

· 临床研究 ·

3种方法检测CRE菌株耐药机制的比较

闫玲¹, 顾兵^{1,2}, 张丽^{2*}, 马萍^{1,2}, 王彦玲¹

¹徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004; ²徐州医科大学附属医院检验科, 江苏 徐州 221002

[摘要] 目的: 评估 Vitek-2 XL 全自动细菌鉴定药敏分析仪、Carba NP 法和改良的碳青霉烯类灭活法(modified carbapenem inactivation method, mCIM) 检测耐碳青霉烯类药物肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 菌株的能力。方法: 采用 Vitek-2 XL 仪器法、Carba NP 法和 mCIM 检测实验室保存的 94 株肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物的耐药性。以 PCR 检测结果为标准, 评估这 3 种方法检测 CRE 菌株的能力。结果: Vitek-2 XL 全自动细菌鉴定药敏分析仪检测 CRE 的灵敏度为 100%, 特异度为 60%; Carba NP 检测的灵敏度为 89.6%, 特异度为 93.8%; mCIM 检测的灵敏度为 93.1%, 特异度为 95.3%。仪器法能检测到包括产碳青霉烯酶在内其他机制的 CRE。结论: Vitek-2 XL 全自动细菌鉴定药敏分析仪检测 CRE 具有很高的灵敏度, 但还存在一定的偏差, 实验室需要增加 mCIM 或 Carba NP 试验作为 CRE 表型筛查方法与仪器检测结果进行复核, 为临床提供准确的药敏结果。

[关键词] Vitek-2 XL; Carba NP; mCIM; 碳青霉烯类耐药性; 检测能力

[中图分类号] R446.5

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2019)08-1235-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190828

碳青霉烯类抗生素是目前临床上控制革兰阴性杆菌感染的有效抗生素, 同时也是治疗重症及免疫缺陷患者感染的一线药物, 因此其在临床上被广泛使用。然而由于临床大量使用甚至滥用, 导致细菌对其耐药性逐渐增强。近十年来, 耐碳青霉烯类药物肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 出现并在全球迅速传播^[1], 给临床医生用药带来极大困扰。因此, 如何快速准确地检出 CRE 菌株成为抗菌治疗的热点^[2]。本研究通过比较 Vitek-2 XL 全自动细菌鉴定药敏分析仪、Carba NP 法及改良的碳青霉烯类灭活法(modified carbapenem inactivation method, mCIM) 检测 CRE 的耐药机制, 评估这 3 种方法检测 CRE 菌株的能力。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2017 年 1—6 月徐州医科大学附属医院住院患者临床送检标本, 经 Vitek-2 XL 全自动细菌鉴定药敏分析仪鉴定为肠杆菌科细菌的 94 株非重复分离菌株(44 株肺炎克雷伯菌、17 株大肠埃希菌、11

株变形杆菌、7 株黏质沙雷菌、7 株阴沟肠杆菌、3 株产气肠杆菌、2 株产酸克雷伯菌、2 株弗氏柠檬酸杆菌、1 株布氏柠檬酸杆菌)。质控标准菌株大肠埃希菌 ATCC5922、肺炎克雷伯菌 ATCC-BAA-1705、肺炎克雷伯菌 ATCC-BAA-1706 购自卫生部临床检验中心。

Vitek-2 XL 全自动细菌鉴定药敏分析仪(梅里埃公司, 法国), ABI2720PCR 扩增仪(ABI 公司, 美国), DYY-8C 型电泳仪(北京六一仪器厂), Gelx1850 凝胶成像系统(上海欧翔科学仪器有限公司), 美罗培南药敏纸片(10 μg, OXIOD 公司, 英国), 哥伦比亚血平板、M-H 平板(梅里埃公司, 法国), 亚胺培南粉末、苯酚红(Sigma 公司, 美国), 细菌蛋白质提取液(Thermo 公司, 美国), ZnSO₄·7H₂O 粉末、NaOH 粉末、5×TAE(上海捷瑞生物工程), Agarose LE 琼脂糖(Promega 公司, 美国), 亚胺培南(OXIOD 公司, 英国)、美罗培南(深圳海滨公司), 头孢泊肟、头孢噻肟、氨曲南(深圳立健公司), 头孢他啶(海南海灵公司), 头孢曲松(台湾泛生公司)。

