

• 论 著 •

EDTA 纸片增效试验检测鲍曼不动杆菌金属 β -内酰胺酶*

何友华¹, 姚庆完²

(1. 昆山市中医医院检验科, 江苏昆山 215300; 2. 昆山市疾病预防控制中心, 江苏昆山 215301)

摘要:目的 探讨金属 β -内酰胺酶(MBL)检测方法, 为临床合理选择抗菌药物提供确切的依据。方法 收集 104 株耐亚胺培南鲍曼不动杆菌(CRAB), 以乙二胺四乙酸(EDTA)纸片增效法检测 MBL 表型, 并与聚合酶链反应(PCR)检测 MBL 基因结果进行比较。结果 应用 PCR 方法, 在 104 株受试菌中检出 MBL 基因阳性菌 21 株; EDTA 纸片增效法检测出 24 株阳性菌株, 对比 PCR 实验结果, 该方法的敏感度 95.2%, 特异度 95.1%。结论 EDTA 纸片增效法检测鲍曼不动杆菌的 MBL 方法简便、结果可靠、成本低廉, 适合于基层医院临床微生物学实验室对产 MBL 鲍曼不动杆菌的初步鉴定。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 金属 β -内酰胺酶; EDTA 纸片增效试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)05-0579-02

Study on EDTA disk potentiation test for detecting metallo- β -lactamase of *Acinetobacter baumannii**

He Youhua¹, Yao Qingwan²

(1. Department of Clinical Laboratory, Kunshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunshan, Jiangsu 215300, China; 2. Kunshan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Kunshan, Jiangsu 215301, China)

Abstract: **Objective** To research a method for detecting metallo- β -lactamase(MBL) to provide the basis for rationally selecting antibacterial drugs in clinic. **Methods** A total of 104 strains of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*(IRAB) were collected. The MBL phenotype was detected by using the EDTA disk potentiation test and the detection results were compared with the PCR detection results of MBL. **Results** Among 104 strains of tested IRAB, 21 strains were the MBL gene positive by using PCR; 24 strains were the MBL gene positive by using the EDTA disk potentiation test. Compared with the PCR detection results, the sensitivity of the EDTA disk potentiation test was 95.2% and the specificity was 95.1%. **Conclusion** The EDTA disk potentiation test for detecting MBL of *Acinetobacter baumannii* is simple, credible in the detection results and cheap in cost, which is suitable for the preliminary identification of the MBL-producing *Acinetobacter baumannii* in the clinical microbiology laboratory of the primary hospitals.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; metallo- β -lactamase; EDTA disk potentiation test

鲍曼不动杆菌是临床常见的条件致病菌之一。近年来随着碳青霉烯类药物的广泛使用, 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌(CRAB)的分离率逐年增高^[1-2], 产金属 β -内酰胺酶(MBL)是鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类抗菌药物主要的耐药机制之一。因此快速、准确地检测产 MBL 的鲍曼不动杆菌对于临床治疗和控制感染播散有重要的意义。目前 MBL 表型的检测方法国内外已有较多报道^[3-6], 本研究采用 EDTA 纸片增效法筛选产 MBL 的鲍曼不动杆菌, 并与聚合酶链反应(PCR)扩增 MBL 基因结果进行比较, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集 2010 年 1 月至 2012 年 12 月从昆山市中医院与昆山市第一人民医院两所三级医院门诊和住院患者中分离出的非重复、耐亚胺培南鲍曼不动杆菌 104 株, 采集的标本包括痰液、创面分泌物、血液、渗出液、支气管灌洗液等。质控菌株为铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。

1.2 仪器与试剂 Powerpac Basic 基础电泳仪及 GelDoc system 全自动凝胶成像系统为 Bio-Rad 产品, 亚胺培南纸片(10 μ g, IMP)购自英国 Oxoid 公司, MH(Mueller Hinton)培养基购自广州迪景微生物科技有限公司, 分析纯 EDTA 购自上海试剂总厂。

1.3 引物系列 根据参考文献[7]设计针对 IMP-1 及 VIM-1

的引物, 由上海生工合成, 金属酶 IMP-1 引物序列为 5'-TGA GCA AGT TAT CTG TAT TC-3'; 5'-TTA GTT GCT TGG TTT TGA TG-3'; 金属酶 VIM-1 引物序列为 5'-TTA TGG AGC AGC AAC CGA TGT-3'; 5'-CAA AAG TCC CGC TCC AAC GA-3'; SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物公司, 由上海生工生物公司进行核酸测序。

1.4 方法

1.4.1 金属酶基因的检测 模板采用煮沸法制备。PCR 反应体系 25 μ L, 包括上下游引物各 1 μ L, 2 $\times$ Taq PCR Master-Mix 12.5 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, Water, nuclease-free 8.5 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 2.0% 凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 并于凝胶成像系统上拍照。PCR 产物的纯化和测序: PCR 扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工生物公司)纯化, 由上海生工公司完成测序, 结果在 Genbank 数据库中进行序列比对分析。

1.4.2 金属酶表型筛选试验 EDTA-Na₂ 先配成 0.5 mol/L 的水溶液, 再以 NaOH 调 pH 值至 8.0, 高压灭菌后 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用, 临用前于室温放置大于 30 min。初筛试验时^[6], 先按照标准纸片扩散法药敏试验操作规程, 将待测菌株制成 0.5 麦氏

* 基金项目: 昆山市 2012 年社会发展科技计划项目(KS1242)。

作者简介: 何友华, 女, 主管检验师, 主要从事临床微生物研究。

单位菌液均匀涂布于 90 mm M-H 琼脂平板上,在平板上放置 2 片 IPM 纸片,2 个纸片相距 30~40 mm 然后在其中 1 片 IPM 上加入 4 μ L EDTA 溶液(750 μ g),35 $^{\circ}$ C 孵育 18~24 h 观察结果。

