

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.004

## Carba NP 直接纸片法检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的应用评估

胡锡池<sup>1</sup>, 胡仁静<sup>1</sup>, 刘小云<sup>2</sup>

(1. 南京医科大学附属无锡市第二人民医院检验科, 江苏 无锡 214002;

2. 徐州医科大学附属医院中心实验室, 江苏 徐州 221002)

**[摘要]** 目的: 评估Carba NP直接纸片法快速检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶菌株的实用价值。方法: 收集2015年4月至2016年12月来自各类标本的肠杆菌科细菌212株, 其中122株试验菌, 90株对照菌分别进行Carba NP试验和Carba NP直接纸片法检测, 同时将耐药基因的普通PCR的检测结果作为金标准。结果: 在122株细菌中, KPC-2耐药基因阳性菌株为112株; NDM-1基因阳性菌株为8株; 2株未检出耐药基因; 未发现携带D组OXA-48基因的实验菌。与PCR结果相比, Carba NP试验与Carba NP直接纸片法对于所测菌株的碳青霉烯酶的敏感性高达98%, 特异性高达100%; Carba NP试验在60 min内完成检测, 而Carba NP直接纸片法最快可以在5 min内完成检测。结论: 相对于Carba NP试验, Carba NP直接纸片法无需昂贵的蛋白抽提液, 试剂成本价廉, 操作简便, 可以有效协助临床抗感染治疗。

**[关键词]** Carba NP直接纸片试验; 碳青霉烯酶; 检测价值

## Clinical evaluation of Carba NP paper strip test in detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

HU Xichi<sup>1</sup>, HU Renjing<sup>1</sup>, LIU Xiaoyun<sup>2</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Second People's Hospital of Wuxi Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi Jiangsu 214002;

2. Department of Center Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 221002, China)

**Abstract** **Objective:** To evaluate Carba NP paper strip test for the carbapenemase detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Methods:** A total of 122 *Enterobacteriaceae* were isolated from various clinical samples from the Second People's Hospital between April 1, 2015 and December 31, 2016. The phenotype of *Enterobacteriaceae* were detected by Carba NP test and Carba NP paper strip test, the genes of carbapenemase detection were performed by PCR, which was regarded as a gold standard method to gene detection. **Results:** A total of 112 blaKPC-2 isolates, 8 blaNDM-1 isolates, no class D carbapenemase isolate, and 2 non-carbapenemase isolates were detected in 122 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. The sensitivity of Carba NP test and Carba NP direct paper to the carbapenemase of the tested strain was as high as 98% and the specificity was as high as 100%.

收稿日期 (Date of reception): 2017-07-04

通信作者 (Corresponding author): 刘小云, Email: justforxiaoyun@126.com

基金项目 (Foundation item): 无锡市科技支撑项目 (CSE31N1602). This work was supported by Science and Technology Bureau of Wuxi, China (CSE31N1602).

refer to PCR results. Carba NP test can be done within one hour, and Carba NP paper strip test can be done within five minutes. **Conclusion:** Relative to the Carba NP test, Carba NP simple paper method does not need expensive protein extraction liquid, cheap and easy to operate, suitable for primary hospitals are widely used, which can effectively assist clinical anti-infection treatment.

**Keywords** Carba NP paper strip test; carbapenemase; detection value

当前, 碳青霉烯类抗生素耐药的肠杆菌科细菌(carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)已经严重威胁全球的公共卫生<sup>[1]</sup>。目前可用于CRE感染的治疗药物非常有限, 主要为黏菌素、多黏菌素B、磷霉素、替加环素和部分氨基糖苷类药物。而单用上述药物治疗严重的CRE感染往往效果不佳, 及早发现CRE、及时联合用药可能对病人的预后更有意义<sup>[2]</sup>。因此快速准确地鉴定出CRE显得尤为重要。目前, 常用的检测碳青霉烯酶的方法有Hodge试验(MHT)、显色培养基和基因检测等。2012年Nordmann等<sup>[3]</sup>首次报道Carba NP实验(Carbapenemase Nordmann-Poirel test)用于快速检测碳青霉烯酶。2015年美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)纳入Carba NP试验用于快速筛查CRE。Carba NP试验检测时间短, 敏感性和特异性高, 在全球医学临床实验室广泛应用。本研究对Carba NP经典方法进行大胆改良, 无需使用昂贵的蛋白提取液, 简化步骤, 使之更适合在广大基层实验室中开展。现将Carba NP直接纸片法检测CRE的结果与Carba NP经典方法和PCR法进行对比, 以期评价其敏感性与特异性。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

