



胶体金免疫层析法快速检测CRE碳青霉烯酶的效果评价

李静, 耿志军, 郑晶, 王涛, 应冲涛, 郭普

引用本文:

李静, 耿志军, 郑晶, 等. 胶体金免疫层析法快速检测CRE碳青霉烯酶的效果评价[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(8): 1089–1092.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.08.026>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药率及同源性分析

Analysis of drug resistance rate and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

蚌埠医学院学报. 2020, 45(8): 1091–1093 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.08.026>

耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药基因检测及其同源性分析

The detection of drug resistance genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its homology analysis

蚌埠医学院学报. 2019, 44(1): 107–111 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.01.030>

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药机制研究

Study of the resistance mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

蚌埠医学院学报. 2017, 42(3): 379–382 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.03.030>

某三甲医院常见多重耐药菌流行趋势分析

Analysis of epidemic trend of common multi-drug resistant bacteria in a tertiary hospital

蚌埠医学院学报. 2020, 45(1): 94–97 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.01.024>

对一组醋酸钙-鲍曼不动杆菌复合体细菌的基因型鉴定

Study on genotyping in clinical *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex

蚌埠医学院学报. 2019, 44(12): 1587–1590 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.12.003>

胶体金免疫层析法快速检测 CRE 碳青霉烯酶的效果评价

李 静¹, 耿志军², 郑 晶¹, 王 涛³, 应冲涛¹, 郭 普¹

[摘要] **目的:** 分析胶体金免疫层析法对碳青霉烯酶耐药肠杆菌科细菌(CRE)产碳青霉烯酶快速检测的有效性。**方法:** 收集蚌埠医学院第一附属医院临床分离的 CRE 80 株和对碳青霉烯类抗生素敏感肠杆菌科细菌 21 株, PCR 法检测 blaKPC、blaNDM、blaIMP、blaVIM、blaOXA-48 耐药基因作为金标准, 采用胶体金免疫层析法进行 CRE 产碳青霉烯酶检测, 并与 PCR 结果进行一致性分析和效能评价。**结果:** 80 株 CRE 中, 表达碳青霉烯酶类基因为 79 株, 该 79 株经胶体金免疫层析法检测碳青霉烯酶结果均为阳性, 包括 61 株产 KPC 酶、10 株产 NDM 酶、6 株产 IMP 酶及 2 株产 VIM 酶; 21 株敏感菌胶体金检测结果均为阴性; 与 PCR 结果相比, 胶体金免疫层析法对四种酶的检测敏感性与特异性均为 100%, 与 PCR 结果一致性 kappa 值均为 1。**结论:** 胶体金免疫层析法可快速区分 CRE 碳青霉烯酶类型, 操作简便, 具有很高的敏感度和特异性, 对临床抗生素合理化用药具有重要意义。

[关键词] 产碳青霉烯酶肠杆菌; 碳青霉烯酶; 胶体金免疫层析法; 基因型

[中图分类号] R 378 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.08.026

Evaluation on effectiveness of colloidal gold immunochromatography for rapid detection of CRE carbapenems

LI Jing¹, GENG Zhi-jun², ZHENG Jing¹, WANG Tao³, YING Chong-tao¹, GUO Pu¹

(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004; 3. Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Lingbi, Suzhou Anhui 234200, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effectiveness of colloidal gold immunochromatography for rapid detection of carbapenemase-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) carbapenemase. **Methods:** A total of 80 CRE strains isolated from The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College and 21 strains of *Enterobacteriaceae* susceptible to carbapenem antibiotics were collected. PCR was used to detect blaKPC, blaNDM, blaIMP, blaVIM and blaOXA-48 genes as gold standard. Colloidal gold immunochromatography was used to detect the carbapenemase produced by CRE, which was conducted by the consistency analysis and efficiency evaluation combined with PCR results. **Results:** Among 80 CRE strains, 79 strains expressing carbapenemase genes were all positive for the detection of carbapenemase by colloidal gold immunochromatography, which includes 61 strains producing KPC, 10 strains producing NDM, 6 strains producing IMP and 2 strains producing VIM enzymes, the colloidal gold test results of 21 sensitive strains were negative. Compared with the PCR results, the sensitivity and specificity of the four enzymes by colloidal gold immunochromatography were both 100%, and the Kappa value was 1. **Conclusions:** Colloidal gold immunochromatography can be applied as a simple, rapid, sensitive and specific diagnostic method for the detection of CRE carbapenemase, which is significant to the rationalization in the clinical use of antibiotics.

