

• 论 著 •

简略快速法在大肠埃希菌鉴定中的应用价值研究*

王小龙¹, 陈思羽², 袁平宗¹, 张淑霞¹, 杨玉霖¹

(1. 内江市第二人民医院检验科, 四川内江 641000; 2. 西南医科大学临床医学院, 四川泸州 646000)

摘要:目的 比较简略快速法与自动生化鉴定法在大肠埃希菌鉴定中的能力差异。方法 使用快速简略鉴定法和自动生化鉴定法对临床标本分离的疑似大肠埃希菌进行鉴定, 比较两种方法结果的一致性及检测时间。结果 492 株疑似大肠埃希菌经快速鉴定法检出 248 株大肠埃希菌及 244 株非大肠埃希菌; 该 248 株大肠埃希菌中, 有 231 株被自动生化鉴定仪确认为大肠埃希菌, 而 244 株非大肠埃希菌中, 有 7 株被确认为大肠埃希菌。简略快速法阳性预测值及阴性预测值分别为 93.1%(231/248)及 97.1%(237/244)。使用自动生化鉴定法耗时 2.5~7.0 h, 平均(4.12±1.08)h; 使用简略快速法耗时 0.5~2.0 h, 平均(1.08±0.45)h, 差异具有统计学意义($t=-40.252, P<0.001$)。结论 使用简略快速法鉴定疑似大肠埃希菌可以获得接近于自动生化鉴定法的结果, 且更加节省时间。

关键词: 大肠埃希菌; 生化鉴定; 快速鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)20-2845-03

Study of application value of simple-rapid method in Escherichia coli identification*

WANG Xiaolong¹, CHEN Siyu², YUAN Pingzong¹, ZHANG Shuxia¹, YANG Yulin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641000, China;

2. Clinical College, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To compare the difference of simple-rapid identification method and automatic biochemical identification method in the identification of Escherichia coli. **Methods** The strains of Escherichia coli isolated from clinical samples were identified by the simple-rapid method and automatic biochemical method. The consistency of result and the time of two methods were compared. **Results** Among 492 suspected strains, 248 strains were identified as Escherichia coli by simple-rapid method, and other 244 strains were not. Meanwhile, 231 strains of these 248 Escherichia coli strains and 7 strains of 244 non Escherichia coli strains were identified as Escherichia coli by automatic biochemical method. The positive and negative predictive value of simple-rapid method were 93.1%(231/248) and 97.1%(237/244). 2.5~7.0 h [average(4.12±1.08) h] were used to identify Escherichia coli by automatic biochemical method while 0.5~2.0 h [average(1.08±0.45) h] were used by simple-rapid method, the difference was statistically significant($t=-40.252, P<0.001$). **Conclusion** The result of simple-rapid method is close to that of automatic biochemical identification method on Escherichia coli, and simple-rapid method used less time.

Key words: Escherichia coli; biochemical identification; rapid identification

病原菌分离与鉴定是临床治疗感染性疾病的前提, 准确、快速地鉴定细菌是临床微生物学的基本要求。细菌的鉴定经历了形态学方法、表型鉴定法及分子生物学方法几大阶段, 鉴定速度不断提高, 分型更加细致, 成本也更加高昂。当前国内外细菌快速鉴定的方法主要为分子生物学方法, 包括基于核酸检测的 PCR 方法及基于菌体蛋白质分析的质谱法, 然而这一类方法大多需要昂贵的特种仪器及试剂, 普通基层医院大部分仍然在使用传统的自动或者半自动生化鉴定系统, 甚至是手工生化反应管鉴定。

目前常用的传统生化鉴定法属于表型鉴定法, 主要根据微生物生长过程中的一些较特异的酶类、糖类或氨基酸反应而设计, 根据其生化反应特性判断该菌最可能是哪种细菌, 其主要缺点为耗时较长。在传统生化反应基础上筛选出某种细菌特有的生化反应或酶反应, 制成快速显色试纸条, 可以对该种细菌进行快速鉴定到种, 称为简略快速法, 根据待检细菌不同, 本法可将细菌鉴定时间压缩至 10 s 至 2 h, 是传统生化鉴定法的改良与提升。

大肠埃希菌是临床上最常见的革兰阴性致病菌, 且对临床常用抗生素的耐药率不断升高^[1], 快速鉴定该菌对临床合理用药至关重要。大肠埃希菌 IND 试验及 MUG 试验均呈阳性, 通过两项试验可与其他相似细菌区别。本研究旨在通过对比试验, 探讨简略快速法鉴定大肠埃希菌的能力与不足, 为基层医院应用该法鉴定大肠埃希菌提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 试验菌株: 收集本院 2016 年 6 月 1 日至 2016 年 12 月 31 日各临床标本中分离到的革兰阴性杆菌, 使用血琼脂平板及麦康凯平板接种并置于 35℃ 普通培养箱中培养 18~24 h, 通过观察菌落大小、气味、颜色等特征并与标准菌株菌落进行比较, 筛选出疑似大肠埃希菌共 492 株作为试验菌株。标准菌株采用大肠埃希菌(ATCC25922)。

