

## 基于 CLSI-M43 国际标准改良的 Mycoview-AST 试剂盒检测性能评估\*

顾敏晔<sup>1,2</sup>, 沈燕<sup>1</sup>, 李福刚<sup>1</sup> (1. 上海奥普生物医药有限公司,  
上海 201201; 2. 复旦大学生命科学院, 上海 200433)

**摘要:**目的 基于美国临床标准化协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI) M43 国际标准改进的泌尿生殖道支原体 Mycoview-AST 试剂盒检测性能评估。方法 以法国 MYCOFAST<sup>®</sup> revolution 支原体试剂盒为比对标准, 用 CLSI-M43 规定的质控株和有关指标及 60 例临床标本对新改进的试剂盒性能进行评估。结果 Mycoview-AST 试剂盒以质控菌株检测的药敏结果与 MYCOFAST<sup>®</sup> revolution 试剂盒一致。60 例临床标本, 阴性标本 37 例, 解脲支原体(Uu)阳性 16 例, 人型支原体(Mh)阳性 5 例, Uu 与 Mh 均阳性的标本 2 例。两种试剂盒 Uu 和 Mh 的鉴定结果一致。23 例阳性标本的药敏结果共 161 个, 与进口比对试剂 MYCOFAST<sup>®</sup> 比对, 154 个结果符合, 药敏结果符合率为 95.6% (154/161)。结论 基于 CLSI-M43 国际标准改进后的 Mycoview-AST 试剂盒检测性能与国际知名品牌 MYCOFAST<sup>®</sup> revolution 试剂盒相当。

**关键词:** 美国临床标准化协会 M43-A; 解脲支原体; 人型支原体

**中图分类号:** R446 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)02-105-04

**doi:** 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2016. 02. 031

## Detection Performance Evaluation of the Mycoview-AST Kits That Was Improved Based on the International Standard CLSI M43-A

GU Min-ye<sup>1,2</sup>, SHEN Yan<sup>1</sup>, LI Fu-gang<sup>1</sup>

(1. Shanghai Upper Biological Medicine Co. LTD, Shanghai 201201, China; 2. College  
of Life Science of Fudan University, Master of Bioengineer candidate, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the performance of the Mycoview-AST kits, which was improved based on the international standard CLSI-M43. **Methods** Evaluated the performance of the improved kit with the control strains which were assigned by CLSI-M43 and 60 clinical specimens, compared with MYCOFAST<sup>®</sup> revolution kit as the standard. **Results** The results of the antibiotic susceptibility tests with the control stain were in accordance with that of MYCOFAST<sup>®</sup> revolution kit. In the 60 clinical specimens, the identification results of mycoplasma in these two kits were corresponding. The coincidence rate of the antibiotic susceptibility tests with the clinical specimens in these two kits was 95.6% (154/161). **Conclusion** The performance of the improved Mycoview-AST kits based on CLSI-M43 was equal to MYCOFAST<sup>®</sup> revolution kit.

**Keywords:** CLSI M43-A; ureaplasma urealyticum; mycoplasma hominis

支原体(mycoplasma)是一类介于细菌和病毒之间, 缺乏细胞壁的原核细胞型微生物。与泌尿生殖道感染有关的主要是解脲支原体(ureaplasma urealyticum, Uu)和人型支原体(mycoplasma hominis, Mh)两种。约有 20%~30% 的非淋菌性尿道炎的病人, 是由以上两种支原体引起的, 它们是引起非淋菌性尿道炎及宫颈炎的第二大致病菌。近年, 随着泌尿生殖道疾病发病率的增高, 以及抗生素滥用引发耐药株增多的情况下, 支原体感染的发病率亦呈明显增高趋势<sup>[1]</sup>。

目前, 临床上使用较普遍的解脲支原体(Uu)和人型支原体(Mh)的培养鉴定和药敏原理是通过

Uu 和 Mh 在生长过程中, 分别能专一性地分解尿素和精氨酸产碱, 使培养介质 pH 升高, 在指示剂作用下, 使培养液由原先的橘黄色变为桃红色, 并且, 颜色变化程度和支原体数量呈正比<sup>[2]</sup>。

