

• 论 著 •

西司他汀在肠杆菌科细菌 Carba NP 试验中的影响评价*

万 林¹, 李昀晖², 胡锡池¹, 胡仁静^{1△}, 金 奕³

(1. 江苏省无锡市第二人民医院检验科 214002; 2. 江苏大学医学院医学检验系, 江苏镇江 212013;
3. 江南大学附属无锡市第四人民医院检验科, 江苏无锡 214002)

摘要:目的 评估西司他汀对肠杆菌科细菌 Carba NP 试验的影响。方法 选取无锡市第二人民医院、无锡市第四人民医院 2016 年 1—12 月肠杆菌科细菌非重复菌株 163 株, 分别以亚胺培南标准品、亚胺培南/西司他汀为底物进行 Carba NP 试验。结果 按照美国临床实验室标准化协会标准选取碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌 83 株, 以亚胺培南标准品、亚胺培南/西司他汀分别为底物检测时 Carba NP 试验诊断产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌的敏感度、特异度均为 100%; 二者所有试验均在 1 h 内完成检测。结论 以亚胺培南标准品、亚胺培南/西司他汀为底物时 Carba NP 试验均能快速、准确筛查出产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌, 以亚胺培南/西司他汀为底物时成本低, 西司他汀对 Carba NP 试验无影响。

关键词:碳青霉烯酶; Carba NP 试验; 西司他汀; 肠杆菌科细菌

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 24. 004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)24-3576-03

Evaluation the influence of Cilastatin on Carba NP test of Enterobacteriaceae*

WAN Lin¹, LI Yunhui², HU Xichi¹, HU Renjing^{1△}, JIN Yi³

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Wuxi, Wuxi, Jiangsu 214002, China;
2. Department of Medical Laboratory, Jiangsu University Medical College, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China;
3. Department of Clinical Laboratory, the Fourth People's Hospital of Wuxi, Wuxi Jiangsu 214002 China)

Abstract: Objective To evaluate the influence of cilastatin for detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae. **Methods** 163 Enterobacteriaceae were collected from January to December, 2016 from The Second People's Hospital of Wuxi and The Fourth People's Hospital of Wuxi in Jiangsu. Imipenem Standard and imipenem-cilastatin were used as substrates to perform the Carba NP test. **Results** According to the Clinical and Laboratory Standards Institute, 83 CRE strains were collected. The sensitivity and specificity of Carba NP test with imipenem and imipenem-cilastatin as substrates, were both 100%. All of the tests were performed within 1 hour. **Conclusion** When the imipenem standard and imipenem-cilastatin were used as substrates, the Carba NP test can detect carbapenemases-producing Enterobacteriaceae (CPE) rapidly and accurately. The cost of imipenem-cilastatin was low, and cilastatin had no effect on the Carba NP test.

Key words: carbapenemase; carba NP test; cilastatin; enterobacteriaceae

多重耐药的肠杆菌科细菌不仅可以造成院内感染, 还可以造成社区感染的暴发流行^[1-2]。多重耐药的肠杆菌科细菌对亚胺培南、厄他培南、美罗培南等碳青霉烯类耐药的菌株在临床上检出日益增多, 重症患者一旦被感染, 治疗手段有限, 死亡概率高, 因此, 及时有效的治疗及有效控制感染显得尤为重要^[3]。一旦分离出可疑菌株, 及时高效地表型确认试验显得尤为需要。Carba NP 试验是 2012 年法国团队研发报道的碳青霉烯类耐药肠杆菌 (CRE) 表型确认试验。该团队以亚胺培南标准品为底物, 由于比较昂贵, 2012 年后部分研究者采用价格便宜 10 倍的亚胺培南/西司他汀进行试验, 但是西司他汀存在稳定性差的问题, 要求每次试剂要现配^[4]。本研究探讨亚胺培南/西司他汀在进行 Carba NP 试验时对检测结果的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取无锡市第二人民医院、无锡市第四人民医院 2016 年 1—12 月 CRE 非重复菌株 83 株, 同时选取碳青霉烯类敏感肠杆菌 (CSE) 80 株作为对照组, 标本包括痰液、血液、尿液、引流液、胸腔积液、腹水等。细菌鉴定及药敏试验采