[Key words] carbapenemase-resistant *Enterobacteriaceae*; carbapenemase; colloidal gold immunochromatography; genotype

碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)的临床分离率不断增加, 其治疗已成为我国抗感染治疗的严峻问题。产碳青霉烯酶是 CRE 最重要的耐药机制之一^[1]。目前, 研究发现碳青霉烯酶主要包括 A 类酶

(KPC)、B 类酶(IMP、NDM 及 VIM 等)及 D 类酶(OXA-48)^[2]。临床试验证明新型 β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂复合物等抗生素对大多数产 A 类和 D 类酶 CRE 菌株有效, 但对 B 类酶无效。因此, 区分 CRE 产酶类型对合理选择抗生素及临床治疗具有重要意义。目前, 临床实验室检测碳青霉烯酶的方法主要有纸片协同试验、mCIM(modified carbapenem inactivation method)和 eCIM(EDTA-carbapenem inactivation method)联合实验、改良 Hodge 实验、显色培养和基因检测方法等。其中 mCIM 和 eCIM 联合实验室目前临床使用较多的碳青霉烯酶检测方法^[3]。但该实验需要两阶段的孵

[收稿日期] 2020-12-15 [修回日期] 2021-03-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81902078)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1. 检验科, 2. 中心实验室, 安徽蚌埠 233004; 3. 安徽省灵璧县中医医院 检验科, 234200

[作者简介] 李 静(1989-), 女, 主管技师。

[通信作者] 郭 普, 主任技师。E-mail: guopubyyf@163.com

育培养,结果时效性较差,且无法准确给出酶的分型结果。胶体金免疫层析法是最新研发的碳青霉烯酶快速检测方法,该法将5种碳青霉烯酶的单克隆抗体与胶体金偶联,并固定于醋酸纤维素膜上,用于培养后获取的细菌样本中碳青霉烯酶的体外定性检测。本研究以蚌埠医学院第一附属医院所收集的CRE菌株为研究对象,通过胶体金免疫层析法检测CRE菌株的产碳青霉烯酶类型,并与基因检测结果进行一致性分析,评估分析胶体金免疫层析法在CRE产碳青霉烯酶类型检测中的应用效能。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集蚌埠医学院第一附属医院2017年7月至2020年12月期间临床分离的肠杆菌科细菌,对厄他培南、亚胺培南耐药,剔除同一病人同一部位分离的肠杆菌科菌株,共收集细菌80株;另外收集对碳青霉烯类抗生素敏感的肠杆菌科细菌作为对照菌株,共计21株。

1.2 主要仪器与试剂 凝胶成像仪(Bio-Rad公司)、PCR扩增仪(Applied Biosystems公司)、冷冻高速离心机(Thermo Fisher Scientific公司)、干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司)、哥伦比亚血琼脂平板(郑州安图生物工程股份有限公司)、西班牙琼脂糖(Biowest)、GeneGreen核酸染料(北京天根生化科技有限公司)、2×Taq PCR Mix(北京天根生化科技有限公司)、Trans2K DNA Marker(北京全式金生物)、碳青霉烯酶基因PCR引物自上海生工生物合成、1×TBE缓冲液(北京天根生化科技有限公司)、亚胺培南纸片(10 mg, OXOID公司)、细菌培养箱(Thermo Fisher Scientific公司)、生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司)、含珠菌种保存管(珠海贝索生物技术有限公司)、碳青霉烯酶检测试剂盒(长沙中生众捷生物技术有限公司)、涡旋仪(合肥艾本森科学仪器有限公司)。

1.3 PCR检测方法 将保存的菌株接种到血琼脂平板上,在37℃、5%CO₂细菌培养箱内隔夜培养进行复苏。采用加热煮沸法提取细菌DNA模板,采用10 μL接种环挑取一环细菌,置于1 mL无菌去离子水中,于干式恒温器中煮沸10 min,离心12 000 r/min,10 min,将含DNA的上清液转移至新EP管中,待进行PCR检测。本实验检测5个常见的碳青霉烯酶基因,基因种类及引物序列见表1,扩增条件和PCR反应体系参考文献[4]设计。PCR扩增产物于1%琼脂糖凝胶中进行电泳,100 V,30 min,于凝胶

