

- epiretinal membranes[J]. Acta Ophthalmol, 2011, 89(2): 115-121.
- [20] Dabiri G, Tumbarello DA, Turner CE, et al. Hic-5 promotes the hypertrophic scar myofibroblast phenotype by regulating the TGF-beta1 autocrine loop[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(10): 2518-2525.
- [21] Mori K, Hirao E, Toya Y, et al. Competitive nuclear export of cy-
- clin D1 and Hic-5 regulates anchorage dependence of cell growth and survival[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(1): 218-232.
- [22] Li X, Martinez-Ferrer M, Botta V, et al. Epithelial Hic-5/ARA55 expression contributes to prostate tumorigenesis and castrate responsiveness[J]. Oncogene, 2011, 30(2): 167-177.

(收稿日期: 2012-11-18)

产碳青霉烯酶菌株实验室检测研究进展

谷秀梅¹, 杨敏²综述, 刘文恩^{1△}审校

(1. 中南大学湘雅医院检验科, 湖南长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医学院医学检验系, 湖南长沙 410003)

关键词: 碳青霉烯酶; 表型检测; 分子诊断技术; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.031**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)01-0068-03

碳青霉烯类抗菌药物是抗菌谱最广、抗菌活性最强的非典型 β -内酰胺类药物, 因其具有对 β -内酰胺酶稳定以及毒性低等特点, 已成为治疗严重细菌感染最主要的抗菌药物之一。随着此类药物的大量使用, 耐药菌株不断出现且检出率逐年提高, 给临床治疗和院内感染控制带来新的挑战。既往临床上常见的耐药菌株以铜绿假单胞菌和不动杆菌属细菌为代表, 但随着此类抗菌药物使用频率增加, 对其耐药的肠杆菌科细菌在世界各地均有报道。对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性可以由产生过量 AmpC 酶同时伴外膜孔道蛋白大量缺失和(或)外排泵过量表达, 或产生碳青霉烯酶引起。而产碳青霉烯酶是碳青霉烯类药物耐药的主要原因, 包括 KPC 酶、金属酶以及部分 OXA 酶, 编码此类酶的基因大多位于可移动基因元件上, 通过质粒或转座子在不同菌种间传播, 从而导致耐药基因的迅速播散^[1]。碳青霉烯类药物是临床治疗重症感染的最后选择, 如果患者对其耐药, 几乎无药可医。因此, 对碳青霉烯酶的快速检测已迫在眉睫。然而, 单独的药敏试验并不能筛查所有的产碳青霉烯酶菌株, 因此预防和控制产酶菌株的播散就必须依赖实验室的诊断。

1 碳青霉烯酶

碳青霉烯酶是能够明显水解亚胺培南或美罗培南等碳青霉烯类抗菌药物的 β -内酰胺酶, 目前发现的碳青霉烯酶属于 Ambler 分子分类中的 A、B、D 类。

1.1 A 类碳青霉烯酶 A 类碳青霉烯酶活性部位具有丝氨酸结构, 对亚胺培南的水解活性强于美罗培南, 可引起青霉素类、氨基糖苷类、碳青霉烯类耐药, 不水解第 3 代头孢菌素, 他唑巴坦、克拉维酸可以抑制此类酶, 而 EDTA 不能抑制。A 类酶主要包括 KPC、NMC-A、IMI-1、SME、GES。其中由质粒介导的 KPC 酶易于在不同菌种间传播, 已成为肠杆菌科细菌耐碳青霉烯类抗菌药物的主要原因之一。自 KPC 酶首次发现后, 产 KPC 酶的肠杆菌科细菌不断被分离, 在美国、法国、希腊、英国、巴西、以色列及中国均有产 KPC 酶菌株感染的病例报道^[2-3], 故推测 KPC 酶可能在全球范围内均有播散。目前国内外研究已发现 12 种 KPC 亚型, 中国主要见于浙江省。

1.2 B 类碳青霉烯酶 B 类酶为金属酶, 主要包括 IMP、VIM、SPM、GIM 及 NDM-1 等, 大多由整合子介导^[4]。其催化活性依赖 Zn^{2+} , 因此可被 EDTA 等金属螯合剂抑制, 但不被克

拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦等 β -内酰胺酶抑制剂抑制, 能灭活青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物, 对氨基糖苷类无水解活性。B 类酶中 IMP、VIM 的检出率较高, 已在铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、弗劳地柠檬酸杆菌等细菌中分离到。此外, 自 2008 年首次报道从肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中分离出 NDM-1 以来, 到 2010 年已有 13 个欧盟国家报道共出现 77 例 NDM-1 阳性的菌株, 大部分为肺炎克雷伯菌, 而这 77 例中有 55 例的患者均有在印度或巴基斯坦的旅游史或治疗史^[5]。2011 年 8 月广州地区报道在臭鼻克雷伯菌和鲍曼不动杆菌中发现 4 株 NDM-1 阳性株, 为该地区首次报道^[6]。