用 VITEK2-compact 进行检测。药敏试验结果解释参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 的 M100-S25^[5] 标准。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.2 仪器与试剂 德国 Eppendorf 公司的聚合酶链反应 (PCR) 仪、Thermo 公司的凝胶成像仪、徐州微科曼生物工程的 PCR 检测试剂、Thermo 公司的酚红试剂、美国 Sigma 公司的硫酸锌七水合物、杭州默沙东制药的亚胺培南/西司他汀、中国药品鉴定所的亚胺培南。

1.3 Carba NP 试验

1.3.1 操作流程 设置 2 个 EP 管分别为试验管和对照管。用 10 μL 接种环挑取约 1 个接种环量的细菌, 分别加入 100 μL 细菌蛋白抽提液, 混悬振荡后, 分别加入 A、B 检测液, 前面 0.5 h 每隔 10 min 观察结果, 0.5 h 后每隔 30 min 观察结果至孵育 2 h。阳性结果颜色由红色变成橙色或黄色。

1.3.2 试剂的配制 Carba NP 试验与 Carba NP 直接纸片法的检测液配方相同, 分为 A、B 级两种试剂。具体如下。A 液: 0.05% 酚红溶液 + 180 μL 的 0.1 mmol/L 硫酸锌 (ZnSO₄) 水溶液 [0.1 mol/L 氢氧化钠 (NaOH) 及 10% 盐酸 (HCL) 调 pH

* 基金项目: 江苏省无锡市科技支撑项目 (CSE31N1602)。

作者简介: 万林, 女, 技师, 主要从事微生物耐药方面的研究。△ 通信作者, E-mail: weiweihuhu112@163.com。

为(7.8±0.1)]。B 液:每毫升 A 液中含有终浓度为 6 mg/mL 的亚胺培南/西司他汀。

1.4 基因检测及测序 水煮法提取细菌 DNA,PCR 扩增常见的碳青霉烯酶基因,具体信息见表 1。PCR 体系:Taq 酶(5 U/ μ L)0.25 μ L、10×PCR 缓冲液 5 μ L,dNTP 缓冲液(2.5 mmol/L)4 μ L、模板 DNA 1 μ L、上下游引物(20 μ mol/L)各 1

μ L,无核酸酶水补足至 50 μ L。PCR 扩增程序:95℃预变性 2 min,95℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸,共 35 个循环,72℃延伸 10 min。扩增的产物作为 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,经凝胶成像系统显像观察结果。PCR 阳性产物测序委托英潍捷基(上海)生物技术有限公司完成,测序结果在 Geng-Bank 数据库中比对确定基因型。

表 1 PCR 检测的引物序列及温度

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)	退火温度(℃)
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCTA	882	56
	KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAA		
<i>bla</i> _{SME}	SME-F	AACGGCTTCATTTTTGTTTAG	830	56
	SME-R	GCTTCCGCAATAGTTTTATCA		
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	846	57
	GES-R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG		
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	CGGCCKCAGGAGMGKCTT	587	57
	IMP-R	AACCAGTTTTGCTTACAT		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	GCMCTTCTCGCGGAGATTGA	257	59
	VIM-R	TGCGCAGCACCRGGATAGA		
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-1-F	TCCTTGATCAGGCAGCCACC	591	64
	NDM-1-R	CGCATTAGCCGCTGCATTGA		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48-F	GCTTGATCGCCCTCGATT	281	57
	OXA-48-R	GATTTGCTCCGTGGCCGAAA		

2 结 果

2.1 基因检测结果 163 株肠杆菌科细菌中,CRE 中 KPC、SME、GES 等为常见的基因型,KPC-2 型肠杆菌科细菌 78 株,NDM-1 型肠杆菌科细菌 3 株,IMP-4 型弗氏柠檬酸杆菌 1 株,1 株未检出碳青霉烯酶。PCR 阳性菌株的产物纯化后测序,肠杆菌科细菌电泳图见图 1。

