

· 论 著 ·

不同金属 β -内酰胺酶检测方法的比较与评价*

赵树龙¹, 姜 飞¹, 赵晓杰¹, 康海泉¹, 邓丽华¹, 顾 兵¹, 马 萍¹, 胡红焱^{2△}

(1. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221004; 2. 武警总医院检验科, 北京 100039)

摘 要:目的 比较双纸片协同法和双纸片增效法在临床金属酶表型鉴定中的应用价值; 对多重 PCR 法检测临床分离菌株中的金属 β -内酰胺酶方法进行评价。方法 56 株已知金属 β -内酰胺酶阳性菌株[其中新德里金属 β -内酰胺酶(NDM-1)阳性 9 株, 维罗纳整合子编码金属 β -内酰胺酶(VIM)阳性 32 株, 亚胺培南酶(IMP)阳性 15 株]用于评价两种表型检测方法。通过优化 PCR 引物的设计, 设计 3 对引物, 在 1 个管中同时检测 3 种金属 β -内酰胺酶(IMP、VIM、NDM), 进而对该方法进行评价。结果 双纸片协同法对金属酶表型鉴定的特异度为 80.36%(45/56), 双纸片增效法为 100.00%(56/56)。多重 PCR 检测的准确度为 100.00%(56/56), 同时还可以通过扩增片段的大小来分辨 3 种金属 β -内酰胺酶类型。结论 双纸片增效法相较于双纸片协同法, 更适用于临床应用; 多重 PCR 法对金属 β -内酰胺酶的检测具有简便、快速、准确度高的特点, 适合临床微生物实验室日常使用, 将有助于临床及时有效地用药。

关键词:金属 β -内酰胺酶; 多重 PCR; 细菌耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2523-03

Comparison and evaluation different methods for detecting metallo- β -lactamase*

ZHAO Shulong¹, JIANG Fei¹, ZHAO Xiaojie¹, KANG Haiquan¹, DENG Lihua¹, GU Bing¹, MA Ping¹, HU Hongyan^{2△}

(1. Department of clinical laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China;

2. Department of Medical Laboratory, the General Hospital of the Chinese People's Armed Police, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To evaluate the application of the double-disk synergy test(DDST) and combined disk test(CDT) in clinical metal enzyme phenotype detection. To evaluate the value of multiplex PCR in detecting the metallo- β -lactamase in clinical. **Methods** 56 strains of metallo- β -lactamase-positive strains were identified [NDM-1($n=9$), VIM($n=32$), IMP($n=15$)] for appraise the two methods. By optimizing the design of PCR primers, 3 pairs of primers were designed and detected(IMP, VIM, NDM-1) in one tube for evaluate the method. **Results** The DDST was 80.36%(45/56), and 100.00%(56/56) in the CDT. The accuracy of multiplex PCR was 100.00%(56/56), and the size of the amplified fragment was used to distinguish three types of metallo- β -lactamase. **Conclusion** The CDT is more suitable for clinical application than DDST. Multiplex PCR has the characteristics of simple, rapid and accurate in detection of metallo- β -lactamase. It is suitable for daily use of clinical microbiological laboratory, which will help the clinical timely and effective administration.

Key words: metallo- β -lactamase; multiplex PCR; bacterial resistance

金属 β -内酰胺酶(MBL)是一组活性部位为金属离子且必须依赖金属离子的存在而发挥催化活性的酶类, 它能水解除单环类以外的包括碳青霉烯在内的一大类 β -内酰胺类抗菌药物, 其活性可被离子螯合物乙二胺四乙酸(EDTA)、菲咯啉以及巯基化合物所抑制, 但不被克拉维酸、舒巴坦等常见的 β -内酰胺酶抑制剂所抑制^[1-4]。近年来, 特别是新德里金属 β -内酰胺酶(NDM-1)的出现, 使 MBL 成为细菌耐药机制研究中的热点^[5], 课题组对文献报道的各种金属酶筛选鉴定方法进行验证、对比后^[6-7], 总结得到简便、快速且能在临床实验室现有条件下能够进行筛选、确认 MBL 的方法, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株 收集大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌 MBL 阳性菌共 56 株。其中金属 β -内酰胺酶(VIM)型阳性菌 32 株、亚胺培南酶(IMP)型阳性菌 15 株和 NDM-1 阳性菌 9 株, 本实验室收集、鉴定的序列都通过 DNA 测序进行验证。

