

肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的研究进展*

黄维真 综述, 潘新年 审校(广西壮族自治区妇幼保健院/妇产医院/儿童医院, 南宁 530021)

【关键词】 碳青霉烯酶; 肠杆菌科细菌; 检测方法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.12.060 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)12-1798-03

碳青霉烯类抗菌药物是抗菌谱广、抗菌活性强、杀菌作用快的 β -内酰胺类药物, 其良好的细胞通透性、高度的酶稳定性及较低的毒性等特点已成为目前临床治疗严重细菌感染最主要的抗菌药物之一, 但是随着碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌的出现及不断的增多, 该类药物的临床应用受到了严峻的挑战。肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制是产碳青霉烯酶。因此, 快速、准确地检测产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌, 对于预防和控制产酶菌株的传播具有重要意义。现就实验室检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的研究进展作一综述。

1 产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的筛查(表型筛查试验)

准确检测肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性是筛选产酶菌株的关键, 试验方法及底物选择影响产酶菌株的筛选。Anderson 等^[1]以 blaKPC 基因作为金标准, 采用亚胺培南、美罗培南、厄他培南对微量肉汤稀释法、E-test 法、平板稀释法、Microscan Autoscan、Vitek-2 等方法作比较, 微量肉汤稀释法对 3 种抗菌药物敏感性大于 90%, 能较好检测出细菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性。不同实验底物对产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌筛查的敏感性、特异性各不相同, Landman 等^[2]研究报道, 以厄他培南作底物的肉汤稀释法、E-test 法、平板稀释法、自动化仪器法敏感性大于 90%, 为最高, 但特异性低于亚胺培南和美罗培南, 提示厄他培南应该作为药物敏感性试验检测最佳底物。近期有研究显示, 菌株对厄他培南的敏感性下降是产 KPC 酶的敏感标志^[3]。2010 年美国临床和实验室标准协会(CLSI)对肠杆菌科细菌碳青霉烯类药物折点进行修订, 耐药范围能更好地覆盖最小抑菌浓度(MIC)值较低的产酶菌株。然而, 筛查范围过宽会造成高产 AmpC 或产 CTX-M 型 ESBLs 合并外膜通道蛋白缺失菌株非特异的假阳性^[4]。由于碳青霉烯酶耐药异质性, 至今尚未有对所有产碳青霉烯酶肠杆菌表型检测的公认和 CLSI 等国际权威机构推荐的方法。因此, 对碳青霉烯酶的筛查需要敏感性更高的检测方法。

2 表型确认试验

2.1 改良 Hodge(MTH) MTH 是 CLSI 推荐的用于检测碳青霉烯酶表型的确认试验。CLSI 根据美国大量肠杆菌科分离菌株进行试验, MTH 检测这些分离菌株中的 KPC, 敏感度和特异度均大于 90%。MTH 在筛选产金属 β -内酰胺酶细菌时敏感性低、特异性差、周期长, 对低水平金属 β -内酰胺酶的敏感性和特异性有待评估。MTH 不能区分碳青霉烯酶类型, 其他

耐药机制(如 CTX-M、AmpC)存在时也可能出现 25% 的假阳性。Fernando 等^[5]设计在 MHT 加入苯硼酸和苯唑西林进行改良 MTH, 改良后 MHT 对 A 类碳青霉烯酶检测的灵敏度和特异性更高(>90%, 100%), 通过不同图形可将产 KPC、GES、SME、IMI、NMC A 类碳青霉烯酶与 ESBLs、AmpC、MBLs、非 A 类碳青霉烯酶区分开来。