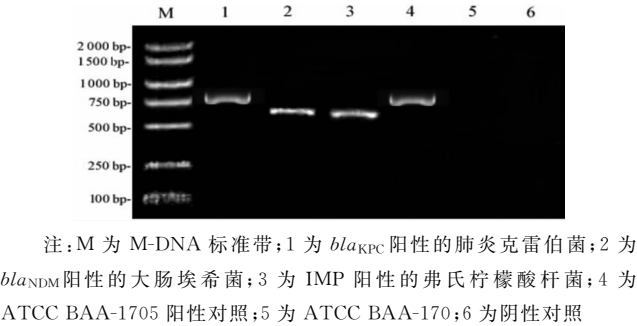


图 1 肠杆菌科细菌电泳图

2.2 Carba NP 试验结果

2.2.1 亚胺培南标准品为底物的试验结果 产 KPC-2 酶的 CRE 菌株 Carba NP 试验均为阳性,均在 60 min 内由红色变成黄色,产 NDM-1 酶的肠杆菌科细菌 Carba NP 试验均为阳性,且主要为大肠埃希菌,均在 5 min 内由红色变为黄色,CRE 中 1 株 NCPE 菌株结果为阴性,CSE 的菌株 Carba NP 试验均为阴性。CSE 组 90 株 Carba NP 试验全部阴性,具体结果见表 2。

2.2.2 亚胺培南/西司他汀为底物的试验结果 试验结果与亚胺培南标准品为底物的试验结果一致。82 株产碳青霉烯酶

的肠杆菌科细菌(CPE)基因阳性的 CRE,Carba NP 试验均为阳性,产 KPC-2 酶的 CRE 菌株均在 60 min 内由红色变成黄色,产 NDM-1 酶的肠杆菌科细菌主要为大肠埃希菌,均在 5 min 内由红色变为黄色,CRE 组中 1 株 NCPE 菌株结果为阴性,CSE 的菌株 Carba NP 试验均为阴性。CSE 中 80 株 Carba NP 试验全部阴性,见表 2。

2.2.3 亚胺培南/西司他汀、亚胺培南标准品为底物结果比较 以亚胺培南/西司他汀为底物进行 Carba NP 试验的结果与亚胺培南标准品为底物的结果比较 Kappa 为 1,两种底物的 Carba NP 试验在各类肠杆菌科细菌中结果完全一致,见表 2。

表 2 肠杆菌科细菌碳青霉烯酶表型试验结果

菌株名称	基因型	菌株数 (株)	Carba NP 试验[n(%)]	
			亚胺培南 标准品	亚胺培南/ 西司他汀
肺炎克雷伯菌	KPC-2	60	60(100)	60(100)
	非产碳青霉烯酶	51	0(0)	0(0)
大肠埃希菌	KPC-2	3	3(100)	3(100)
	NDM-1	3	3(100)	3(100)
	非产碳青霉烯酶	30	0(0)	0(0)
产气肠杆菌	KPC-2	2	2(100)	2(100)
阴沟肠杆菌	KPC-2	2	2(100)	2(100)
弗氏柠檬酸杆菌	KPC-2	1	1(100)	1(100)
	IMP-4	1	1(100)	1(100)
液化沙雷菌	KPC-2	2	2(100)	2(100)
黏质沙雷菌	KPC-2	8	8(100)	8(100)

3 讨 论

CRE 产生的碳青霉烯酶分为 3 组,即 A、B、D 组,本研究 163 株肠杆菌科细菌包括 83 株 CRE 和 80 株 CSE。83 株 CRE 包括 CPE82 株及非产碳青霉烯酶肠杆菌 1 株。82 株 CPE 中 78 株产 A 组 KPC-2 酶,3 株产 B 组酶,1 株 IMP-4 型弗氏柠檬酸杆菌。产 B 酶的均为大肠埃希菌;未检测到 D 组的碳青霉烯酶。