1.2 仪器与试剂 仪器: VITEK-2 型全自动微生物分析仪和

GN 鉴定卡均由法国 BioMerieux 公司生产, PCR 扩增仪由德国 Mastercycler Eppendorf 公司制造, UV-2102C 型紫外分光光度计(UNICO 公司, 美国), 凝胶电泳成像仪(Gel Logic 100, 美国, Kodak 公司)。试剂: Taq DNA 聚合酶、PCR 反应试剂、DNA Marker(大连, 宝生物公司), 琼脂糖、溴化乙锭, Chel-ex100 树脂(BioRad 公司, 美国), 同时实验所用试剂均为优级纯或分析纯等级, 水为灭菌去离子水, 试剂的配制严格按照《分子克隆指南(第三版)》进行。

1.3 菌株的分离培养和鉴定 严格按《全国临床检验操作规程》和 VITEK-2 型全自动微生物分析仪操作指南进行。

1.4 表型筛选试验

1.4.1 表型筛选试验双纸片协同法 在涂布待测菌的 MH 平板上, 同时贴亚胺培南(10 μ g)药敏片和 0.5 mol EDTA 纸片, 两纸片相隔 10 mm, 18 h 培养后以两纸片中间区域出现“钥匙孔”现象为阳性。

1.4.2 表型筛选试验双纸片增效法 在涂布待测菌的 MH 平板上, 同时贴亚胺培南(10 μ g)和亚胺培南(10 μ g) + EDTA

* 基金项目: 武警总医院科研基金(WZ20130109)。

作者简介: 赵树龙, 男, 技师, 主要从事细菌耐药机制方向的研究。 △ 通信作者, E-mail: huhongyanwj@163.com。

(0.05 mmol/L, 10 μ L)复合纸片, 18 h 培养后, 以复合纸片比单药纸片抑菌环直径增大 ≥ 5 mm 初步判断为金属 β -内酰胺酶阳性。

1.5 多重 PCR 对金属酶的检测

1.5.1 引物的设计 根据 GenBank 中查到的金属 β -内酰胺酶基因保守区域进行设计, 包括所有金属酶的亚型, 必要时使用兼引物。引物序列见表 1。

表 1 不同金属酶的引物序列		
引物名称	序列(5'-3')	长度(bp)
IMP-F	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C	
IMP-R	CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	188
VIM-F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	
VIM-R	CGA ATG CGC AGC ACC AG	390
NDM-F	ATG GAA TTG CCC AAT ATT ATG C	
NDM-R	AAT GGC TCA TCA CGA TCA TG	751

1.5.2 PCR 反应和检测 接种适量的细菌至含 2 mL 营养肉汤培养基, 放 37 $^{\circ}$ C 水浴培养 18~24 h。将菌液倒入 1.5 mL 离心管中, 以 12 500 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 将沉淀的细菌用无菌水洗 1 次, 最后加入 100 μ L Chelex100 树脂[5% (W/V)], 充分混匀后煮沸 10 min, 之后放入冰浴 5 min(12 000 r/min 离心 10 min), 取上清液作为扩增模板。在 25 μ L 的 PCR 反应体系中, 五套引物各提供 0.10、0.25 mmol/L 的 dNTP, 同时含有约 50 ng 细菌基因组 DNA, 0.25 U 的 Taq 酶。PCR 反应的条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 10 min; PCR 产物以 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析, 电泳结果在凝胶成像系统中扫描记录结果。需要测序的 PCR 产物送上海生工公司进行测定。

2 结 果

2.1 双纸片协同法 研究发现, 56 株菌中有 11 株未能看到钥匙孔现象, 其余 45 株可看到钥匙孔现象。双纸片协同法使用亚胺培南(10 μ g)和 EDTA(0.5 mol, 10 μ L)纸片, 间距 10 mm, 两个纸片的距离对结果影响很大, 特别是待选菌株高产金属 β -内酰胺酶的时候, 两个抑菌圈无交集, 协同效果不明显, 两纸片中间区域未出现明显“钥匙孔”现象。见图 1。

