**应用CarbAcineto NP方法快速检测产碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌**

**牛翠1，马芳1，张凯1，时东彦2**

摘要：目的 快速检测耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌产生的碳青霉烯酶。方法：连续收集121株鲍曼不动杆菌，应用全自动细菌鉴定仪进行菌株鉴定和药敏试验，CarbAcineto NP方法检测鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶，应用PCR方法检测OXA-23型碳青霉烯酶基因。结果：121株鲍曼不动杆菌中，69株对亚胺培南和美罗培南耐药，其中有66株携带OXA-23基因，61株菌CarbAcineto NP为阳性。对碳青霉烯类敏感的51株鲍曼不动杆菌中，49株菌OXA-23阴性， 50株菌CarbAcineto NP为阴性。1株对亚胺培南耐药，对美罗培南敏感，OXA-23为阳性，CarbAcineto NP为阴性。CarbAcineto NP方法的敏感性和特异性分别为86.9%和96.2%。结论 相比较PCR方法CarbAcineto NP方法操作简单，试剂成本低，易于在实验室开展，应用CarbAcineto NP方法可以快速检测鲍曼不动杆菌OXA-23型碳青霉烯酶。

关键词：鲍曼不动杆菌；碳青霉烯酶；OXA-23; CarbAcineto NP方法

**CarbAcineto NP Method for Rapid Detection Carbapenemase Producing in** ***Acinetobacter Baumannii***

**Abstract:** Objective To detect rapidly Carbapenemase Producing in *Acinetobacter Baumannii* Methods A total of 121 strains were used to evaluate the performance of test. Identification and susceptibility testing of 121 strains of *A.baumannii* was determinated by *VITEK* compact. CarbAcineto NP Method was applied to detect the Carbapenemase of the  *A.baumannii and* Detection of the gene of theCarbapenemaseby the common PCR method*..* **Results** There were 69 of 121 strains resistant to imipenem and meropenem . PCR showed that 66 of 69 were carrying OXA-23 gene. 61 of 69 strains was positive for CarbAcineto NP experiment. 51 of 121 in *A.baumannii* strains was susceptible to imipenem and meropenem. PCR showed that OXA - 23 gene was negative in 49 of 51 and CarbAcineto NP was negative in 50 of 51 non-carbapenemase-producing *A.baumannii* . Only 1 strain is susceptible to imipenem and resistant to meropenem, and negative for the CarbAcineto NPand the OXA-23 gene was positive . The sensitivity and the specificity of CarbAcineto NP was 86.9% and 96.2% , respectively. **Conclusion**  CarbAcineto NP was concordance with results obtained by PCR to detect gene coding for OXA-23. The CarbAcineto NP can detect rapidly Carbapenemase Producing in Acinetobacter Baumannii

 **Key words**: Acinetobacter Baumannii;carbapenemase; OXA-23 gene;CarbAcineto NP Method

作者：1，河北省邢台市第三医院检验科2河北医科大学第二医院检验科

第一作者：牛翠（1986-），女，主管检验技师，主要从事细菌耐药机制研究,联系电话：13722906212，通讯地址：河北省邢台市钢铁北路108号邢台市第三医院检验科

通讯作者：时东彦，shidongyan73@126.com

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)属于革兰氏阴性球杆菌，是医院内重要的机会致病菌，鲍曼不动杆菌被美国感染病协会划分为世界医院范围内六大最重要的多重耐药细菌之一。尤其在免疫力低下的患者中，可以引起严重的甚至致死性的感染，如败血症、呼吸机相关肺炎、泌尿系统感染、脑膜炎等。通常，碳青霉烯类药物做为治疗多重耐药的鲍曼不动杆菌的最后选择，但是由于这类药物的广泛和大量应用，导致对碳青霉烯类也产生了耐药。因此尽快检测耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌，可以及早为临床提供准确的耐药机制，为临床选择合适的抗生素，减少医疗消耗，减少耐药株的传播提供有效服务。

