

mCIM 法与 PAE-MHT 法检测铜绿假单胞菌 产金属 β -内酰胺酶的性能评价

谢国艳,蔡枫,梁斌,裴凌燕,冯琪(上海中医药大学附属市中医医院检验科,上海 200071)

摘要:目的 评估改良的碳青霉烯类灭活法(mCIM)和铜绿假单胞菌改良 Hodge 试验(PAE-MHT)法对铜绿假单胞菌(PAE)产金属 β -内酰胺酶(MBLs)的表型筛选能力。方法 收集176株耐碳青霉烯类 PAE,PCR 检测 IMP 和 VIM 基因,采用 mCIM 法和 PAE-MHT 法检测产 MBLs 菌株,其中 mCIM 法分别选择亚胺培南(IMP)和美罗培南(MEM)作为药物底物进行筛选能力的研究,对几种方法与 PCR 检测结果的一致性进行统计分析。结果 以 IMP 为底物 mCIM 法和以 MEM 为底物 mCIM 法检测 MBLs 的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.01, P>0.05$)。以 IMP 为底物 mCIM 法、以 MEM 为底物 mCIM 法和 PAE-MHT 法的准确度分别为 94.9%、96.6% 和 94.3%;敏感度分别为 90.5%、100% 和 85.7%;特异度分别为 95.5%、96.1% 和 95.5%。三者准确度、敏感度和特异度之间两两相比,差异均无统计学意义($\chi^2=0.01\sim 2.99$,均 $P>0.05$)。三种方法与 PCR 法均具有良好的一致性。结论 PAE-MHT 法经济、操作简便,结果易于判读。以 MEM 为底物的 mCIM 法具有高敏感度与高特异度,更适合于检测 PAE 的 MBLs。

关键词:改良碳青霉烯类失活法;铜绿假单胞菌;金属 β -内酰胺酶;评估

中图分类号:R378.991;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2020)01-057-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.015

Evaluation of Modified Carbapenem Inactivation Method and *Pseudomonas Aeruginosa*-Modified Hodge Test for Detection of Metallo-Lactamase-Producing *Pseudomonas Aeruginosa*

XIE Guo-yan, CAI Feng, LIANG Bing, PEI Ling-yan, FENG Qi

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China)

Abstract: Objective To evaluate the screening capacity of modified carbapenem inactivation method(mCIM) and *Pseudomonas aeruginosa*-Modified Hodge(PAE-MHT) test for detection of metallo- β -lactamase-producing(MBLs) in PAE. **Methods** 176 carbapenem-resistant PAE clinical isolates were detected to MBLs by mCIM and PAE-MHT test, respectively. Meanwhile, IMP genes and VIM genes were detected by PCR. The examination results were analyzed statistically. **Results** Comparing mCIM of imipenem-substrate methods to mCIM of meropenem-substrate method, the detection rates of MBLs were not statistically significant($\chi^2=0.01, P>0.05$). For mCIM of imipenem-substrate, mCIM of meropenem-substrate and PAE-MHT, the accuracy rate was 94.9%, 96.6% and 94.3%, respectively. The sensitivity was 90.5%, 100% and 85.7%, respectively. The specificity was 95.5%, 96.1% and 95.5%, respectively. Pairwise comparison of accuracy, sensitivity and specificity among the three groups showed no statistically significant difference ($\chi^2=0.001\sim 2.99$, all $P>0.05$). Three methods had a good consistency compared with PCR. **Conclusion** PAE-MHT test is a method of economical, practical and simple operation. The mCIM of meropenem-substrate is high sensitivity and good specificity for detecting MBLs-producing PAE.

