

• 论 著 •

应用改良 Hodge 试验检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的研究^{*}解春宝¹, 罗江蓉², 传良敏¹, 肖代雯¹, 喻 华¹, 杨永长¹, 姜 伟¹, 黄文芳^{1△}

(四川省医学科学院/四川省人民医院:1. 检验科;2. 急诊科, 成都 610072)

摘要:目的 应用改良 Hodge 试验(MHT)检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的应用价值。方法 应用 MHT 检测对碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的 24 株肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的情况。同时利用聚合酶链反应(PCR)检测碳青霉烯酶的基因,包括 KPC、NDM、IMP、SIM 和 VIM,PCR 阳性的产物测序结果与 Gen Bank 数据库进行比对。综合分析 MHT 和 PCR 检测碳青霉烯酶的效率。结果 对碳青霉烯酶抗菌药物敏感性降低的 24 株肠杆菌科细菌应用 MHT 检测碳青霉烯酶的阳性菌株共为 13 株,而 PCR 检测出碳青霉烯酶基因的只有 5 株。且 PCR 产物测序结果经比对后证实 1 株为 KPC-2 和 4 株为 IMP-4。对比分析 MHT 和 PCR 的检测结果可知有 4 株肠杆菌科细菌的 MHT 和 PCR 同时检测出碳青霉烯酶;有 9 株肠杆菌科细菌的 MHT 为阳性,但 PCR 没检测出碳青霉烯酶的基因;有 1 株肠杆菌科细菌 MHT 为阴性,但 PCR 检测出碳青霉烯酶的基因。结论 MHT 作为筛查碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的准确性值得继续探讨。

关键词:肠杆菌科; 碳青霉烯酶; 改良 Hodge 试验; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.15.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)15-2034-03

Research on screening carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by modified Hodge test^{*}XIE Chunbao¹, LUO Jiangrong², CHUAN Liangmin¹, XIAO Daiwen¹, YU Hua¹,YANG Yongchang¹, JIANG Wei¹, HUANG Wenfang^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Emergency, Sichuan Academy of Medical Science/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: **Objective** To discuss the application value of modified Hodge test(MHT) for screening carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Methods** The 24 Enterobacteriaceae reduced susceptibility to carbapenems were detected by MHT. At the same time, polymerase chain reaction(PCR) was used to detect carbapenemase genes of KPC, NDM, IMP, SIM and VIM. PCR products were sequenced and the results were compared with the sequences of Gen Bank database. Comprehensive analysis the application value of MHT and PCR to detect carbapenemase. **Results** Among these 24 strains, 13 stains appeared to produce carbapenemase by MHT, 5 positive strains were found to carry carbapenemase genes by PCR. By comparing with the sequences of Gen Bank database 1 strain were confirmed to KPC-2 and 4 strains were confirmed to IMP-4. We found that 4 strains of Enterobacteriaceae, detected carbapenemase by MHT and PCR at the same time. 9 strains of MHT were positive, but we couldn't detect the carbapenemase genes. 1 strain of MHT was negative, but carbapenemase gene was found in the strain. **Conclusion** The value of MHT to screen carbapenemase-producing Enterobacteriaceae is necessary to further study.

Key words: Enterobacteriaceae; carbapenemase; modified Hodge test; polymerase chain reaction

碳青霉烯类抗菌药物是治疗革兰阴性菌,尤其是肠杆菌科细菌感染最强效的一类 β -内酰胺类药物。肠杆菌科细菌能产生碳青霉烯酶,将碳青霉烯类抗菌药物水解,使该类药物的治疗效果降低或消失。因此,快速而准确地检测出碳青霉烯酶显得非常重要。目前检测碳青霉烯酶的方法较多,改良 Hodge 试验(MHT)就是其中一种。本研究旨在评价 MHT 检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的准确性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集四川省人民医院对碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的肠杆菌科细菌共 24 株,其中肺炎克雷伯菌 11 株、阴沟肠杆菌 7 株、黏质沙雷菌 2 株、产气肠杆菌 2 株、奇异