收集江苏省无锡市第二人民医院2015年4月至2016年12月收集的耐碳青霉烯类抗生素的肠杆菌科细菌122株, 同时留取90株碳青霉烯类抗生素敏感的肠杆菌科细菌(剔除重复株)用于对照, 标本来自痰、尿液、血液、引流液、胸腹水等。药敏结果解释参照美国CLSI的M100-S25标准。阳性质控菌ATCC BAA-1705和阴性质控菌ATCC BAA-1706由南京鼓楼医院惠赠。

### 1.2 主要仪器和试剂

主要仪器有德国Eppendorf公司的PCR仪和美

国Thermo公司的凝胶成像仪。主要试剂有德国Eppendorf公司的DNA标志物, 北京天根生化科技有限公司的DNA提取试剂盒, 徐州微科曼得生物工程有限公司的PCR检测试剂, 上海生工生物工程有限公司的引物的合成和测序, 杭州默沙东制药有限公司的亚胺培南西司他丁钠, 美国Thermo公司的酚红试剂和细菌总蛋白抽提试剂以及美国Sigma公司的硫酸锌七水合物。

### 1.3 试剂的配制<sup>[3]</sup>

Carba NP试验与Carba NP直接纸片法的检测液的配方相同。

A液: 0.05%酚红溶液+180  $\mu$ L的0.1 mmol/L ZnSO<sub>4</sub>水溶液(0.1 mol/L NaOH及10% HCl调pH为7.8 $\pm$ 0.1)。

B液: 每毫升A液中含有终浓度为6 mg/mL的亚胺培南/西司他丁。

### 1.4 碳青霉烯酶表型确认试验

#### 1.4.1 Carba NP试验<sup>[3]</sup>

实验流程: 取200  $\mu$ L细菌蛋白抽提液分别加到两个EP管中, 各100  $\mu$ L, 作为试验管和对照管。用10  $\mu$ L接种环取1满环细菌的量, 分别加入EP管, 混匀振荡5 s后, 再分别加入检测液A, B, 然后放置于37  $^{\circ}$ C孵箱, 每隔半小时观察结果(2 h内观察为宜)。

#### 1.4.2 Carba NP直接纸片法

实验流程: 制备1.5 cm  $\times$  1.5 cm直径的圆形滤纸片, 在纸片上加入A, B液各50  $\mu$ L。用10  $\mu$ L接种环取1满环细菌的量, 分别在纸片上进行研磨, 观察颜色变化。结果判读同上。

### 1.5 基因检测及测序

严格按照试剂盒说明书提取细菌DNA, PCR扩增主要的碳青霉烯酶基因, 具体引物名称与序列、扩增长度等见表1。

表1 PCR检测的引物的序列及温度

Table 1 Primers used for PCR detection of carbapenemase encoding genes

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度/bp	退火温度/°C
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCTA	882	56
	KPC-R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAA		
<i>bla</i> <sub>SME</sub>	SME-F	AACGGCTTCATITTTGTTTAG	830	56
	SME-R	GCTTCCGCAATAGITTTATCA		
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GES-F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	846	57
	GES-R	CTAITTGTCCGTGCTCAGG		
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP-F	CGGCKCAGGAGMGKCTT	587	57
	IMP-R	AACCAGTITGTCYTACAT		
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	VIM-F	GCMCTTCTCGCGGAGATTGA	257	59
	VIM-R	TGCGCAGCACCRGGATAGA		
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	NDM-1-F	TCCTTGATCAGGCAGCCACC	591	64
	NDM-1-R	CGCATTAGCCGCTGCATGA		
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48-F	GCTTGATCGCCCTCGAIT	281	57
	OXA-48-R	GATTGCTCCGTGGCCGAAA		

