

诱导剂联合美罗培南筛查肺炎克雷伯菌碳青霉烯耐药基因研究

张彭 徐宏亮 褚美玲 任微 于静波 杨婧 薛文成

【摘要】 目的 探讨美罗培南联合多种抑制剂检测肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶类型的可行性。方法 共收集可疑产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌菌株 87 株。采用美罗培南加多种抑制剂包括 3-氨基苯硼酸 (APBA), 二吡啶羧酸 (DPA), 乙二胺四乙酸钠 (EDTA) 和氯唑西林 (cloxacillin) 等试验来检测菌株产碳青霉烯酶的可能类型; 以耐药基因 PCR 扩增、测序结果作为标准来判断上述试验的敏感性和特异性, 并与临床常用的改良 Hodge 试验结果相比较。结果 87 株试验菌中, 经 PCR 扩增证实产 KPC 的菌株 40 株, 待测序确认 6 株; 无 VIM、IMP 等基因型; 改良 Hodge 试验筛选碳青霉烯酶表型的敏感性为 100%, 特异性为 97.6%; 美罗培南和 APBA 联合检测 KPC 表型的敏感性为 100%, 特异性为 100%; 美罗培南和 DPA 联合检测 MBL 表型的敏感性为 83.3%, 特异性为 97.5%; 美罗培南和 EDTA 联合检测 MBL 表型的敏感性为 83.3%, 特异性为 98.8%。结论 改良 Hodge 试验敏感性好, 特异性不高, 只能作为碳青霉烯酶的初步筛选。美罗培南加抑制剂的试验敏感性和特异性较好, 尤其是 APBA 检测 KPC 方法, 临床上可以考虑该方法作为经济、准确检测碳青霉烯酶的方法推广。

【关键词】 克雷伯菌属; 碳青霉烯酶; 检测方法; 耐药

Use of inducer and substrate antibiotic combinations to screen carbapenemases resistance phenotype in Klebsiella pneumoniae isolates ZHANG Peng, XU Hong-liang, CHU Mei-ling, REN Wei, YU Jing-bo, YANG Jing, XUE Wen-cheng. Clinical Laboratory, General Hospital of Shenyang Command, Shenyang 110840, China
Corresponding author: XUE Wen-cheng, Email: 13309884078@189.cn

【Abstract】 Objectives To evaluate the effect of three methods to identify carbapenemases in Klebsiella pneumoniae isolates in order to make a preliminary evaluation of its practicality and reliability. **Methods** Eighty-seven K. pneumoniae clinical isolates with reduced susceptibility to carbapenems were evaluated. Antimicrobial susceptibility was performed by agar dilution and VITEK 2 respectively. The carbapenemase resistance phenotype of the isolates resistant to carbapenem was identified by the VITEK 2 automated microbial identification and susceptibility instrument, the K-B disk dissemination test, inhibitor tests using APBA, DPA, EDTA, cloxacillin etc. The carbapenemase-encoding genes were identified by PCR and amplicon sequencing. **Results** Of 87 isolates, 40 isolates were determined as KPC positive by PCR, 6 isolates were waiting for confirmation by sequencing. There were no VIM and IMP gene. Based on the results of PCR, for detecting carbapenemase phenotype, the sensitivity and specificity were as follows: modified Hodge test screening were 100% and 97.6%; meropenem and PBA derivation of the KPC phenotype were 100% and 100%; meropenem and DPA derivation MBL phenotype were 83.3% and 97.5%; meropenem and EDTA derivation MBL phenotype were 83.3% and 98.8%, respectively. **Conclusions** The sensitivity of modified Hodge experiment is higher but the specificity is lower. This means the method can be used only as a preliminary screening of carbapenemases. The inhibitors tests of carbapenemase activity have high sensitivity and specificity, especially APBA for detecting KPC. Clinicians can consider this method as an economic and accurate method to detect carbapenemases.

