

• 基础实验研究论著 •

Carba NP 法用于产碳青霉烯酶菌株快速检测的研究*

袁 敏, 龚 林, 陈 霞, 刘 佳, 禹惠兰, 徐建国, 李 娟[△]

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所细菌耐药室/传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 探讨将 Carba NP 法用于产碳青霉烯酶肠杆菌科及假单胞菌属细菌的检测。方法 将 8 株产碳青霉烯酶菌株作为研究对象, 采用 Carba NP 法进行碳青霉烯酶检测, 并将其与改良 Hodge 试验比较。结果 Carba NP 法能够特异、灵敏地检测产碳青霉烯酶菌株。Carba NP 试验 I 能检测菌株是否产碳青霉烯酶, Carba NP 试验 II 能进一步判定产碳青霉烯酶菌株的组别。其检测方法较改良的 Hodge 试验更简单、快速。结论 Carba NP 法操作快速、简单, 有助于提高产碳青霉烯酶菌株的检出率及医院内感染的控制。

关键词: 肠杆菌属; 假单胞菌属; 碳青霉烯酶

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)23-3105-02

A study of Carba NP method in rapid detection of carbapenemase-producing strains*

Yuan Min, Gong Lin, Chen Xia, Liu Jia, Yu Huilan, Xu Jianguo, Li Juan[△]

(Department of Bacteria Resistance, State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100026, China)

Abstract: **Objective** To explore the application of Carba NP method for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonads*. **Methods** Eight carbapenemase-producing strains were served as objects, Carba NP method was conduct to detect carbapenemase production and was compared with modified Hodge test. **Results** Carba NP method could detect carbapenemase-producing strains specifically and sensitively. Carba NP I could identified whether the strains were carbapenemase producers and Carba NP II could further discriminate the type of carbapenemase-producing strains. It was more easily and quickly. than modified Hodge test. **Conclusion** Carba NP method is rapid, simple and contribute to improve the detection rate of carbapenemase-producing strains and control the nosocomial infection.

Key words: Enterobacter; Pseudomonas; carbapenemase

菌株产生碳青霉烯酶, 通过碳青霉烯酶水解药物介导菌株耐药是细菌对碳青霉烯耐药的主要机制之一。碳青霉烯酶分 A、B、D 3 组, A 组为丝氨酸碳青霉烯酶, 这类酶的活性可以被克拉维酸和他唑巴坦抑制。B 组为金属 β -内酰胺酶, 金属离子螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)可以抑制其水解反应。D 组酶为苯唑西林酶家族, 其活性不被酶抑制剂和 EDTA 抑制^[1]。碳青霉烯酶的编码基因大多存在于细菌的质粒、整合子、转座子等可移动的基因元件上, 可以通过基因水平转移的方式在细菌之间传播, 这极大地加速了碳青霉烯耐药菌的产生和耐药传播。碳青霉烯酶的产生和跨种属、跨地域传播使临床治疗和感染控制面临严峻的挑战。提高碳青霉烯酶携带菌株的检测能力, 加强感染者或定植者的隔离防护, 对减少耐药菌感染、阻断其传播具有重要意义。目前检测菌株是否产碳青霉烯酶的方法主要有美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的改良 Hodge 试验以及专门针对 B 组碳青霉烯酶的亚胺培南-EDTA 双纸片协同试验和商品化的 Etest MBL 确认试条^[2]。然而, 随着耐药菌株所含耐药基因的组合方式日趋复杂, 上述方法的敏感性、特异性受到挑战, 传统检测产碳青霉烯酶菌株的方法亟待革新。Carba NP 法用于检测产碳青霉烯酶肠杆菌由法国南法医学院 Patrice Nordmann 教授研究团队于 2012 年 9 月首次报道^[3], 此后, 陆续优化和拓展该方法用于检测产碳青霉烯

酶假单胞菌及指示碳青霉烯酶类型的 Carba NP 试验 II^[4-5]。在肠杆菌属和假单胞菌属检测中, Carba NP 法的敏感性 & 特异性均为 100%。本研究结合国内肠杆菌科细菌和单胞菌属碳青霉烯酶的流行状况, 用相对廉价的亚胺培南/西司他丁钠、酚红等试剂探索降低 Carba NP 试验成本, 评价其灵敏性和重复性, 并与改良的 Hodge 试验比较。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与耗材 主要试剂: 亚胺培南西司他丁钠(杭州默沙东制药有限公司)、他唑巴坦(中国药品生物制品检定研究院)、0.5 mol/L EDTA(上海生工生物工程有限公司)、细菌总蛋白抽提试剂(Thermo 公司)、酚红(Amresco 公司)、硫酸锌七水合物(美国 sigma 公司)。主要耗材为 96 孔细胞培养板(美国 Corning 公司)。