1.2 方法

1.2.1 Vitek-2 XL 仪器检测

分纯细菌培养 18~24 h; 选择 Vitek-2 革兰阴性杆菌(GN) 鉴定卡及革兰阴性杆菌药敏卡(AST-GN) 进行细菌鉴定与药敏试验, 仪器检测后的药敏信息

[基金项目] 徐州市科技计划项目(KC14SH088)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangli.771@163.com

由高级专家系统进行统计分析,电脑分析所有数据并予以结果,确认无误结果可传至中文电脑,由操作者认可并发放临床报告(抗菌药物敏感性试验结果参照2017版标准判读)。

1.2.2 细菌DNA的提取及耐药基因检测

采用煮沸法提取细菌DNA作为PCR模板。PCR方法扩增7种常见的碳青霉烯酶基因,6种超广谱β-内酰胺酶(extended spectrum beta-lactamase, ES-BL)基因。靶基因引物序列、片段长度及反应参数等见表1,引物由上海生物工程有限公司合成。反应体系共25 μL,包括DNA模板2 μL,10 μmol/L上下游引物各1 μL,2×PCR Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 8.5 μL。产物经15 g/L琼脂凝胶电泳后,用凝胶成像系统分析。

1.2.3 Carba NP试验^[3]

Carba NP A液的配制:在25~50 mL的烧杯中加16.6 mL临床实验室试剂用水(CLRW),然后再加2 mL的0.5%酚红溶液;再加入180 μL 10 mmol/L硫酸锌

溶液;用0.1 mol/L NaOH溶液调节pH至7.8 ± 0.1;于4~8 °C避光保存。Carba NP B液的配制:A液+6 mg/mL亚胺培南。

给2支微量离心管做标识(1个“a”和1个“b”),用于每份患者标本分离株、质控菌株和未接种空白对照管;分别在每支离心管中加100 μL细菌蛋白提取试剂;刮取血平板上过夜培养的菌落,乳化,分别取1 μL接种环的菌悬液接种到离心管a和b中,漩涡振摇5 s(空白对照只有细菌蛋白提取试剂,没有细菌);分别向a管和b管中加入100 μL A液和100 μL B液;(35 ± 2)°C孵育2 h,在2 h内出现阳性结果(a管为红色或桔红色,b管为黄色)的报告为产碳青霉烯酶。

1.2.4 mCIM试验^[4]

刮取1 μL血平板上过夜培养的菌落于胰蛋白胍大豆肉汤(tryptone soybean broth, TSB)中,漩涡振摇10~15 s;使用无菌镊子每管加入1张10 μg的美罗培南纸片,确保整张纸片浸没在TSB中;在(35 ± 2)°C中培养4 h ± 15 min;在取出TSB中的美罗培南

表1 耐药基因引物

扩增基因	引物序列	扩增长度(bp)	退火温度(°C)
bla _{KPC-2}	F:5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3'	1 010	58
	R: 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'		
bla _{NDM-1}	F:5'-GAAGCTGAGCACCAGATTAG-3'	982	58
	R: 5'-GGGCCGTATGAGTGATTGC-3'		
bla _{IMP}	F:5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3'	587	55
	R:5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'		
bla _{VIM}	F:5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3'	261	59
	R:5'-ATGAAAGTGCGTGAGAC-3'		
bla _{GES}	F:5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3'	846	62
	R:5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'		
bla _{SME}	F:5'- AACGGCTTCATTTTTGTTTAG-3'	831	58
	R:5'- GCTTCCGCAATAGTTTTATCA-3'		
bla _{OXA-48}	F:5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3'	743	62
	R:5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3'		
bla _{SHV}	F:5'-CGCCGGTTATTCTTATTTGTGCGC-3'	1 017	68
	R:5'-TCTTTCCGATGCCGCCGAGTCA-3'		
bla _{TEM}	F:5'-ATA AAATTCTTGAAGACGAAA-3'	1 080	58
	R:5'-GACAGTTACCAATGCTTAATCA-3'		
bla _{CTX-M-1}	F:5'- CAGCGTTTTGCCGTCTAAG-3'	945	58
	R:5'-GGCCCATGGTTAAAAAATCACTGC-3'		
bla _{CTX-M-2}	F:5'- CTCAGAGCATTCGCCGCTCA-3'	848	59
	R:5'- CCGCCGACCCAGAATATCC-3'		
bla _{CTX-M-8}	F:5'- ACTTCAGCCACACGGATTCA-3'	1 024	56
	R:5'- CGAGTACGTCACGACGACTT-3'		
bla _{CTX-M-9}	F:5'- GTTACAGCCCTTCGGCGATGATTC-3'	881	62
	R:5'-GCCATGGTGACAAAAGAGAGTGCAA-3'		

