

美国 CLSI M52 商品化微生物鉴定及药敏试验系统的验证过程^{*}

黄钰竹^{1,2}, 王 薇¹, 赵海建¹, 王治国^{1,2}

(1. 北京医院 国家老年医学中心, 卫生部临床检验中心/北京市临床检验工程技术研究中心, 北京 100730; 2. 北京协和医学院研究生院, 北京 100730)

摘要:应用商品化微生物检测系统检测患者样本前,每个实验室须确定其是否能达到厂商规定的性能规范,包括正确度、精密度(重复性)、检测结果的报告范围,以及厂商参考范围是否适用于实验室患者。对此,美国临床和实验室标准化研究院成立了委员会以制定商品化微生物鉴定和药敏试验系统的验证过程及质量保证计划,为美国食品药品监督管理局的商品化检测提供建议。该指导方针聚焦于临床实验室广泛应用的仪器系统,也可用于微生物鉴定和药敏试验的手工检测方法。现根据微生物鉴定及药敏试验系统的原理及 CLSI M52 为商品化微生物鉴定和药敏试验系统的验证过程提供一些参考。

关键词:微生物鉴定系统;药敏试验系统;商品化;验证

中图分类号:R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)04-148-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.043

Verification Process of American CLSI M52-Commercial Microbial Identification System and Antimicrobial Susceptibility Testing System

HUANG Yu-zhu^{1,2}, WANG Wei¹, ZHAO Hai-jian¹, WANG Zhi-guo^{1,2}

(1. National Center for Clinical Laboratories, Beijing Engineering Research Center of Laboratory Medicine, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Beijing 100730, China; 2. Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Abstract: Before performing patient testing with commercial microbial test systems, each laboratory must verify that it can obtain performance specifications comparable to those of the manufacturer. This includes trueness, precision (reproducibility), and reportable range of test results, and verifying that the manufacturer's reference ranges are appropriate for the laboratory's patient population. American Clinical and Laboratory Standards Institute has set up a committee to develop a verification process and a quality assurance program for commercial microbial identification system and antimicrobial susceptibility testing system, in order to provide recommendations for US Food and Drug Administration (FDA). This guidance is applicable to instrument systems widely used in clinical laboratories and can also be used for manual testing of microbiological identification and antimicrobial susceptibility testing. The aim of this article is to provide advice for the microbial identification system and antimicrobial susceptibility testing system verification process, based on principles of microbiological identification and antimicrobial susceptibility and CLSI M52 guideline.

Keywords: microbial identification system; antimicrobial susceptibility testing system; commercial; verification

在 CLSI M52^[1]中,术语“验证”被用于描述当实验室引进新系统时,或采用新的鉴定培养基、药敏试剂、数据库、软件或硬件而造成系统更新时执行的过程和研究。当实验室引入商品化微生物鉴定系统(microbial identification system, MIS)或药敏试验系统(antimicrobial susceptibility testing system, ASTS)时,或当前使用系统发生重要改变时,CLSI M52 要求进行验证研究^[1]。验证研究的目的在于验证当前系统是否满足厂商规范,实验室人员检验得到正确及可重复结果的能力,以及实验

室是否满足监管要求。尽管 CLSI M52 对如何进行验证提供指导[如正确度、精密度(重复性)和报告范围],但不提供具体建议,因此,每个实验室需要执行特定的验证过程。

1 验证前活动 实验室进行验证前须考虑并评估应用商品化检测系统(包括 MIS 和 ASTS)的相关风险,包括:错误结果相关风险、系统变化相关风险^[1]。实验室风险评估及管理可参考 CLSI 文件 EP23TM^[2]。执行微生物鉴定和药敏试验系统验证研究时,需保证至少 30 个微生物的样品量。当进

^{*} 基金项目:北京市自然科学基金(7143182);北京医院课题资助(BJ-2015-025)。

作者简介:黄钰竹(1995—),女,硕士研究生,研究方向:实验室质量管理,E-mail: yuzhu_huang9533@163.com。

通讯作者:王治国,E-mail: zgwang@nccl.org.cn。

行 MIS 验证研究时,选择实验室常见菌种;进行 ASTS 验证研究时,须避免过低或过高最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的菌株^[1]。

自动化系统的厂商负责仪器的安装,并在人员培训和执行验证研究前确保系统正常运行。为此厂商可培训一个或多个系统主要用户及额外实验室人员。实验室也必须针对新系统的使用及验证过程的执行培训相关人员,可限制验证过程的人员数量以保证用于比较分析的协议、文件和数据组织的一致性。在验证后实验室可以培训其他员工,记录员工能力。