1.2 检测液成分 检测液 A: 每毫升 0.5% 酚红溶液(pH 7.0~7.8)中含有终浓度为 8 mg/mL 的亚胺培南/西司他丁钠, 0.1 mmol/L ZnSO₄。检测液 B: 每毫升 0.5% 酚红溶液(pH 7.0~7.8)中含有终浓度为 8 mg/mL 的亚胺培南/西司他丁钠, 0.1 mmol/L ZnSO₄ 和 4 mg/mL 他唑巴坦。检测液 C: 每毫升 0.5% 酚红溶液(pH 7.0~7.8)中含有终浓度为 8 mg/mL 的亚胺培南/西司他丁钠和 0.003 mol/L EDTA。

1.3 Carba NP 法 Carba NP 法直接采用细菌细胞裂解后的

* 基金项目: 传染病预防控制国家重点实验室面上项目(2012SKLID2005)。 作者简介: 袁敏(1984~), 女, 助理研究员, 主要从事细菌耐药机制研究。 [△] 通讯作者, E-mail: lijuan@icdc.cn。

蛋白抽提液(酶粗提物)与亚胺培南进行反应,碳青霉烯酶能水解碳青霉烯类药物,使其开环,开环的同时伴随 H⁺ 的产生,当 H⁺ 累计到一定浓度,可使检测液中的酸碱指示剂(酚红)变色,用肉眼即可辨别此颜色变化,从而推测菌株是否产碳青霉烯酶。Carba NP 试验分 Carba NP 试验 I 和 Carba NP 试验 II,Carba NP 试验 I 结果可判断菌株是否产碳青霉烯酶,Carba NP 试验 II 根据不同组别酶抑制剂的不同,在 Carba NP 试验 I 的基础上增设 2 个检测孔,以进一步判定产碳青霉烯酶菌株的组别。本研究所用受试菌株见表 1。

表 1 受试菌株种属及其携带的碳青霉烯酶			
菌株编号	种属	碳青霉烯酶	
		A 组	B 组
1	肺炎克雷伯菌	—	NDM-1
2	大肠埃希菌	—	NDM-1
3	阴沟肠杆菌	KPC-2	—
4	奇异变形杆菌	—	NDM-1
5	肺炎克雷伯菌	—	IMP-4
6	恶臭假单胞菌	—	IMP-25
7	恶臭假单胞菌	—	VIM-2
8	肺炎克雷伯菌	KPC-2	IMP-4
9	大肠埃希菌 ATCC25922	—	—

—:不携带该类型的碳青霉烯酶。

1.3.1 Carba NP 试验 I 操作步骤 用 10 μL 接种环从 37 ℃ 培养 18~22 h 的培养基上直接刮取约 1 个接种环细菌的量,混悬于 100 μL 细菌蛋白抽提液中,涡旋震荡器上剧烈振荡 1 min 后,室温静置 20~30 min,15 000 r/m 离心 5 min,取上清液 40 μL 加入 100 μL 检测液,并用移液器吹打混匀,置于 37 ℃ 孵箱,每 0.5 h 观察记录颜色变化至孵育 1 h 结束。Caba NP 试验 II 刮取的菌量和蛋白抽提液用量增加 1 倍,其余同 Carba NP 试验 I。

1.3.2 改良 Hodge 试验法 制备大肠杆菌 ATCC25922 0.5 麦氏浓度的悬浊液,用肉汤以 1:10 的比例进行稀释,用无菌棉棒蘸取稀释液,均匀涂布于 MH 琼脂平板,待平板干燥 3~10 min 后,在平板中央放置美罗培南药敏纸片。用棉棒蘸取 3~5 个过夜培养的受试菌株的克隆,以药敏纸片为边缘、为起点,划出一定宽度的直线,长度至少为 20~25 mm。置于 37 ℃ 孵育 16~20 h。孵育后如果在受试菌株划线边缘与大肠杆菌 ATCC25922 相交的区域能观察到增强后者的生长,即为阳性,即产碳青霉烯酶。反之为阴性。

2 结 果

2.1 Carba NP 试验结果 检测板在 37 ℃ 孵育 5 min~1 h,见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),Carba NP 试验 I 和试验 II 中,检测孔 A 为亚胺培南+硫酸锌检测孔,检测孔 B 为亚胺培南+硫酸锌+他唑巴坦检测孔,检测孔 C 为亚胺培南+EDTA 检测孔,检测孔 D 为不加药物阴性对照。Carba NP 试验 I:阴性对照不变色,检测孔在孵育一段时间后由红色变为黄色或橙黄色,即为阳性,可判定受试细菌产碳青霉烯酶。Carba NP 试验 II:(1)检测孔 A、C 变色,检测孔 B 不变色,即为碳青霉烯酶活性可以被 他唑巴坦抑制,即菌株可能产 A 组酶。(2)检测孔 A、B 变色,检测孔 C 不变色,即为碳青霉烯酶活性可以被 EDTA 抑制,即菌株可能产 B 组酶。(3)检测孔 A、B、C 均变色,即为碳青霉烯酶活性既不被他唑巴

