

· 论 著 ·

一种检测 KPC 和 NDM 耐药基因的双重 PCR-LF 方法建立及初步应用*

王 洁^{1,2}, 裴 兵¹, 孙 宁², 王卫萍², 王 颖², 李晓军^{2△}

1. 南京医科大学附属宿迁第一人民医院中心实验室, 江苏宿迁 223800; 2. 东部战区总医院临床中心实验科, 江苏南京 210002

摘要:目的 建立一种双重聚合酶链反应-侧流层析(PCR-LF)方法快速检测肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)和新德里金属 β -内酰胺酶(NDM)两种耐药基因。方法 根据 KPC 和 NDM 的基因保守区, 分别设计并合成了特异性引物, 建立双重 PCR 和 LF 技术相结合的检测体系, 通过优化扩增和 LF 检测体系, 将建立起的方法初步应用于临床标本检测。结果 双重 PCR-LF 可用于 KPC 和 NDM 两种碳青霉烯酶基因的检测, 检测下限均为 200 CFU/mL。以药敏表型检测为参考方法, 利用双重 PCR-LF 直接检测 120 份临床无菌体液标本, 两种方法结果差异无统计学意义($P > 0.05$), Kappa 值为 0.644, 表明一致性较好。结论 双重 PCR-LF 方法用于 KPC 和 NDM 两种耐药基因检测快速有效, 对于指导临床用药与监控院内细菌碳青霉烯类抗菌药物耐药性的传播具有重要意义。

关键词: 双重聚合酶链反应; 侧流层析; 碳青霉烯酶基因; 耐药表型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.24.020 **中图法分类号:** R446.9

文章编号: 1673-4130(2021)24-3032-04 **文献标志码:** A

Establishment and preliminary application of a duplex PCR combined with lateral flow assay for detecting drug resistance genes KPC and NDM*

WANG Jie^{1,2}, PEI Bing¹, SUN Ning², WANG Weiping², WANG Ying², LI Xiaojun^{2△}

1. Central Research Laboratory, the Affiliated Suqian First People's Hospital of Nanjing Medical University, Suqian, Jiangsu 223800, China; 2. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

Abstract: Objective To establish a duplex polymerase chain reaction combined with lateral flow (PCR-LF) assay for detecting of drug resistance gene *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (NDM). **Methods** The specific primers were designed on the basis of conserved regions of KPC and NDM. The duplex PCR combined with lateral flow assay was built by optimized the reaction conditions. Clinical samples were tested by the duplex PCR-LF to evaluated the performance of this assay. **Results** The duplex PCR-LF assay was successful for the detection of two carbapenemase genes, with limits of detection of 200 CFU/mL for KPC and NDM. There was no significant difference between the results of duplex PCR-LF (genotype) and the results from antimicrobial susceptibility testing (phenotype) in the detection of 120 clinical sterile body fluid samples ($P > 0.05$), and the Kappa value of the consistency test was 0.644, indicating a good consistency between the two methods. **Conclusion** The duplex PCR-LF could be used for rapid and effective detection of the drug-resistance genes KPC and NDM, and which is of great significance for guiding clinical drug and monitoring the spreading of carbapenems-resistant bacteria in the hospital.

Key words: duplex polymerase chain reaction; lateral flow; carbapenemase gene; drug resistance phenotype

随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛应用,耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)逐年增多^[1],给感染的治疗带来了极大的挑战^[2]。在 CRE 的耐药机制中,最主

要是产碳青霉烯酶,其中肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)和新德里金属 β -内酰胺酶(NDM)是目前研究最多也最为常见的碳青霉烯酶。目前,采用常规实验

* 基金项目:江苏省宿迁市临床医学检验实验室重点实验室项目(M201902);江苏省宿迁市市级指导性科技计划项目(Z2019141)。

作者简介:王洁,女,主管技师,主要从事临床微生物检验及基因诊断研究。△ 通信作者,E-mail:18105240883@163.com。

本文引用格式:王洁,裴兵,孙宁,等.一种检测 KPC 和 NDM 耐药基因的双重 PCR-LF 方法建立及初步应用[J].国际检验医学杂志,2021,42(24):3032-3035.