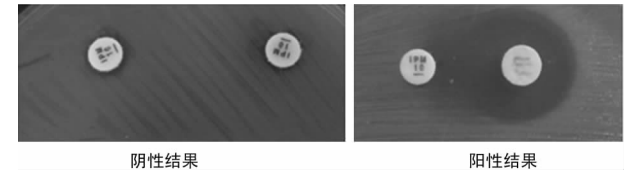


图 1 双纸片协同法金属酶表型检测

2.2 双纸片增效法 在进行双纸片增效法研究时, 发现文献[7]报道的 0.5 mol EDTA 浓度对细菌的生长有强烈的抑制作用, 如果使用这个浓度就会产生假阳性。因此, 研究不同浓度的 EDTA 对临床常见的 4 种革兰阴性杆菌: 大肠埃希菌(Eco)、鲍曼不动杆菌(Aba)、铜绿假单胞菌(Pae)、肺炎克雷伯菌(Kpn)的抑制实验, 发现 0.05 mol EDTA 10 μ L 是最佳的选择。用亚胺培南(10 μ g)和亚胺培南(10 μ g) + EDTA(0.05 mol, 10 μ L)复合纸片, 以复合纸片比单药纸片抑菌环直径 ≥ 5 mm 初步判断为金属 β -内酰胺酶阳性, 具有较好的选择性和准确度, 适合常规筛选使用。56 株菌株菌均可看到阳性结果。见图 2。

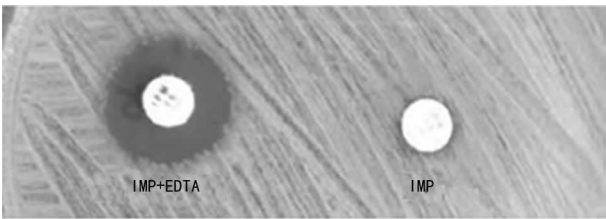
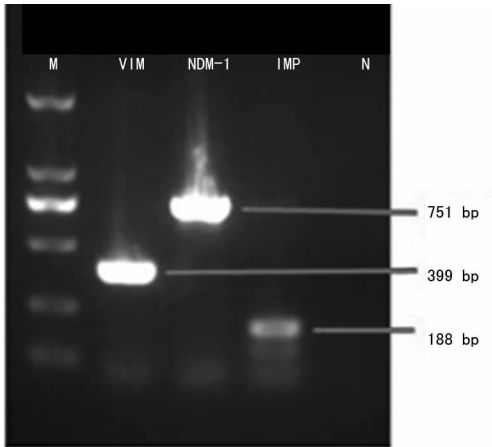


图 2 双纸片增效法金属酶表型检测

2.3 多重 PCR 确认金属 β -内酰胺酶 对测序已知金属酶类型的 56 株菌, 使用已知金属 β -内酰胺酶的引物(IMP、VIM、GIM、SIM、NDM-1)进行多重 PCR 分析, 然后进行 DNA 测序验证。由于巧妙设计, 不同基因扩增的长度不同, 因此在一管中进行多重 PCR 就可以检测全部已知金属 β -内酰胺酶基因。研究结果显示, 56 株菌株菌的检测结果显示与测序结果一致。见图 3。



注: M 为标记物, N 为空白对照。

图 3 多重 PCR 确认金属 β -内酰胺酶

3 讨 论

1991 年日本学者在肺炎克雷伯氏菌中发现了第 1 种金属 β -内酰胺酶 IMP-1^[8], 1999 年意大利学者分离肺炎克雷伯菌并鉴定到金属 β -内酰胺酶 VIM-1^[9], 2002 年巴西发现 SPM-1^[10], 2004 年在德国出现 GIM-1^[11], 2005 年在韩国 Seoul 出现 SIM-1^[12], 2010 年英国报道了 NDM-1^[13], 2010 年在荷兰出现 DIM-1^[14], 2012 年在澳大利亚出现 AIM-1^[15], 2013 年在意大利发现 FIM-1^[16], 除了以上这些位于质粒上可以水平转移的金属 β -内酰胺酶外, 还出现了一些位于染色体上的金属 β -内酰胺酶^[17-18]。已知金属 β -内酰胺酶编码基因可以借助整合子的移动、基因盒的插入、切除等方式进行传播, 进而会导致细菌间碳青霉烯抗菌药物耐药水平传播, 同时碳青霉烯类抗菌药物的使用量增加导致耐药菌株不断出现, 可能会导致金属酶的快速传播。因此, 早期准确发现金属酶, 监测产酶菌株在临床上的流行情况, 将具有较大的临床意义。