坦,也不被 EDTA 抑制,即菌株可能产 D 组酶,或同时产 A 组酶和 B 组酶。(4)阴性对照变色试验结果不可信。Carba NP 试验 I 可有效检出肠杆菌属细菌中所含有的 A 组酶和 B 组酶。对假单菌属细菌所产的 B 组酶能有效的检出。Carba NP 试验 II 能很好区分菌株所产的酶属于 A 组还是 B 组,还是两者合产的情况。

2.2 改良 Hodge 试验与 Carba NP 试验的比较 改良 Hodge 试验能较好检出本试验所挑选的菌株,由附图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)可以看出菌株 8 为强阳性,阴性对照菌株 9 为阴性。菌株 4 为产 I 型新德里金属 β 内酰胺酶(NDM-1)变形杆菌,结果为弱阳性或者阴性。其余受试菌株均可判断为阳性。

3 讨 论

不同于以往各种表型检测方法,Carba NP 试验直接并且直观地反映细菌酶粗提物与碳青霉烯类药物亚胺培南是否能发生生化反应,能很好地区分碳青霉烯耐药菌株对碳青霉烯类药物的耐药是由于产酶机制介导,还是由于其他非产酶机制介导。如一些菌株对碳青霉烯类的耐药是由于外膜孔道蛋白通透性下降或缺失合并头孢菌素酶和(或)超广谱 β-内酰胺酶的过量表达。Carba NP 试验阳性则几乎可以确定菌株对碳青霉烯类药物的耐药有产酶机制的参与。

Carba NP 试验 I 可直观地确定菌株是否产酶,进一步 Carba NP 试验 II 可明确菌株产碳青霉烯酶的所属组别,而改良 Hodge 试验只能初步判断菌株是否产酶。近年来改良 Hodge 试验对于检测肠杆菌科中碳青霉烯酶的价值受到关注,研究表明,改良 Hodge 试验对于 A 组酶和 D 组酶敏感性较好,但对于 B 组酶,如 NDM-1 的敏感性仅为 50%^[6]。CLSI 已明确提出,除非用于感染控制和流行病学研究需要,对患者样本的初筛以及改良 Hodge 试验不再是必要的步骤。除此之外,改良 Hodge 试验仅针对肠杆菌科细菌的有效性数据,对于非发酵菌属,如假单胞菌属和不动杆菌属所产碳青霉烯酶的有效检测,尚缺乏数据支持。Carba NP 法检测碳青霉烯酶不局限在肠杆菌科细菌。

Carba NP 试验最大的优势在于分离到菌株后 1 h 内便可以判定菌株是否产酶,用药敏板测定药敏,以及用改良 Hodge 试验均需要额外 16~18 h 才能初步判断耐药性及产酶情况。而 Carba NP 实验快速方便,不需要昂贵试剂,且有很高的敏感性和特异性。适合在临床微生物学实验室、医院感染控制室及疾病预防控制系统各单位普及应用。

目前医院内感染专家一致认为控制医院内获得性耐药菌感染的首要措施是尽早发现耐药菌感染者或定植者,及时采取隔离防护措施,阻断耐药菌的感染和传播。对临床分离的肠杆菌科和假单胞菌属细菌,建议仅做 Carba NP 试验 I,如果阳性,尽早报告接诊医生和护理人员,该患者携带产碳青霉烯酶菌株,碳青霉烯类抗菌药物的治疗效果差,需要尽早隔离,同时,医护人员注意严格执行手卫生措施,减少产酶菌株的医院内播散机会。

参考文献

[1] Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective[J]. Int J Antimicrob Agents,2010,36 Suppl 3:S8-14.
[2] Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp[J]. (下转第 3109 页)