## 2 结果

### 2.1 基因检测结果

122株CRE中的碳青霉烯酶基因阳性株为120株, 分别为产KPC-2型碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌112株和产NDM-1型碳青霉烯酶8株(8株菌均为大肠埃希菌)。CRE组中2株未检出碳青霉烯酶基因。90株对照菌株均未检出碳青霉烯酶基因。PCR电泳结果见图1。

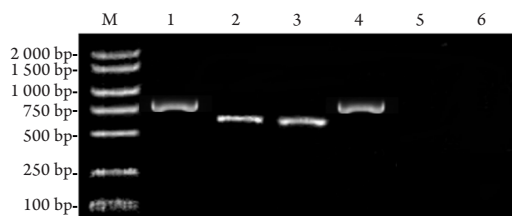


图1 肠杆菌科细菌电泳图

**Figure 1 Electrophoresm examples for the products of PCR**  
1: *bla*<sub>KPC</sub>阳性的肺炎克雷伯菌; 2~3: *bla*<sub>NDM</sub>阳性的大肠埃希菌; 4: ATCC BAA-1705(阳性对照); 5: ATCC BAA-1706(阴性对照)。

Lane 1: *bla*<sub>KPC</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae*; lanes 2~3: *bla*<sub>KPC</sub>-positive *Escherichia coli*; lane 4: ATCC BAA-1705 (positive control); lane 5: ATCC BAA-1706 (negative control).

### 2.2 碳青霉烯酶表型试验结果

#### 2.2.1 Carba NP 试验结果

120株碳青霉烯酶基因阳性的CRE中, 有118株Carba NP试验为阳性, 110株产KPC-2酶的CRE菌株均在60 min由红色变成黄色, 8株产NDM-1酶的CRE菌株在5 min内均由红色变为黄色, CRE组中2株非产碳青霉烯酶的菌株及90株CSE菌株的Carba NP试验均为阴性(图2, 表2)。

#### 2.2.2 Carba NP 直接纸片法

120株碳青霉烯酶基因阳性的CRE中, 有118株改良Carba NP试验阳性, 110株KPC-2及8株NDM-1酶型均在5 min内均由红色变为黄色, CRE组中2株非产碳青霉烯酶的菌株及90株CSE菌株的Carba NP试验均为阴性。该方法结果与Carba NP试验完全一致。纸片法的颜色消退比较快, 需5 min内完成结果判读(图3, 表2)。

### 2.3 表型试验与 PCR 结果比较

与PCR结果相比: 122株受检菌株, Carba NP直接纸片法筛查碳青霉烯酶结果的敏感性为98%, 特异性为100%(表2, 3, 图4)。

表3中两种方法检测碳青霉烯酶的结果差异无统计学意义( $P < 0.05$ )。以PCR结果为金标准, Carba NP直接纸片法的敏感性为98%(118/120),