金属 β -内酰胺酶自发现开始其研究方法就是研究的热点^[19-21], 同时表型筛选就是利用其活性中心需要 2 价阳离子的特性, 使用络合剂 EDTA 来螯合 2 价阳离子, 与含有碳青霉烯抗菌药物的纸片协同作用来进行筛选。课题组同时对双纸片协同法和双纸片增效法进行研究, 发现双纸片协同法和双纸片增效法均有出现假阴性的可能, 但优化 EDTA 的浓度, 可以进一步增加了双纸片增效法的敏感性和特异性, 更快速、准确地进行金属 β -内酰胺酶表型的筛选。因此, 双纸片增效法更适合于临床实验室的应用。

通过表型筛选得到的菌株需要进行 PCR 分析和测序验证,目前,金属酶的亚型比较繁多,比如目前 IMP 和 VIM 有 36 个亚型,NDM 有 7 个亚型等,因此设计可以 1 次检测多个基因的方法尤为重要。多重 PCR 法一方面选择核苷酸序列的保守区,同时加入兼并碱基,利用一套兼并引物可以检测 IMP、VIM 和 NDM 等金属酶的全部亚型^[22]。因此,多重 PCR 方法是可以快速、准确进行金属 β -内酰胺酶分析的方法,适合临床微生物实验室常规使用。

在进行上述方法学研究时,课题组也必须注意到,无论是双纸片协同法还是双纸片增效法都是对已知金属酶类型的情况下进行的检测,但是对于表型阴性者,是真的阴性还是存在未知的其他表形的金属酶,是本实验室关心的问题以及进一步研究的重点。

参考文献

- [1] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 306-325.
- [2] Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, et al. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues [J]. Int J Antimicrob Agents, 2007, 29(4): 380-388.
- [3] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.
- [4] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(3): 969-976.
- [5] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [6] Samuelsen O, Buarø L, Giske G, et al. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country [J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(4): 827-830.
- [7] Yong D, Lee Y, Jeong H, et al. Evaluation of double-disk potentiation and disk potentiation tests using dipicolinic acid for detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(10): 3227-3232.
- [8] Watanabe M, Iyobe S, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(1): 147-151.
- [9] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaBJM-1, a new integron-borne metallo-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(7): 1584-1590.
- [10] Simm AM, Toleman MA, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America; report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50(5): 673-679.
- [11] Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(12): 4654-4661.
- [12] Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo-lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from *acinetobacter baumannii* clinical isolates from korea [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(11): 4485-4491.
- [13] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [14] Nashwan A, Yvette J, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-lactamase from a *pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the netherlands [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2420-2424.
- [15] Yong D, Toleman MA, Bell J, et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- β -lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(8): 6154-6159.
- [16] Pollini S, Maradei S, Pecile P, et al. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(7): 410-416.
- [17] Wachino J, Yoshida H, Yamane K, et al. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(11): 5143-5149.
- [18] El Salabi A, Borra PS, Toleman MA, et al. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo-lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(6): 2241-2245.
- [19] 陶晶, 张俊丽, 翟婷婷, 等. 铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶分布及产金属酶检测方法比较 [J]. 检验医学, 2009, 24(2): 145-148.
- [20] 辜依海, 罗燕萍, 张文莉, 等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药性分析及金属 β -内酰胺酶检测 [J]. 中华医院感染学, 2005, 15(3): 339-341.
- [21] 孟素慧, 刘丽文, 翁亚贤. 细菌金属 β -内酰胺酶检测方法的评价 [J]. 临床军医杂志, 2005, 34(3): 340-342.
- [22] Poirel L, Walsh TR, Cu villier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.