1.2 仪器与试剂 大肠埃希菌自动生化鉴定采用梅里埃全自动细菌鉴定系统 VITEK2 compact 及配套生化鉴定 GN 卡(批号 241384140, 效期至 2017 年 6 月 20 日); 简略快速法试纸条采用重庆庞通公司提供的 IND 试纸条(批号 16F0804, 效期至

* 基金项目: 国际医学研究基金(亚洲区)临床微生物学专项基金项目(CNSC-J2011-A3300)。 作者简介: 王小龙, 男, 主管技师, 主要从事临床微生物感染及耐药机制研究。

2017 年 6 月 8 日)及 MUG 试纸条(批号 16J1304,效期至 2017 年 10 月 13 日)。

1.3 方法

1.3.1 自动生化鉴定 按鉴定仪标准操作规程进行操作,使用无菌棉拭子挑取待检菌落洗脱于无菌生理盐水中并调整浊度至 0.5 McF,与 GN 卡一起置于样本架中上机鉴定,等待自动读取结果。

1.3.2 简略生化鉴定 根据试剂使用说明书操作,使用 IND 缓冲液润湿 IND 试纸条末端,立即用接种环挑取适量菌苔涂抹于试纸上,10 s 内观察结果,涂抹位置显明显蓝色为阳性,否则为阴性,阴性结果判定为非大肠埃希菌;阳性菌株继续进行 MUG 试验。使用 MUG 缓冲液润湿 MUG 试纸条末端,立即用接种环挑取适量菌苔涂抹于试纸上,将试纸置于密闭容器内于 35℃ 孵育,每半小时取出使用伍德灯($\lambda=365\text{ nm}$)对试纸条末端进行照射,显蓝白色荧光为阳性,鉴定为大肠埃希菌,2 h 内不产荧光为阴性,鉴定为非大肠埃希菌。

1.4 统计学处理 记录自动仪器与快速检测鉴定结果及检测时间数据,采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,检测结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,均数比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 简略快速鉴定结果与自动生化鉴定结果对比 使用快速试纸条对疑似大肠埃希菌进行鉴定,结果为大肠埃希菌 248 株,非大肠埃希菌 244 株;使用梅里埃全自动细菌鉴定仪进行鉴定确认,结果快速试纸条检出的 248 株大肠埃希菌中,有 231 株被确认,17 株分别被鉴定为肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌及阴沟肠杆菌等;244 株非大肠埃希菌经自动鉴定仪确认为大肠埃希菌 7 株,肺炎克雷伯菌 184 株,产气肠杆菌 34 株,阴沟肠杆菌 16 株,产酸克雷伯菌 2 株,黏质沙雷菌 1 株;使用简略生化试纸条鉴定细菌的阳性预测值及阴性预测值分别为 93.1%(231/248)和 97.1%(237/244)。见表 1。

表 1 简略快速鉴定结果与自动生化鉴定结果对比			
快速鉴定结果	生化鉴定结果	数量(n)	构成比(%)
大肠埃希菌	大肠埃希菌	231	47.0
	肺炎克雷伯菌	11	2.2
	阴沟肠杆菌	4	0.8
	产气肠杆菌	2	0.4
非大肠埃希菌	肺炎克雷伯菌	184	37.4
	产气肠杆菌	34	37.4
	阴沟肠杆菌	16	6.9
	大肠埃希菌	7	3.3
	产酸克雷伯菌	2	0.4
	黏质沙雷菌	1	0.2

2.2 简略快速鉴定与自动生化鉴定检测时间对比 使用快速简略生化鉴定时,IND 试纸显色时间约 10 s,而 MUG 产生荧光的时间为 0.5~2 h,248 株“大肠埃希菌”鉴定用时平均 $(1.08\pm0.45)\text{ h}$;使用梅里埃鉴定仪时,仪器自动读取结果,耗时 2.5~7.0 h,238 株大肠埃希菌平均用时 $(4.12\pm1.08)\text{ h}$ 。两种方法鉴定时间比较,差异有统计学意义($t=-40.252,P<0.001$),使用快速简略鉴定法更省时。