成像仪中曝光并拍照。

表1 PCR引物列表

序号	基因名称		引物序列	产物大小/bp
1	KPC	F	GTA TCG CCG TCT AGT TCT GC	637
		R	GGT CGT GTT TCC CTT TAG CC	
2	IMP	F	CTA CGA TGA TTG CCA GCG	399
		R	CCA TTT GAT AAT CGC CCT G	
3	VIM	F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	390
		R	CGA ATG CGC AGC ACC AG	
4	NDM	F	CAC CTC ATG TTT GAA TTC GCC	984
		R	CTC TGT CAC ATC GAA ATC GC	
5	OXA-48	F	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG	744
		R	GAG CAG TTC TTT TGT GAT GCC	

1.4 胶体金免疫层析法检测 胶体金免疫层析法检测CRE碳青霉烯的方法参照试剂盒说明书进行,将碳青霉烯酶检测卡盒和提取缓冲液平衡至室温。于EP管中加入150 μL提取缓冲液,使用1 μL接种环取一环细菌样本置于含提取缓冲液的EP管中。样本使用涡旋仪混合震荡5 s使标本混合均匀(如果样本黏稠,震荡3 min并室温静置10 min后进行检测)。取100 μL样本混合液,加入检测卡盒的样本孔中,室温放置15 min,读取结果。试剂检测结果解释:(1)阴性结果,仅在C线区域出现一条红线,则样本中不含所测5种碳青霉烯酶或含量低于检测线,判读为阴性结果。(2)阳性结果,在C线区域中出现一条红线并且在K、O、V、I、N检测线区域中出现一条或多条红线,判读为阳性结果,样本中含有一种或多种碳青霉烯酶。(3)无效结果,在C线区域未出现红线,则测试结果无效。

1.5 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件进行分析。以PCR检测结果为标准,计算胶体金免疫层析法的敏感性、特异性,Kappa值>0.750,说明一致性程度较好。

2 结果

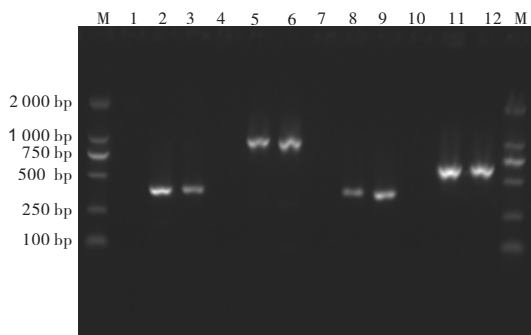
2.1 临床分离CRE菌株分布 101例临床分离的肠杆菌科细菌,主要来自ICU、急诊科等临床科室;体外药敏试验表型为CRE 80株(包括肺炎克雷伯菌60株、阴沟肠杆菌7株、大肠埃希菌13株),对碳青霉烯酶类抗生素敏感的菌株21株(包括肺炎克雷伯菌13株、阴沟肠杆菌2株、大肠埃希菌5株、产气肠杆菌1株)。菌株分布结果见表2。

2.2 CRE碳青霉烯类耐药基因检测结果 80株

CRE 菌株中碳青霉烯酶基因阳性为 79 株,碳青霉烯酶基因阴性为 1 株,其中检测到 KPC 基因型 61 株(76.25%),NDM 基因型 10 株(12.50%),IMP 基因型 6 株(7.50%),VIM 基因型 2 株(2.50%);未检测到 OXA-48 基因型,21 株对碳青霉烯类抗生素敏感的细菌均未检测到耐药基因。代表性 CRE 菌株基因型检测结果见图 1。

表 2 临床分离 CRE 菌株分布

细菌种类	菌株数	百分比/%	耐药菌株数	敏感菌株数
肺炎克雷伯菌	73	72.28	60	13
阴沟肠杆菌	9	8.91	7	2
大肠埃希菌	18	17.82	13	5
产气肠杆菌	1	0.90	0	1
合计	101	100.00	80	21



