

• 论 著 •

## Carba NP 法快速检测鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶的研究\*

荆泳玮, 胡访溪, 阎琦, 夏梦琪, 王东月, 刘新<sup>△</sup>

(沈阳医学院, 沈阳 110034)

**摘要:**目的 了解泛耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶表型及酶基因型, 为临床合理使用抗生素, 监控医院感染提供依据。方法 收集 117 株鲍曼不动杆菌临床分离株进行常规微生物学检测, K-B 纸片法筛选多重耐药鲍曼不动杆菌, 通过 Carba NP 试验及改良 Hodge 试验进行产碳青霉烯酶表型检测, 利用 PCR 对多重耐药不动杆菌耐药基因型进行确证。结果 临床分离的 117 株鲍曼不动杆菌株有 64 株属多重耐药鲍曼不动杆菌, 其中 33 株碳青霉烯酶阳性, 检出碳青霉烯酶 OXA-23 耐药基因型, 未检出 IMP、VIM、NDM-1 耐药基因。结论 Carba NP 法可以快速检测产碳青霉烯酶菌株, 且敏感性强, 操作简单, 有助于提高产碳青霉烯酶菌株检出率, 利于监控医院感染。

**关键词:** 鲍曼不动杆菌; 耐药基因; 碳青霉烯酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)15-2076-03

Research on rapid detection of *Acinetobacter baumannii* produced carbapenemase by CarbaNP method\*JING Yongwei, HU Fangxi, YAN Qi, XIA Mengqi, WANG Dongyue, LIU Xin<sup>△</sup>

(Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110034, China)

**Abstract:** **Objective** To understand the phenotype and enzyme genotype of pan-drug resistant carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* to provide the evidence for clinical rational use of antibiotics and monitoring hospital infection. **Methods** A total of 117 clinically isolated strains of *Acinetobacter baumannii* were collected and performed the routine microbiological detection. Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* was screened by K-B disk diffusion method. The phenotype of carbapenemase-producing strains was detected by using the Carba NP colorimetry and modified Hodge test. The drug resistant genotype of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* was verified by PCR. **Results** Among clinically isolated 117 strains of *Acinetobacter baumannii*, 64 strains were multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, in which 33 strains were carbapenemase positive. OXA-23 drug-resistant genotype of carbapenemase was detected by PCR, while IMP, VIM and NDM-1 drug resistant genes were not detected. **Conclusion** The CarbaNP method can rapidly detect carbapenemase-producing strains with the advantages of strong sensitivity and simple operation, which conduces to improve the detection rate of carbapenemase-producing strains and monitor the nosocomial infection.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; drug-resistant gene; carbapenemase

鲍曼不动杆菌为广泛存在于自然界的非发酵机会致病菌之一, 可定植于医院环境及人体皮肤表面, 自然环境中水和土壤等处大量存在。主要引起呼吸道、泌尿道、伤口等处感染<sup>[1]</sup>。据 2015 年 12 月全国细菌耐药监测网(CARSS)根据 1 427 所医院数据报告: 2014 年 10 月至 2015 年 9 月鲍曼不动杆菌共分离 183 178 株(10.7%), 位居分离的革兰阴性菌第 4 位, 某些医院不动杆菌引起的医院感染数量已超过铜绿假单胞菌, 日益增高的鲍曼不动杆菌检出率提示鲍曼不动杆菌已成为医院感染中的常见机会致病菌, 使临床抗感染治疗及控制医院感染面临严峻挑战。鲍曼不动杆菌具有较强耐药性, 特别是因产碳青霉烯酶导致的耐药, 使临床抗感染困难重重, 因此监控鲍曼不动杆菌及快速检测不动杆菌并鉴定其耐药性成为医院感染控制的重要任务。目前检测的方法主要是改良的 Hodge 试验及商品化 Etest 试条等, 但这些方法操作步骤多, 耗时长且材料昂贵, 因此临床迫切需要简单、快速的检测方法用于鉴定产碳青霉烯酶的菌株。Carba NP 法由 Patrice Nordmann 于 2012 年首次报告<sup>[2]</sup>, 此后该方法陆续优化和拓展用于检测碳青霉烯酶<sup>[3]</sup>, 但目前用于流行病学尚未在临床推广应用。2015 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)药敏试验标准(M100-S25)