3 讨 论

大肠埃希菌在人类及其他动物肠道中正常定植,且广泛分

布于自然环境中,包括人类饮水及食物,是一种常见的革兰阴性杆菌。某些血清型大肠埃希菌可引起人类腹泻,称为致泻性大肠埃希菌,但多数血清型属于条件致病菌,主要引起人类败血症、肺炎、腹膜炎、尿路及软组织感染等,是国内外临床标本中分离率最高的细菌^[2-3]。近年来,随着抗生素被广泛用于治疗各类细菌引起的感染,作为人体正常菌群的大肠埃希菌在抗生素作用下,其耐药性不断增强,甚至产生广谱耐药性,给临床治疗带来困难。特别是在发展中国家,由于抗生素的不合理应用,大肠埃希菌的耐药性发展趋势比发达国家更让人担忧^[4-6]。正是由于其对抗生素耐药性的不断提高,经验性抗菌治疗正变得越来越低效,控制大肠埃希菌或者其他致病菌的耐药性的重要方法即是规范抗菌药物的使用,在治疗用药时需要尽可能地“对症下药”,使治疗更加科学精准,而快速、准确地鉴定大肠埃希菌则是科学用药的前提。

目前,受制于国内经济发展水平,我国大部分基层医疗机构仍然使用全自动或半自动细菌鉴定系统,如梅里埃 VITEK2 Compact、西门子 WalkAway 及国产的迪尔 96 系统,少数大型医院配置有 PCR 检测仪或者质谱分析仪用于细菌鉴定,而使用简略生化反应进行鉴定的报道尚且罕见。该方法的不足之处在于仅采用了两种生化反应鉴定大肠埃希菌,其他肠杆菌科细菌也可能因含有相关酶类而产生相同结果,或者由于大肠埃希菌的自身变异使得反应不够灵敏,进而影响鉴定结果,出现一定的错误率,所以需要对其鉴定的准确性进行研究和验证。经过本研究比较,在大肠埃希菌常规鉴定能力方面,简略快速法相较于梅里埃 VITEK2 鉴定仪的阳性预测值与阴性预测值均大于 90%,其鉴定结果可信度较高,而且可以节约大量鉴定时间,平均仅需耗费日常鉴定 25% 的时间。

简略快速检测是由表型鉴定法中的生化反应分析法经过简化演变而来,虽然其鉴定能力尚无法达到与全面生化反应相同的水平,但由于其耗时短、速度快、判读直观,且在成本控制方面优于分子生物学方法^[7-9],可用于大肠埃希菌的快速筛查。另外,虽然与传统方法相比,其存在一定的鉴定错误率,但从结果来看,简略快速法鉴定错误大部分发生在肠杆菌科内,根据 CLSI 规则并不影响其药敏结果判读,所以该法在大肠埃希菌快速药敏试验及血培养二级报告精准化方面的作用不容忽视^[10]。

本研究认为,简略快速法相对于分子生物学方法具有成本优势,与传统方法比较具有速度优势,基本可满足基层医院对细菌快速鉴定的需求。相较于传统鉴定方法,简略快速法可能为患者精准用药提供一个更加科学的参考。

参考文献

[1] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,全国细菌耐药监测网. 2015 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国执业药师, 2016(3):3-8.

[2] Alem N,Frikkh M,Srifi A,et al. Evaluation of antimicrobial susceptibility of Escherichia coli strains isolated in Rabat University Hospital (Morocco) [J]. BMC Research Notes,2015,8:392.

[3] Lobel B,Valot A,Cattoir V,et al. Comparison of antimicrobial susceptibility of 1 217 Escherichia coli isolates from women with hospital and community-acquired urinary tract infections [J]. Presse Med,2008,37(5 Pt 1):746-750.

[4] Bell JM,Turnidge JD,Gales AC,et al. (下转第 2849 页)

温度的影响。

本研究结果提示,在低温度时,出现血型正反定型不符合交叉配血不相符时,应考虑是否存在冷凝集素的影响,从而导致结果出现偏差。因此,临床中进行配血时,应保证在 37℃ 环境温度下进行,并注意将冷凝集素与血清中有可能存在的其他不规则抗体相鉴别,可用盐水法配血联合聚凝胺法配血。此外,在输血时,选择能与同种抗体相容的血液,在输注之前,于 37℃ 适当加热,以避免出现冷凝集反应,降低输血风险,提高输血安全性。

当环境温度较低时,可引起血液中的冷凝集素短暂性升高,从而影响 ABO 血型正反定型和电子交叉配血试验的结果。因此,在血型鉴定及配血的过程中应注意保持适宜的环境温度,避免冷凝集反应发生。如提升环境温度后,仍发生冷凝集反应或者正反定型结果不相符,要排除其他原因引起的冷凝集反应,同时在输血过程中,要对所输血液进行复温,输注速度不应太快,以保证安全输血,降低不良反应发生率。