纸片之前,采用标准菌株 ATCC25922 配制 0.5 麦氏单位的菌悬液;按 CLSI M02 文件中常规纸片扩散法的步骤于 15 min 内在 M-H 平板上涂布上述菌悬液,干燥 3~10 min;使用 10 μ L 接种环取出 TSB 中的美罗培南纸片,在管壁内缘挤去多余液体,放在涂布有 ATCC25922 的 M-H 平板上;在 (35 \pm 2) $^{\circ}$ C 中培养 18~24 h 之后,测量抑菌圈直径大小。

结果判读:抑菌圈直径为 6~15 mm 或在 16~18 mm 内有菌落生长,为碳青霉烯酶阳性。抑菌圈直径 \geq 19 mm 为碳青霉烯酶阴性。抑菌圈直径在 16~18 mm,不确定是否存在碳青霉烯酶。

2 结果

2.1 药敏检测结果

检测到 55 株 CRE 菌株。94 株肠杆菌科细菌对亚胺培南、氨曲南、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢他啶、头孢曲松的耐药率分别为 58.5%、61.7%、34.0%、36.1%、45.7 及 71.2%。

2.2 耐药基因检测结果

94 株肠杆菌科细菌 29 株检测到碳青霉烯酶基因,其中 bla_{KPC-2} 阳性 20 株,包括 19 株肺炎克雷伯菌和 1 株大肠埃希菌;bla_{NDM-1} 阳性 7 株,包括 2 株肺炎克雷伯菌、1 株大肠埃希菌、1 株普通变形杆菌、1 株奇异变形杆菌及 1 株阴沟肠杆菌;2 株大肠埃希菌同时携带 bla_{KPC-2} 与 bla_{NDM-1} 基因。37 株检测到 ESBL 基因,bla_{TEM} 阳性 26 株,bla_{SHV} 阳性 22 株,bla_{CTX-M-1} 阳性 10 株,bla_{CTX-M-2} 阳性 25 株,bla_{CTX-M-9} 阳性 17 株,多数菌株同时携带 1 种以上耐药基因。7 种阳性耐药基因 PCR 电泳见图 1,耐药基因阳性 PCR 产物经测序后确定为该基因。

2.3 Carba NP 试验

94 株肠杆菌科细菌中,Carba NP 试验阳性 30 株,其中 2 株肺炎克雷伯菌和 2 株大肠埃希菌均未检测到本试验设计中的碳青霉烯酶。29 株碳青霉烯酶阳性菌株中,Carba NP 试验阳性 26 株,1 株 bla_{NDM-1} 型

奇异变形杆菌、1 株 bla_{KPC-2} 合并 bla_{SHV} 型肺炎克雷伯菌、1 株 bla_{NDM-1} 合并 bla_{SHV} 型普通变形杆菌 Carba NP 试验均阴性(图 2)。

2.4 mCIM 试验

94 株肠杆菌科细菌中,mCIM 试验阳性 30 株(20 株肺炎克雷伯菌,6 株大肠埃希菌,1 株普通变形杆菌,1 株奇异变形杆菌,1 株弗氏柠檬酸杆菌,1 株阴沟肠杆菌)。29 株碳青霉烯酶阳性菌株,1 株肺炎克雷伯菌 mCIM 试验为阴性,1 株肺炎克雷伯菌不确定是否产酶(图 3)。