为证明新的或改进的系统安装、运行正确,及实验室人员经培训后的能力,在验证开始前,相关人员须用厂商推荐的质控菌株获得可接受结果。如果一株或多株质控菌株的检测结果显示超出范围,则检测人员须检查所有在用仪器,并保证仪器的使用遵循厂商的指导建议。如果超出范围的原因不明,且重复检测未解决该问题,则实验室应咨询厂家寻求指导建议,直到得到满意的可接受结果才可执行验证研究。

此外,实验室应具备有明确检测、可接受标准、结果分析方法、差异解决方法的书面验证实验方案,其中应包括:验证目的、新系统和比较方法之间的差异、检测元件差异等。

2 选择测试微生物 实验室应根据系统检测的范围,对需检测微生物的数量和类型进行选择,质控菌株的检测仅仅是验证的一部分,且本身不足以用于 MIS 或 ASTS 的验证。临床或之前鉴定的保存菌株也须再次进行检测。用于验证研究的临床菌株应是新鲜的,且包括已知鉴定或药敏结果的保存菌株。

根据 MIS 的预期用途选择检测菌种的类型,对于鉴定范围广泛的实验室 MIS,须审查实验室所有分离菌种的分布和频率,如此便能测定 80%~90%实验室通常分离的菌种,建议每个菌种检测 3~5 株菌。对于新引入或系统发生变化的 MIS,每个应用(如新的生化平板)应至少检测 30 株菌^[1]。检测的菌种类型应包括:经 MIS 鉴定的菌种、肠杆菌科中的常见菌种、不常见的病原体如非发酵菌、革兰阳性菌、其他在特定患者人群中出现的菌种(如酵母菌或苛养菌)及 MIS 数据库中的菌种。大多数检测菌株应来自临床,也可从其他途径获得,如商品化菌种保存处和/或能力验证(proficiency testing, PT)调查中保存的菌株。

进行 ASTS 的验证时,每平板至少检测 30 株菌。用于验证药敏试验系统的微生物须有代表性,

能指示临床药敏试剂,同时应考虑:平板类型、每个药敏试剂的活性谱^[3]、检测范围、敏感和非敏感表型。验证研究不包括未列入厂商产品列表的菌种和不常见菌种。建议使用新鲜临床菌株(即在研究 7 天内从常规临床保存菌株中获得的未冻存菌株);来自实验室的冻存菌株可用于增加基因和物种多样性并支持耐药表型数量的研究;妥善保存质粒携带耐药基因菌株以防止质粒损失;也可来自 PT 调查或其他来源的菌株。检测前,再次培养所有冻存菌株,再次培养时间不超过 24 h^[1]。

3 精密度和正确度 精密度和正确度是评估商品化微生物鉴定系统和药敏试验系统最常用的性能指标。精密度指的是在相同条件下,重复多次检测结果之间的符合程度。正确度是指测量结果均值与真值之间的符合程度。

3.1 精密度 为检测 MIS 的精密度,可选用 MIS 完整质控数据集的一个有代表性子集,其中应包括 MIS 的关键指示菌株和临床菌株。最少检测 5 株菌株(质控或临床菌株),每株菌检测 3 次。MIS 检测患者样本时应比较鉴定结果和非个体基质效应。

考虑 ASTS 的精密度时,应考虑药敏试剂 ± 1 个稀释度的变化(抗真菌试剂应考虑 ± 2 个稀释度的变化),使用有代表性的质控菌株子集和临床菌株,至少检测 5 株菌(质控或临床菌株),每株菌检测 3 次,可在同一天或多天内进行检测,不要求用当前系统检测菌株。如果用新系统检测临床菌株发现其结果不具重复性,则须用当前系统重复检测菌株;如果用当前系统检测该菌株发现其结果还不具重复性,则可用另一菌株代替。当评估 ASTS 的精密度时,至少 95%的菌株检测结果应在基本一致(essential agreement, EA)内;至少 95%的质控菌株结果应在质控范围内。

3.2 正确度 为确定 ASTS 的正确度,用新系统、参考或当前 ASTS 系统检测相同菌株,建议使用临床菌株验证正确度。评估正确度时,ASTS 结果的分析包括分类一致(category agreement, CA)(新系统和当前系统对敏感、中介和耐药结果的一致性)及 EA(如新系统的一个细菌 MIC 结果在旧系统 MIC 结果的一个稀释度内;新系统的一个酵母菌 MIC 结果在旧系统 MIC 结果的两个稀释度内)的评估。可接受性能要求 CA 和 EA 的一致性均 $\geq 90\%$ 。