但支原体由于其菌体的特殊性, 如没有细胞壁, 其菌液定量存活稳定性远不如细菌, 并且对培养液营养要求高。又因体积微小, 无法形成浊度而难于控制药敏试验中的菌量, 因此其体外药敏试验较难标准化<sup>[3]</sup>。故在 2011 年以前, CLSI 和其他国际组织均没有公布用于支原体的药敏试验标准。因此, 各生产厂商的配方、操作、判读、质控各异, 各医院对同一样本的检测结果往往一致性很差。审

\* 基金项目: 上海医学即时检验产业技术创新联盟(11DZ0512200)。

作者简介: 顾敏晔(1973-), 女, 学士, 硕士研究生在读, 副主任检验师, E-mail: lyxwan@live.cn。

批试剂盒的国家食品药品监督管理局在执法时也无权威性的法规可参照,只能依赖于和已上市多年、反响较好的试剂盒进行比对测试,绝大多数样本测试结果符合就算合格。

历年来,美国临床实验室标准化协会(CLSI)公布的药敏试验操作和判断标准,是全球均遵循的法规性文件。标准对抗生素种类、浓度、质控标准菌株及介质组分和 pH、孵育条件、结果判读等做了具体规定,每年定期公布更新版本,但从不包括支原体。

2011年10月,CLSI颁布的《人支原体抗微生物药物敏感试验方法执行指南》M43-A 出台。该文件提供了针对肺炎支原体、人型支原体(Mh)、解脲支原体(Uu)的药物体外肉汤稀释和琼脂稀释药敏试验的操作、判读和质量控制的指导意见,规定了质控菌株,确定了 Mh 和 Uu 药敏检测的抗生素选择和最小抑菌浓度(MIC)判读标准<sup>[4]</sup>。

新指南出台后,我们在原上市产品“Mycoview 泌尿生殖道支原体培养和药敏试剂盒”的基础上,用 CLSI M43-A 指南规定的标准菌株、药物浓度和判读方法等,改进原来的检测板条,使其与 CLSI 首次颁布的支原体药敏试验指南接轨,提供符合国际标准指南的试剂盒。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2014 年 5~6 月,上海某三级某专科医院临床 60 例女性疑似支原体感染患者的宫颈分泌物,每个患者同时取 2 份拭子标本。

### 1.2 标准菌株与试剂

1.2.1 CLSI 规定的质控菌株:解脲支原体(ATCC33175)和人型支原体(ATCC23114)由法国 Zeakon Diagnostics 公司提供。

1.2.2 试剂: Mycoview 支原体完全培养基由上海奥普生物公司提供;法国 ELITech 公司 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 试剂盒由法国 Zeakon Diagnostics 公司提供;左旋氧氟沙星、莫西沙星、红霉素、克林霉素和四环素等抗生素购于美国 SIGMA 公司。改进后的支原体培养鉴定计数药敏试剂盒 Mycoview-AST 已由奥普公司生产外销欧洲。

### 1.3 方法

1.3.1 建立在一定期限内、活支原体数量稳定的解脲支原体(ATCC33175)和人型支原体(ATCC23114)质控菌株贮存方法,使每次药敏中质控株的菌量能方便的受控,稀释后即可应用。

1.3.1.1 质控菌株冻干菌种制备方法:取 1 ml 已复溶的首代支原体 ATCC 标准株接种于 9 ml 奥普 Mycoview 完全培养液中,37℃ 培养 16~24 h,至培养液颜色呈微红时,分装西林瓶,每瓶 0.5

ml, -20℃ 预冻过夜。第二天冷冻干燥,在真空条件下封口 -20℃ 保存。每半年取出一瓶菌种进行活菌量稳定性检测。将冻干菌种用 0.5 ml 无菌生理盐水复溶进行连续梯度稀释,依次为 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>……10<sup>10</sup> 倍稀释。分别取上述稀释的菌液 0.2 ml 接种于 1.8 ml Mycoview 完全培养液中,37℃ 培养 24~48 h。Uu 24 h 记录结果, Mh 48 h 记录结果。