2.2 纸片增效试验 碳青霉烯类抗菌药物加上酶抑制剂纸片增效试验常作为检测金属 β -内酰胺酶(MBL)的方法, 根据乙二胺四乙酸(EDTA)抑制 MBL 特性的 E-test 试条作为检测 MBL 建议的方法, 但是由于 E-test 试纸条成本较高, 其他 β -内酰胺酶耐药机制和膜孔蛋白缺失或高度表达影响 MIC 的结果^[6]。一种包含美罗培南联合抑制剂 EDTA、吡啶二羧酸、氨基苯硼酸、氯唑西林碳青霉烯酶检测的试验, 可检测出 KPC、VIM、IPM、OXA 和碳青霉烯类耐药肠杆菌伴膜孔蛋白缺失 ESBL、AmpC^[7]。利用苯硼酸对 KPC 的高敏感度, 合并 AmpC 和膜孔蛋白缺失也可检出, 与 KPC 不同, 氯唑西林对 AmpC 和膜孔蛋白有协调作用。EDTA、吡啶二羧酸拥有较高的灵敏度检测产金属酶肺炎克雷伯菌, EDTA 特异性较差, 少量 ESBL、KPC、OX-48 也可出现阳性, 但吡啶二羧酸特异性较强, 只有 MBL 出现阳性, ESBL、KPC、OX-48 都为阴性。Emilie 等^[8]报道拉氧头孢+EDTA 协同试验检测 MBL, 拉氧头孢高水平水解质粒介导的金属 β -内酰胺酶, 但对丝氨酸碳青霉烯酶水解能力偏弱, 拉氧头孢对所有 MBL(包括 IPM、VIM 等)都耐药(<23 mm), EDTA 能增强拉氧头孢抑菌圈直径(≥ 10 mm)。拉氧头孢敏感试验作为常规抗菌试验, 用于敏感筛选 MBL 甚至低产 MBL 的方法。拉氧头孢+EDTA 协同试验用于不同 MBL 及膜孔蛋白改变的确认, 方法简单、经济、结果易于观察, 适合于临床微生物实验室常规检验。

3 培养法

通过选择性的在显色培养基中加入碳青霉烯类抗菌药物筛选产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌。Panagea 等^[9]比较 CHROMagar KPC 与加亚胺培南麦康凯培养基筛选产碳青霉烯酶肠杆菌的检测结果, 其阳性和阴性预测值分别为 CHROMagar 100.0% 和 98.8%, 亚胺培南麦康凯培养基 94.7% 和 88.6%。尽管 bla(KPC)和 bla(VIM)在 CHROMagar 上无法从颜色或菌落形态进行区分, 但 CHROMagar KPC 是一个有效的筛选培养基, 适用于粪便中筛选各种产碳青霉烯酶肠杆菌科。一种包含厄他培南、氯唑西林、硫酸锌的培养基(SUPERCARBA)能筛选出(除 OXA-163 外)OXA-48、NDM、

* 基金项目: 广西医药卫生自筹经费计划课题(Z2014152)。

VIM、IMP 和 KPC 肠杆菌科细菌, $(1\sim3)\times10^4$ cfu/100 mg 的浓度就能检出, 敏感性比 ChromID ESBL (bioMérieux) 和 CHROMagar KPC (CHROMagar) 都高^[10]。SUPERCARBA 培养基能有效提高检测产碳青霉烯酶(多数常见类型)肠杆菌的能力, 更广泛检测产碳青霉烯酶任何类型。ID Carba 是一种新显色培养基, 在检测 NDM-1 比 Colorex KPC 更敏感, 有可能作为筛查 NDM-1 的筛选培养基^[11]。

4 生物化学方法

4.1 Carba NP test^[12] Patrice Nordmann 研发了 Carba NP test, 采用细菌细胞裂解后的酶粗提物与亚胺培南进行反应, 碳青霉烯酶能水解碳青霉烯类抗菌药物, 使其开环伴 H^+ 产生, 一定浓度 H^+ 可使检测液中的酚红指示剂变色, 根据颜色变化进行判断, 推测菌株是否产碳青霉烯酶, 根据不同酶抑制剂进一步确定产碳青霉烯酶菌株的组别。通过生化反应能较好区分碳青霉烯类耐药菌株的耐药机制。Carba NP 对大多数产碳青霉烯酶细菌在 15~30 min 可检出, Carba NP 100% 的 OXA-48、KPC、IMP 能被检出(无论非选择培养基还是选择培养基), VIM、NDM 只能从补充锌 Mueller-Hinton 琼脂被检出。Dortet 等^[13]研究表明锌离子浓度是 Carba NP 检测 VIM、NDM-1 的关键。Carba NP 还可用于直接检测血培养细菌、培养基上生长菌落及临床标本, 但阳性、阴性预测值有待评估。该试验与分子生物学技术比较, 敏感性、特异性均为 100%, 2 h 可获得结果, 经济实用且不需要其他技术, 可在医院微生物实验室日常实施。