**1.材料和方法**

1.1材料

1.1.1菌株来源

 选择河北医科大学第二医院2015年5月- 6月和邢台市第三医院2014年1月-2015年6月从临床标本分离所得的非重复耐碳青霉烯类抗生素的鲍曼不动杆菌菌株共计121株，全部菌株均采用VITEK COMPACT全自动细菌鉴定药敏鉴定仪进行验证。菌株采用无菌纸片-20℃低温保存。 选取肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705碳青霉烯酶阳性对照质控菌株，肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706碳青霉烯酶阴性对照质控菌株，药敏质控菌株大肠埃希氏菌ATCC 25922。

1.1.2仪器

 VITEK2全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司产品)； GeneAmpPCRsystem 2400热循环仪（美国Applied Biosystems Inc.）；ID Scientific 自动凝胶成像系统（美国 Kodak Inc.）；Premix Taq酶(大连Takara公司)；DNA Marker DL2000(大连Takara公司)；琼脂糖（美国Hydra Gene公司）；Goldviw显影液（北京赛百盛生物技术公司）；电热恒温水浴锅（山西省文水医疗器械厂）；涡旋振荡器（[杭州雷琪实验器材有限公司](http://deer81.wjw.cn/%22%20%5Ct%20%22_blank)）。

1.1.3试剂

血琼脂平板(郑州安图生物工程股份有限公司；氯化钠（纯度≥99.5%）（天津市风船化学试剂科技有限公司）；精密试纸(PH6.4-8.0) （上海三爱思试剂有限公司）；苯酚红 （天津市永大化学试剂有限公司）；硫酸锌（ZnSO4• 7H2O含量≥99.5%）(天津市永大化学试剂有限公司)；亚胺培南西司他丁钠（杭州默沙东制药有限公司）

1.1.4 CarbAcineto NP试剂的配制：

0.1N NaOH 0.4g NaOH粉末加入100ml蒸馏水，混合，室温保存。

10mM ZnSO4 1.4gZnSO4 • 7H2O加入500ml蒸馏水，混合，室温保存。

0.5%酚红 1.25g酚红加入250ml蒸馏水，混合，室温保存。

5M NaCl 14.625g溶解于蒸馏水中，最后定容至50ml。

1.1.5 CarbAcineto NP检测液的配制

A液：准备25-50ml容器，加入2ml0.5%酚红溶液于16.6ml蒸馏水中，然后加入180μl 10mMZnSO4 溶液。用0.1N NaOH或者10%HCl调节PH值为7.8±0.1。4-8℃保存一个星期，避免长时间光照。

B液：检测液A中加入12mg/ml亚胺培南西司他丁钠。计算B液需要量，平均一株菌需要100μlB液。共配制15mlA液，加入180mg亚胺培南西司他丁备用。加完后不用再调PH值。4-8℃保存3天，一般现配现用。

1.2方法

1.2.1菌株鉴定和药敏试验

标本采集和分离严格按照《全国临床检验操作规程》第三版进行，获得纯培养后，经VITEK compact全自动细菌鉴定仪进行鉴定和药敏实验，按照2014年的美国微生物标准委员会CLSI的标准来判定鲍曼不动杆菌的耐药情况。

1.2.2菌株复苏

 从-20℃低温保存的菌株库找到相应菌株，确认无误后，用LB液体培养液进行振荡复苏，然后接种到血琼脂培养基上进行培养。

1.2.3 引物设计

引物: OXA-23-F 5’GATCGGATTGGAGAACCAGA OXA-23-R 5’ATTTCTGACCGCATTTCCAT。 目的片段501bp。由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2.4 DNA模板的制备

 采用煮沸法，挑取在血培养上孵育18-24h的数个菌落加入到有灭菌蒸馏水150μl的EP管中，煮沸10分钟后立即冷却于4℃，12000r/min离心5分钟，取上清作为PCR模板。

1.2.5 PCR扩增

 PCR反应条件，预变性 95℃ 2min, 循环参数：变性 95℃ 30s; 退火温度58℃ 30s; 延伸72℃ 1 min; 延伸72℃ 10min , 共循环30次 。电泳: 取6μlPCR产物用1.5%，含有Goldview染料的琼脂糖凝胶上电泳。然后再紫外成像仪上成像并记录结果。