建议使用模板收集验证数据,为检测人员提供指导,并保证数据记录的一致性,数据记录后导入应用软件。将 MIS 新系统的结果与当前系统或方法及仲裁进行比较后,记录验证结果:经鉴定结果唯一的数量(无补充检测)、经鉴定结果不唯一的数

量(要求进行补充检测直至结果唯一)、错误鉴定的菌株、未鉴定结果。对于测试的每株菌,计算其鉴定正确或结果可接受的数量。如果新系统与当前系统等效或更好(如 $\geq 90\% \sim 95\%$),则认为该测试是有效的。

ASTS的分析应包括计算最低限度的CA。如果CA结果是可接受的,则无需额外分析计算EA;仅检测有限的稀释度(如两个或三个),不要求计算EA;稀释数足够多(> 4 个稀释度),且MIC值被用于指导治疗决策时,须计算EA;MIC值被用于评估相对耐药趋势(如万古霉素用于金黄色葡萄球菌)时,也须计算EA。

4 质量控制和可接受标准 CLSI M52^[1]就MIS和ASTS的质量控制和可接受标准给出了详细的方案,确保商品化系统能提供重复可接受结果。

4.1 质量控制 一旦证明MIS系统可提供重复性结果,则无需对整个验证过程进行质量控制,除非厂商的使用说明书要求进行质量控制,CLSI M52指南仅要求当MIS采用新批次鉴定基质时进行质量控制。若厂商提供了关键指示菌株的信息,实验室可能采用CLSI M50^[4]中提及的改进版质控方案,并将其作为发展个体化质量控制方案(individualized quality control plan, IQCP)的一部分。在ASTS验证过程中,应每天对新系统进行质量控制。使用适当的质控菌株或其他药物进行验证。如CLSI文件M02^[5]和M07^[6]中所述,微生物实验室想减少ASTS的质控频率,将频率从每日缩减到每周,这些实验室须使用支持该类改变的数据执行IQCP。

应用当前系统和新系统对相同或相似的菌株进行重复检测,严重的鉴定差异须用第三种方法进行仲裁。目前微生物鉴定的金标准是分子检测(如核糖体DNA测序),但大多数实验室不会开展基因型检测法^[1]。随着高特异性基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)的引入,用现有表型的鉴定方法鉴定微生物是不够的,差异检测法不适用于其与生化法的比较过程,须回顾文献及常见生化或表型特征,必要时可通过测序分析菌株。

实验室须重复检测有分类差异的菌株,在当前和新系统中用相同培养液平行或一式三份地执行重复检测。采用第三种方法解决重复检测后的差异,理想的第三种方法是CLSI参考方法(见CLSI文件M07^[6])。大多数实验室采用的参考方法是纸片扩散法,但如果实验室采用了不同于参考方法的系统,则须参考另一实验室的检测结果。需注

意:参考方法可能不适用于所有药物/微生物组合(如万古霉素无纸片扩散结果)。如可能,用于比较的参考方法采用开展ASTS的参考方法。开展ASTS的参考方法可参阅厂商指导说明书。

实验室记录参考方法的检测结果,以及参考系统和新系统结果相关性的重分析数据。如若结果一致,则无需其他测试;若结果再次出现差异,则实验室须咨询厂家,厂家可能要求实验室递交菌株以进行额外测试。厂商给予指导建议后,一旦发现问题和/或采取正确的措施后,须重新检测有差异结果的菌株。如果厂商额外测试证明差异是由新系统的误差造成,则在厂家解决问题之前,实验室应采用其他可用的方法检测特定药物/微生物。

4.2 可接受标准 当MIS新系统显示错误或不显示鉴定结果时,要求在鉴定前进行额外检测。详细检测MIS新系统的结果差异类型,若新系统的数据库包括当前系统数据库中没有的菌株,则考虑用替代方法额外检测这些菌株。实验室无需对每一菌株进行验证,报告菌株鉴定结果时,要求额外检测能使用户对微生物鉴定结果的准确度满意。如果新系统不满足实验室常见菌株的验证要求,则考虑采用未验证过的措施进行检测。

厂商在出售药敏平板前,对美国食品及药品管理局(food and drug administration, FDA)批准的每台仪器和每一药敏试剂都建立了严格的标准(包括EA和生长失败等)^[7,8]。若出现CA和EA $\geq 90\%$,总耐药菌株的非常主要差异(very major discrepancy, VMD)或非常主要误差(very major error, VME)率 $< 3\%$ ^[9]、总敏感菌株的主要差异或主要误差率 $< 3\%$ 三种情况之一时,则考虑ASTS已用于特定药物/微生物组合的验证。若检测系统满足实验室标准,则已成功验证该系统,若检测系统未满足任何一项标准,则须进行额外测试。