1.3.1.2 质控菌株甘油液相贮存方法:取 1 ml 已复溶的首代支原体 ATCC 标准株接种于 9 ml Mycoview 完全培养液中,37℃ 培养 16~24 h,至培养液颜色呈微红时,加入 2 ml 无菌甘油,充分混匀后分装,每支 0.5 ml,做好标识, -20℃ 保存。每月取出一支菌种进行菌量稳定性检测,用无菌生理盐水进行连续梯度稀释,依次为 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>……10<sup>10</sup> 倍稀释。分别取出上述稀释的菌液 0.2 ml 接种于 1.8 ml 完全培养液中,37℃ 培养 24~48 h。Uu 24 h 后记录结果, Mh 48 h 后记录结果。

1.3.2 半定量计数滴度:用已有 CE 认证的 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 试剂盒来定量检测质控菌株的浓度。因为所有经过 CE 认证的支原体试剂盒都与 A8 支原体琼脂平板计数的金标准方法做过比对试验,已标化了 10<sup>4</sup> CFU/ml 鉴定孔的浓度。取冻干的 Uu 和 Mh 标准菌种用 0.5 ml 无菌生理盐水复溶后混匀(液相保存者解冻摇匀直接稀释),用生理盐水作 10 倍连续梯度稀释,依次为 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> 5 个稀释度。取上述不同稀释倍数的菌液 0.2 ml 分别接种 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 试剂条。37℃ 培养, Uu 24 h 后观察结果, Mh 48 h 后观察结果。观察不同浓度梯度的 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 板条上 Uu 10<sup>4</sup> 和 Mh 10<sup>4</sup> 鉴定孔的培养结果,选择最后显示阳性的那个稀释倍数,乘以 10<sup>4</sup> 的结果作为贮存质控菌株的原始浓度,药敏检测时稀释到 M43-A 文件推荐的 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> CFU/ml 质控菌株浓度。

1.3.3 按 2011 年 CLSI M43-A 新法规要求,改进原 Mycoview 药物敏感试验板条上第 6~12 孔的药物浓度,依次为克林霉素 0.25 μg/ml;四环素 1 μg/ml 和 4 μg/ml;左旋氧氟沙星 1 μg/ml 和 2 μg/ml;莫西沙星 0.25 μg/ml 和 2 μg/ml,以达到 CLSI-M43-A 要求的药物浓度。用 CLSI-M43 规定的质控菌株和有关指标及 60 例临床标本对新改进的试剂盒性能进行评估。

1.3.3.1 质控菌株药敏试验方法:按照试剂盒说明书,将已定量的质控菌株 200 μl,加入 2.0 ml 运输培养液中混匀,并全部转移到冻干的生长培养液中,充分复溶混匀。将混匀后的培养液分别接种 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 和新板条 Mycoview

AST,每孔 100  $\mu$ l。然后加入 2 滴石蜡油,封膜。37℃培养 24~48 h。Uu 24 h 后记录结果,Mh 48 h 后记录结果。

1.3.3.2 临床标本药敏试验方法:已采样的拭子在 2.0 ml 运输培养液中搅动数次,取出前紧压瓶壁。将接种后的运输培养液全部转移到冻干的生长培养液中,充分复溶混匀。将混匀后的培养液分别接种 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 和新板条 Mycoview AST,每孔 100  $\mu$ l。然后加入 2 滴石蜡油,封膜。37℃培养 24~48 h。Uu 24 h 后记录结果,Mh 48 h 后记录结果。

## 2 结果

### 2.1 ATCC 标准菌株保存稳定性结果

2.1.1 冻干标准菌株-20℃保存稳定性结果:2013年3月~2015年3月,每半年的菌量稳定性测试结果表明,标准菌株在-20℃冻干条件下保存2年,活菌量滴度稳定。

2.1.2 甘油液相保存标准菌株稳定性结果:自2013年3月~7月,每个月的菌量稳定性测试结果表明,菌种在甘油液相-20℃保存的条件下,可以稳定保存三个月,第四个月开始活菌滴度略有下降。

2.2 半定量计数滴度培养 当稀释度为  $10^3$  时,Uu 仍能生长,乘以该孔浓度  $10^4$ ,得到其原始浓度为  $10^7$ ;当稀释度为  $10^2$  时,Mh 仍能生长,乘以该孔浓度  $10^4$ ,得到其原始浓度为  $10^6$ ;稀释后得到各自最终半定量浓度  $10^4$  CFU/ml。