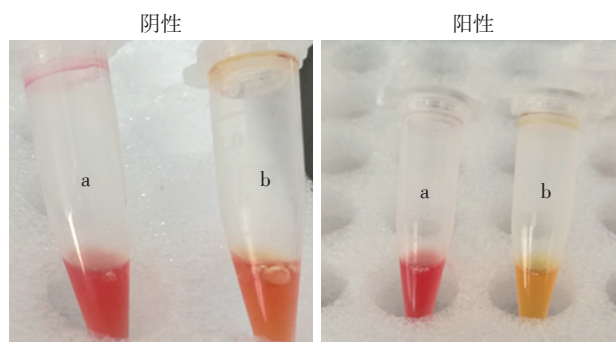
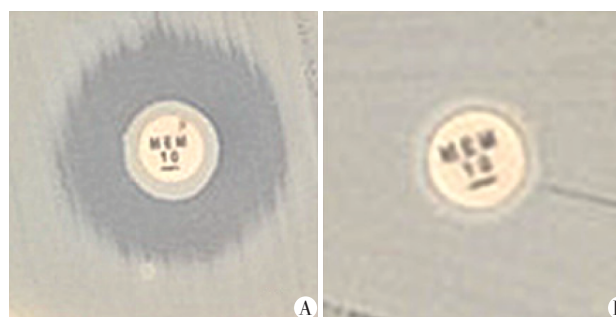


图 2 Carba NP 试验



A: 阴性(未检测到碳青霉烯酶);B: 阳性(检测到碳青霉烯酶)。

图 3 mCIM 试验

2.5 仪器法、Carba NP 试验、mCIM 检测 CRE 菌株的比较

29 株碳青霉烯酶阳性菌株,仪器检测灵敏度为 100%、特异度为 60.0%,Carba NP 试验检测灵敏度为 89.6%、特异度为 93.8%,mCIM 的灵敏度为 93.1%、特异度为 95.3%。与 PCR 方法相比,Vitek-2 XL、Carba NP 试验、mCIM 检测产碳青霉烯酶菌株符合率分别为 72.3%、92.5%、94.6%。仪器检测为 CRE 的 55 株菌,16 株均未检测到本试验中的耐药基因,mCIM 与 Carba NP 试验均阴性;2 株大肠埃希菌及 1 株肺炎克雷伯菌均未检测到实验设计中的碳青霉烯酶基因而具有 ESBL 基因,mCIM 与 Carba NP 试验均阳性。仪器检测对亚胺培南、美罗培南、厄他培南均敏感的 1 株肺炎克雷伯菌,未检测到本实验设

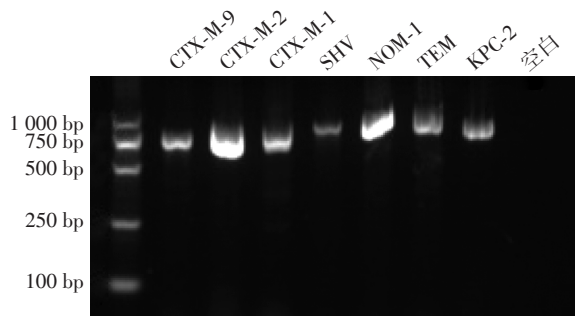


图 1 7 种阳性基因 PCR 产物电泳图

计碳青霉烯酶基因,而 mCIM 与 Carba NP 试验均阳性。不同方法检测 CRE 的性能评价见表2。

表2 3种方法检测 CP-CRE 性能评价

评价指标	Vitek-2 XL	Carba NP	mCIM
灵敏度(%)	100.0	89.6	93.1
特异度(%)	60.0	93.8	95.3
阳性预测值(%)	52.7	86.6	90.0
阴性预测值(%)	100.0	100.0	96.8
正确指数	0.60	0.83	0.88
一致率(%)	72.3	92.5	94.6