Carba NP 试验是 2012 年 Nordmann 团队研发的一种快速表型试验,试验原理采用酶粗提物与亚胺培南的水解反应,酸性产物可以使酚红变色,2015 年 Carba NP 试验被 CLSI 推荐使用^[5-6]。2012—2016 年世界各地的研究者对该试验进行验证和改进^[7-8],改进试验包括:The BYG Carba 试验^[9-10]、Blue-Carba 试验^[11-12]、Carba NP direct 试验等^[13],这些改进试验主要集中在几个方面:简化试验流程;更改蛋白抽提液,改变指示剂;成品试剂盒规范试验流程;提高敏感度等。但是对反应底物是亚胺培南标准品还是亚胺培南/西司他汀很少有文献做过比较。本研究采用亚胺培南标准品及亚胺培南/西司他汀作为底物进行 Carba NP 试验并比较二者的差异,研究数据显示二者无差异。

采用亚胺培南/西司他汀替进行 Carba NP 试验,降低了试验成本。亚胺培南/西司他汀的构成比是 1:1,在配制时选取的浓度是 12 mg/mL,相当于亚胺培南标准品 6 mg/mL。以二者作为底物进行 Carba NP 试验,在 60 min 内出现阳性结果,试验简单、快速、方便,并且在常规实验室中用于碳青霉烯酶检测非常便宜。

试验从血平板培养基或 MH 培养基上直接挑取菌落^[14],而麦康凯等选择性平板培养基上的菌落在进行纸片法检测时阳性率降低,因此,选择性培养基不适合进行 Carba NP 试验。本研究肠杆菌科细菌的耐药菌株主要产 KPC-2、NDM-1 型酶,无其他酶型菌株检出。目前产的 D 组我国相对报道较少,世界范围内 D 组酶主要在土耳其、摩洛哥等高发流行^[15-16],后续研究中应继续收集更多的菌株。

西司他汀对 Carba NP 试验的结果无影响,但是由于本研究菌株数有限,需要进一步扩大样本量及获得更多的基因型来验证。Carba NP 试验能在 60 min 内检测出产酶菌株,检测成本低,操作方便简单,特别是采用亚胺培南/西司他汀作为底物,其成本更低,试验更具可行性,适合在临床微生物学实验室开展。

参考文献

- [1] 杨晨,胡仁静,胡锡池,等. MLST 在碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学分析中的应用[J]. 中华医院感染学杂志,2016,26(23):5514-5516.
- [2] Piso RJ, Kach R, Pop R, et al. A Cross-Sectional Study of Colonization Rates with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Four Swiss Refugee Centres[J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0170251.
- [3] Bassetti M, Peghin M, Pecori D. The management of multidrug-resistant Enterobacteriaceae[J]. Curr Opin Infect Dis, 2016, 29(6):583-594.

- [4] AbdelGhani S, Thomson GK, Snyder JW, et al. Comparison of the Carba NP, Modified Carba NP, and Updated Rosco Neo-Rapid Carb Kit Tests for Carbapenemase Detection[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(11):3539-3542.
- [5] Poirel L, Nordmann P. Rapidec Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase Producers[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(9):3003-3008.
- [6] Dortet L, Brechard L, Poirel L, et al. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test[J]. J Med Microbiol, 2014, 63(Pt5):772-776.
- [7] Dortet L, Brechard L, Poirel L, et al. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(4):340-344.
- [8] Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Further proofs of concept for the Carba NP test[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(2):1269-1276.
- [9] Noel A, Huang TD, Berhin C, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(2):510-518.
- [10] Bogaerts P, Yunus S, Massart M, et al. Evaluation of the BYG Carba Test, a New Electrochemical Assay for Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(2):349-358.
- [11] Nastro M, Ayora M, Garcia S, et al. Rapid Blue-Carba test: reduction in the detection time of carbapenemases performed from a 4-hour bacterial lawn[J]. J Chemother, 2017, 29(3):150-153.
- [12] Pires J, Tinguely R, Thomas B, et al. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. J Microbiol Methods, 2016, 122(1):33-37.
- [13] Pasteran F, Tijet N, Melano RG, et al. Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(12):3908-3911.
- [14] Morey KE, Vega R, Cassidy PM, et al. Evaluation of the Carba NP Test in Oregon, 2013[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(1):3005-3015.
- [15] El Garch F, Sauget M, Hocquet D, et al. Mcr-1 is borne by highly diverse *Escherichia coli* isolates since 2004 in food-producing animals in Europe[J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(1):51-54.
- [16] Arcilla MS, van Hattem JM, Haverkate MR, et al. Import and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(1):78-85.