Keywords: mCIM; *Pseudomonas aeruginosa*; metallo- β -lactamase; evaluation

铜绿假单胞菌(*pseudomonas aeruginosa*, PAE)是医院感染的重要条件致病菌,近年来随着碳青霉烯类药物的广泛使用,耐碳青霉烯类 PAE 逐年增多,感染患者的死亡率也在逐年上升^[1],对临床感染治疗

构成了严重威胁。产金属 β -内酰胺酶(metallo- β -lactamases, MBLs)是 PAE 对碳青霉烯类耐药的主要原因,其基因型以 IMP 和 VIM 为主^[2],及时检测产 MBLs 的 PAE 是非常必要的。目前 MBLs 的表型筛

作者简介:谢国艳(1974-)女,硕士,副主任医师,主要从事临床微生物学检测及耐药研究,E-mail:xieguoyan93@163.com。

通讯作者:蔡枫,主任技师,硕士,主要从事检验医学、临床免疫学方面的研究,E-mail:2984821930@qq.com。

选方法主要是美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的改良的碳青霉烯类失活法(modified carbapenem inactivation method, mCIM)^[3],此法可适用于耐碳青霉烯类的肠杆菌科及PAE菌株检测。而PAE改良Hodge试验(PAE-MHT)法是PASTERAN等^[4]针对改良Hodge试验(MHT)法只适合检测肠杆菌科细菌的碳青霉烯酶的局限性而进行的改进,从而使PAE-MHT法可以用于PAE的MBLs检测。国内有关mCIM法检测肠杆菌科报道颇多,但对PAE的研究甚少,本研究以PAE为研究对象,对mCIM法和PAE-MHT法筛选PAE产MBLs的能力进行评估,为流行病学研究及感染控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验菌株 选取2015年8月~2019年5月从上海市中医医院和上海市新华医院崇明分院的临床标本中分离的176株碳青霉烯类耐药的PAE株(112株耐IMP,36株耐MEM和28株同时耐药),均为非重复菌株。所有菌株均经VITEK2-compact全自动微生物鉴定仪进行鉴定和药敏试验,菌株以甘油肉汤-20℃保存备用。肺炎克雷伯菌ATCC700603、IPM-1型及VIM-2型PAE购自卫生部临床检验中心。大肠埃希菌ATCC25922购自上海市临检中心。

1.2 试剂与仪器 VITEK2-compact全自动微生物鉴定仪、MIC药敏试验为GN板(法国梅里埃公司);10 μl定量接种环(上海晶安公司);亚胺培南(IMP)(10 μg)、美罗培南(MEM)(10 μg)药敏纸片(OXOID公司);MH培养基、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)(上海伊华公司);7000型荧光定量PCR扩增仪(美国Applied Biosystems公司),凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司);引物和探针及测序由上海生工公司完成。

1.3 方 法

1.3.1 MBLs基因检测:煮沸法提取细菌DNA,扩增IMP,VIM基因,所需的引物序列和PCR反应条件及确认方法见文献^[5]。

1.3.2 不同底物的mCIM法试验^[3]:

1.3.2.1 方法:取10 μl接种环满环的新鲜培养待测菌落于2ml TSB肉汤中,振荡混匀,再将10 μg IMP, MEM纸片分别浸入菌悬液中,35℃大气环境温孵育4 h,孵育快结束时,配制0.5麦氏浊度的大肠埃希菌ATCC25922菌悬液,用无菌棉签均匀涂布在MH培养基上。用10 μl接种环取出培养后的药敏纸片并挤去多余菌液,贴至上述MH培养基上,35℃孵育18~24 h,测量抑菌圈的直径。

1.3.2.2 结果判读:碳青霉烯酶阳性:抑菌圈直径为6~15 mm或直径为16~18 mm但抑菌圈内有散在菌落;碳青霉烯酶阴性:抑菌圈直径≥19 mm且圈

内无散在菌落;若抑菌圈直径为16~18 mm或直径≥19 mm但圈内有散在菌落,无法判断是否存在碳青霉烯酶。

1.3.3 PAE-MHT法^[6]:将肺炎克雷伯菌ATCC700603调成0.5麦氏单位的菌悬液,再用生理盐水1:10稀释后均匀涂布MH平皿,室温放置10 min后,贴MEM(10 μg)纸片。挑取3~5个过夜生长的待测菌,从纸片边缘向外划直线,35℃培养16~20 h,观察指示菌有无出现向MEM纸片增强生长现象,若增强生长,即为MBLs阳性。

