

DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2022.01.011

## • 技术与方法 •

# 胶体金免疫层析法在碳青霉烯酶快速分型中的临床应用

萨磊, 马立艳

近年来,随着人口老龄化、抗菌药物的广泛使用、侵入性操作技术的发展等,多重耐药细菌的检出率呈明显上升趋势<sup>[1]</sup>。碳青霉烯类抗菌药物是治疗多重耐药肠杆菌目细菌的主要药物,但是在抗生素选择压力下,2019 年全国三级医院耐碳青霉烯肠杆菌目细菌(carbapenem-resistant *Enterobacterales*, CRE)的分离率已达到 10%~30%,使临床治疗选药困难重重,患者死亡率明显上升<sup>[2]</sup>。产生 A 类丝氨酸酶(KPC)、B 类金属酶(VIM、IMP、NDM)或 D 类 OXA-48 型碳青霉烯酶是肠杆菌目细菌对碳青霉烯类药物最常见的耐药机制,而酶型的不同直接影响临床的抗感染用药、患者的疗效和预后<sup>[3]</sup>。根据 CLSI M100 S30 文件,临床实验室检测碳青霉烯酶型主要采用改良碳青霉烯酶灭活试验(mCIM)和 EDTA 介导的碳青霉烯酶灭活试验(eCIM)联合检测方法,但该方法需要对分纯菌株过夜孵育,仅可区分 A 类丝氨酸酶和 B 类金属酶。实验室条件允许时,也可采用分子生物学方法,但 PCR 检测需要配备专门的实验仪器,工作人员需要获得检测资质,单个检测成本较高,并未在临床实验室得到常规开展。因此,在临床治疗选药和感控工作的迫切需求下,可同时快速进行碳青霉烯酶(KPC、OXA-48、VIM、IMP、NDM)分型的胶体金免疫层析法得以研发<sup>[4]</sup>。

本研究选取对碳青霉烯类药物耐药(CRE)和敏感的肠杆菌目细菌(carbapenem-susceptible *Enterobacterales*, CSE),以 PCR 耐药基因分型和测序为金标准,采用胶体金免疫层析法检测碳青霉烯酶型,评估其在临床中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2020 年 3 月-9 月首都医科大学附属北京友谊医院微生物室分离保存的对亚胺培南、厄他培南或美罗培南耐药的肠杆菌目细菌,仅保留同一患者同一部位分离的第一株细菌。A 类丝氨酸酶阳性对照菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705, B 类金属酶阳性对照菌株和 D 类 OXA-48 型阳性对照菌株为本室保存菌株,经测序证实。阴性对照菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 和 30 株碳青霉烯类敏感肠杆菌目细菌。

1.1.2 主要仪器和试剂 VITEK-MS 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪、基质液 CHCA、VITEK 2-Compact 全自动微生物分析系统、VITEK 2 药敏卡均为法国生物梅

里埃公司产品;哥伦比亚血琼脂培养基和 MH 琼脂培养基购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司;亚胺培南、美罗培南和厄他培南 E-test 条购自安图生物工程股份有限公司;碳青霉烯酶检测试剂盒和胶体金免疫层析法购自长沙中生众捷生物技术有限公司;DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR Master Mix 试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;ABI7500 PCR 仪购自美国应用生物公司。

1.1.3 碳青霉烯酶基因引物序列<sup>[5]</sup> 包括 A 类丝氨酸酶 KPC, B 类金属酶 NDM、VIM 和 IMP, D 类酶 OXA-48, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体引物序列见表 1。

表 1 碳青霉烯酶基因引物序列及片段长度

目的基因	引物序列	长度(bp)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621
	R: CGGAATGGCTCATCACGATC	
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798
	R: CTTGTCACTCTTGTAGGCG	
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	F: GATGGTGTTTGGTCGCATA	390
	R: CGAATGCGCAGCACCAG	
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
	R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232
	R: GGTTTAAYAAAAACAACCACC	

### 1.2 方法

1.2.1 菌种复苏确认 将冻存的菌株进行复苏,35℃ 孵育得到单个纯菌落, MALDI-TOF MS 鉴定确认。应用 VITEK 2-Compact 全自动微生物分析系统、MH 琼脂培养基和亚胺培南、美罗培南和厄他培南 E-test 条对 CRE 和 CSE 菌株进行确认。