M为Marker;1~12为临床标本;1为IMP基因型阴性菌;2~3为IMP基因型阳性菌(399);4为NDM基因型阴性菌;5~6为NDM基因型阳性菌(984 bp);7为VIM基因型阴性菌;8~9为VIM基因型阳性菌(390 bp);10为KPC基因型阴性菌;11~12为KPC基因型阳性菌(637 bp)

图1 碳青霉烯酶基因型PCR产物电泳结果

2.3 胶体金免疫层析法检测 经胶体金免疫层析法检测,结果显示,61 株 KPC 基因型均为阳性,10 株 NDM 基因型均为阳性,6 株 IMP 基因型均为阳性,2 株 VIM 基因型均为阳性,胶体金免疫层析法对 CRE 的筛选敏感性为 100%,特异性为 100%,四种酶型分别与 PCR 结果进行一致性检验分析,Kappa 值均为 1,完全一致。具体分析结果见表 3。

3 讨论

目前,临床感染性疾病中革兰阴性细菌感染率约占 50%,碳青霉烯类抗菌药物作为最后一道防线已被临床广泛应用。细菌耐药监测数据显示,革兰阴性杆菌对碳青霉烯类药物的耐药率逐年增加^[5-6]。目前的研究^[7-8]发现,肠杆菌科细菌主要通过产碳青霉烯酶发挥对碳青霉烯类抗菌药物产生耐药性,碳青霉烯酶依据 Ambler 分类主要分为三

类,包括 A 类酶、B 类酶和 D 类酶。A 类酶在含有丝氨酸残基的部位进行催化作用,又称为丝氨酸酶,其中 KPC 基因是我国最常见的基因型;B 类酶又称金属酶,可被 EDTA 等含有金属离子螯合剂抑制,包括 IMP、VIM、NDM 等基因,IMP 基因是目前报道的最早发现的金属酶,其水解碳青霉烯类抗生素的能力较强;D 类酶对亚胺培南具有较高水解活性,在肠杆菌科细菌中发现的唯一基因型是 OXA-48,目前临床分离的产 D 类酶菌株较少^[9-10]。临床试验证明新型 β -内酰胺类/ β -内酰胺酶抑制剂复合物等抗生素对大多数产 A 类和 D 类酶 CRE 菌株有效,但对 B 类酶无效。因此,区分 CRE 产酶类型对合理选择抗生素及临床治疗具有重要意义。

表 3 PCR 法与胶体金免疫层析法结果对比分析

表型试验	碳青霉烯酶	结果	PCR		敏感性/%	特异性/%	Kappa 值
			+	-			
胶体金免疫层析法							
KPC	+	61	0	100	100	1	
	-	0	22				
NDM	+	10	0	100	100	1	
	-	0	22				
IMP	+	6	0	100	100	1	
	-	0	22				
VIM	+	2	0	100	100	1	
	-	0	22				

本研究针对蚌埠医学院第一附属医院 2017 年 7 月至 2020 年 12 月收集的 CRE 菌株,进行耐药基因检测,在 80 株 CRE 菌株中,79 株检测出耐碳青霉烯酶基因,其中表达 KPC 基因有 61 株,表达 NDM 基因有 10 株,表达 IMP 基因有 6 株,表达 VIM 基因有 2 株;未检测到 OXA-48 基因型。本研究中检测到的最主要基因型是 KPC,由此可见本地区临床分离的 CRE 菌株 KPC 仍是最主要的碳青霉烯酶基因型,与前期报道^[11-12]基本一致。另外,我们还检测到 NDM、IMP 及 VIM 基因型,本研究中的 10 株产 NDM 菌株对碳青霉烯类抗生素在内的其他药物几乎全部耐药。我国海南、武汉等地均有从肠杆菌科细菌中检出 NDM 的报道^[11]。由于抗生素的不合理使用,目前 CRE 的耐药机制多样,除产碳青霉烯酶外,还包括外膜蛋白的缺失或合并产超广谱 β -内酰胺酶及药物外排泵高度表达等^[13]。本研究中 1 株碳青霉烯类抗生素耐药菌株的 PCR 法及胶体金免疫层析法检测结果均为阴性,可能原因是该菌株通过产生其他碳青霉烯酶(OXA-23、GIM、SPM 及 GES

