, HCV RNA 试剂盒,英科新创(厦门)生物公司生产,仪器为厦门安普利生物公司生产的全自动医用 PCR 分析系统型号 Genelight 9800(试剂为该公司的配套试剂)。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取方法 (1)Trizol-氯仿法:严格参照 Invitrogen 公司试剂盒说明书进行操作。(2)异硫氰酸胍法:取 50 μ L