变形杆菌 1 株、大肠埃希菌 1 株。入选标准:亚胺培南、美罗培南中介或耐药;剔除同一患者的重复菌株。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2-Compact 全自动微生物分析仪 VITEK-2、VITEK-2 配套的药敏实验复合板、比浊仪均购自法国生物梅里埃公司;离心机 Microfuge 18 Centrifuge 购自美国 Beckman Coulter 公司;PCR 扩增仪、电泳仪均购自美国 Bio-Rad 公司;CO₂ 恒温培养箱购自法国 Heraeus 公司;生物安全柜购自博迅公司;美罗培南纸片、空白纸片均购自英国 Oxoid 公司;麦康凯琼脂平板、水解酪蛋白(M-H)琼脂平板均购自安图绿科公司;GoldView™ 核酸染料购自赛百盛公司;2×Tap PCR Master Mix、DNA 标记物 II 购自康为世纪公司;引物由上

^{*} 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ470);四川省医学科学院/四川省人民医院青年基金项目(2015QN03)。

作者简介:解春宝,男,主管技师,主要从事细菌耐药机制的研究。 △ 通信作者, E-mail: huangwf2002@21cn.com。

海英骏生物技术公司合成。

1.3 细菌鉴定 将符合初筛条件的菌株转种于麦康凯平板上培养过夜,以便获得单个菌落。将所获菌株均用 VITEK 2-Compact 全自动分析仪鉴定到种。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922,该菌由本实验室保存。

1.4 MHT 配制 0.5 麦氏浊度的大肠埃希菌 ATCC25922 菌液,用无菌生理盐水按 1:10 稀释后均匀涂抹在药敏实验道的平板上,待菌液干燥 3~5 min。在平板的正中央贴上美罗培南纸片,每片 10 μg,用接种环挑取平板上过夜培养的 3~5 株阴性质控菌或待检菌,自纸片外侧向平板外侧划线,划线长度为 20~25 mm,经 35℃ 培养 16~20 h 后判读结果。标准菌株大肠埃希菌 ATCC25922 与待检菌株抑菌环的交汇处大肠埃希菌生长增强,并呈矢状为该待检菌碳青霉烯酶阳性,否则为阴性。阳性质控菌为产 KPC-2 型碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌(本试验组经扩增及测序比对证实后为携带 KPC-2 基因),阴性质控菌为肺炎克雷伯菌 ATCC700603。

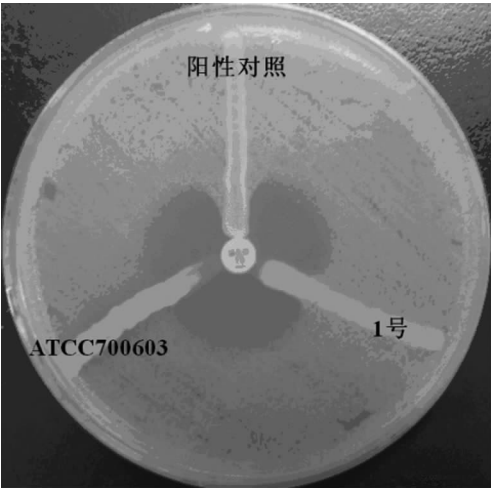
1.5 PCR 检测碳青霉烯酶 DNA 提取:将过夜培养的细菌悬浊于 200 μL dH₂O,沸水浴 10 min,然后 12 000 r/min 离心 5 min,上清就是 DNA 模板。采用 PCR 法检测的各基因引物序列、产物长度及退火温度等参考文献[1-2],见表 1。PCR 体系(20 μL):10 μL 2×Taq PCR Master Mix,正、反向引物各 1 μL,2 μL DNA 模板,6 μL dH₂O。PCR 条件:首先 94℃ 预变性 3 min;其次 94℃ 变性 1 min,Tm℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,30 个循环周期;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增的产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪检测并照相。基因扩增阳性的产物送到公司测序,测得序列与 Gen Bank 数据库序列进行比对分析。

表 1 PCR 引物序列及目的产物长度

基因	引物序列(5'→3')	产物长度	退火温度
		(bp)	(℃)
KPC	P1:ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT	893	64
	P2:TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC		
NDM-1A	P1:CAG CAC ACT TCC TAT CTC	292	55
	P2:CCG CAA CCA TCC CCT CTT		
NDM-1B	P1:GGC GGA ATG GCT CAT CAC GA	286	60
	P2:CGC AAC ACA GCC TGA CTT TC		
IMP	P1:TGA GCA AGT TAT CTG TAT TC	740	55
	P2:TTA GTT GCT TGG TTT TGA TG		
SIM	P1:TAC AAG GGA TTC GGC ATC G	571	58
	P2:TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG		
VIM	P1:TTA TGG AGC AGC AAC CGA TGT	920	55
	P2:CAA AAG TCC CGC TCC AAC GA		