1.3 D 类碳青霉烯酶 D 类酶主要是指 OXA 酶, 目前发现较多的是来自鲍曼不动杆菌的 OXA-23 以及肺炎克雷伯菌的 OXA-48, 其对亚胺培南有较高的水解活性, 编码基因位于质粒上。在欧洲、美国、伊朗、日本及中国均有许多关于 OXA 酶的报道。

2 碳青霉烯酶检测

2.1 表型检测

2.1.1 检测碳青霉烯类的 MIC 值 药物敏感试验可以初步确定药物对细菌的体外抗菌活性, 因此, 准确检测碳青霉烯类抗菌药物的耐药性是筛选产酶菌株的关键。但不同的药敏检测方法对耐药性的检出率也不同。国外有文献报道自动化药敏检测系统并不能有效检测出产 KPC 酶菌株对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性^[7]。不同的菌种对碳青霉烯类抗菌药物的敏感性水平亦不尽相同。例如, 产碳青霉烯酶肠杆菌科菌株对亚胺培南的 MIC 值可以低至 $0.125 \mu\text{g/mL}$ ^[8], 产 OXA 或 KPC 酶鲍曼不动杆菌菌株一般对碳青霉烯类耐药, 而产金属酶菌株可能对其敏感^[4]; 产碳青霉烯酶铜绿假单胞菌通常对亚胺培南的 $\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g/mL}$ ^[9]。因此, 不能仅仅凭借单一的碳青霉烯类抗菌药物的药敏结果去筛查所有可疑菌株。联合评价多种碳青霉烯类药物的抗菌活性可以提高产酶菌株的筛查效果^[10], 且对于不同的菌种或者不同的酶应当选择合理的实验组合灵活鉴定。

2.1.2 改良 Hodge 试验 2010 年版 CLSI 建议对 MIC 增高或纸片法抑菌圈缩小的对碳青霉烯类抗菌药物敏感的肠杆菌科细菌采用改良 Hodge 试验 (MHT) 进行碳青霉烯酶表型确

证试验。CLSI 认为该试验在确证 KPC 型碳青霉烯酶时敏感度和特异度均超过 90%，而检测金属酶或 OXA 酶的敏感性低，且存在一些假阳性结果^[11]，麦康凯培养基或者在纸片上加锌离子溶液可以提高其敏感性。改良 Hodge 试验操作简单，结果易于观察，适用于各级微生物室作为常规工作开展。Pasteran 等^[12]利用加苯硼酸或苯唑西林的改良 Hodge 试验能够很好地区分产 AmpCs/ESBLs 菌株导致的假阳性结果，对 A 类碳青霉烯酶检测的敏感性和特异性大于 90%。为了解决某些非发酵菌如铜绿假单胞菌可能产生某种抑制指示菌生长的物质使得改良 Hodge 试验出现无法判定的结果，Pasteran 等^[13]发现选用肺炎克雷伯菌 ATCC700603 作为指示菌株时，可以避免这类现象出现且结果易于判断，并命名该试验为铜绿假单胞菌改良 Hodge 试验 (PAE-MHT)，但其高敏感度 (100%) 和高特异度 (97%) 还需临床实践进一步证实。

2.1.3 抑制剂增效实验及其衍生方法 抑制剂增效实验为检测金属酶的常用方法，将 EDTA、吡啶二羧酸、巯基丙酸、克拉维酸、邻二氮杂菲等抑制剂加至亚胺培南、头孢他啶和头孢吡肟等抗菌药物纸片上，比较加入抑制剂后的药物纸片与未加者所产生的抑菌圈大小，如果加抑制剂后抑菌圈直径增大 7 mm 及以上时判定为产金属酶。其中加 EDTA 或者吡啶二羧酸的纸片扩散法效果最佳^[14]。金属酶的 E-test 法原理与抑制剂增效实验相同，试纸条两侧 MIC 值相差 8 倍以上判定为阳性，然而某些菌株本身对 EDTA 敏感可能导致假阳性。目前又出现了拉氧头孢联合 EDTA 检测金属酶的报道，其对低产的金属酶菌株也具有很好的检测能力^[15]。Tris/EDTA Disk Test 是在 EDTA 协同试验的基础上，将涂布有待测菌株的 EDTA 纸片紧贴于亚胺培南纸片旁，它能够检测细菌是否同时产金属酶和其他类型的碳青霉烯酶。纸片联合苯硼酸可以很好的检测 KPC 酶、AmpC 酶以及部分外膜蛋白缺失的菌株，但 KPC 酶不被氯唑西林抑制而后两者则与其协同抑制使抑菌圈增大，因而可以据此区分^[16]。最近又有根据针对金属酶抗原表位的单克隆抗体建立的免疫层析法检测金属酶，其与 PCR 扩增 IMP 基因有很高的一致性^[17]。