室的药敏试验方法指导临床用药,存在着培养时间过长的缺点,严重影响了临床治疗时效性。为了适应临床治疗对快速检测的需求,低成本、快速的侧流层析(LF)技术得到进一步发展^[3]。本研究将双重聚合酶链反应(PCR)技术和 LF 技术有机结合,建立双重 PCR-LF 方法检测 2 种重要碳青霉烯酶基因(KPC 和 NDM),实现在一个反应体系中快速、特异地检测 2 个靶标基因,并将该方法直接用于临床无菌体液标本的检测,为早期指导临床用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 携带 KPC、NDM 肺炎克雷伯菌,产 KPC-2 的碳青霉烯类抗菌药物耐药标准肺炎克雷伯菌菌株 ATCCBAA-1705,携带 blaIMP 的铜绿假单胞菌,携带 blaVIM 的恶臭假单胞菌,携带 blaNDM-1 的肺炎克雷伯菌均由东部战区总医院中心实验科微生物室保存。

1.2 仪器与试剂 Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye); PCR 分析试剂盒(Takara 公司)和 DL2000 DNA 标记物(Takara 公司);TIANamp Blood DNA 检测试剂盒(天根生物科技有限公司);核酸染料 GelRed(美国 Biotium 公司)。PCR 扩增仪(美国 BioRad 公司)、电泳仪(美国 BioRad 公司);凝胶电泳成像分析系统(上海欧翔科学仪器有限公司);高速离心机(Eppendorf5417R);VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统(法国生物梅里埃公司);微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 将细菌接种于 MH 琼脂平板上,分区划线培养,挑取单个菌落,将其悬浮于 100 μ L 灭菌去离子水,100 $^{\circ}$ C 10 min,12 000 \times g 离心 5 min,转移上清液至-20 $^{\circ}$ C 保存备用。无菌体液标本 DNA 按照试剂盒说明书进行提取。

1.3.2 引物 根据 GenBank 已发表的序列^[4-6],设计 KPC、NDM 引物。引物序列由上海 Invotrigen 公司合成。

1.3.3 双重 PCR 扩增体系(25.0 μ L):Premix Ex Tap Hot Start Version 12.5 μ L,2 种耐药基因(KPC、

NDM)的正向和反向引物(10 μ mol/L)各加 0.5 μ L 至同一反应体系,1.0 μ L DNA 模板,加 ddH₂O 补足至 25.0 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 40 s,55~60 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共计 35 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,10 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。取产物经琼脂糖凝胶电泳后,进行测序验证。

1.3.4 双重 PCR 方法学评价 将携带 KPC、NDM 的肺炎克雷伯菌,按照上述 1.3.1 步骤进行 DNA 提取后,检测其水平,进行 10 倍梯度稀释,按照建立的双重 PCR 反应体系进行检测。

1.3.5 LF 试纸的制备与性能测试 以半抗原地高辛、荧光素与相应抗体的免疫反应为基础,制备 LF 试纸。在双重 PCR 检测 KPC 和 NDM 的研究基础上,将上述 KPC 和 NDM 引物进行标记(KPC 上下游引物分别标记生物素和地高辛;NDM 上下游引物分别标记生物素和荧光素),扩增带有双标记的 DNA 产物,电泳后回收产物,利用 NanoDrop-1000 检测其水平;而后进行 LF 试纸的性能测试,以 1 ng 的双标记 DNA 产物为测试模板,首先分析不同抗体水平的检测效果,两条检测线:T1 为抗地高辛抗体,T2 为抗荧光素抗体,质控线 C 为生物素化的牛血清清蛋白(B-BSA)。

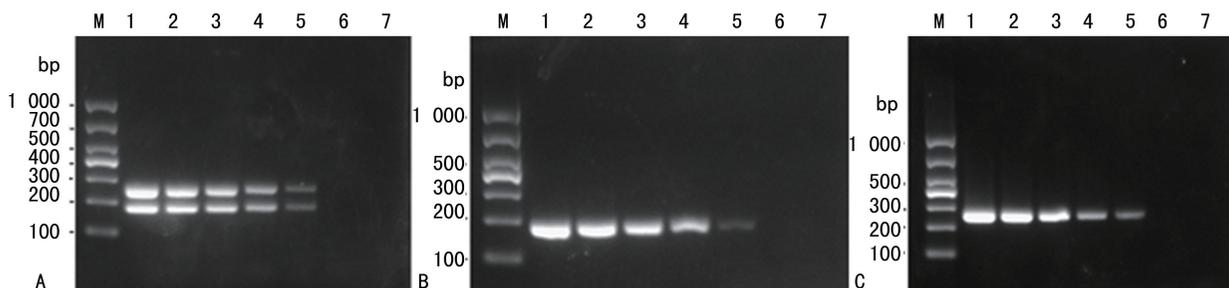
1.3.6 双重 PCR-LF 检测 KPC 和 NDM 采用双重 PCR-LF 检测标准菌株和临床分离菌株中的 KPC 和 NDM 基因。取双重/单重 PCR 产物 5 μ L 点样在层析试纸条上,5~10 min 后进行结果判读。

