

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.10.017

CarbAcineto NP 快速检测耐碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌的方法学评价

牛 翠¹, 黄红革², 马 芳¹, 薛 云¹, 董月稳¹, 时东彦^{1△}

(1. 河北省邢台市第三医院检验科 054000; 2. 河北医科大学第二附属医院检验科, 石家庄 050000)

摘要:目的 快速检测产碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌的方法学评价。方法 选择邢台市第三医院 2015 年 1 月至 2016 年 1 月在临床标本中连续收集的 80 株鲍曼不动杆菌, 采用全自动细菌鉴定仪对鲍曼不动杆菌进行药敏试验, 应用普通 PCR 方法对所有菌株进行 OXA-23 型碳青霉烯酶基因检测, 同时应用 CarbAcineto NP 方法检测菌株的碳青霉烯酶。结果 80 株鲍曼不动杆菌中, 49 株耐亚胺培南和美罗培南, 其中 47 株菌检测出 OXA-23 基因, 43 株菌 CarbAcineto NP 为阳性; 31 株菌对亚胺培南和美罗培南敏感, 其中 29 株菌 OXA-23 阴性, 30 株菌 CarbAcineto NP 为阴性。CarbAcineto NP 方法的敏感性为 87.8%, 特异性为 96.7%。结论 与普通 PCR 方法比较, CarbAcineto NP 方法的试剂成本较低, 易于操作, 时间短, 能快速有效检测鲍曼不动杆菌的 OXA-23 型碳青霉烯酶。

关键词:鲍曼不动杆菌; 碳青霉烯酶; OXA-23; CarbAcineto NP

中图分类号: R372

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)10-1428-03

CarbAcineto NP method for rapid detection carbapenemase producing in acinetobacter baumanniiNIU Cui¹, HUANG Hongge², MA Fang¹, XUE Yun¹, DONG Yuewen¹, SHI Dongyan^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third Hospital of Hebei Xingtai, Xingtai, Hebei 054000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

Abstract: Objective To evaluate the method of fast detecting carbapenemase of acinetobacter baumannii. by CarbAcineto NP. **Methods** A total of 80 strains were used to evaluate the performance of test from January 2015 to January 2016 in the Third Hospital of Hebei Xing Tai. Identification and susceptibility testing of 80 strains of A. baumannii was determined by VITEK compact. CarbAcineto NP was applied to detect the Carbapenemase of the A. baumannii and the OXA-23 gene of the Carbapenemase was detected by the common PCR method. **Results** There were 49 of 80 strains resistant to imipenem and meropenem. PCR showed that 47 of 49 were carrying OXA-23 gene, 43 of 49 strains was positive for CarbAcineto NP experiment, 31 of 80 in A. baumannii strains was susceptible to imipenem and meropenem. PCR showed that OXA-23 gene was negative in 29 of 31 and CarbAcineto NP was negative in 30 of 31 non-carbapenemase-producing A. baumannii. The sensitivity and the specificity of CarbAcineto NP was 87.8% and 96.7%, respectively. **Conclusion** CarbAcineto NP was concordance with results obtained by PCR to detect gene coding for OXA-23. The CarbAcineto NP can detect rapidly carbapenemase producing in acinetobacter baumannii

Key words: acinetobacter baumannii; carbapenemase; OXA-23 gene; CarbAcineto NP method

多重耐药鲍曼不动杆菌, 特别是耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌的报道越来越多, 其在院内导致致死性感染, 如呼吸机相关肺炎、败血症、脑膜炎等^[1-2]。为指导临床及时对感染多重耐药的鲍曼不动杆菌患者选择有效的抗菌药物, 现探讨应用 CarbAcineto NP 方法(改良 CarbaAcineto NP 实验), 检测耐碳青霉烯酶的不动杆菌属。

1 材料与方法**1.1 一般材料** 选择邢台市第三医院 2015 年 1 月

至 2016 年 1 月从临床标本分离所得的非重复鲍曼不动杆菌株, 共 80 株, 所有菌株用无菌纸片—20℃低温保存, 采用 VITEK COMPACT 全自动细菌药敏鉴定仪进行鉴定。质控菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 和 ATCC BAA-17056, 大肠埃希菌 ATCC 25922, 均来源于原卫生部临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 VITEK COMPACT 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司); Gene Amp PCR System 2400 热循环仪(美国 Applied Biosystems Inc.);

ID Scientific 自动凝胶成像系统(美国 Kodak Inc.)。Premix Taq 酶(大连 Takara 公司);DNA Marker DL 2000(大连 Takara 公司);琼脂糖(美国 Hydra Gene 公司);Goldview 显影液(北京赛百盛生物技术公司);氯化钠(纯度:≥99.5%)(天津市风船化学试剂科技有限公司);硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ≥99.5%),苯酚红(天津永大化学试剂有限公司);亚胺培南西司他丁钠(杭州默沙东制药有限公司)。