特异性为100%(92/92)。

Carba NP直接纸片法出现阳性的时间较短, 在5 min之后阳性均出现。而Carba NP试验大部

分在20 min内出现阳性, 而还有部分阳性结果在60 min左右出现(图4)。

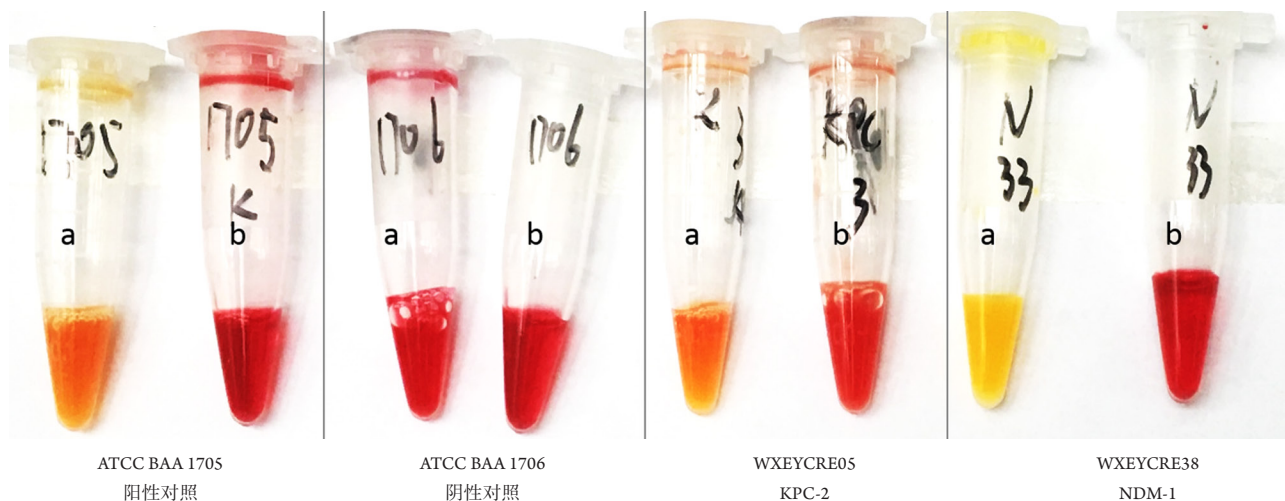


图2 肠杆菌科细菌 Carba NP试验结果图

Figure 2 Carba NP test results for *Enterobacteriaceae*

表2 肠杆菌科细菌碳青霉烯酶表型试验的结果比较

Table 2 Comparison of the results of carbapenemase phenotype in *Enterobacteriaceae* using Carba NP test and Carba NP paper strip test

组别	基因型	菌株	最小抑菌浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )		表型试验	
			IMP	ETP	Carba NP试验 阳性株数	Carba NP 直接纸片 法阳性株数
CRE 组	KPC-2(n=112)	肺炎克雷伯菌(n=92)	4, ≥16	0.5, ≥8	92	92
		大肠埃希菌(n=14)	≤1, ≥16	2, ≥8	14	14
		产气肠杆菌(n=2)	2, ≥16	≥8	2	2
		黏质沙雷菌(n=3)	4	≥8	3	3
		弗氏柠檬酸杆菌(n=1)	4	2	1	1
	NDM-1(n=8)	大肠埃希菌(n=8)	4, ≥16	≥8	8	8
	非产碳青霉烯酶(n=2)	肺炎克雷伯菌(n=2)	≤1	≤0.5, ≥8	0	0
CSE 组	产ESBLs酶	肺炎克雷伯菌(n=55)	≤1	≤0.5	0	0
		大肠埃希菌(n=35)	≤1	≤0.5	0	0