1.5 判断标准 加了 EDTA 的 IPM 纸片产生的抑菌圈比单纯的 IPM 纸片产生的抑菌圈直径大于或等于 7 mm 为产金属酶株^[5]。

2 结 果

2.1 金属酶基因型检测 应用 PCR 法,在 104 株对碳青霉烯类抗菌药物耐药的鲍曼不动杆菌中检出 IMP-1 型金属酶阳性株 21 株,且各 PCR 产物电泳条带位置皆完全一致,未检出 VIM-1 型金属酶阳性株。随机选择部分 IMP-1 阳性株经标准产物纯化后送上海生工公司完成测序,测序结果与 blaIMP-1 基因序列完全一致,从而证实为 IMP-1 型金属酶。部分电泳图见图 1。



M:DNA 标记物;1、2、5、6、7、10、11、13:扩增出 740 bp 的产物。

图 1 IMP 型碳青霉烯酶电泳图

2.2 EDTA 纸片增效法 从临床分离的 104 株待测菌中,EDTA 纸片增效试验阳性 24 株,加 EDTA 后抑菌圈直径比不加 EDTA $\geq$ 7 mm,提示有可能产生金属酶见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 表型初筛试验的结果与 PCR 结果的比较 应用 PCR 方法,在 104 株受试菌中检出 MBL 基因阳性菌 21 株;EDTA 纸片增效法检测出 24 株阳性菌株,其中有 4 株 PCR 结果为阴性。对比 PCR 实验结果,该方法的敏感度为 95.2%,特异度为 95.1%,提示本法与 PCR 法有较好的相关性。

3 讨 论

MBL 是一类需要金属离子协助才能发挥催化活性的一类广谱 β -内酰胺酶,具有广泛水解包括碳青霉烯类在内的 β -内酰胺类抗菌药物的能力,而且对常用的 β -内酰胺酶抑制剂如克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦敏感度差。产 MBL 的鲍曼不动杆菌能水解包括第三、第四代头孢菌素类及碳青霉烯类抗菌药物,比非产酶碳青霉烯耐药菌株多重耐药情况更加严重,对临床抗感染治疗构成严重的威胁^[8]。因此,亟须一种简单而准确地检测产 MBL 菌株的方法。

目前国内外利用 PCR 技术检测 MBL 被认为是最为准确的方法^[9]。可产生 MBL 的基因有多种,PCR 法通常一种引物只能检测到一种产 MBL 的基因,导致该技术检测的 MBL 比较单一,且其步骤繁琐、价格昂贵,不适合在临床微生物实验室用作常规检验。EDTA 纸片增效法是利用金属离子螯合剂 EDTA 可去除锌离子以灭活酶的活性,导致试验中出现抑菌环扩大的现象来检测 MBL,据国内文献^[10-11]报道 EDTA 纸片增效法检测 MBL 的准确率较高,均在 90%以上。

本研究根据参考文献^[6,12]选择 EDTA 实验浓度为 750

μ g/4 μ L,从 104 株待测菌种筛选出 MBL 表型阳性菌共 24 株(阳性率为 23.0%)。该 24 株菌株经 PCR 法证实其中 20 株 MBL 基因阳性,且均为 IMP-1 型 MBL。MBL 阳性的菌株抑菌圈直径扩大 7~12 mm(平均 8.38 mm),MBL 阴性的菌株抑菌圈直径则扩大 1~6 mm(平均 4.25 mm)。

本研究结果提示本法与 PCR 法有较好的相关性,敏感度为 95.2%,特异度为 95.1%;4 株 PCR 法阴性而 EDTA 纸片增效法检测阳性,可能是由于 PCR 法通常一种引物只能检测到一种产 MBL 的基因,而可产生 MBL 的基因有多种;分析 1 株 PCR 法检测 MBL 基因阳性而 EDTA 纸片增效法阴性的菌,可能与菌株虽然携带有基因但其所产生酶的量相对较少有关。

总之,本研究认为 EDTA 纸片增效法操作简便、敏感度高,对检测鲍曼不动杆菌中产 MBL 的菌株具有较好的特异度。可作为 MBL 的初筛方法在临床微生物室日常工作中开展。

参考文献

[1] 张辉,张小江,徐英春,等. 2011 年中国 CHINET 不动杆菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 342-248.

[2] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5): 321-330.

[3] Franklin C, Liolios L, Peleg AY, et al. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(9): 3139-3144.

[4] Lee K, Lim YS, Yong D, et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamases-producing isolates of Pseudomonas spp and Acinetobacter spp[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4623-4629.

[5] 胡燕燕,周宏伟,孙谦,等. 四种碳青霉烯类抗生素筛选金属酶方法的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(10): 905-909.

[6] Yong D, Lee K, Yum JH, et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas spp and Acinetobacter spp[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3798-3801.

[7] Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp[J]. Int J Antimicrob Agents, 2006, 27(5): 351-353.

[8] 汤荣睿,龚雅利,张晓兵,等. 碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌耐药性分析及金属 β -内酰胺酶检测[J]. 重庆医学, 2011, 40(21): 2094-2098.

[9] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg infect Dis, 2011, 17(10): 1791.

[10] 顾剑,彭少华,李从荣. 获得性金属 β -内酰胺酶初筛方法的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(6): 603-606.

[11] 严育忠,范惠清,郑文龙,等. 改良亚胺培南-EDTA 纸片增效试验检测铜绿假单胞菌产金属酶表型[J]. 检验医学, 2014, 20(1): 65-68.

[12] 路秀文,沙丹,张淑萍,等. 病原菌金属 β -内酰胺酶筛查方法的比较[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(9): 1323-1325.

(收稿日期:2014-10-28)