【Key words】 Klebsiella; Carbapenemases; Detection; Resistance

水解碳青霉烯的 β -内酰胺酶中碳青霉烯酶活性最

强, 对所有的 β 内酰胺类均有水解作用, 碳青霉烯酶主要包括KPC、VIM、IMP、NDM和OXA-48等^[1-2]。携带KPC酶的耐药质粒通常携带有多种类型的耐药基因, 致使产该酶菌株仅对替甲环素、多黏菌素极少数药物敏感, 临床治疗极为困难。及时准确地检测出产该类酶菌株对有效地控制感染、预防产酶菌株传播有

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.15.050

基金项目: 辽宁省科技攻关计划 (2011225021)

作者单位: 110840 沈阳军区总医院检验科 (张彭、褚美玲、任微、于静波、杨婧、薛文成); 解放军第 230 医院检验科 (徐宏亮)

通讯作者: 薛文成, Email: 13309884078@189.cn

重要意义。对碳青霉烯酶的区分与鉴定,以PCR为基础的分子生物学技术依然是金标准,其缺点是成本高,要求具备一定的仪器设备,不易推广。国外文献报道多种非分子诊断试验用于碳青霉烯酶活性及类型检测,如液体或固体培养基添加抑制剂的检测方法,通过比较添加不同抑制剂后药敏变化,推测所产碳青霉烯酶的类型^[3-6],国内相关报道较少。本研究旨在探讨美罗培南联合3-氨基苯硼酸(APBA)等抑制剂检测碳青霉烯酶基因型的能力,以PCR方法为标准对其做出初步评价。

对象和方法

1. 菌株来源:2011年9月至2012年12月沈阳军区总医院临床分离肺炎克雷伯菌49株,沈阳市其他医院38株产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌。菌株来源于血标本17株,尿标本3株,痰标本67株。质控菌株:Hodge试验阳性的肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705;Hodge试验阴性的肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706;大肠埃希菌ATCC 25922。

2. 主要仪器:Roche480 II实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司),超速离心机(美国Tomos公司);法国梅里埃VITEK2-COMPACT自动鉴定仪等。

3. 主要试剂:所用培养基均为天津金章公司产品,常规药敏试验用VITEK2-COMPACT仪器原装配套试剂,药敏纸片:美罗培南(MEM)等药敏纸片,购自英国OXOID公司。PCR扩增试剂盒购自大连宝生物公司(TaKaRa),批号(lot):B1101AA。

碳青霉烯酶筛选添加试剂:3-氨基苯硼酸(APBA),购自SIGMA-ALDRICH公司;二吡啶羧酸(DPA)批号:STBC4022V,购自SIGMA-ALDRICH;乙二胺四乙酸钠(EDTA,分子式: $C_{10}H_{18}N_2Na_2O_{10}$;分子量:372.24)和氯唑西林(cloxacillin)。试剂购自Dr.Ehrenstorfer GmbH,批号:11219。

4. 改良Hodge试验:依据文献2009版CLSI推荐方法完成^[7]。肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705为Hodge阳性对照;ATCC BAA-1706为Hodge试验阴性对照。将过夜培养的大肠埃希菌ATCC 25922配成0.5麦氏浊度的,再将菌悬液10倍稀释后均匀地涂布于MH琼脂平板上,待平板干燥3~10 min后,在平板中央贴一片美罗培南(纸片使用前在室温放置30 min)。用10 μl的接种环挑取中国蓝平板上过夜生长的3~5个待测菌落和质控菌株菌落,从药敏纸片边缘向平板边缘至少划20~25 mm的直线接种,把培养皿置于35℃孵育16~20 h后判定结果。结果判断:若待测菌株产碳青霉烯酶,其接种线与大肠埃希菌ATCC 25922抑菌环

交界处会产生朝向抑菌圈内增强生长现象,即MHT试验阳性,否则为阴性。

5. PCR扩增检测耐药基因:引物设计及PCR扩增检测参照文献^[8]进行,PCR基因测序由北京中科希林公司测序部完成,Pubmed数据库比对分析证实,具体所用引物见表1。

表1 KPC及2种金属型碳青霉烯酶引物

引物名称	引物碱基序列(方向为5'→3')
Imp-f	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC
Imp-r	GTGATGCGTCYCCAAYTTCCT
VIM-f	CAGATTGCCGATGGTGTITGG
VIM-r	AGGTGGGCCATTAGCCAGA
blaKPC-f	CCTCGTCATCCGACCAAC
blaKPC-r	CGCGCAGACTCCTAGCCTAAA

注:Imp、VIM: B类碳青霉烯酶中的2种类型;blaKPC:肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶

菌株DNA模板提取:细菌DNA模板制备采用加热煮沸法:将过夜培养的待测细菌刮取1~2接种环菌落,加入含200 μl双蒸水的EP管中。将菌落和双蒸水混匀后,100℃加热煮沸10 min,以13 000 r/min转速离心10 min,抽取上清液约100 μl作为细菌DNA的模板,将其置于-20℃保存备用。

肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705为Hodge阳性对照;ATCC BAA-1706为Hodge试验阴性对照。

PCR扩增:选用大连宝生物试剂盒,采用50 μl的反应体系:rTaq25 μl、上游引物2 μl、下游引物2 μl、DNA模板5 μl、双蒸水16 μl。PCR反应条件:94℃预变性10 min,共25个扩增循环,每个循环包括:94℃变性1 min,退火温度:55℃,保持1 min,72℃延伸2 min。最后72℃保持7 min,使产物延伸完整。由北京中科希林公司测序部完成PCR产物测序。

6. 美罗培南纸片联合添加抑制剂检测碳青霉烯酶:以美罗培南纸片(10 μg/片)添加以下几种抑制剂:100 mg/ml的DPA、0.2 mol/L EDTA、60 mg/ml APBA、75 mg/ml的cloxacillin。肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705、ATCC BAA-1706为质控菌株。试验重复3次,取均值作为最终判断结果用的数值。

取孵育18~24 h的中国蓝平板上挑出单个菌落,用生理盐水制成0.5麦氏浊度的菌悬液,用无菌棉拭子蘸取调好的菌液涂布于M-H培养基,将5片美罗培南药敏纸片均匀贴在MH琼脂培养基上,用加样枪依次在美罗培南纸片中心添加以上β-内酰胺酶抑制各10 μl。五片美罗培南药敏纸片和抑制剂构成组合纸片,其药物含量分别为:美罗培南10 μg、美罗培南10 μg+DPA 1000 μg、美罗培南10 μg+730 μg EDTA、美罗培南

10 μg + 600 μg APBA、美罗培南 10 μg + 750 μg cloxacillin。待纸片上的药物被琼脂吸收后,置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 的孵箱培养。18~24 h 后读取结果。

结果判定:比较抑菌圈的大小:含有 DPA、EDTA、cloxacillin 构成的组合纸片比单独美罗培南的抑菌圈 ≥ 5 mm 时,判定为阳性结果。APBA 与美罗培南构成的组合纸片比美罗培南单独使用的抑菌圈 ≥ 4 mm 时,为阳性结果^[9]。

结 果

1. 改良 Hodge 试验筛选结果:87 株待测菌中改良 Hodge 试验阳性的菌株有 47 株阳性。本试验阳性菌株分别是(6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 21, 35, 50~87 号),Hodge 试验阳性的肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 结果为阳性,Hodge 试验阴性的肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 结果为阴性。

2. 美罗培南与各种抑制剂组合检测碳青霉烯酶结果:依照方法中介绍的判定标准:美罗培南与 DPA、EDTA、氯唑西林这三种抑制剂的组合纸片与美罗培南单独使用的抑菌圈之差 ≥ 5 mm 的即阳性菌株分别:DPA 阳性菌株有 6 株(8, 9, 12, 13, 14, 20 号); EDTA 阳性菌株有 6 株(6, 8, 10, 13, 14, 28 号)。图 1 示意 14 号菌株试验阳性结果;氯唑西林全部为阴性;而 APBA+美罗培南组合纸片与美罗培南单独使用的抑菌圈 ≥ 4 mm 判断为阳性,87 株试验菌株中 APBA 阳性菌共 40 株(21, 35, 50~87 号),图 2 示意的是试验菌株 52 号株试验结果。

依照协同试验判定结果推出:87 株肺炎克雷伯菌中,ABBA(+),Cloxacillin(-)可协同推导出 KPC 型肺炎克雷伯菌;ABBA(+),Cloxacillin(+)可推导出高产 AmpC 酶合并外膜孔蛋白缺失的表型;DPA(+)可推导出 MBL 表型;EDTA(+)可推导出 MBL 表型。本试验推导出产 KPC 酶 40 株,分别是:(21, 35, 50~87 号);推出 AmpC 酶合并外膜孔蛋白消失的表型(0)株;本试验 DPA 推导出 MBL 是 6 株(8, 9, 12, 13, 14, 20 号);本试验 EDTA 推导出 MBL 是 6 株(6, 8, 10, 13, 14, 28)。协同试验推导菌株耐药表型见表 2。

3. 碳青霉烯酶基因 PCR 及测序检测结果:经 PCR 扩增及测序证实 KPC 基因检测阳性结果共 40 株。本实验中表型推导为金属 β 内酰胺酶 6 株,金属 β 内酰胺酶 VIM、IPM 基因检测均为阴性,KPC 引物 PCR 扩增出 500 bp 左右的产物(目标片段为 1000 bp 左右)。连续送测序 3 次,均未能顺利测序,此 6 株疑为非特