4.2 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOFMS)方法^[14] 将细菌菌液加入到含美罗培南十二烷基硫酸钠 Tris-HCl-NaCl 缓冲液中, 35℃ 孵育 2 h, 1 μ L 上清液与 1 μ L 二甲基苯甲酸混合后进行 MALDI-TOFMS 检测, 产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌由于可以水解美罗培南出现 358.5、380.5 m/z 质谱峰, 不出现 384.5、406.5 M/Z 质谱峰, 非产碳青霉烯酶细菌则相反, 通过质谱峰的变化可以鉴定产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌。MALDI-TOFMS 法与 PCR、测序法、分光光谱测量法结果高度一致, 无假阳性、假阴性结果。该法可快速、准确直接检测酶活性, 其不仅可以作为鉴定依据还可以用于耐药机制分析, 但是要注意标本晾干后立即用质谱仪测定, 如耽搁 1 h 后会引起美罗培南降解而变异。

4.3 二氧化硅磁珠法^[15] 用二氧化硅磁珠快速裂解产碳青霉烯酶细菌, 检测提取物对亚胺培南、美罗培南、头孢他啶水解活性, 根据酶底物特异性和 EDTA、克拉维酸抑制不同碳青霉烯酶的特点, 快速区分丝氨酸碳青霉烯酶和金属碳青霉烯酶。

4.4 分光光度计法 分光光度计检测碳青霉烯酶的水解作用是检测可疑菌株碳青霉烯酶产生的参考方法。分别检测细菌粗提物或部分纯化酶加抑制剂和不加抑制剂, 对碳青霉烯类药物水解前后的吸光度, 检测酶的活性。这种方法能够获取酶型, 但必须在参考实验室进行。

5 免疫层析法^[16]

根据金属酶抗原表位的单克隆抗体建立免疫层析法可以直接检测碳青霉烯类不敏感的 IPM β -内酰胺酶肠杆菌和非发酵菌, 免疫层析法直接检测 IMP-MBLs(包括 IMP-1、-2、-6、-7、-10、-11、-19、-20、-22、-40、-41、-42 新型), IMP-MBLs 通过与双纸片增效试验、MBL E-test、MTH 比较, PCR 证实, 敏感性、

特异性均为 100%, 有关试验结果表明, 对于 IMP-MBLs 免疫层析法有可能替代 PCR。

6 分子生物学方法

6.1 PCR 法 包括普通 PCR、多重 PCR、实时 PCR、分子信标多重实时 PCR, PCR 技术采用基因特异性引物进行 PCR 扩增及基因测序, 可以检测细菌是否具有碳青霉烯酶基因, 多重 PCR 技术通过在 1 个反应体系中加入多对特异引物可以在 1 次反应中检测多种目的基因。van der Zee 等^[17]采用多重实时 PCR 准确、快速地检测 Carbapenemases bla OXA-48、blaVIM、blaIMP、blaNDM、blaKPC, 而且适用于筛选肉汤培养或直肠拭子和临床标本。实时荧光定量 PCR 用荧光定量探针针对所有 blaKPC 进行扩增, 阳性扩增产物被 BstN I 和 Rsa I 进行酶切消化分析以区分 blaKPC1-3 型基因。分子信标多重实时 PCR 根据荧光强度和荧光类型能检测出 blaKPC-2~blaKPC-11, 有学者报道用分子信标多重实时 PCR 可检测 NDM-1 基因。与常规 PCR 相比较, 分子信标多重实时 PCR 可以进行闭管操作, 有效消除核酸交叉污染, 具有实时、定量、高灵敏度、高特异性特点。在临床应用中 PCR 法是检测碳青霉烯酶基因的金标准, 但是由于需要特殊仪器设备, 费用昂贵, 不适合临床实验室开展, 另外其也无法检测细菌大量耐药的机制和碳青霉烯类耐药的其他机制。

6.2 核酸微阵列法^[18] PCR 是最广泛使用的分子技术, 然而这些方法仍然耗时。核酸微阵列法从提取 DNA 到结果报告仅需 7~8 h。Check-MDR CT102 微阵列除了检测 KPC、OXA-48、VIM、IMP、NDM-1 碳青霉烯酶基因, 还可检测 TEM、SHV、CTX-M ESBLs, blaVIM、blaIMP、blaNDM、blaOXA-48 基因, 其特异性和敏感性都为 100.0%, 而 blaKPC 基因分别为 100.0% 和 85.0%。blaVIM、blaIMP、blaNDM、blaOXA-48 基因, 阳性和阴性预测值都是 100.0%, blaKPC 基因的阳性和阴性预测值分别为 100.0% 和 98.0%。核酸微阵列可区分同一分离株中产碳青霉烯酶基因及 ESBLs、AmpC、膜孔蛋白缺失, 但对于不动杆菌(OXA-23、OXA-24、OXA-58)可能会漏检, 无法检测少见的 PER、GES、VEB、BEL-1、ESBLs, 无法区分各种酶亚型。