1.2.6 CarbAcineto NP方法

准备1.5ml的EP管，分别标记上菌株编号，每株编号分别设置A,B两管。每管中加入100μl 5M NaCl。用10μl接种环挑取满环经过过夜培养的鲍曼不动杆菌分别加入到A,B两管100μl 5M NaCl溶液中，肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705碳青霉烯酶阳性对照质控菌株和肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706碳青霉烯酶阴性对照质控菌株也分别加入到A,B两管100μl 5M NaCl溶液中，盖上盖子，涡旋振荡混匀。在标记的A，B管中，分别对应加入100μl A，B检测液，盖上盖子，振荡混匀。放入35℃温箱中2个小时后观察结果。

1.2.7结果解释

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 管a：溶液A（作为内质控） | 管b:溶液B | 结果解释 |
| 红色或红-橙色 | 红色或红-橙色 | 阴性，非碳青霉烯酶产生株 |
| 红色或红-橙色 | 浅橙色，深黄色或黄色 | 阳性，碳青霉烯酶产生株 |
| 红色或红-橙色 | 橙色 | 无效 |
| 橙色，浅橙色，深黄色或黄色 | 任何颜色 | 无效 |

2. 结 果

2.1 细菌耐药情况

121株鲍曼不动杆菌中69株对亚胺培南和美罗培南都耐药，51株对亚胺培南和美罗培南都敏感。只有1株对亚胺培南耐药，对美罗培南敏感。

2.2 PCR检测OXA-23结果分析

121株鲍曼不动杆菌中，69株PCR显示携带OXA-23基因。见图1，其中对亚胺培南耐药的70株鲍曼不动杆菌中，有67株携带OXA-23基因，OXA-23基因携带率为95.7%。51株鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南都敏感，其中2株菌携带OXA-23基因，见表1



Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of OXA-23 Genes．

P：Positive Control；N：Negative Control．

M：Marker (100、250、500、750、1000、2000bp)

2.3 CarbAcineto NP检测结果分析

 121株鲍曼不动杆菌中62株CarbAcineto NP方法检测结果阳性，见图2 。69株对亚胺培南和美罗培南耐药，61株菌CarbAcineto NP为阳性。52株鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南都敏感，50株菌CarbAcineto NP为阴性。1株对亚胺培南耐药，对美罗培南敏感，CarbAcineto NP为阴性。见表1

Fig.2 Part of the results of CarbAcineto NP.

 1705：阳性对照 1706：阴性对照

**表1 CarbAcineto NP和OXA-23的结果和耐药性分析**

**Table1 Resistant comparison with CarbAcineto NP and OXA-23**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 鲍曼不动杆菌 | MIC (mg/L) | CarbAcineto NP | OXA-23 |
| 亚胺培南 | 美罗培南 |
| 48株 | ≤1 | ≤1 | - | - |
| 60株 | 8或≥16 | ≥16 | + | + |
| 1株 | ≤1 | ≤1 | + | - |
| 1株 | ≥16 | 2 | - | + |
| 6株 | ≥16 | ≥16 | - | + |
| 1株 | ≥16 | ≥16 | + | - |
| 2株 | ≤1 | ≤1 | - | + |
| 2株 | ≥16 | ≥16 | - | - |

2.4 CarbAcineto NP和OXA-23的结果比对

 以OXA-23为标准，CarbAcineto NP阳性检测能力为60/69，阳性预测值为86.9%，阴性检测能力为50/52，阴性预测值为96.2%，结果见表2。

**表2 CarbAcineto NP和OXA-23的结果比较**

**Table2 validation results of CarbAcineto NP and OXA-23**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| OXA-23 | CarbAcineto NP  | 　合计 |
| 阳性 | 阴性 |
| 阳性 | 60 | 9 | 69 |
| 阴性 | 2 | 50 | 52 |
| 合计 | 62 | 59 | 121 |

**3.讨 论**

由鲍曼不动杆菌导致的医疗相关感染（HAI），经常发生在病情危重的病人身上，常见于有基础疾病或经历了重大的外科手术，长期住院的病人，鲍曼不动杆菌很容易通过血管内导管，开放性伤口和机械通风机进入人体。鲍曼不动杆菌还可引起获得性感染，主要包括肺炎和菌血症。还可引起皮肤，眼部，软组织感染，继发性脑膜炎和心内膜炎，泌尿系统感染。