1.3.7 应用双重 PCR-LF 检测临床标本 收集临床微生物送检无菌体液标本 120 份(包括脑脊液、穿刺液、关节液、引流液等),进行 DNA 提取。按照上述建立起来的反应体系,进行双重 PCR-LF 检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析。将双重 PCR-LF 的检测结果与耐药表型结果进行配对比较,采用 McNemar 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双重 PCR 检测 KPC 和 NDM 方法学评价 双重 PCR 检测 KPC 和 NDM 的检测限为 200 CFU/mL,与常规单重 PCR 检测结果一致,见图 1。



注:A 为双重 PCR 结果;B 为常规 PCR 扩增 KPC;C 为常规 PCR 扩增 NDM;M 为 DL1000 DNA 标记物;7~1 为梯度稀释的产 KPC 和 NDM 的肺炎克雷伯菌($2 \sim 2 \times 10^5$ CFU/mL)。

图 1 琼脂糖凝胶电泳分析结果

2.2 LF 试纸的性能测试 LF 试纸的性能测试结果表明,抗地高辛抗体、抗荧光素抗体和 B-BSA 的点样水平分别为 250、50、50 ng 时效果最佳,见图 2。

2.3 双重 PCR-LF 检测 KPC 和 NDM 方法学评

价 双重 PCR-LF 检测 KPC 和 NDM,最低可检测到 200 CFU/mL 的肺炎克雷伯菌,并且与其他超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)基因没有交叉反应,见图 3。

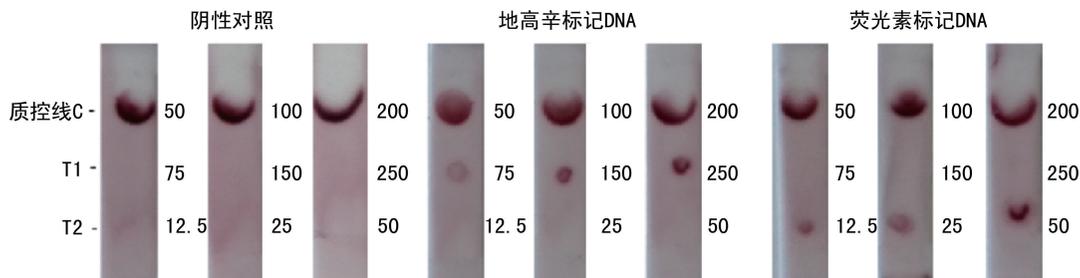
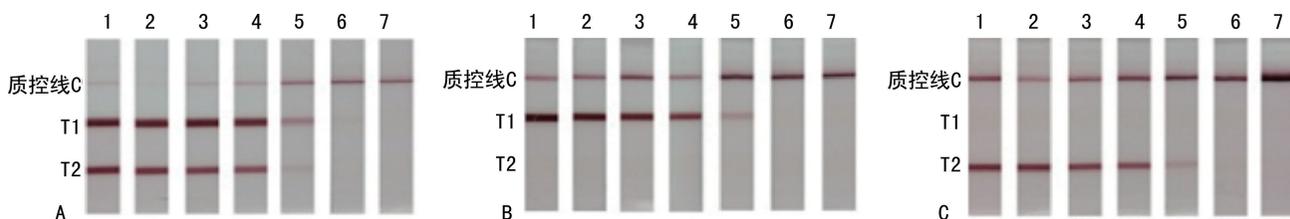