1.3 菌株鉴定和药敏试验 80 株鲍曼不动杆菌进行纯培养,运用 VITEK COMPACT 全自动细菌鉴定仪进行药敏试验,按照 2015 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准判定细菌的耐药情况。

1.4 碳青霉烯酶 OXA-23 基因检测 采用煮沸法在灭菌蒸馏水中加入数个菌落,100 °C 水中煮沸 10 min,4 °C,12 000 r/min 离心 5 min,上清液作为 PCR 模板。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成,OXA-23-F:5'GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA;OXA-23-R:5'ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT。目的片段 501 bp,反应体系 25 μL。PCR 反应条件:预变性 95 °C 2 min,循环参数:变性 95 °C 30 s;退火温度 52 °C 30 s;延伸 72 °C 1 min;延伸 72 °C 10 min,共循环 30 次。取 5 μL PCR 产物用 1.5% 含 Goldview 染料的琼脂糖凝胶电泳,然后在紫外成像仪上成像并记录结果。

1.5 CarbAcineto NP 方法 参照 CLSI M100-S25,采用 5 mol/L NaCl 替代 Tris-HCL^[3]。取 1 环(10 μL)在血琼脂平板上过夜培养的细菌,加入含 100 μL 5 mol/L NaCl 管中振荡混匀。每株菌分别加入 2 个 EP 管中,分别设置为 A 管(对照管)和 B 管(试验管)。A 管中加入 100 μL 酚红硫酸锌溶液(pH 值 7.8);B 管中加入 100 μL 含 12 mg/mL 亚胺培南西司他丁钠的酚红硫酸锌溶液(pH 值 7.8),35 °C 温育 2 h 后观察结果。CarbAcineto NP 结果判读:(1)A 管和 B 管都为红色或红-橙色,结果为阴性(非碳青霉烯酶产生株)。(2)A 管为红色或红-橙色,B 管为黄色、深黄色或浅橙色,结果为阳性(碳青霉烯酶产生株)。(3)若 A 管为深黄色、黄色、浅橙色或橙色,B 管为任何颜色,则结果判为无效。肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 和 ATCC BAA-1705 分别作为阴性和阳性对照。

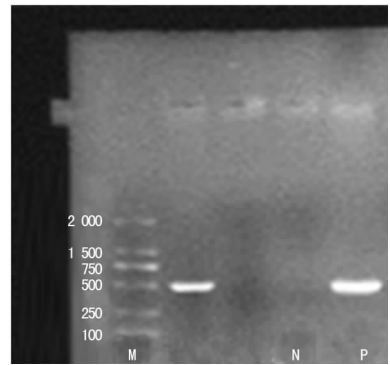
1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,使用配对 χ^2 检验中 McNemar 检验对 OXA-23 和 CarbAcineto NP 的阳性率进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鲍曼不动杆菌的耐药性分析 80 株鲍曼不动杆菌中 49 株细菌对碳青霉烯类药物耐药,31 株对碳青

霉烯类药物敏感。

2.2 PCR 检测 OXA-23 基因结果分析 耐碳青霉烯类的 49 株鲍曼不动杆菌中,有 47 株携带 OXA-23 基因,携带率为 95.9%。见图 1。



注:N 表示阴性对照;P 表示阳性对照;M 表示标记物

图 1 OXA-23 基因的 PCR 检测

2.3 CarbAcineto NP 检测结果分析 耐碳青霉烯类的 49 株鲍曼不动杆菌中,43 株菌 CarbAcineto NP 方法检测为阳性。31 株对碳青霉烯类敏感株中有 30 株菌 CarbAcineto NP 检测为阴性。见表 1。

表 1 OXA-23 和 CarbAcineto NP 的检测结果和耐药性

鲍曼不动杆菌(n)	MIC(mg/L)		CarbAcineto NP	PCR
	亚胺培南	美罗培南		
43	≥16	≥16	+	+
4	≥16	≥16	-	+
2	≥16	≥16	-	-
28	≤1	≤1	-	-
2	≤1	≤1	-	+
1	≤1	≤1	+	-

2.4 CarbAcineto NP 与 PCR 的检测结果比较 与 PCR 比较,CarbAcineto NP 方法的阳性预测值为 87.8%(43/49),阴性预测值为 96.7%(30/31)。见表 2。

表 2 CarbAcineto NP 和 PCR 的检测结果比较(n)

检测方法 PCR	CarbAcineto NP		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	43	6	49
阴性(-)	1	30	31
合计	44	36	80