本次研究中，两个医院的鲍曼不动杆菌的感染主要是在重症医学科，呼吸科和神经外科，这是由于这三个科室的病人病情危重，抵抗力弱，住院时间较长，长期带呼吸机，容易造成鲍曼不动杆菌的感染，70株耐亚胺培南的菌株同时也对头孢菌素类,氨基糖苷类，喹诺酮类药物耐药，是由于这些菌株也存在其他耐药机制如产超广谱β内酰胺酶，头孢菌素酶（AmpC酶），氨基糖苷类修饰酶，armA等16SrRNA甲基化酶，拓扑异构酶gyrA、parC基因突变等原因造成的多重耐药。多重耐药的鲍曼不动杆菌在重症医学科，神经外科，呼吸科所占比例很高，而在新生儿科，心内科所检测到的鲍曼不动杆菌对所有药物敏感，说明多重耐药的鲍曼不动杆菌的出现和流行与病房内病人之间的交叉感染有很大的关联。

细菌对碳青霉烯类抗生素产生耐药的主要耐药机制有：1.青霉素结合蛋白(PBPs)靶位的改变，PBPs靶位改变主要见于革兰阳性球菌，在革兰阴性杆菌中较少见。2.外膜蛋白改变导致外膜通透性的减少。3.外排泵的高度表达。4. 通过质粒介导的碳青霉烯酶基因传播。有染色体介导的高水平的耐药基因表达，如OXA和Ampc基因，从而导致管家基因的改变;β内酰胺酶启动子序列改变; 在启动子上插入序列等【1,2】。有时会几种机制同时存在，由于获得碳青霉烯酶编码的基因是最重要耐药机制。所以检测碳青霉烯酶尤为重要。

碳青霉烯酶是由于ESBLs的传播，从而过度使用碳青霉烯类药物，使碳青霉烯酶产生。它是一类能够水解亚胺培南或者是美罗培南等碳青霉烯类的一类β内酰胺酶。包括Ambler分类中的A、B、D三类酶。 有重要临床意义的是质粒介导的碳青霉烯酶基因型，主要包括亚胺培南铜绿假单胞菌酶（Imipenemase, IMP）、维罗纳亚胺培南酶（Verona Imipenemase, VIM）、苯唑西林酶（Oxacillinases, OXA）、产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌（Klebsiella pneumonia Carbapenemase, KPC）和新德里一号金属酶（New Delhi metalloid β-lactamase 1,NDM-1）, D类碳青霉烯酶的水解作用是鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类的最主要原因,这类酶的基因位于质粒和染色体上，OXA-23，OXA-24和OXA-58在鲍曼不动杆菌中发现的比较多【3】。

本实验中，121株鲍曼不动杆菌中，70株菌对亚胺培南耐药，耐药率为57.9%，70株对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌中有67株携带OXA-23基因，OXA-23基因携带率为95.7%，说明在河北医科大学第二医院和邢台市第三医院的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的主要碳青霉烯酶的基因型为0XA-23。此结果不仅与国内大多数文献报道相一致【4,5】，与Neil Woodford等【6】报道也相一致。在徐丽[7] 对341株多重耐药的鲍曼不动杆菌的研究中，blaOXA-23-like，balISAbal的检出率为89.44%和99.41%。说明ISAbal不同插入片段位于这些基因（除balOXA-24）的5’及3’端时其表达量增加，从而导致耐药。

本次实验有2株对碳青霉烯类敏感的鲍曼不动杆菌也携带OXA-23基因，可能是由于OXA-23基因表达比较弱，或者无ISAbal提供的强启动子，并不能导致对碳青霉烯类耐药，这个需要做进一步实验来探讨。

Carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP)方法 [8]是2015年CLSI推荐的碳青霉烯酶的生化检测法。主要原理是测试菌水解亚胺培南的β内酰胺环，通过PH指示剂的颜色变化通常是用酚红指示剂，颜色由红色变为黄色或橘黄色，这个实验针对肠杆菌和绿脓在全球有了很广泛的验证，然而不动杆菌属产生了大量弱的D类碳青霉烯酶，传统的Carba NP很难检测出在不动杆菌属中高表达的OXA型的D类碳青霉烯酶。因此，建立一个改良的Carba NP（CarbAcineto NP）方法【9】 来检测不动杆菌的碳青霉烯酶可以对鲍曼不动杆菌的及时控制传播提供有效的临床依据。

在Carba NP实验中，大量的蛋白抽提液会阻碍弱的碳青霉烯酶的活性的释放，因此，在CarbAcineto NP中，用高渗的5M NaCl取代了蛋白抽提液，可以使细菌完全溶解，释放蛋白；并且挑取的菌量也增加了两倍，可以增加酶的释放量。

有3株对碳青霉烯类耐药，但是未检测到OXA-23基因，可能是由于细菌携带其他碳青霉烯酶耐药基因或者细菌外膜蛋白减少导致外膜通透性减少，外排泵的高表达等耐药机制造成的。下面用两个表型方法来检测鲍曼不动杆菌的碳青霉烯酶，统计这两种方法的敏感性和特异性，以及是否可以弥补PCR只能检测已知基因的缺陷。

此次试验中，耐碳青霉烯类的鲍曼不动杆菌有69株，其中60株CarbAcineto NP和OXA-23都为阳性；2株CarbAcineto NP和OXA-23为阴性，有可能是由于其他耐药机制如细菌外膜通透性下降，外排泵高表达等原因造成对碳青霉烯类耐药；6株OXA-23阳性，CarbAcineto NP阴性，可能是由于OXA-23基因表达的碳青霉烯酶活性比较弱，CarbAcineto NP方法无法验证；1株OXA-23阴性，CarbAcineto NP阳性，说明这一株鲍曼不动杆菌产非OXA-23类基因的碳青霉烯酶，如果通过PCR方法就要经过很多碳青霉烯酶基因检测来验证，但是通过这个表型方法可以很快检测到是否产碳青霉烯酶。

对碳青霉烯类敏感的51株鲍曼不动杆菌，其中有48株OXA-23和CarbAcineto NP都为阴性；2株OXA-23阳性，CarbAcineto NP阴性，可能是由于OXA-23基因表达的碳青霉烯酶活性比较弱，无ISAbal提供的强启动子，并不对碳青霉烯类耐药，这需要进一步实验验证；1株OXA-23阴性，CarbAcineto NP阳性，可能是存在其他类碳青霉烯酶基因，表达活性也较弱，不对碳青霉烯类耐药。

结果表明，CarbAcineto NP的敏感性和特异性分别达到了86.9%和96.2%，从方法评价上是敏感性和特异性很好的方法。PCR方法【10】可以精确鉴定碳青霉烯酶的种类，但是实验过程复杂，消耗高，并且只能鉴定已知的碳青霉烯酶基因。CarbAcineto NP方法用到的试剂廉价，操作简单，用时短，结果易于解释，在普通实验室就可以开展，可以为临床及时应用及调整抗生素提供快速有效的依据。

**参考文献**

1. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. N Engl J Med 2005;352:380-91.

2. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an up-date. Curr Opin Infect Dis 2008;21:367-71

3. Diene SM,Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 831~838.

4. 张伟红，叶慧芬，杨银梅，等.耐亚胺培南鲍曼不动杆菌耐药表型和碳青霉烯酶基因型分析[J].中国感染与化疗杂志，2011，11（1）：45－48.

5. 陈振华.鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶检测及流行病学分析.中南大学2010年硕士学位论文.

6. Woodford N，Ellington MJ，Coelho JM，et a1．Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp．Int J Antimierob Agents , 2006,27:351-353.

7. 徐丽，北京某医院鲍曼不动杆菌临床分离株耐药性及分子流行病学研究.河北医科大学2013年硕士学位论文.

8 . Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test. Antimicrob. Agents Chemother. 2012,56:6437~6440.

9. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Acinetobacter spp. J Clin Microbiol ,2014,52: 2359~2364.

10. Nordmann, P., Gniadkowski, M., et al., 2012c. Identification and screening of

carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin. Microbiol. Infect. 18 (5),

432–438.