表 2 美罗培南与各种抑制剂组合检测推导碳青霉烯酶类型结果(87 株)

协同试验	耐药基因	菌株数量	代表菌株号
ABBA(+),Cloxacillin(-)	KPC	40	21,35,50~87
ABBA(+),Cloxacillin(+)	AmpC	0	NEG
DPA(+)	MBL	6	8,9,12,13,14,20
EDTA(+)	MBL	6	6,8,10,13,14,28

注:NEG 表示全部阴性(49 号菌株药敏试验显示对碳青霉烯不敏感,Amp C 酶筛选阳性,Hodge 试验阴性,协同抑制试验筛选结果阴性)

异扩增或产物为与 KPC 酶同源性较高的其他酶基因。其他 40 株推导为 KPC 的菌株,PCR 产物条带 1200 bp 左右,随机挑取 2 株送检测序,结果与 Pubmed 核酸数据库中通道号 FJ853623.1 *Klebsiella pneumoniae* strain Irish-1 plasmid class A carbapenemase KPC-2 (blaKPC-2) gene 等多株 KPN 菌株的 blaKPC-2 序列最大一致度为 99%。

4. 碳青霉烯酶不同筛选方法结果对比分析:以 PCR 方法为金标准(假定 6、8、9、10、13、14 等 6 株菌株 PCR 结果成立),在现有的检测结果包括 VIM、IPM、KPC 等碳青霉烯酶基因为前提,不考虑未检测的 NDM、OXA-48 等基因情况下,Hodge 试验、美罗培南加抑制剂法的敏感性、特异性:改良 Hodge 试验敏感性为 100%,特异性为 97.6%;DPA 抑制试验敏感性是 83.3%,特异性为 97.5%;EDTA 抑制试验敏感性为 83.3%,特异性为 98.8%;APBA 抑制试验敏感性为 100%,特异性为 100%。

讨 论

CSLI 建议将改良 Hodge 试验作为检测肠杆菌科产碳青霉烯酶细菌的标准方法,但该方法只能检测出是否产碳青霉烯酶,并不能区分是具体哪一种酶。近年来文献报道该方法敏感性较好而特异性不高,因此该方法只适用于碳青霉烯酶初筛试验^[9-10]。本试验 87 株待测菌中 Hodge 试验敏感性为 100%,特异性为 97.6%,与国外一些研究报道结果相符。该方法特异性不高的主要原因是其易将 ESBLs 或 AmpC 酶过度表达同时伴外膜孔蛋白表达缺陷的菌株鉴定为阳性结果^[10-11]。

文献报道,在鉴别产 KPC 的肺炎克雷伯菌方面,APBA 是一种优秀的抑制剂,但如果遇到 AmpC 酶的过度表达同时伴外膜孔蛋白缺失这种情况,本试验方法也会出现假阳性结果,要进一步区分产 KPC 和高产 AmpC 伴外膜孔蛋白缺失这两种情况,需要使用氯唑西林协同完成。本试验中 28 号和 49 号菌株对碳青霉烯药物耐药,但抑制试验、基因检测均阴性,VITEK2 提示产碳青霉烯酶或高产 ESBLs 伴外膜蛋白缺失,结

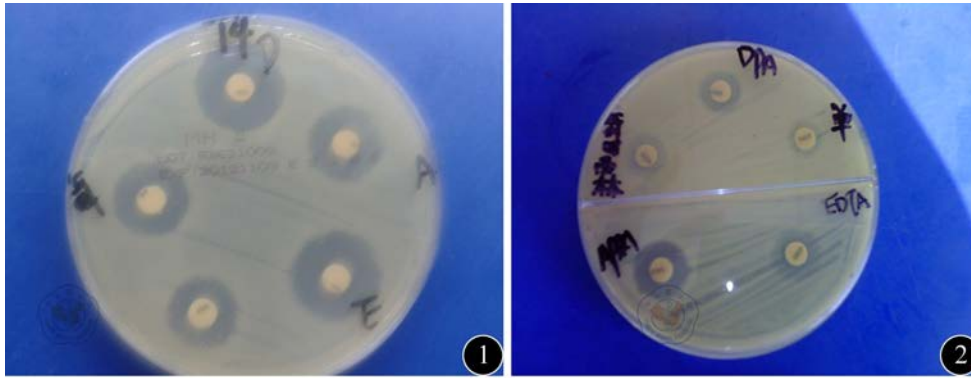


图1 美罗培南加抑制剂DPA/EDTA阳性结果示意。为本试验菌株中的14号株，MEM联合DPA(D)/EDTA(E)抑菌圈较单独MEM明显扩大 图2 美罗培南加抑制剂APBA阳性结果示意。为本试验菌株中的52号，MEM联合APBA抑菌圈较单独MEM抑菌圈明显扩大