图 2 不同抗体水平对检测双标记 DNA 的影响



注:7~1 为梯度稀释的产 KPC 和 NDM 的肺炎克雷伯菌($2\sim 2\times 10^6$ CFU/mL);A 为双重 PCR-LF 检测结果;B 为单重 PCR-LF 检测 KPC 的结果;C 为单重 PCR-LF 检测 DNM 的结果。

图 3 双重和单重 PCR-LF 检测 KPC 和 NDM

2.4 双重 PCR-LF 与药敏表型检测结果比较 以药敏表型为参考方法,双重 PCR-LF 检测的灵敏度为 69.39%,特异度为 92.96%,Kappa 值为 0.644,两种方法结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 双重 PCR-LF 与药敏表型检测结果比较(n)

多重 PCR-LF	药敏表型检测		
	耐药	敏感	合计
+	34	5	39
-	15	66	81
合计	49	71	120

3 讨 论

据 2017 年全国细菌耐药监测报告显示,在临床常见细菌感染中,大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物(对亚胺培南、美罗培南或厄他培南任意一种药物耐药)的耐药率分别为 1.5%、9.0%、20.7%和 56.1%。就江苏省而言,碳青霉烯类抗菌药物耐药率高于全国平均水平,这一现象对当地居民的健康和感染控制造成了严重威胁^[7-10]。因此,迫切需要建立一种快速、准确的碳青霉烯酶基因检测方法,指导临床用药,缩短 TAT 时间,避免抗菌药物的滥用,预防产碳青霉烯酶细菌暴发性感染。

常规微生物实验室多采用药敏表型检测的方法指导抗菌药物使用,需要进行细菌分离培养,整个检

测流程时间较长,且易产生假阴性^[11],易延误治疗。多重 PCR 可一次扩增多种耐药基因,提高检测效率同时降低检测成本,减轻患者负担^[5]。然而多重 PCR 仍存在一定不足,例如:常规的多重 PCR 技术需采用电泳或测序进行产物分析,实时荧光 PCR 技术需要配有荧光检测通道的 PCR 仪器,存在着操作烦琐、易污染等问题,且需要严格的操作流程和实验环境要求。

本研究将双重 PCR 检测方法和 LF 技术相结合。LF 技术主要分为两类,一类是以碱基互补配对原则为反应基础的核酸 LF 技术(NALFT);另一类是以免疫反应为基础的 LF 技术(NALFIA),即在双链 DNA 上标记半抗原或生物素,而后利用生物素-亲和素反应或半抗原-抗体的免疫反应,以胶体金或量子点等作为标记物,进行核酸检测,实现快速、准确、可视化的检测需求。

本研究建立的双重 PCR-LF 方法直接用于无菌体液标本的检测,结果显示,LF 试纸能够快速有效检测到耐药基因 KPC 和 NDM,与药敏表型检测结果的 Kappa 值为 0.644,一致性较好,且灵敏度达 69.39%,特异度达 92.96%,可为临床用药提供依据。但是本研究发现,部分无菌体液标本的药敏表型为耐药表型,但双重 PCR-LF 方法检测结果为阴性。分析原因:一是细菌的耐药方式并不仅局限于产碳青霉烯酶^[12];二是本研究建立的方法不能包含全部的碳青霉烯酶基因。但是随着细菌耐药机制研究的不断深入,

发现 KPC 和 NDM 是较为常见和分布较广的碳青霉烯酶^[2,13-14]。因此,从一定程度上讲,多重 PCR-LF 可以满足临床检测碳青霉烯酶基因的需求。

综上所述,本研究建立的双重 PCR-LF 方法检测时间约为 3 h,且灵敏度、特异度均达到较高水平,实现了碳青霉烯酶基因的快速检测,可在临床药敏结果出来之前,指导临床用药,避免抗菌药物的滥用。同时,该检测方法也为今后在一个反应体系纳入 3 种及以上的耐药基因检测方法提供了思路与基础。

参考文献

- [1] 郭玲,王美玲,叶丽艳,等.某院 2017—2018 年耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌检测及分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(7):807-811.
- [2] BONOMO R A, BURDE M, CONL Y J, et al. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(8): 1290-1297.
- [3] HU J, WANG S Q, WANG L, et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 54(15): 585-597.
- [4] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Micr DIs, 2011, 70(1): 119-123.
- [5] NORDMANN P, NASS T, POIREL L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.
- [6] 顾芸芸,孙宁,姚新月,等.双重 PCR 快速检测 KPC 和 NDM 耐药基因[J].医学研究生学报,2018,31(11):1153-1157.
- [7] LIU C P, LU H P, LUOR T. Clonal relationship and the

association of the ST218 strain harboring blaOXA-72 gene to mortality in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2019, 52(2): 297-303.