引入了 Carba NP 试验<sup>[4]</sup>, 提示临床微生物实验室、医院感染控制室、疾病控制等相关机构将广泛应用 Carba NP 试验方法。本研究根据目前多重耐药鲍曼不动杆菌流行情况, 选择亚胺培南、酚红等试剂, 通过 Carba NP 法对鲍曼不动杆菌产碳青霉烯酶检测, 并经过改良 Hodge 实验及分子生物学技术确证并分析耐药基因型, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集沈阳医学院附属医院 2013~2015 年临床分离鲍曼不动杆菌 117 株, 分别来自呼吸科、ICU、消化外科、急诊室等科室。

**1.2 主要试剂与仪器** 氨苄西林、头孢他啶、头孢唑啉、头孢吡肟、亚胺培南、阿米卡星、头孢哌酮/舒巴坦药敏纸片均购自 Oxoid 公司; Carba NP 检测试剂按文献<sup>[2]</sup>配制: 0.5% 酚红溶液, 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 亚胺培南/培他司丁(Merck & Dohme Corp. U. S. A.), 0.1 mol/L NaOH。ATB 试剂(REF 32100, 批号 1003844720)。A 液: 2 mL 0.5% 酚红溶液加入 16.6 mL 临床实验室试剂用水中, 加入 180 μL 0.1 mmol/L ZnSO<sub>4</sub> 水溶液, 0.1 mol/L NaOH 及 10% HCl 调 pH 为 7.8 ± 0.1。B 液: 每毫升 A 液中含有终浓

\* 基金项目: 辽宁省科学事业公益研究基金项目(GY2013-A-014); 辽宁省大学生创新创业训练项目(20150810)。

作者简介: 荆泳玮, 男, 沈阳医学院 2012 级本科学子, 临床医学专业。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: syliuxin141236@sina.cn。

度为 6 mg/mL 的亚胺培南/西司他丁。细菌 DNA 提取试剂盒、Taq 酶, Marker DL2000, TAE 缓冲液, 琼脂糖均购自大连宝生物公司。PCR 扩增仪为 Eppendorf 公司产品, 电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品, 质粒提取试剂盒由康为世纪公司提供。

**1.3 菌株筛查** 将临床标本首先进行涂片、革兰染色、显微镜观察; 选择成对排列, 且较难脱色的球杆菌标本, 分区划线接种于中国蓝培养基中, 44 ℃ 培养过夜, 挑取单个无色的可疑菌落再次革兰染色镜检, 符合之前的检测, 进一步氧化酶试验、动力试验、硝酸盐还原试验, 初步确定为不动杆菌后通过 ATB 生化鉴定, 经鉴定为鲍曼不动杆菌的菌株 117 株保存备用。

**1.4 多重耐药鲍曼不动杆菌检测** 采用 K-B 法检测鲍曼不动杆菌药物敏感性; 接种环挑取纯培养的鲍曼不动杆菌菌苔, 配制为 0.5 麦氏浓度菌悬液, 涂布于整个 M-H 平板, 通过纸片分散器将药敏纸片均匀贴于平板上, 37 ℃ 温箱孵育 18~24 h。药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。按 CLSI 2015 标准选择多重耐药鲍曼不动杆菌菌株标记备用。

**1.5 不动杆菌碳青霉烯酶表型筛查**

**1.5.1 Carba NP 法快速检测碳青霉烯酶** 96 孔细胞培养板, 每一菌株做 3 个复孔, 每孔加样量如表 1, 置于 37 ℃ 温箱 30 min 后, 观察各孔颜色变化<sup>[5]</sup>。

表 1 Carba NP 法快速检测碳青霉烯酶

| 溶液   | 试验孔    | 对照孔    | 反应条件        |
|------|--------|--------|-------------|
| A 液  | —      | 100 μL | 37 ℃ 30 min |
| B 液  | 100 μL | —      |             |
| 待测菌液 | 100 μL | 100 μL | —           |