3 讨论

肠杆菌科细菌耐碳青霉烯类药物的机制主要包括碳青霉烯酶的产生、靶位的改变、主动外排泵和膜通透性的改变、过量合成靶酶或竞争性靶酶底物等^[5]。CRE 是指表型定义为对碳青霉烯类药物不敏感的肠杆菌科细菌,其对碳青霉烯类耐药的产生可以由以上各种机制引起。CRE 菌株包括产碳青霉烯酶耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenemases-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CP-CRE)及非产碳青霉烯酶耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(non-CP-CRE)。由于碳青霉烯酶位于可移动元件上易使耐药性在菌株间传播,CRE 菌株的检出在世界范围内呈逐年上升的趋势^[6-8],CRE 引起的感染通常治疗费用昂贵、死亡率高^[9-10]。近期有研究认为,CRE 毒力更强^[11],因此,实验室快速准确地检测 CRE 菌株的耐药机制对预防和控制耐药传播具有重要意义。

Carba NP 试验和 mCIM 分别是 2015 年及 2017 年由美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐使用的肠杆菌科碳青霉烯酶表型筛选方法。本试验 94 株肠杆菌科细菌中,碳青霉烯酶基因阳性 29 株,Carba NP 试验阳性 30 株,mCIM 试验阳性 30 株,碳青霉烯酶基因检出率低于 2 种表型筛查试验,出现表型阳性、基因阴性的原因可能是本试验设计的碳青霉烯酶引物未包括菌株携带的基因型。

仪器检测为 CRE 的 55 株菌,碳青霉烯酶检出率为 52.7%,ESBL 的检出率为 61.8%,提示产碳青霉烯酶及产 ESBL 是引起本研究中肠杆菌科细菌耐碳青霉烯类药物的主要原因。然而,55 株 CRE 菌株中 16 株未检测到耐药基因,提示本试验中的 CRE 菌株同时存在其他耐药机制。

以 PCR 检测碳青霉烯酶基因为金标准,仪器法

检测到所有菌株(29/29),采用 Carba NP 试验检测到 26 株(26/29),mCIM 检测到 27 株(27/29),仪器法、Carba NP 试验、mCIM、检测产碳青霉烯酶菌株的灵敏度分别为 100%、89.6%及 93.1%,表明 Vitek-2 XL 检测产碳青霉烯酶菌株具有极高的灵敏度。然而针对仪器检测产碳青霉烯酶菌株灵敏度的研究,本试验结果不同于 Woodford 等^[12]的结果,该研究认为 Vitek-2 检测产碳青霉烯酶基因菌株灵敏度仅为 74%,本研究与 Woodford 等^[12]研究结果的不同可能与不同国家 CRE 菌株流行特点不尽相同有关。本试验中检测到 bla_{KPC-2} 和 bla_{NDM-1} 型碳青霉烯酶,未检测到 bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{SME}、bla_{GES}、bla_{OXA-48} 这几种碳青霉烯酶基因。说明本院流行的碳青霉烯酶主要是这 2 种类型。而且检测到多数菌株同时携带几种 ESBLs 和一种碳青霉烯酶,两者在基因突变上是否有直接关系有待于进一步研究。本试验中仪器法检测产碳青霉烯酶菌株的特异度(60.0%)明显低于 Carba NP 试验(93.1%)与 mCIM(95.3%),与 PCR 方法相比,mCIM 检测 CRE 的一致性最好(94.6%)。Vitek-2 XL 检测为对亚胺培南、美罗培南、厄他培南均敏感的 1 株肺炎克雷伯菌,未检测到本实验设计中的碳青霉烯酶基因,而 mCIM 与 Carba NP 试验均阳性,说明该菌株为 CP-CRE 菌株,仪器检测的碳青霉烯类药物药敏结果存在偏差。

综上所述,mCIM 检测 CRE 菌株中产碳青霉烯酶菌株具有极高的灵敏度和特异度,Carba NP 试验次之,Vitek-2 XL 检测产碳青霉烯酶菌株特异度不高,但能检测到包括产碳青霉烯酶菌株在内的其他机制的 CRE,其检测 CRE 仍存在一定偏差,临床微生物实验室工作者在日常工作中,有必要采用 CLSI 最新推荐的表型筛选方法与仪器检测结果进行复核,为临床医生提供准确的实验室依据以便确定合适的治疗方法和实施感染控制措施。