果表明很有可能属于后一种情况，需进一步进行外膜蛋白检测证实。本试验中以 PCR 为金标准，APBA 抑制试验筛选 KPC 的敏感性是 100%，特异性 100%，与文献报道一致^[9]。

试验中，以 PCR 为金标准，DPA 抑制试验敏感性是 83.3%，特异性 97.5%，EDTA 抑制试验敏感性是 83.3%，特异性 98.8%，二者结果相近。文献报道^[9]DPA 和 EDTA 在检测肺炎克雷伯菌产金属-β 内酰胺酶的敏感性都很强，但与 DPA 相比，EDTA 的特异性较差，试验中部分产 ESBLs 和 KPC 的菌株也会出现假阳性结果，而以上情况使用 DPA 则全部显示阴性结果，特异性几乎达到 100%。因此用 DPA 检测肺炎克雷伯菌产金属-β 内酰胺酶的敏感性和特异性最佳。本试验中 EDTA 抑制试验特异性较 DPA 稍高，这主要和阳性例数太少（5 株）有关，可能属统计学中构成比误差。

总体分析，改良 Hodge 试验敏感性好，特异性不高，只能作为碳青霉烯酶的初步筛选方法。美罗培南加抑制剂的试验敏感性和特异性较好，尤其是 APBA 检测 KPC 方法，临床上可以考虑该方法作为经济、准确检测碳青霉烯酶的方法推广，但仍不能将 OXA-48 基因有效鉴别^[12]。Dortet 等^[3]最新建立了一种基于碳青霉烯酶水解亚胺培南产酸，使溶液 pH 改变，通过监测指示剂颜色变化来确认细菌是否含碳青霉烯酶，初步研究该法敏感性、特异性均达到了 100%，且通过添加不同抑制剂如 EDTA、他唑巴坦等，可以同时碳青霉烯酶进行正确分类，该方法与本试验的优劣值得进一步研究。

参 考 文 献

[1] Elizabeth B, Hirsch L, Vincent H, et al. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases(KPC): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother, 2010, 65:

1119-1125.
 [2] 张鞠玲, 鲍春梅, 陈素明, 等. 对亚胺培南不敏感菌株的产碳青霉烯酶的情况分析. 中国卫生检验杂志, 2011, 21: 1328-1330.
 [3] Dortet L, Poirel L, Nordmann P, et al. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by Using a Biochemical Test. Antimicrob. Agents Chemother, 2012, 56: 6437-6441.
 [4] Seah C, Low DE, Patel SM, et al. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol, 2011, 49: 1965-1969.
 [5] Pournaras S, Poulou A, Tsakris A, et al. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. J Antimicrob Chemother, 2010, 65: 1319-1321.
 [6] Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, et al. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing enterobacteriaceae clinical isolates. J Clin Microbiol, 2011, 49: 2804-2809.
 [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for anti -microbial susceptibility testing: 19th informational supplement. CLSI document M 100-S20. CLSI, Wayne, PA.
 [8] Jiang Y, Yu DL, Wei ZQ, et al. Complete Nucleotide Sequence of Klebsiella pneumoniae Multidrug Resistance Plasmid pKP048, Carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. Antimicrob. Agents Chemother, 2010, 54: 3967-3969.
 [9] Giske CG, Gezelius L, Warner M, et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-β-lactamases and KPC in Klebsiella pneumoniae with the use of Meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol infect, 2011, 17: 552-556.
 [10] Girlich D, Poirel L, Nordmann P, et al. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol, 2012, 50: 477-479.
 [11] Essayagh T, Karimou A, Elhamzaoui S, et al. Carbapenemases among Klebsiella pneumoniae: sensitivity, E-test and Hodge test. Ann Biol Clin (Paris), 2012, 70: 299-304.
 [12] Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48 producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgium hospitals. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39: 168-172.

(收稿日期: 2013-05-22)
 (本文编辑: 戚红丹)