注: 若 A 液颜色为红色或橙红色, B 液颜色为红色或橙红色即为 Carba NP 试验阴性; 若 A 液颜色为红色或橙红色, B 液为深黄色, 黄色或浅橙色提示 Carba NP 试验阳性; 如果 A 液颜色为红色、橙红色以外颜色, B 液为橙色提示结果无效; — 为该项无数据。

**1.5.2 改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶表型确证** 用无菌生理盐水将过夜培养的大肠埃希菌 ATCC 25922 调制成为 0.5 麦氏菌悬液, 然后进行 1 : 10 稀释备用, 将稀释的菌液均匀涂布于 M-H 平板, 静置 3~10 min, 将 10 μg 的亚胺培南纸片贴于 M-H 平板中央, 1 μL 接种环挑取 3~5 个过夜培养的待测鲍曼不动杆菌菌落分别接种于平板上, 接种时从纸片边缘向平板边缘划线, 长度至少 20~25 mm, 于 37 ℃ 温箱培养 18~24 h 后, 观察结果。若在被测菌株与大肠埃希菌 AT25922 抑菌环交汇处, 大肠埃希菌生长增强即可判定为产碳青霉烯酶菌株<sup>[6]</sup>。

**1.5.3 耐药基因型确证** 受试菌株的基因组及质粒分别通过试剂盒提取, 按参考文献<sup>[7]</sup>合成引物(表 2)。扩增基因主要为 B 类碳青霉烯酶中 IMP、VIM、NDM-1, 以及 D 类碳青霉烯酶中 OXA-23、OXA-24 等基因。PCR 反应总体积为 50 μL, 其中 Taq 酶 0.25 μL, 引物 1 与引物 2 各 1 μL, PCR Buffer 5 μL, dNTP 4 μL, 无菌双蒸水定容至 50 μL。反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 ℃ 再延伸 7 min。配置 1% 琼脂糖凝胶, 将扩增产物于琼脂糖凝胶中 100 v 电泳 30 min, 在紫外凝胶成像仪下观察拍照。

**2 结 果**

**2.1 临床分离的不动杆菌初步微生物学鉴定** 标本涂片、染色、镜检为革兰阴性球杆菌, 较难脱色, 多成对排列; 氧化酶阴性, 动力阴性, 硝酸还原实验阴性, 触酶试验阳性。经 ATB 生

化鉴定为不动杆菌。

**2.2 多重耐药不动杆菌筛选(K-B 法)** 临床收集的 117 株不动杆菌中, 多重耐药菌株 64 株, 多重耐药率达 51.2%(图 1)。

表 2 扩增耐药基因及测序引物

| 基因名称   | 引物序列(5'→3')            | 长度(bp) |
|--------|------------------------|--------|
| OXA-23 | GATGTGTCATAGTATTCGTCG  | 1 058  |
|        | TCACAACAACATAAAAGCACTG |        |
| OXA-24 | TTCCCTAACATGAATTTGT    | 1 024  |
|        | GTACTAATCAAAGTTGTGAA   |        |
| IMP    | CTACCGCAGCAGAGTCTTAC   | 587    |
|        | AACCAGTTTTCCTTACCAT    |        |
| VIM    | AGTGGTGAGTATCCGACAG    | 261    |
|        | ATGAAAGTGCGTGGAGAC     |        |
| NDM-1  | CAGCACACTTCCTATCTC     | 292    |
|        | CCGCAACCATCCCTCTT      |        |