[参考文献]

- [1] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! [J]. Trends Mol Med, 2012, 18(5):263-272
- [2] Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge [J]. Med Mal Infect, 2014, 44(2):51-56
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100S. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth edition [S]. Wayne, PA: CLSI, 2015
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100S. Performance standards for antimicrobial susceptibility test-

- ing: twenty-seventh edition [S]. Wayne, PA: CLSI, 2017
- [5] 蔡壬辛,黄彬.革兰阴性细菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展[J].中国微生态学杂志,2013,25(5):612-616
- [6] Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015 [J]. *Euro Surveill*, 2015, 20(45):1-18
- [7] 程国平,简雪峰,许德英,等. MALDI-TOF MS在碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌流行病学分析中的应用[J].南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(1):62-66
- [8] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005—2014 [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22:S9-S14
- [9] Cerceo E, Deitzelzweig SB, Sherman BM, et al. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options [J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(5):412-431
- [10] 胡仁静,严子禾,韩志君,等.感染碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌患者全国死亡的meta分析[J].南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(12):1567-1572
- [11] Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, et al. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteremia [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(3):257-264
- [12] Woodford N, Eastaway AT, Ford M, et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(8):2999-3002
- [收稿日期] 2018-03-17

(上接第1213页)

- Outcome Score after subarachnoid haemorrhage [J]. *Acta Neurochirurgica*, 2006, 148(12):1267-1276
- [7] Zhang X, Medow JE, Iskandar BJ, et al. Invasive and non-invasive means of measuring intracranial pressure: a review [J]. *Physiol Meas*, 2017, 38(8):R143-R182
- [8] 左建东,刘文广,倪洪早,等.微创血肿穿刺术治疗高血压脑出血的疗效及其对炎性因子表达水平的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(10):1273-1277
- [9] Ropper AE, Chi JH. Treatment of traumatic brain injury without direct intracranial pressure monitoring [J]. *Neurosurgery*, 2013, 72(4):N19
- [10] Liu H, Xu R, Yang J, et al. Initial intracranial pressure as a prognosticator in head-injured patients undergoing decompressive craniectomy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(38):62657-62663
- [11] 谭泽梁,杨志勇,蔡成柱,等.重症脑出血伴颅内压升高患者的临床特征及预后的前瞻性研究[J].中国实用神经疾病杂志,2017,20(15):22-25,29
- [12] Ferrete-Araujo AM, Egea-Guerrero JJ, Vilches-Arenas A, et al. Predictors of mortality and poor functional outcome in severe spontaneous intracerebral hemorrhage: a prospective observational study [J]. *Med Intensiva*, 2015, 39(7):422-432
- [13] 施小燕,李珉.脑血流自动调节功能与最佳灌注压[J].中华急诊医学杂志,2016,25(12):1223-1225
- [14] Lazaridis C, DeSantis SM, Smielewski P, et al. Patient-specific thresholds of intracranial pressure in severe traumatic brain injury [J]. *Journal of Neurosurgery*, 2014, 120(4):893-900
- [15] 吴翔,高国一,冯军峰,等.颅脑创伤患者颅内压相关参数与预后关系的研究[J].中华神经外科杂志,2018,34(2):119-123
- [16] Tanaka E, Kaga M, Kobayashi J, et al. Blood pressure variability on antihypertensive therapy in acute intracerebral hemorrhage: the stroke acute management with urgent risk-factor assessment and improvement-intracerebral hemorrhage study [J]. *Stroke*, 2014, 45(8):2275-2279
- [17] Manning L, Hirakawa Y, Arima H, et al. INTERACT2 investigators. Blood pressure variability and outcome after acute intracerebral haemorrhage: a post-hoc analysis of INTERACT2, a randomised controlled trial [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(4):364-373
- [收稿日期] 2019-01-03