5 小结 当实验室引入商品化微生物鉴定系统和药敏试验系统时,需进行验证研究,其中正确度和精密度(重复性)是最常用的性能指标。对于MIS而言,无微生物鉴定的可报告或参考范围;ASTS的结果报告以定量结果或MIC表示,ASTS无正常值或参考值。实验室可遵循CLSI M52提供的验证流程并结合厂商指导建议,进行验证研究。

虽然验证研究的过程繁琐,需要耗费大量的时间和精力,但引进经验证符合标准的商品化微生物鉴定系统和药敏试验系统可大大减少工作量,有助于实验室充分发挥其资源。此外,CLSI M52^[1]文件鼓励实验室适当发展基于风险的验证协议。

参考文献:

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Verifica-

- tion of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems[S]. Wayne: PA, CLSI M52, 2015.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory Quality Control Based on Risk Management; Approved Guideline[S]. Wayne: PA, CLSI EP23-A™, 2011.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement [S]. Wayne: PA, CLSI M100-S25, 2015.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute M50-A. Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems; Approved Guideline[S]. Wayne: PA, CLSI M50-A, 2008.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standards-Twelfth Edition [S]. Wayne: PA, CLSI M02-A12, 2015.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards-Tenth Edition[S]. Wayne: PA, CLSI M07-A10, 2015.
- [7] U S Food and Drug Administration. Procedures for Class II Device Exemptions from Premarket Notification, Guidance for Industry and CDRH Staff [EB/OL]. (2015-07-23). <https://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucmo80198.htm>.
- [8] US Food and Drug Administration. Class II Special Controls Guidance Document; Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems; Guidance for Industry and FDA [EB/OL]. (2015-07-17). <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm080564.htm>.
- [9] Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices[J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(11): 1749-1755. 收稿日期: 2017-03-23

(上接 59 页)

虽然与股骨头坏死相关 miRNAs 的研究仍处于探索阶段, miRNAs 在股骨头坏死病理过程中的具体调控机制及信号通路尚不完全明确, 但 miRNA 在股骨头坏死的研究已显示出广阔的前景, 对股骨头坏死的早期诊断、治疗具有重大的临床意义。深入研究 miRNAs 调控机制, 可能为股骨头坏死的早期诊断和治疗提供更多选择。

参考文献:

- [1] 徐庆雷, 朱宝林, 马小波, 等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 microRNA-206 表达水平的变化及意义[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 64-66.
Xu QL, Zhu BL, Ma XB, et al. Level of microRNA-206 in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and their significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 64-66.
- [2] 刘福尧, 刘承伟, 吴声忠. 不同置钉方式修复中青年移位型股骨颈骨折: 复位质量及股骨头坏死率对比[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(31): 4983-4988.
Liu FY, Liu CW, Wu SZ. Different screw placement schemes in the treatment of middle-aged and young patients with displaced femoral neck fracture: reduction quality and femoral head necrosis rate[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(31): 4983-4988.
- [3] 赵红星, 黄媛霞, 梁秋冬, 等. 股骨颈骨折复位内固定术后股骨头坏死的相关危险因素分析[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(6): 906-909.
Zhao HX, Huang YX, Liang QD, et al. The correlation factors for femoral head necrosis after internal fixation in femoral neck fracture[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Edition), 2016, 37(6): 906-909.
- [4] Zaccagnini G, Maimone B, Di Stefano V, et al. Hypoxia-induced miR-210 modulates tissue response to acute peripheral ischemia[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(8): 1177-1188.
- [5] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Angiogenic microRNA-210 is present in cells surrounding osteonecrosis[J]. J Orthop Res, 2012, 30(8): 1263-1270.
- [6] Yuan H, Christina VR, Guo C, et al. Involvement of microRNA-210 demethylation in steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. Scientific Reports, 2015(6): 20046.
- [7] 赵丁岩, 郭万首, 俞庆声, 等. 淫羊藿苷对激素诱导损伤骨微血管内皮细胞微小 RNA 表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(15): 2140-2147.
Zhao DY, Guo WS, Yu QS, et al. Effects of icariin on microRNAs expression in bone microvascular endothelial cells in steroids-induced femoral head lesions [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2016, 20(15): 2140-2147.
- [8] Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(20): 8287-8292. 收稿日期: 2017-04-09
修回日期: 2017-05-24