**2.3 不动杆菌碳青霉烯酶检测** 按 CLSI(M100-S25)引入的 Carba NP 试验方法比对试验孔颜色变化, 本研究中 64 株多重耐药不动杆菌中 33 株 Carba NP 试验阳性, 阳性率达 55%。

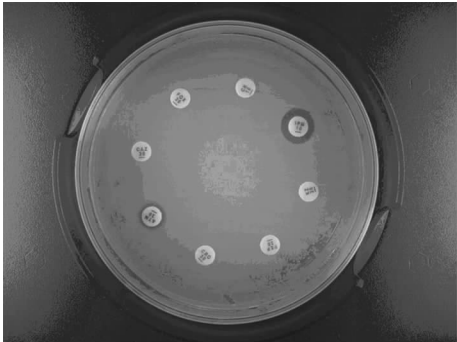
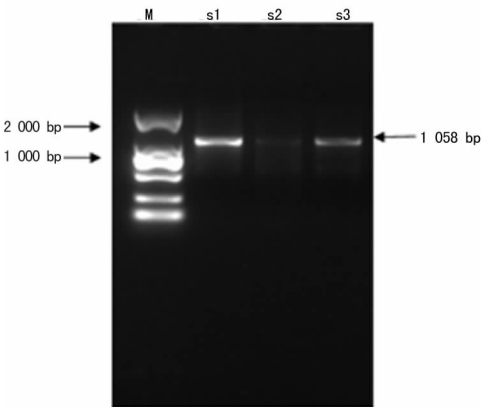


图 1 鲍曼不动杆菌药敏试验(K-B 法)



注: M 为 Marker; s1~s3 均为鲍曼不动杆菌。

图 2 部分菌株 OXA-23 基因 PCR 电泳图

**2.4 改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶表型确证** 64 株多重耐药不动杆菌中 33 株提示改良 Hodge 阳性, 阳性率达 55%, Carba NP 法检测碳青霉烯酶阳性率与改良 Hodge 法检测结果一致。

**2.5 PCR 扩增耐药基因结果** 64 株多重耐药菌中, 33 株检出 OXA-23、OXA-24 等酶基因, 未检测到 IMP、VIM、NDM-1 基因(图 2), 验证了 Carba NP 试验结果的准确性、一致性。

3 讨 论

近年来,鲍曼不动杆菌分离率呈上升趋势<sup>[8]</sup>,随着广谱抗生素的广泛使用,鲍曼不动杆菌对抗生素的耐药性逐年增强,多重耐药不动杆菌、泛耐药不动杆菌检出率日益增高。鲍曼不动杆菌对抗菌药物的耐药机制主要为产生碳青霉烯酶,水解碳青霉烯酶类抗生素。碳青霉烯酶包括 Ambler 分子结构分类的 A、B、D 3 类酶。A 类和 D 类为丝氨酸酶,D 类酶中主要包括 OXA-23、OXA-24、OXA-51、OXA-58 等 4 型,最主要的是 OXA-23、24 酶等<sup>[9]</sup>;B 类为金属酶,包括 SIM、VIM、IMP 等多型,可被 EDTA 抑制。部分菌株还携带超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)、头孢菌素酶(AmpC)和氨基糖苷类修饰酶,可导致一种和几种氨基糖苷类抗生素耐药。2015 年数据显示鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类的耐药率全国为 59.0%,对碳青霉烯类耐药是指对亚胺培南或美罗培南任一药物耐药,这给临床治疗带来极大困难,也对医院感染的控制提出了新要求。因此,提高产碳青霉烯酶不动杆菌检出能力,加强医院感染控制,阻断其传播已至关重要。