等)或存在其他耐药机制,需要我们进一步分析研究。

目前,临床实验室检测碳青霉烯酶的方法主要有纸片协同试验、mCIM 和 eCIM 联合实验、改良 Hodge 实验、显色培养和 PCR 法等。改良 Hodge 试验及 mCIM 试验是 2017 版美国临床和试验室标准化协会(CLSI)推荐的碳青霉烯酶表型筛选方法。而 mCIM 和 eCIM 联合实验室是目前临床使用较多的碳青霉烯酶检测方法。胶体金免疫层析法是最新研发的碳青霉烯酶快速检测方法,该法将 KPC、IMP、VIM、NDM 和 OXA-48 型 5 种碳青霉烯酶的单克隆抗体与胶体金偶联,并固定于醋酸纤维素膜上,用于培养后获取的细菌样本中 KPC、IMP、VIM、NDM 和 OXA-48 型 5 种碳青霉烯酶的体外定性检测,可快速鉴定细菌样本中是否存在 5 种碳青霉烯酶中一种或几种,从而鉴定感染病人是否对碳青霉烯类抗生素具有耐药性^[14]。目前该方法在中国尚未作为临床常规检测 CRE 碳青霉烯酶,其检测效能尚需进一步评价,本研究采用胶体金免疫层析法对 79 株 CRE 菌株进行产酶检测,并与 PCR 检测结果进行一致性分析,结果证实胶体金免疫层析法对 KPC、IMP、VIM、NDM 的检测敏感性高(100%)、特异性强(100%),更重要的是操作简单快速,仅需 20 min 左右即可鉴定出 CRE 产碳青霉烯酶类型。

总之,胶体金免疫层析法是一种操作简便、快速高效的 CRE 碳青霉烯酶检测方法,该法检测产碳青霉烯酶肠杆菌耐药表型的敏感性和特异性较高,对流行病学调查、感染控制及临床抗菌药物管理优化均具有重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] ZHANG Y, WANG Q, YIN Y, *et al.* Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections; Report from the China CRE Network[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(2): e01882.
- [2] LOGAN LK, WEINSTEIN RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a

Global Menace[J]. *J Infect Dis*, 2017, 215(suppl_1):S28.

- [3] 喻华,徐雪松,李敏,等. 肠杆菌目细菌碳青霉烯酶的实验室检测和临床报告规范专家共识[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(6):671.
- [4] 宋晓萍,张宁欣,王健,等. 青岛地区 3 家“三甲”医院 ICU 耐亚胺培南革兰氏阴性杆菌碳青霉烯酶基因型研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(4):478.
- [5] 郑永贵,胡付品,朱德妹,等. 2019 年 CHINET 细菌耐药监测网二级医院监测结果[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2020, 20(6):585.
- [6] 朱敬蕊,崔琢,汪振林,等. 某三甲医院常见多重耐药菌流行趋势分析[J]. *蚌埠医学院学报*, 2020, 45(1):94.
- [7] PECORA N, ZHAO X, NUDEL K, *et al.* Diverse Vectors and Mechanisms Spread New Delhi Metallo- β -Lactamases among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in the Greater Boston Area[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(2):e02040.
- [8] 张洪涛,曹青凤,张娜,等. 耐碳青霉烯类抗生素肠杆菌科细菌耐药机制的研究进展[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2016, 37(2):68.
- [9] DEL FM, PAONE L, NOVATI R, *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789) [J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15(1):260.
- [10] MCMULLEN AR, YARBROUGH ML, WALLACE MA, *et al.* Evaluation of Genotypic and Phenotypic Methods to Detect Carbapenemase Production in Gram-Negative Bacilli [J]. *Clin Chem*, 2017, 63(3):723.
- [11] 刘宇豪,陈晨,次仁曲珍,等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(2):55.
- [12] 程莉,谭婷婷,魏红霞,等. 临床分离的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的耐药机制研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017(3):112.
- [13] 孙艳. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药机制及实验室检测研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(16):2011.
- [14] BODENDOERFER E, KELLER PM, MANCINI S. Rapid identification of NDM-, KPC-, IMP-, VIM- and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriales from blood cultures by a multiplex lateral flow immunoassay [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(6):1749.

(本文编辑 刘璐)