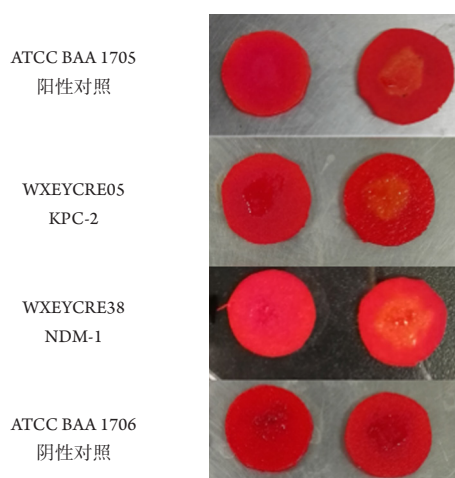


图3 肠杆菌科细菌Carba NP direct试验结果图

Figure 3 Carba NP test results for *Enterobacteriaceae*

表3 Carba NP直接纸片法与PCR法检测碳青霉烯酶的结果比较

Table 3 Comparison between the results of Carba NP paper strip test and PCR

Carba NP直接 纸片法	PCR法		合计
	阳性	阴性	
阳性	118	0	118
阴性	2	92	94
合计	120	92	212

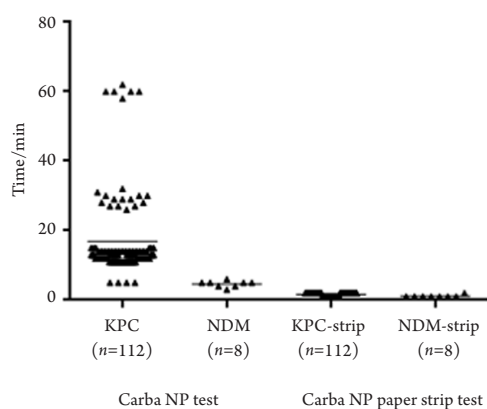


图4 Carba NP试验及Carba NP 纸片法出现阳性结果的反应时间

Figure 4 Incubation time required for detection of carbapenemase activity by using Carba NP test and Carba NP paper strip test

### 3 讨论

当前由CRE引起的院内感染的案例日益增多, 2001年Hawkey等<sup>[4]</sup>首次报道我国的产blaIMP-4碳青霉烯酶的柠檬酸杆菌, 2007年Wei等<sup>[5]</sup>首次报道我国的产KPC-2的肠杆菌科。2015年全国耐药监测网的数据显示: 全国肺炎克雷伯菌对耐碳青霉烯类抗生素平均耐药率为7.6%, 且呈逐年加快趋势。而在经济发达的东南沿海如上海, 浙江地区已经接近20%, 因此探索快速检测产碳青霉烯酶CRE的试验方法俨然成为当务之急。2012年美国CDC将CRE列入最高耐药菌防范等级, 快速耐药表型检测得到全世界范围的关注。2012年报道的Carba NP试验在2015年被纳入CLSI; 2015年报道的碳青霉烯类失活(carbapenem inactivation method, CIM)实验在经过改良后在2017被纳入CLSI, 期间大量的学者团队致力于快速表型检测的研究。

Carba NP实验是2012年Nordmann等<sup>[3]</sup>团队研发的一种快速显色碳青霉烯酶检测试验。2012年后国内外的研究人员对该试验进行改良, 包括改变抽提液、显色底物等方式来提高灵敏度<sup>[7-9]</sup>; 改变底物来降低成本<sup>[10]</sup>, 并且将检测范围扩展到非发酵菌领域。但是该试验仍需要昂贵的蛋白抽提液, 在基层医疗机构普遍开展还是有相当大的难度。2016年泰国有学者<sup>[11]</sup>使用滤纸法进行Carba NP试验, 该方法操作简便, 无需使用蛋白提取液, 简化实验步骤。但是该研究中主要试验菌株集中在产NDM-1酶的肠杆菌科, 仅包含1个产KPC-2酶的菌株, 缺少我国广泛流行的KPC酶的检测数据。若直接在中国采用该改良Carba NP试验, 缺乏足够的支持性数据。因此本研究对122株CRE(其中112株产KPC-2酶, 占91.8%)进行Carba NP试验和Carba NP直接纸片法, 同时参照PCR结果, 从而评估直接纸片法的应用价值。

本研究中212株受检菌中122株为CRE, 90株为CSE。122株CRE中120株产碳青霉烯酶, 2株不产碳青霉烯酶, 估计为其它的耐药机制导致碳青霉烯酶类抗生素耐药。Carba NP直接纸片法结果与Carba NP试验完全一致, 共检出118株阳性,

94株阴性。Carba NP直接纸片法在5 min内阳性结果全部出现, 而Carba NP试验中部分结果的反应时间为60 min。与PCR结果相比: 212株受检菌株, Carba NP直接纸片法筛查碳青霉烯酶结果的敏感性为98%(92株碳青霉烯酶阳性的肺炎克雷伯菌中有两株Carba NP试验与Carba NP直接纸片法均为阴性, 可能与仅仅携带KPC基因而没有表达蛋白有关), 特异性为100%(限于财力物力, 本文仅检测碳青霉烯酶的最常见7种基因型, 数据可能不够全面)。综上所述, Carba NP直接纸片法与Carba NP试验性能相同, 而Carba NP直接纸片法变色时间比Carba NP试验更短, 并且不需要昂贵的蛋白提取液, 成本更低, 操作性更强, 尤其适合基层微生物学实验室开展。临床实际工作中, 当我们第一时间在ICU、呼吸监护等重度耐药菌频发的标本中发现可疑病原菌时, 可立即采用Carba NP直接纸片法检测碳青霉烯酶, 不需要经过复杂的蛋白提取步骤, 短短十几分钟后就可得到结果, 如果该试验阳性, 立即迅速通知临床医生该菌为产碳青霉烯酶的重度耐药菌, 建议临床根据病情酌情联用强效抗生素用于CRE菌株的感染, 这对于临床争分夺秒抢救重度感染患者, 遏制耐药菌引起的院内感染的扩散与爆发均具有重要意义<sup>[12]</sup>。