本研究中采用 Carba NP 试验,利用菌株产生的碳青霉烯酶水解亚胺培南/西司他丁钠药物,从而引起酸碱度的改变,使检测液中的酚红产生肉眼可见颜色变化,进行多重耐药不动杆菌碳青霉烯酶的检测,具有良好的时效性、特异性、准确性,从而达到快速检测不动杆菌碳青霉烯酶的目的。本实验方法适合在微生物实验室、疾病控制机构、医院检验科临床微生物室等相关单位广泛应用,有助于提高产酶菌株检出的时效性及准确性,为临床治疗及医院感染控制更加有效进行争取宝贵时间。本研究在对 33 株产碳青霉烯酶不动杆菌耐药基因型分析中,细菌染色体中 OXA-23 基因型检出率达 80% 以上,OXA-24 基因型检出率达 47%,未检出 SIM、VIM、IMP 等基因型,质粒中未检出 OXA-23、OXA-24 等基因型,由此提示产 D 类碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌其耐药性为菌体本身固有存在而非通过质粒传播。产 B 类碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌耐药基因型检测及其耐药性传播方式仍有待研究。本研究表明本院产碳青霉烯酶多重耐药不动杆菌主要以 OXA-23 型、OXA-24 型产碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌为主,携带 VIM、IMP 等耐药基因

型的鲍曼不动杆菌未在本院流行传播。

参考文献

[1] Senok A, Garaween G, Raji A, et al. Genetic relatedness of clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates from an intensive care unit outbreak[J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(6): 665-669.

[2] Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(9): 1503-1507.

[3] 朱雄, 袁敏, 刘佳, 等. Carba NP 碳青霉烯酶检测方法在医院感染监测中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(23): 5721-5724.

[4] 张雅薇, 王辉. 2015 年 CLSI M100-S25 主要更新内容介绍[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(4): 229-232.

[5] CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement[M]. Wayne, PA: CLSI, 2015.

[6] 刘运德, 楼永良. 临床微生物学检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 56.

[7] 俞刚, 陆峰泉, 陈瑜, 等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 OXA 和 NDM-1 耐药基因的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(11): 1275-1278.

[8] 张辉, 张小江, 徐英春, 等. 2012 年中国 CHINET 不动杆菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 5(5): 392-397.

[9] Merino M, Acosta J, Poza M, et al. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2724-2727.

(收稿日期: 2016-03-28 修回日期: 2016-05-23)

(上接第 2075 页)

[J]. Am J Clin Pathol, 1989, 91(5): 607-612.

[15] Koike T, Aoki S, Maruyama S, et al. Cell surface phenotyping of megakaryoblasts[J]. Blood, 1987, 69(3): 957-960.

[16] 陶元黎. 急性白血病患者免疫学表型的预后意义[J]. 国外医学输血及血液学分册, 1997, 20(2): 102-105.

[17] 蓝建平, 孙酬经, 钱美华, 等. 急性巨核细胞白血病的免疫表型分析[J]. 浙江临床医学, 2000, 2(7): 441-443.

[18] Tsujimoto H, Kounami S, Mitani Y, et al. Neonatal acute megakaryoblastic leukemia presenting with leukemia cutis and multiple intracranial lesions successfully treated with unrelated cord blood transplantation[J]. Case Rep Hematol, 2015(2015): 610581-610583.

[19] Gökçe M, Aytac S, Ünal S, et al. Acute megakaryoblastic leukemia with t(1;22) mimicking neuroblastoma in an infant[J]. Turk J Haematol, 2015, 32(1): 64-67.

[20] Wang L, Peters JM, Fuda F, et al. Acute megakaryoblastic

leukemia associated with trisomy 21 demonstrates a distinct immunophenotype[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2014, 88(4): 244-252.

[21] Venkatesan S, Purohit A, Ahuja A, et al. Unusual massive bone marrow fibrosis in acute promyelocytic leukemia following arsenic trioxide therapy[J]. Leuk Res Rep, 2015, 4(2): 76-78.

[22] Bennett JM, Wells DA, Relee H, et al. an unusual case of myeloperoxidase-positive acute megakaryoblastic leukemia. Ann Lab Med 2015; 35: 466-8 [J]. Ann Lab Med, 2015, 35(5): 542-543.

[23] Jayasudha AV, Nair RA, Jacob PM, et al. Clinical and hematological profile of acute megakaryoblastic leukemia: a 2 year study[J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2015, 31(2): 169-173.

(收稿日期: 2016-01-05 修回日期: 2016-04-26)