1.2.2 胶体金免疫层析法检测酶型 于试剂盒提供的 EP 管中加入 5 滴约 150 μl 提取缓冲液,使用 1 μl 接种环取一环样本置于缓冲液中涡旋振荡混匀 5~8 s,使用一次性移液管吸取混合液于试剂卡上“S”孔位滴入 5 滴(约 100 μl),15 min 读取结果。

基金项目:首都卫生发展科研专项重点攻关项目(2018-1-4081)

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院临床检验中心

通信作者:马立艳, Email: happy\_mayan@ccmu.edu.cn

收稿日期:2021-06-10



究中所采用的胶体金免疫层析试剂盒与 NG-Test Carba 5<sup>[11]</sup>有所不同,原料来自于法国,检测原理相同,但是在国内生产,制造成本有所降低。与 Xpert Carba-R 相比,胶体金免疫层析方法检测的是碳青霉烯酶,并非碳青霉烯酶基因,操作更为简便,检测时间更短,而且不需要购置昂贵的仪器,每个测试的检测成本也更低。本研究中,胶体金免疫层析法对 KPC、NDM、VIM、IMP 和 OXA-48 的检测敏感性和特异性都达到了 100%,完全能够满足临床治疗选药需求。不足之处就是对于少见酶型,如 GES、IMI 和 GIM 尚不能进行检测。

综上,胶体金免疫层析法在 15 min 内即可区分 3 类 5 型碳青霉烯酶,操作简单易行,有助于临床选择有效的治疗方案,降低治疗成本,提高 CRE 感染患者的生存率并改善预后,减少耐药株在医疗机构内的水平传播。

#### 参考文献

- [1] Dickstein Y, Edelman R, Dror T, et al. Carbapenem resistant Enterobacteriaceae colonization and infection in critically ill patients: a retrospective matched cohort comparison with non carriers. J Hosp Infect, 2016, 94(1):54-59.
- [2] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across tertiary hospitals in 2019. Chin J Infect Chemother, 2020, 20(3):233-243. (in Chinese)  
胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(3):233-243.
- [3] Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4):682-707.
- [4] Zhou M, Wang D, Kudinha T, et al. Comparative evaluation of four phenotypic methods for detection of class A and B carbapenemase producing Enterobacteriaceae in China. J Clin Microbiol, 2018, 56(8):e00395-18.
- [5] Han R, Shi Q, Wu S, et al. Dissemination of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated from adult and children patients in China. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:314.
- [6] Zhang R, Liu L, Zhou H, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China. EBioMedicine, 2017, 19:98-106.
- [7] Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2321-2333.
- [8] Tsai YM, Wang S, Chiu HC, et al. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. BMC Microbiol, 2020, 20(1):315.
- [9] Li S, Zhang Y, Wen W, et al. A high-sensitivity thermal analysis immunochromatographic sensor based on a nanoparticle-enhanced two-dimensional black phosphorus photothermal-sensing materials. Biosens Bioelectron, 2019, 133:223-229.
- [10] Shah KG, Yager P. Wavelengths and lifetimes of paper autofluorescence: A simple substrate screening process to enhance the sensitivity of fluorescence-based assays in paper. Anal Chem, 2017, 89(22):12023-12029.
- [11] Jenkins S, Ledebor NA, Westblade LF, et al. Evaluation of NG-test carba 5 for rapid phenotypic detection and differentiation of five common carbapenemase families: Results of a multicenter clinical evaluation. J Clin Microbiol, 2020, 58(7):e00344-20.

#### • 更正 •

### 关于《链霉菌 *Streptomyces* sp. CPCC 204095 产生原黄醇酮 C 的固态发酵及制备》一文的更正

本刊 2021 年 8 月第 16 卷第 4 期刘晓岩等的《链霉菌 *Streptomyces* sp. CPCC 204095 产生原黄醇酮 C 的固态发酵及制备》一文,基金项目应为“国家重点研发计划(2018YFA0902000);国家自然科学基金(81903530);国家微生物资源基础平台(NIMR-2018-3)”,特此更正。