3 讨 论

本研究结果表明,80 株鲍曼不动杆菌中 49 株菌对碳青霉烯类耐药,耐药率为 61.3%,47 株携带 OXA-23 基因,携带率为 95.9%,该院耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的主要基因型为 OXA-23 型。较多研究报道此类鲍曼不动杆菌的基因型为 OXA-23^[4-6]。

本研究 2 株鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类敏感且携带 OXA-23 基因,可能因为这 2 株细菌无 ISAbal 提供的强启动子,无法使 OXA-23 表达量增加,但需进一步的实验证实^[7-8]。

Carba NP 方法原理是细菌可水解亚胺培南药物的 β -内酰胺环,然后通过酚红的颜色变化进行验证^[9]。肠杆菌和绿脓杆菌所产生的金属 β -内酰胺酶和 KPC 酶通过实验表明有较高的敏感性($>90\%$)和特异性($>90\%$),然而传统的 CarbaAcineto NP 方法很难检测出不动杆菌属的碳青霉烯酶,是由于不动杆菌属产生了较弱的 OXA 型 D 类碳青霉烯酶。因此, DORTET 等^[9]建立一种 CarbAcineto NP 方法(改良的 Carba NP 实验)检测不动杆菌属的碳青霉烯酶。CarbAcineto NP 方法由于挑取的菌株量较 CarbaAcineto NP 方法增加 2 倍,因此增加了酶的释放量,且使用 5 mol/L NaCl 高渗溶液不会像蛋白抽提液(Tris-HCl)会对溶液导致轻微的 pH 值的改变,更容易使细菌蛋白得到完全释放。本研究有 2 株耐碳青霉烯类药物的菌株在 CarbAcineto NP 和 PCR 方法检测为阴性,由于鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类药物的机制有很多(如细菌外膜通透性)下降;外排泵高表达;产碳青霉烯酶 A 类(KPC、GES 型)、B 类(IMP、VIM、SIM、NDM 型)、D 类(OXA-24、OXA-51、OXA-58、OXA-143、OXA-235 型)^[10-12]。由于本实验检测方法有限,这 2 株细菌的耐药机制还需进一步检测。

2 株对碳青霉烯类敏感的鲍曼不动杆菌经 CarbAcineto NP 方法检测呈阴性,OXA-23 基因呈阳性,原因可能是 OXA-23 基因表达的碳青霉烯酶活性较弱,无 ISAbal 提供的强启动子,致使未对碳青霉烯类耐药,但仍需进一步实验验证。

DORTET 等^[9]应用 CarbAcineto NP 方法对 151 株产碳青霉烯酶和 69 株不产碳青霉烯酶的不动杆菌属进行检测,除 GES 型外,所有为后天获得的碳青霉烯酶基因型。如果由于 OXA-51 固有基因过度表达或由非碳青霉烯酶机制导致,这项实验结果依然阴性,其敏感性和特异性分别达 94.7%和 100.0%。而本实验 CarbAcineto NP 方法的敏感性和特异性分别达 87.8%和 96.2%,与 PCR 方法比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。CarbAcineto NP 方法操作相对简单,试剂易于配置,价格低廉,耗时较短,结果易于观察,在临床实验室可很好地开展,是检测产碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌的快速检测方法。

参考文献

[1] TORRES H A, VAZQUEEZ E G, YAGUE G, et al. Mul-

tidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights[J]. *Rev Esp Quimioter*, 2010, 23(1): 12-15.

- [2] THOM K A, JOHNSN J K, LEE M S, et al. Environmental contamination because of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* surrounding colonized or infected patients [J]. *Am J Infect Control*, 2011, 39(9): 711-715.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement: M100-S25 [S]. CLSI, Wayne, PA, USA, 2015.
- [4] 王辉, 孙宏莉, 廖康, 等. 北京和广州地区四家医院不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(6): 636-641.
- [5] WOODFORD N, ELLINGTON M J, COELHO J M, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27(4): 351-353.
- [6] SUSAN B, SEBASTIAN A. OXA β -lactamases in *Acinetobacter*: the story so far [J]. *Antimicrob Chemother*, 2006, 57(6): 1-3.
- [7] FIGUEIREDO S. Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(9): 4045-4047.
- [8] FU Y, ZHOU J, ZHOU H, et al. Wide dissemination of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 22 in multiple cities of China [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(4): 644-650.
- [9] DORTET L, POIREL L, NORDMANN P. Rapid identification of carbapenemase types in enterobacteriaceae and pseudomonas spp. by using a biochemical test [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(12): 6437-6440.
- [10] DORTET L, POIREL L, ERRERA C, et al. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(7): 2359-2364.
- [11] DIENE S M, ROLAIN J M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli, Enterobacteriaceae, Pseudomonas and *Acinetobacter* species [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(9): 831-838.
- [12] RUMBO C, GATO E, LOPEZ M, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5247-5257.

(收稿日期:2017-10-20 修回日期:2018-01-01)