Carba NP试验的菌株一般取自血平板培养基或者MH培养基上<sup>[13]</sup>, 麦康凯等选择性平板的培养基上的菌落存在干扰反应体系酸碱度的可能, 所以不予采用。另外, Carba NP试验对D组的产OXA-48酶及OXA-48-like菌株的检测的敏感性较低, 阳性率仅11%, 主要与D组的OXA-48酶的水解活性相关。本研究中2株非产酶的Carba NP纸片法与Carba NP试验均为阴性, 可能与孔蛋白丢失相关<sup>[14]</sup>, 有待进一步研究。

## 参考文献

- 杨晨, 胡仁静, 胡锡池, 等. MLST在碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学分析中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(23): 5514-5516.  
YANG Chen, HU Renjing, HU Xichi, et al. Application of MLST in molecular epidemiology analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2016, 26(23): 5514-5516.
- 曹慧玲, 舒钊彻, 杨琳, 等. 亚胺培南与舒巴坦联合应用对多重耐药肺炎克雷伯菌的体外试验研究[J]. 实用医学, 2016, 32(3): 475-478.  
CAO Huiling, SHU Zhaoqie, YANG Ling, et al. In vitro study of combined use of imipenem and sulbactam against multi drug resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. The Journal of Practical Medicine, 2016, 32(3): 475-478.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(9): 1503-1507.
- Hawkey PM, Xiong J, Ye H, et al. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China[J]. FEMS Microbiol Letts, 2001, 194(1): 53-57.
- Wei ZQ, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 763-765.
- García-Fernández S, Morosini MI, Gijón D, et al. Detection of carbapenemase production in a collection of *Enterobacteriaceae* with characterized resistance mechanisms from clinical and environmental origins by use of both Carba NP and Blue-Carba tests[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(2): 464-466.
- Tang HJ, Chen YT, Chiang T, et al. Identification of the first imported KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* from the USA to Taiwan[J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 44(5): 431-435.
- Pires J, Tinguely R, Thomas B, et al. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. J Microbiol Methods, 2016, 122: 33-37.
- Rodrigues C, Bavlovic J, Machado E, et al. KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN)[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1000.
- Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, et al. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(5): 1338-1342.
- Srisrattakarn A, Lulitanond A, Wilailuckana C, et al. Modification and evaluation of the Carba NP test by use of paper strip for simple and rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32(7): 117.
- 胡仁静, 严子禾, 韩志君, 等. Carba NP试验及Carba NP-direct试验检测产碳青霉烯酶肠杆菌的临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(8): 1079-1086.  
HU Renjing, YAN Zhihe, HAN Zhijun, et al. The clinical significance of Carba NP test and Carba NPdirect test in the detection of

- carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* strains[J]. *Journal of Clinical and Pathological Medicine*, 2016, 36(8): 1097-1085.
13. Dortet L, Bréchard L, Poirel L, et al. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test[J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63(Pt 5): 772-776.
14. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control[J]. *J Intern Med*, 2015, 277(5): S01-S12.

本文引用: 胡锡池, 胡仁静, 刘小云. Carba NP直接纸片法检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的应用评估[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(10): 2043-2049. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.004

**Cite this article as:** HU Xichi, HU Renjing, LIU Xiaoyun. Clinical evaluation of Carba NP paper strip test in detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(10): 2043-2049. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.004