- [8] HATRONGITR, KERDSIN A, AKEDA Y, et al. Detection of plasmid-mediated colistin-resistant and carbapenem-resistant genes by multiplex PCR [J]. Mary Ann Liebert Inc, 2018, 5: 114-117.
- [9] 崔秀格,吴忠伟,王珊珊,等.耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌的分布及耐药性分析[J].中国医药,2019,14(9):1410-1414.
- [10] WANG Z, QIN R R, HUANG L, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and mortality of *Klebsiella pneumoniae* infection [J]. Chin Med J (Engl), 2018, 131(1): 56-62.
- [11] 王颖,陈芳芳,黄梅,等. VITEK 2 Compact 专家系统对肠杆菌科碳青霉烯酶耐药表型分析的问题探讨[J].现代检验医学杂志,2017,32(4):101-103.
- [12] SUAY-GARCIA B, PEREZ-GRACIA M T. Present and future of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) infections[J]. Antibiotics (Basel), 2019, 8(3): 122.
- [13] LASKO M J, NICOLAU D P. Carbapenem-resistant Enterobacteria: considerations for treatment in the era of new antimicrobials and evolving enzymology[J]. Curr Infect Dis Rep, 2020, 22(3): 6.
- [14] 王俊,高凯杰,张玲,等.2015—2017 年某儿童医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌分布及耐药性分析[J].中国抗生素杂志,2019,44(7):860-863.

(收稿日期:2021-03-15 修回日期:2021-10-09)

(上接第 3031 页)

- [5] GRACH M, MASSALHA W, PUD D, et al. Can coadministration of oxycodone and morphine produce analgesic synergy in humans? An experimental cold pain study [J]. Bri J Clin Pharmacol, 2004, 58(3): 235-242.
- [6] 祝丽,龙晓宏,尚宇.盐酸羟考酮复合丙泊酚靶控输注用于老年患者内窥镜逆行胰胆管造影术的麻醉效果观察[J].中国现代医学杂志,2016,26(18):118-122.
- [7] 熊俊成,朱程芬,李剑,等.羟考酮在门诊无痛宫腔镜术中的应用[J].临床麻醉学杂志,2015,31(6):607-608.
- [8] 李运,秦美满,方波.右美托咪定联合盐酸羟考酮对胃肠手术老年患者麻醉苏醒期的影响[J].中国新药杂志,2016,25(8):69-73.
- [9] KAPLAN R, PARRIS W C, CITRON M L, et al. Comparison of controlled-release and immediate-release oxycodone tablets in patients with cancer pain [J]. J Clin Oncol, 1998, 16(10): 3230-3237.
- [10] 申颖,罗芳,孟岚.芬太尼或氢酚羟考酮辅助丙泊酚静脉全麻用于老年患者无痛结肠镜检查的效果比较[J].中国

新药杂志,2009,18(14):1324-1327.

- [11] 卜敏,恽惠芳,陆燕丰.盐酸羟考酮或吗啡 PCIA 联合超声引导下 TAP 阻滞在胃肠肿瘤根治术后镇痛效果评价[J].重庆医学,2018,47(10):111-113.
- [12] 曹锴,狄建彬,魏文祥,等. miRNA 在结肠癌早期诊断和筛选中的作用[J].世界华人消化杂志,2009,17(35):50-54.
- [13] 杨宇帆,潘波,李思源,等.七氟烷麻醉大鼠海马组织特异 microRNA 的差异表达及靶标预测[J].中国医药导报,2013,10(36):30-33.
- [14] 黄天丰,高巨,罗科,等.右美托咪定对大鼠内毒素性急性肺损伤时 miR-155-HIF-1 α -HO-1 信号通路的影响[J].中华麻醉学杂志,2016,36(2):214-218.
- [15] 许鑫,彭勉,孙玲玲,等.术后认知功能障碍小鼠海马微小 RNA 表达的变化及生物信息学分析[J].中华麻醉学杂志,2016,36(3):289-294.

(收稿日期:2021-03-19 修回日期:2021-09-22)