2 结 果

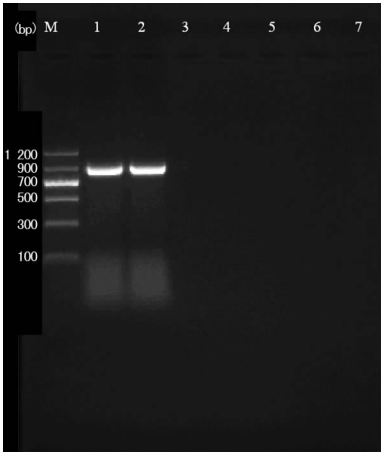
2.1 MHT 结果 24 株菌中改良 MHT 阴性 11 株、阳性 13 株,阳性率为 54.2%。阳性菌株分别为肺炎克雷伯菌 6 株、阴沟肠杆菌 5 株、产气肠杆菌 1 株、大肠埃希菌 1 株。1 号菌的检测结果见图 1。



注:阳性对照为阳性;阴性对照(ATCC700603)为阴性;1号菌为阳性。

图 1 1 号菌的 MHT 结果

2.2 PCR 检测碳青霉烯酶基因及序列分析 采用 PCR 检测所有试验菌株的碳青霉烯酶基因 KPC、NDM、IMP、SIM、VIM。检测出基因的阳性率为 20.8%(5/24),其中有 1 株 KPC-2 为阳性,该菌是肺炎克雷伯菌;有 4 株 IMP-4 是阳性,分别是阴沟肠杆菌(1/4)和肺炎克雷伯菌(3/4),与 MHT 法检测出的阳性菌株不完全一致。4 株肠杆菌科细菌 MHT 为阳性,同时 PCR 也检测出碳青霉烯酶基因;有 9 株肠杆菌科细菌 MHT 为阳性,但 PCR 没检测出碳青霉烯酶基因;有 1 株肠杆菌科细菌 MHT 为阴性,但 PCR 检测出碳青霉烯酶基因,这株细菌为肺炎克雷伯菌。见图 2。



注:M 为 DNA 标记物;1 为 KPC-2 阳性对照;2 为 24 号;3~7 分别为 23 号、22 号、21 号、20 号和 19 号菌株。

图 2 KPC 基因 PCR 扩增结果

3 讨 论

肠杆菌科细菌是革兰阴性杆菌或者球杆菌,广泛分布在环境中。该类细菌作为社区获得性感染和医院内感染的重要病原菌,可以引起呼吸道、尿道等各部位的感染[3]。碳青霉烯类抗菌药物是治疗肠杆菌科细菌感染效果较好的一类抗菌药物。碳青霉烯类抗菌药物是以亚胺培南、美罗培南和厄他培南为代表的一组具有特定分子结构的β-内酰胺类抗菌药物,杀菌活性优于头孢菌素类抗菌药物,碳青霉烯类(下转第 2039 页)

234.

[4] Brady MT, Milam JD, Anderson DC, et al. Use of deglyc-
erolized red blood cells to prevent posttransfusion infec-
tion with cytomegalovirus in neonates[J]. J Infect Dis,
1984, 150(3):334-339.

[5] Bowden RA, Slichter SJ, Sayers MH, et al. Use of leuko-
cyte-depleted platelets and cytomegalovirus-sero-negative
red blood cells for prevention of primary cytome-galovirus
infection after marrow transplant[J]. Blood, 1991, 78(1):
246-250.

[6] Bowden RA, Slichter SJ, Sayers MH, et al. A comparison
of filtered leukocyte reduced and cytomegalovirus(CMV)
seronegative blood products for the prevention of transfu-
sion associated CMV infection after marrow transplant
[J]. Blood, 1995, 86(9):3598-3606.

[7] Nichols WG, Price TH, Gooley T, et al. Transfusion-
transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leu-
koreduced blood products[J]. Blood, 2003, 101(10):
4195-4200.

[8] Luthardt T, Siebert H, Losel I, et al. Cytomegalovirus in-
fections in infants with blood exchange transfusions after
birth[J]. Klin Wochenschr, 1971, 49(2):81-86.