6.3 环介导等温扩增技术 Notomi 首先提出了环介导等温扩增技术, 其利用一种具有链置换反应 DNA 聚合酶和 2 对特殊引物, 对靶序列上的 6 个特异序列进行特异扩增, 在 65℃ 的等温条件下反应 1 h 即可将靶序列 DNA 扩增 $10^9\sim10^{10}$ 倍, 产生肉眼可见的白色焦磷酸镁沉淀。环介导等温扩增与 PCR 比较, 检测 bla(NDM-1)和 bla(KPC)具有更大的敏感性和特异性且快速, NDM-1 阳性参考菌株基因组每管 1 pgDNA 检出^[19]。345 份临床样本的检测结果显示, 与 PCR 检测结果 100% 的一致, 其中 3 个受污染的标本被正确检出, PCR 却不能, 但其高敏感性可能造成假阳性导致应用受到一定的限制^[20]。

7 结 语

产碳青霉烯酶是肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因。碳青霉烯酶的检测方法主要有耐药菌筛选、表型确认、基因水平分析等, 效能各有利弊, 但快捷、方便、准确的实验室检测方法有待进一步研究。临床微生物实验室应根据流行病学资料制定统一的适合该地区的实验室检测标准, 将碳青霉烯酶检测作为实验室常规项目, 可最大限度地发现耐药菌

株,为临床提供快速、准确的信息,针对性地进行抗菌治疗和控制产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的传播,防止该类病原菌的扩散,有效控制医院感染的发生。

参考文献

- [1] Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evolution of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2723-2725.
- [2] Landman D, Salamera J, Singh M, et al. Accuracy carbapenem non-susceptibility for identification of KPC-possessing enterobacteriaceae using the revised CLSI breakpoints[J]. Clin Microbiol, 2011, 49(2): 697-701.
- [3] Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *klebsiella pneumoniae* carbapenemase in enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2723-2725.
- [4] Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol, 2009, 47(36): 1631-1639.
- [5] Fernando P, Tania M, Melina R, et al. Controlling false-positive results obtained with the hodge and masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic acid[J]. Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1323-1332.
- [6] Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR[J]. Clin Microbiol, 2008, 46(9): 2879-2883.
- [7] Giske CG, Gezelius L, White O, 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 C[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(4): 552-556.
- [8] Emilie P, Guillaume A, Edouard B, et al. Sensitive and specific phenotypic assay for Metallo- β -Lactamase detection in enterobacteria by use of a moxalactam disk supplemented with EDTA[J]. Clin Microbiol, 2011, 49(7): 2667-2670.
- [9] Panagea T, Galani I, Souli M, et al. Evaluation of CHROMagar[®] KPC for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rectal surveillance cultures[J]. Antimicrob Agents, 2011, 37(2): 124-128.
- [10] Nordmann P, Girlich D, Poirel L, et al. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium[J]. Clin Microbiol, 2012, 50(8): 2761-2766.
- [11] Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, et al. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media[J]. Antimicrob Chemother, 2011, 66(10): 2288-2294.
- [12] Patrice N, Laurent P, Laurent D, et al. Rapid detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae emerg[J]. Infect Dis, 2012, 18(9): 1503-1507.
- [13] Dortet L, Br  chard L, Poirel L, et al. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test[J]. Antimicrob Chemother, 2014, 69(3): 623-627.
- [14] Jaroslav H, Vendula B, Radka W, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-Assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2441-2443.
- [15] Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of gram-negative carbapenemase producers[J]. Antimicrob Chemother, 2008, 62(2): 336-344.
- [16] Shigeyuki N, Mari M, Kiyoko T, et al. Detection of IMP Metallo- β -lactamase in carbapenem-nonsusceptible enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting gram-negative rods by immunochromatography assay[J]. Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1762-1768.
- [17] van der Zee A, Roorda L, Bosman G, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(11): 14-27.
- [18] Thierry N, Gaelle C, Pierre B, et al. Evaluation of a DNA microarray (check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases[J]. Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1608-1613.
- [19] Qi J, Du Y, Zhu X, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of NDM-1 gene[J]. Microb Drug Resist, 2012, 18(4): 359-363.
- [20] Solanki R, Vanjari L, Ede N, et al. Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of blaNDM-1 and blaKPC genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates[J]. Med Microbiol, 2013, 62(10): 1540-1544.