1.4 统计学分析 采用SPSS13.0统计软件,不同药物底物mCIM法检测MBLs采用McNemar检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。以PCR检测结果为金标准,计算几种方法的准确度、敏感度及特异度,并将几种方法与PCR检测结果进行Kappa一致性检验, $K > 0.75$ 表示好的一致性, $K < 0.4$ 表示一致性差。

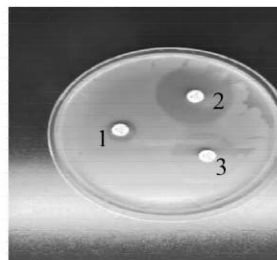
2 结 果

2.1 MBLs基因检测结果 见表1。PCR扩增176株耐碳青霉烯类PAE,共检出21株MBLs基因阳性株,产酶阳性率为11.9%,其中耐IMP株的产酶阳性率为7.4%(13/176),耐MEM株的产酶阳性率为1.1%(2/176),同时耐药的产酶株阳性率为3.4%(6/176)。

表1 PCR检测3种耐药表型的基因分布情况($n=176$)

耐药表型	株数	IPM型	VIM型
耐IMP	112	4	9
耐MEM	36	0	2
耐IMP+MEM	28	2	4

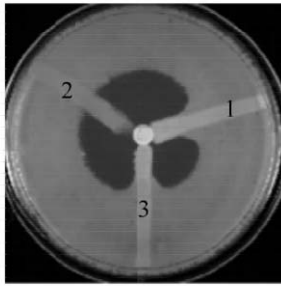
2.2 采用不同药物底物mCIM法检测MBLs结果 176株耐碳青霉烯类PAE,以IMP为底物筛选MBLs菌株,共检出19株阳性株(IPM型6株,VIM型13株),阳性率为10.8%;以MEM为底物筛选MBLs菌株,共检出21株阳性株(IPM型7株,VIM型14株),阳性率为11.9%。采用两种底物mCIM法检测MBLs的阳性检测率差异无统计学意义($\chi^2=0.01, P > 0.05$)。以MEM为底物mCIM法检测MBLs阳性株见图1。



注:1为阴性对照,2为阳性菌,3为结果无法判定

图1 mCIM法

2.3 PAE-MHT 法检测 MBLs 结果 176 株耐碳青霉烯类 PAE 测得 18 株菌株产 MBLs, 阳性率为 10.2%, 见图 2。



注:1,2 为阴、阳性对照;3 为阳性菌

图 2 PAE-MHT 法

2.4 方法学分析 见表 2。以 PCR 法结果为金标准, 比较三种方法的准确度、敏感度和特异度, 同时三种方法分别与 PCR 结果进行一致性检验, 均 $K > 0.75$ 。

表 2 不同方法检测 MBLs 的性能评价

方法	PCR		准确度 (%)	敏感度 (%)	特异度 (%)	Kappa 值
	+	-				
IMP 为底物 mCIM 法	+	19	94.9	90.5	95.5	0.780
	-	7				
MEM 为底物 mCIM 法	+	21	96.6	100	96.1	0.856
	-	6				
PAE-MHT 法	+	18	94.3	85.7	95.5	0.751
	-	7				

注:三者间在准确度之间的两两比较, χ^2 分别为 0.63, 0.06 和 1.05, 均 $P > 0.05$; 三者间在敏感度之间的两两比较, χ^2 分别为 0.16, 0.01 和 0.23, 均 $P > 0.05$; 三者间在特异度之间的两两比较, χ^2 分别为 2.00, 0.20 和 2.99, 均 $P > 0.05$ 。