[9] Kumar A, Nankervis GA, Cooper RA, et al. Acquisition of
cytomegalovirus infection in infants following exchange
transfusion; A prospective study[J]. Transfusion, 1980,
20(3):327-331.

[10] Yeager AS, Grumet FC, Haffleigh EB, et al. Prevention of
transfusion-acquired cytomegalovirus infections in new-
born infants[J]. J Pediatr, 1981, 98(2):281-287.

[11] Preiksaitis JK, Rosno S, Grumet C, et al. Infections due to
herpes viruses in cardiac transplant recipients; Role of the
donor heart and immunosuppressive therapy[J]. J Infect
Dis, 1983, 147(6):974-981.

[12] Bowden RA, Sayers M, Flournoy N, et al. Cytomegalovir-
us immune globulin and seronegative blood products to
prevent primary cytomegalovirus infection after marrow
transplantation[J]. N Engl J Med, 1986, 314(16):1006-
1010.

[13] Preiksaitis JK, Desai S, Vaudry W, et al. Transfusion and
community-acquired cytomegalovirus infection in children
with malignant disease; A prospective study[J]. Transfu-
sion, 1997, 37(9):941-946.

[14] 毕昊, 余谨, 王志辉, 等. 一种定量 PCR 试剂盒通过血液
诊断 HCMV 感染效能的 Meta 分析[J]. 中国输血杂志,
2015, 28(8):1040-1043.

(收稿日期:2017-02-18 修回日期:2017-04-18)

(上接第 2035 页)

抗菌药物是治疗产 ESBLs 和 AmpC 菌株的强效抗菌药物^[1]。但近年来,由于该类抗菌药物的大量、不科学使用加速了临床上肠杆菌科耐药菌株的产生,其耐药的主要机制之一就是产碳青霉烯酶。因此快速而准确地检测出碳青霉烯酶显得非常重要。

目前检测碳青霉烯酶的方法较多,MHT 就是其中一种。有文献报道 MHT 对产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的检测具有很高的敏感度、特异度和准确性,MHT 是检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌准确而且简便的方法^[4]。但是近年来,MHT 受到很多研究者的质疑。目前国内外把 PCR 作为检测产碳青霉烯酶的金标准。但细菌可产生碳青霉烯酶的基因有多种,通常 PCR 法一种引物只能检测对应的一种基因,导致 PCR 检测碳青霉烯酶比较单一,且 PCR 步骤较复杂,价格昂贵,不适合作为临床实验室的常规检测技术^[5-6]。

本研究就是对比 MHT 和 PCR 的结果,分析 MHT 作为筛查肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的效率。研究发现对碳青霉烯酶抗菌药物敏感性降低的 24 株肠杆菌科细菌应用 MHT 检测碳青霉烯酶的阳性菌株共为 13 株,而 PCR 检测出碳青霉烯酶基因的只有 5 株。且 PCR 产物测序结果经比对后证实 1 株为 KPC-2 和 4 株为 IMP-4。对比分析 MHT 和 PCR 的检测结果可知有 4 株肠杆菌科细菌的 MHT 和 PCR 同时检测出碳青霉烯酶;有 9 株肠杆菌科细菌的 MHT 为阳性,但 PCR 没检测出碳青霉烯酶的基因;有 1 株肠杆菌科细菌 MHT 为阴性但

PCR 检测出碳青霉烯酶的基因。这说明 MHT 也会产生假阳性结果^[6]。可见 MHT 作为筛查碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的准确性值得继续探讨。

参考文献

[1] 解春宝,喻华,肖代雯,等.一株对 3 种碳青霉烯类抗菌药物均耐药的肺炎克雷伯菌耐药机制研究[J]. 检验医学, 2014, 29(4):369-374.

[2] 解春宝,喻华,肖代雯,等.应用 EDTA 协同法检测肠杆菌科细菌产金属 β -内酰胺酶放的研究[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(3):445-448.

[3] 解春宝,黄文芳.肠杆菌科细菌产金属 β -内酰胺酶的研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2013, 25(4):491-495.

[4] 张成宪,金凤玲.改良 Hodge 试验检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的诊断价值的系统评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(22):2710-2711.

[5] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbap-
enemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect
Dis, 2011, 17(10):1791-1798.

[6] 姚慧琳.改良 Hodge 试验检测 KPC 型碳青霉烯酶的临床
应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24):5318-5320.

(收稿日期:2017-02-06 修回日期:2017-04-06)