### 2.3 改进后的 Mycoview AST 质量性能验证结果

2.3.1 将  $10^4$  CFU/ml 的 ATCC33175 和 ATCC 23114 接种基于 CLSI-M43 国际标准改进后的 Mycoview AST 和对照试剂 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 的药物敏感试验结果见表 1,CLSI M43-A 标准见表 2。

表 1 标准菌株在改进后的新试剂及对照试剂中的药敏结果

药物 MIC ( $\mu$ g/ml)	ATCC 33175			ATCC 23114	
		Mycoview AST	MYCOFAST <sup>®</sup>	Mycoview AST	MYCOFAST <sup>®</sup>
克林霉素	0.25	R	R	S	S
四环素	1	R	R	S	S
	4				
左氧氟沙星	1	S	S	S	S
	2				
莫西沙星	0.25	S	S	S	S
	2				

注:R 耐药;S 敏感。

表 2 CLSIM43-A 标准要求

MIC ( $\mu$ g/ml)	克林霉素 0.25	四环素 1 4	左氧氟沙星 1 2	莫西沙星 0.25 2
ATCC	—	—	0.5~2	0.5~2
33175	—	S $\leq$ 1 R $\geq$ 2	S $\leq$ 2 R $\geq$ 4	S $\leq$ 2 R $\geq$ 4
ATCC	0.03~0.25	—	—	0.015~0.12
23114	S $\leq$ 0.25 R $\geq$ 0.5	S $\leq$ 4 R $\geq$ 8	S $\leq$ 1 R $\geq$ 2	S $\leq$ 0.25 R $\geq$ 0.5

注:—:标准中无相关结果;R 耐药;S 敏感。

2.3.2 用改进后的 Mycoview AST 试剂盒与对照试剂盒 MYCOFAST<sup>®</sup>检测 60 例临床标本,阴性标本 37 例,Uu 阳性 16 例,Mh 阳性 5 例,Uu 与 Mh 均阳性的标本 2 例。两种试剂盒 Uu 和 Mh 的鉴定结果完全一致。

2.3.3 23 例阳性标本的药敏结果共 161 个,与进口比对试剂 MYCOFAST<sup>®</sup>比对,154 个结果符合,符合率为 95.6%。改进后的 Mycoview AST 试剂盒与国际知名 MYCOFAST<sup>®</sup>revolution 试剂盒的药敏比对结果符合率良好。

3 讨论 早在上世纪 60 年代,支原体体外药物敏感试验开始应用。此后,虽有大量的文献报道使用肉汤和琼脂平板的方法进行支原体的药物敏感性试验,但是一直没有统一的被接受的标准参考方法来指导和规范支原体体外药敏试验,从而导致该类检验结果对临床的指导意义受到限制,大部分支原体感染在临床上的治疗还是以经验性治疗为主<sup>[5]</sup>。M43-A 是 CLSI 首次颁布的用于 Uu 和 Mh 的体外药敏试验标准的指南。该指南首次指定了支原体药敏试验质控参考菌株,定义了不同药物的 MIC 范围,并推荐了 MIC 的判读标准。虽然由于支原体的生物特殊性,其体外药敏试验的标准化规范工作还将不断改进,但 CLSIM43-A 指南的出台无疑标志着支原体药敏试验的标准化工作已经开始起步。

Mh ATCC 23114 和 Uu ATCC 33175 是 CLSIM43-A 推荐的标准菌株,作为质控菌株在活菌滴度不变前提下的保存在实际工作中有重要作用。由于支原体缺乏细胞壁,导致其生物稳定性差,不如细菌容易保存。另外,首代标准菌株经三次传代后得到的工作菌株一般不宜再作质控菌株使用。因此支原体标准储备菌株保存条件的研究尤为重要。甘油保存菌种的条件是需要冻存,靠低温甘油使菌体较持久地存活,达到在活菌滴度不变前提下的保存目的。一般甘油的使用量占总体积的 20%左右。众所周知,

(下转 111 页)