3 讨论

PAE 在不发酵糖革兰阴性杆菌感染中仅次于不动杆菌属排第二位, 对碳青霉烯类抗生素的耐药情况越来越严峻^[7]。最新文献报道^[8], 头孢他啶-阿维巴坦、美罗培南/韦博巴坦等新药可有效抑制 A 类丝氨酸碳青霉烯酶, 但对 B 类 MBLs 无效, 因此治疗产 MBLs 的 PAE 菌株更为棘手。

CLSI 推荐 mCIM 法是以 MEM 为底物的检测方法, 闫玲等^[3]发现以 IMP 为底物检测肠杆菌科产碳青霉烯酶菌株的效果更好, 因此本研究也设计采用不同药物作底物的 mCIM 法来检测 PAE 产 MBLs 株, 以便寻找出检测 PAE 产 MBLs 最适合的底物。本研究以 PCR 法结果为金标准, 对两种底物的 mCIM 法和 PAE-MHT 法筛选 PAE 产 MBLs 的能力进行评估。研究发现, 不同底物的检测方法在阳性率方面的差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.01, P > 0.05$), 但对某些特

殊菌株的结果判断有所不同: 有 2 株菌株在以 MEM 为底物的 mCIM 法中能明确的判断为阳性 (抑菌圈直径 $< 15\text{mm}$), 而以 IMP 为底物的 mCIM 法的直径为 $16 \sim 18\text{mm}$ 无法判断是否产 MBLs, 通过 PCR 法确定为 MBLs 阳性, 推测其原因可能是菌株产 MBLs 量少, 水解 IMP 的能力弱于 MEM, 因此以 MEM 为底物的 mCIM 法敏感度最好, 更适合于 PAE 的 MBLs 检测。

将三种方法分别与 PCR 法进行 Kappa 一致性检验, MEM 为底物的 mCIM 法的 K 值为 0.856, IMP 为底物的 mCIM 法的 K 值为 0.780, PAE-MHT 法的 K 值为 0.751, 说明三者与 PCR 法均具有好的一致性。同时研究结果显示: 三者 in 准确度、敏感度和特异度之间两两相比, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。三种方法的准确度、特异度都非常好, 而在敏感度方面的比较, 以 MEM 为底物的 mCIM 法敏感度最好, 为 100%, 其次分别是 IMP 为底物的 mCIM 法 90.5%, PAE-MHT 法 85.7%。

PCR 法是目前检测 MBLs 最为准确、可靠的方法, 但某些医院在硬件设施方面达不到建造 PCR 实验室的要求, 因此 PCR 检测不能在临床全面开展。PAE-MHT 法通过改变指示菌, 用肺炎克雷伯菌 ATCC700603 代替大肠埃希菌 ATCC25922, 观察指示菌有无出现向 MEM 纸片增强生长现象来判定结果, 从而避免了 MHT 试验针对 PAE 出现无法判定结果的问题, 该方法经济、操作简便、易于判读, 对指示菌的菌液浓度要求不高, 适于在基层临床微生物实验室推广, 但敏感度低于 mCIM 法。mCIM 法检测肠杆菌科细菌和 PAE 是流行病学调查或感染控制为目的, mCIM 对各种各样的碳青霉烯酶保持较高的敏感度和特异度^[9], 操作简便, 但在试验中会受到某些因素的影响, 如待测菌的纯度、接种量的变化、大肠埃希菌菌液浓度高低及抑菌圈直径结果无法判断等问题, 故要求应严格按照操作规程进行试验, 以求得更可靠的结果。

MBLs 表型检测对于流行病学研究及感染控制工作有很重要的作用, 因此选择一种方便、实用的适合本实验室的 MBLs 表型筛选方法是非常必要的。

参考文献:

[1] 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, 29(1):65-68.
YAN Haizhong, FAN Huiqing, ZHENG Wenlong, et al. The phenotypic detection of metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa by modified imipenem-EDTA disk potentiation test [J]. Laboratory Medicine, 2014, 29(1):65-68.