DENV-1 E 蛋白多抗效价为 1 : 25 600。

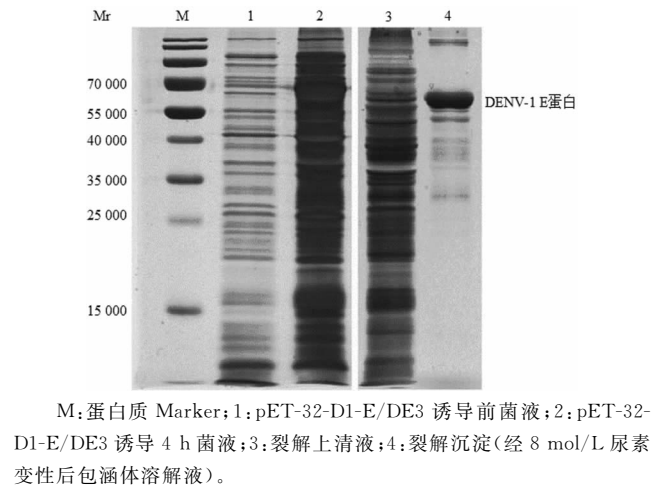


图 1 表达产物 DENV-1 E 的 SDS-PAGE 分析

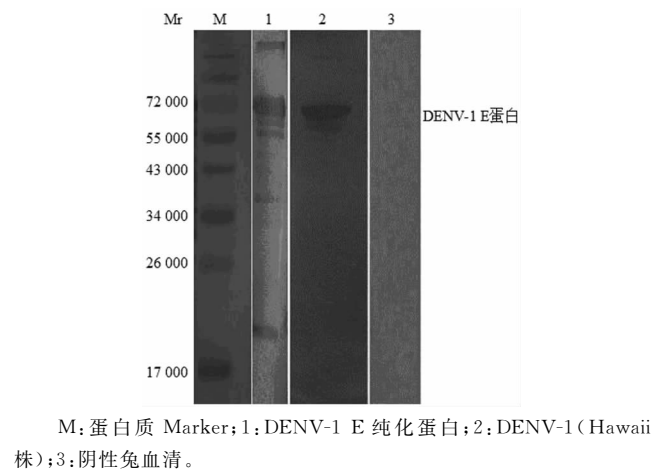


图 2 多克隆抗体的 Western blot 分析

3 讨 论

DENV-1 E 基因全长 1 200 bp(除去 3'末端跨膜区),所编码蛋白相对分子质量约 65 000。去除 C 端疏水区的 E 蛋白不仅能够提高目的蛋白在大肠杆菌中的表达量,而且能够增加目的蛋白的稳定性^[11]。

本实验以 DENV-1 ThD1_0008_81 株为模版设计引物,通过 PCR 获取 E 蛋白基因(去除 C 端疏水区),再克隆至 pGEM-T 载体,将测序正确的目的片段插入到 pET-32a(+)表达载体的多克隆位点,并以 *E. Coli Rosetta* (DE3)作为重组质粒表达的宿主菌,通过优化蛋白表达条件,发现目的蛋白即使在低温与低浓度 IPTG 诱导条件下仍易于形成包涵体。用尿素变性条件下纯化包涵体的方法纯化的目的蛋白免疫家兔,可刺激家兔产生特异性多克隆抗体,并且在第 3 次免疫后,经 ELISA 检

测抗体滴度可达到 1 : 25 600。利用 Western blot 试验结果证实,该抗血清能特异性地识别 DENV-1 E 蛋白,可以用于 DENV-1 病毒的快速检测。

综上所述,本实验成功表达和纯化了 DENV-1 E 蛋白,并制备了效价较高的特异性多克隆抗体,这不仅解决了登革疫苗研究中 DENV-1 E 蛋白抗体缺乏的问题,也为进一步研究 E 蛋白的功能及 DENV 感染的临床诊断试剂盒的研发奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 1(7): 2395-2400.
- [2] Kroeger A, Nathan M, Hombach J. Dengue[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(5): 360-361.
- [3] Jaiswal S, Khanna N, Swaminathan S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif, 2004, 33(1): 80-91.
- [4] Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(12): 6899-6901.
- [5] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein [J]. J Virol, 2005, 79(2): 1223-1231.
- [6] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(12): 6986-6991.
- [7] Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells[J]. J Virol, 2001, 75(16): 7769-7773.
- [8] Hermida L, Bernardo L, Martín J, et al. A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates[J]. Vaccine, 2006, 24(16): 3165-3171.
- [9] Chen Y, Maguire T, Hileman RE, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 866-871.
- [10] Pattnaik P, Babu JP, Verma SK, et al. Bacterially expressed and refolded envelope protein (domain III) of dengue virus type-4 binds heparan sulfate[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 846(1/2): 184-194.
- [11] Sugrue RJ, Cui T, Xu Q, et al. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [J]. J Virol Methods, 1997, 69(1/2): 159-169.

(收稿日期:2013-09-28)

(上接第 3106 页)

J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3798-3801.

- [3] Delphine G, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(9): 1503-1507.
- [4] Delphine G, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3773-3776.
- [5] Delphine G, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbap-

enemase types using a biochemical test in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* [J]. Antimicrobial Agents Chemother, 2012, 56(37): 6437-6440.

- [6] 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.

(收稿日期:2013-06-29)