2.1.4 显色培养基 利用显色培养基进行微生物的筛选分离，其反应的灵敏度和特异度大大优于传统培养基。Panagea 等^[18]评价 CHROMagar KPC 显色培养基和添加了亚胺培南的麦康凯培养基对肛拭子产碳青霉烯酶菌的检测能力，发现产酶菌株在显色培养基上产生蓝色金属光泽的菌落，阳性和阴性预测值均大于 95%，因此其作为筛查试验不失为一种好方法。但缺点是产 KPC 和 VIM 酶的菌株均为蓝色，无法根据菌落颜色区分具体产何种酶，并且培养时间至少要 48 h，不利于临床有效的控制感染。近来又出现了一种名为 SUPERCARBA medium 的培养基，它在培养基中添加亚胺培南、氯唑西林、硫酸锌，筛选能力要优于 ChromID ESBL (bioMérieux) 和 CHROMagar-KPC(CHROMagar)，可以检测目前出现的大部分碳青霉烯酶包括 KPC、NDM-1、IMP、VIM 和 OXA-48^[19]。

2.1.5 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 (MALDI-TOF) 将过夜培养的细菌加入到含有亚胺培南的溶液中共同温育 4 h 后离心取上清液用质谱仪分析，如果在 300.0 m/z 处的亚胺培南峰值消失或者其代谢产物在 254.0 m/z 处的峰值增加使二者比值小于 0.5 则判定为碳青霉烯酶阳性。对 124 株临床分离肠杆菌和铜绿假单胞菌检测的敏感度和特异度分别为 96.67% 和 97.87%^[20]。另有报道用此方法检测鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶敏感度和特异度均达到 100%^[21]。这种

方法直接检测酶活性，不仅可以作为鉴定依据还可以用于耐药机制分析，但是要注意准确控制亚胺培南与细菌温育的时间^[20]。

2.2 分子诊断技术

2.2.1 PCR 技术及多重 PCR 技术 采用基因特异性引物进行 PCR 扩增及基因测序可以检测细菌是否具有碳青霉烯酶基因。多重 PCR 技术通过在一个反应体系中加入多对特异引物，可以在一次反应中检测多种目的基因。Poirel 等^[22]建立的三个多重 PCR 体系可以检测目前出现的 11 种碳青霉烯酶基因。然而 PCR 技术也有其局限性，由于其具有需要专业技术、专业设备和成本高等特点而不能在日常工作中普遍开展。

2.2.2 实时荧光定量 PCR 及其衍生技术 实时荧光定量 PCR 检测 KPC 基因的技术已较成熟，Cole 等^[23]运用 Taqman 实时荧光定量 PCR 对细菌 DNA 进行扩增，然后用 Rsa I 对扩增产物进行酶切分析以区分 KPC-2 和 KPC-3 型基因。但这种方法需要对扩增产物进行酶切消化和电泳，比较费时，不适合大样本研究。Chen 等^[24]采用多重分子信标实时定量 PCR 对目前出现的 10 种 KPC 基因进行检测，反应体系包括两套 PCR 引物和 6 种分子信标，只需进行一次 PCR 就可根据荧光强度和荧光类型将细菌的基因型别鉴定出来。目前也有用于检测 NDM-1 基因的报道^[25]。

2.2.3 环介导等温扩增技术 环介导等温扩增技术是一种新型的核酸扩增技术，针对目的基因的 6 个区域设计 4 种引物，利用链置换 DNA 聚合酶在等温 (60~65 °C) 的条件下高效、特异的扩增目的基因，扩增结果可通过肉眼观察是否产生扩增副产物焦磷酸镁沉淀进行判断。临床实验室根据这个原理检测 NDM-1 基因^[26]，针对该基因的八个特异区域设计 6 种引物，包括 1 对外引物、1 对内引物及 1 对环状引物。整个反应只需在 65 °C 水浴 40 min。此法的特异度及敏感度均高于传统的 PCR。对于 NDM-1 阳性的菌株每管含量 1 pg 的 DNA 都能检测出来。不仅如此，该法对临床污染的标本同样可以进行检测，而 PCR 却不能。但是它的高敏感性可能造成假阳性，使得其应用受到一定的限制。