参考文献

- [1] 王静,徐凤娟,叶宏辉,等. 高效价冷凝集素对血型鉴定和交叉配血的影响相关分析[J]. 临床血液学杂志(输血与检验),2014,27(6):500-501.
- [2] Zhang J,Gu F,Zhu JY,et al. Using a combined hydrolysis factor to optimize high titer ethanol production from sulfite-pretreated poplar without detoxification[J]. Bioresour Technol,2015,186:223-231.
- [3] 刘芳,高新. 高效价冷凝集素所致血型鉴定困难 200 例报告分析[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2015,12(6):67-69.
- [4] 王华. 冷凝集素在血型鉴定和交叉配血不合中的鉴别[J]. 实用心脑血管病杂志,2011,19(10):1758-1758.
- [5] 李英,夏伟红. 高效价自身冷抗体致血型鉴定和交叉配血困难的有效处理[J]. 临床研究,2016,24(2):192-192.
- [6] 王欣,唐燕平,张丽萍,等. 冷凝集素致血液分析仪检测结果误差的分析[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(12):3479-3480.
- [7] Hu J,Lin Y,Zhang Z,et al. High-titer lactic acid production by lactobacillus pentosus FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermenta-

- tion. [J]. Bioresour Technol,2016,214:74-80.
- [8] 孔秀红. 吸收放散试验在高效价冷凝集素导致的血型鉴定和交叉配血困难时的临床应用价值[J]. 中国继续医学教育,2015(5):171-172.
- [9] 任伟,陈惠欣,韩杰,等. ABO 血型正反定型不一致的原因分析及解决策略[J]. 临床血液学杂志(输血与检验),2016,29(2):289-291.
- [10] 张丽,黎宇,杨雨珍. 60 例 ABO 血型正反定型不符的原因分析[J]. 吉林医学,2014,35(5):1001-1002.
- [11] 刘家瑞,王远杰,陈亮,等. 电子交叉配血技术中供血者不规则抗体筛查的临床研究[J]. 实用医院临床杂志,2014,11(4):131-133.
- [12] 陈芳,文进. 高效价冷凝集素干扰 ABO 血型鉴定和交叉配血 1 例报告[J]. 医学信息,2014(20):635-635.
- [13] Tripathi L, Mani S, Raut R, et al. Pichia pastoris-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies[J]. Front Microbiol,2015,6:1005.
- [14] 刘家瑞,陈亮,王远杰,等. 电子交叉配血技术在手术备血中的应用研究[J]. 华西医学,2014,10(7):1313-1315.
- [15] Kawaoka Y, Horimoto T, Murakami S. High titer recombinant influenza viruses with enhanced replication in vero cells [P]. 2011-05-12 [2017-10-30]. paperuri: (12054e1bd100fbe19c89ad8f8260ed85).
- [16] 邹文涛,何子毅,王庆,等. 献血者红细胞不规则抗体检测在电子交叉配血技术中的应用分析[J]. 中国输血杂志,2015,28(5):533-536.
- [17] 唐友云,桂满元. 冷凝集素对血常规的影响及不同处理方法的分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(17):2401-2403.
- [18] Xia Y,Peng Z,Sun J,et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock[J]. J Biotechnol,2016,217:112-121.
- [19] 李琰. 高效价冷凝集素对血常规检测的影响和消除对策[J]. 中国保健营养,2016,26(18):307-308.

(收稿日期:2017-03-20 修回日期:2017-05-24)

(上接第 2846 页)

- Prevalence of extended spectrum beta-lactamase(ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa; regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program(1998—1999)[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2002,42(3):193-198.
- [5] 唐凤鸣,罗麟洁,简阅,等. 2011—2013 年宜宾市大肠埃希菌临床分布及耐药趋势分析[J]. 华西医学,2015,30(7):1274-1276.
- [6] 闫广运,张敏. 2008—2014 年 1 239 株大肠埃希菌的医院感染状况及耐药分析[J]. 现代预防医学,2016,43(3):534-536.
- [7] Bourjilat F, Bouchrif B, Dersi N, et al. Emergence of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in community-acquired urinary infections in Casablan-

- ca, Morocco[J]. J Infect Dev Ctries,2011,5(12):850-855.
- [8] Rahi P, Prakash O, Shouche YS. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists[J]. Front Microbiol,2016,7(4):1359.
- [9] Cox CR, Saichek NR, Schweizer HP, et al. Rapid *Burkholderia pseudomallei* identification and antibiotic resistance determination by bacteriophage amplification and MALDI-TOF MS[J]. Bacteriophage,2014,4(3):e29011.
- [10] 王书侠,张家明,周竞,等. 血培养阳性标本直接药敏试验临床应用价值的评估[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(10):2270-2272.

(收稿日期:2017-03-22 修回日期:2017-05-26)