- Ma XJ, Jia WP, Zhou J, et al. The effect of hyperglycemia on arginine stimulation test in type 2 diabetes [J]. Chin J Diabetes, 2007, 15(1): 7-9.
- [8] 张曙晴, 张骆军, 李洪彬, 等. 精氨酸刺激试验评估糖尿病患者第一相胰岛素分泌功能的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 70-72.
- Zhang SQ, Zhang LJ, Li HB, et al. Clinical value of arginine stimulation test in evaluating function of the first-phase insulin release in diabetic patients [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 70-72.
- [9] 陈蕾, 贾伟平, 项坤三. 葡萄糖钳夹技术在糖尿病研究中的应用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2003, 19(1): 74-76.
- Chen L, Jia WP, Xiang KS. Application of glucose clamp technique in the study of diabetes mellitus [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2003, 19(1): 74-76.
- [10] 张建功, 程桦, 黎峰, 等. 血糖控制对2型糖尿病患者胰岛 $\beta$ 细胞功能及胰岛素敏感性的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2003, 19(1): 21-24.
- Zhang JG, Cheng H, Li F, et al. Effects of glycemic control on islet  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2003, 19(1): 21-24.
- 收稿日期: 2015-12-22  
修回日期: 2016-02-04

(上接 107 页) 药物敏感试验结果和微生物接种量密切相关。细菌药敏均以硫酸钡浊度标准管控制接种菌量, 但是支原体悬液无浊度, 故 CLSI M43-A 要求以 A8 琼脂培养计数或溯源于该法的可靠方法对药敏中的质控菌接种量加以控制。因此, 本文中一定期限内能稳定支原体活菌量的保存方法, 对临床实验室必带来极大便利。

改进后的 Mycovieview AST 药敏结果与 MYCOFAST<sup>®</sup> revolution 符合率良好。7 个不符合的结果可能与 2 个拭子标本采样或支原体菌液浓度分布不均匀等因素有关。改进后试剂的药物及浓度选择参考 CLSIM43-A 推荐的药物及折点浓度。克林霉素是林可霉素 7 位羟基被氯离子取代的半合成衍生物。两者抗菌谱相同, 抗菌活性比后者强 4~8 倍, 克林霉素临床用量增长很快, 已逐步取代了林可霉素的位置。莫西沙星 (Moxifloxacin) 是第 3 代喹诺酮类药物, 它既保持了早期喹诺酮类抗菌药对革兰阴性菌良好的抗菌活性, 又增强了对革兰阳性菌、厌氧菌及非典型微生物如支原体、衣原体和军团菌的抗菌活性<sup>[6]</sup>。左旋氧氟沙星 (Levofloxacin) 也是喹诺酮类药物, 具有广谱抗菌作用, 抗菌作用强, 为氧氟沙星的左旋体, 其体外抗菌活性约为氧氟沙星的两倍, 对支原体、肺炎衣原体也有抗菌作用。四环素 (Tetracycline) 是传统的大环内酯类抗生素, 由于其导致牙齿着色等副作用, 目前在临床上已很少使用, 但在细菌和支原体 CLSI 药敏法规中, 四环素都被选用, 因其药敏结果可代表其它目前广泛应用的大环内酯类抗生素的药敏结果。

#### 参考文献:

- [1] 荣仕成, 余伟香. 泌尿生殖道感染的解脲支原体 (Uu) 培养及药敏分析 [J]. 中国医药指南, 2014, 12(21):

238.

Rong SC, Yu WX. The culture and antibiotic sensitivity test of Uu in the urinary and genital tract infection [J]. Guide of China Medicine, 2014, 12(21): 238.

- [2] Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, et al. Comparison of the new *Mycoblast Revolution* assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens [J]. BMC Infectious Diseases, 2013(13): 453.
- [3] Waites KB, Crabb LB, Duffy DM. Comparative in vitro susceptibilities of human mycoplasmas and ureaplasmas to a new investigational ketolide, CEM-101 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(5): 2139-2141.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; Approved guideline [S]. Wayne: PA, CLSI M43-A, 2011.
- [5] Waites KB, Duffy LB, Bebear CM, et al. Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(11): 3542-3547.
- [6] Bebear CM, Barbeyrac BD, Pereyre S, et al. Activity of moxifloxacin against the urogenital *Mycoplasmas* *Ureaplasma* spp. *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* and *Chlamydia trachomatis* [J]. Clinical Microbiology & Infection, 2008, 14(8): 801-805.

收稿日期: 2015-09-03

修回日期: 2015-11-29