2.2.4 基因芯片 基因芯片的测序原理是杂交测序方法，通过与一组已知序列的核酸探针杂交进行核酸序列测定。近来发展的基因芯片如 Check-MDR CT102^[27]可以检测 ESBLs (SHV、TEM 和 CTX-M) 和碳青霉烯酶 (KPC、OXA-48、VIM、IMP 和 NDM-1) 基因，此方法从提取 DNA 到报告结果只要 7~8 h，远远短于传统的 PCR 扩增后测序。但是这种方法也有其局限性，例如无法检测少见的 ESBLs 如 VEB、PER、GES 等，且不能区分各种酶的具体亚型。

3 小结

产碳青霉烯酶是细菌对碳青霉烯类药物耐药的主要原因。因此，对碳青霉烯酶的快速准确检测刻不容缓。检测碳青霉烯酶的方法有多种，各有利弊，实验室应根据具体情况选择合适的实验灵活鉴定。对于碳青霉烯酶的检测，最理想的目标是将其纳入常规检测中，运用一种灵敏度高、可以检测所有类型碳青霉烯酶的试验进行检测，如果出现阳性，再进行其他的特异性试验以确证^[28]。另外，可以通过对临床分离标本中检测到的各种酶的结构进行分析，研发和生产针对这些酶的药物，为临床制定合理的治疗方案和个体化医疗的实施提供帮助^[29]，延缓细菌耐药的产生，控制耐药菌株的播散。

参考文献

[1] 王彩虹, 陈坚, 郭杰, 等. 质粒介导 KPC-2 型碳青霉烯酶弗劳地柠

- 柠檬酸盐杆菌的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(11): 1233-1236.
- [2] Samuelsen O, Naseer U, Tofteland S, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(4): 654-658.
 - [3] Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(2): 818-820.
 - [4] 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.
 - [5] Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe[J]. *Euro Surveill*, 2010, 15(46): 19716.
 - [6] 杨银梅, 叶惠芬, 张伟红, 等. 臭鼻克雷伯和鲍曼不动杆菌中检出 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1207-1409.
 - [7] Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(9): 2879-2883.
 - [8] Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, et al. Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(1): 59-63.
 - [9] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(3): 440-458.
 - [10] Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, et al. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(2): 697-701.
 - [11] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(2): 477-479.
 - [12] Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, et al. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *enterobacteriaceae* by incorporating boronic Acid [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(4): 1323-1332.
 - [13] Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, et al. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(12): 4301-4303.
 - [14] Cohen SJ, Leverstein-Van HM. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(3): 205-210.
 - [15] Pluquet E, Arlet G, Bingen E, et al. Sensitive and specific phenotypic assay for metallo-beta-lactamase detection in *Enterobacteria* by use of a moxalactam disk supplemented with EDTA [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(7): 2667-2670.
 - [16] Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(4): 552-556.
 - [17] Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, et al. Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo-beta-lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas* [J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 87(3): 330-337.
 - [18] Panagea T, Galani I, Souli M, et al. Evaluation of CHROMagar KPC for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2011, 37(2): 124-128.
 - [19] Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* using a novel screening medium [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(8): 2761-2766.
 - [20] Hrabak J, Walkova R, Studentova V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9): 3222-3227.
 - [21] Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31676.
 - [22] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 119-123.
 - [23] Cole JM, Schuetz AN, Hill CE, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(2): 322-326.
 - [24] Chen L, Mediavilla JR, Endimiani A, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (bla KPC) variants [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(2): 579-585.
 - [25] Ong DC, Koh TH, Syahidah N, et al. Rapid detection of the blaNDM-1 gene by real-time PCR [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(7): 1647-1649.
 - [26] Qi J, Du Y, Zhu X, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of NDM-1 gene [J]. *Microb Drug Resist*, 2012, 18(4): 359-363.
 - [27] Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, et al. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM-1 carbapenemases [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4): 1608-1613.
 - [28] Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(4): 1019-1025.
 - [29] Lee JH, Sohn SG, Jung HI, et al. Preparation, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of OXA-23, a carbapenemase conferring widespread antibiotic resistance [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2011, 48(6): 395-398.

(收稿日期: 2012-12-12)