

# Cica-Beta Test 试剂盒检测 耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属 $\beta$ -内酰胺酶的评估\*

谢国艳,高志生,许俊,秦云,钱敏健

(上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院,上海 202150)

**摘要:**目的 评估 Cica-Beta Test 试剂盒对铜绿假单胞菌(PAE)金属  $\beta$ -内酰胺酶(MBLs)检测的临床适用性。方法 选取文献[5]中的 82 株耐亚胺培南 PAE,PAE-MHT 法和 Cica-Beta Test 试剂盒分别进行 MBLs 检测。结果 PAE-MHT 法的敏感度、特异度和准确率分别为 84.6%,97.2%和 97.6%。Cica-Beta Test 试剂盒敏感度、特异度和准确率分别为 76.9%,100%和 96.3%。PAE-MHT 法和 Cica-Beta Test 试剂盒有非常好的一致性。结论 两种方法均适合应用于临床快速筛查非发酵菌产 MBLs。

**关键词:**铜绿假单胞菌;金属  $\beta$ -内酰胺酶;HMRZ-8

中图分类号:R378.991;R446 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)01-123-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.036

## Evaluation of Cica-Beta Test Kit for Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas Aeruginosa*

XIE Guo-yan,GAO Zhi-sheng,XU Jun,QIN Yun,QIAN Min-jian

(Chongming Branch of Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 202150, China)

**Abstract: Objective** To evaluate Cica-Beta Test kit for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) in the clinical microbiology laboratory. **Methods** A total of 82 imipenem-resistant PAE clinical isolates from literature[5] was detected to metallo- $\beta$ -lactamase (MBLs) by PAE-MHT and Cica-Beta Test kit. **Results** The sensitivity, specificity and accuracy rate of PAE-MHT was 84.6%,97.2% and 97.6%, and the sensitivity, specificity and accuracy rate of Cica-Beta Test kit was 76.9%,100% and 96.3%, respectively. Two methods had a good consistency. **Conclusion** Two methods are simple, quick for detecting to metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* in clinical laboratories.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; metallo- $\beta$ -lactamase; HMRZ-8

Cica-Beta Test 试剂盒是日本 Kanto Chemical 公司生产的一种能够简便快速地检测  $\beta$ -内酰胺酶并进行初步分类的试剂。Colodner 等<sup>[1]</sup>曾运用该试剂盒评估了对 ESBLs 的检测效果,国内也有学者<sup>[2,3]</sup>将 Cica-Beta Test 试剂盒应用于大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌及鲍氏不动杆菌的  $\beta$ -内酰胺酶的检测及初步分型,但并未将 Cica-Beta Test 试剂盒应用于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,PAE)产酶的检测。近年 PAE 对碳青霉烯类抗菌药物耐药状况越来越严重,目前认为产金属  $\beta$ -内酰胺酶(metallo- $\beta$ -lactamases,MBLs)是 PAE 对其产生耐药性的重要机制,检测 MBLs 的方法虽多,但目前国际上还没有制定金属酶的标准检测法。笔者曾应用改良 Hodge 试验(PAE-MHT)法<sup>[4]</sup>检测耐亚胺培南 PAE 的  $\beta$ -内酰胺酶,认为 PAE-MHT 法简便、快捷,不失为临床快速筛查非发酵菌产 MBLs 的一种新方法。本研究将该试剂盒用于耐亚胺培南的

PAE 的 MBLs 检测,并与 PAE-MHT 法作比较,分析两种方法对检测 MBLs 的适用性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源:选取文献[5]中的 82 株耐亚胺培南 PAE(非重复分离株),其中 13 株经 MBLs 基因检测确定为 MBLs 基因阳性株(IMP 型 2 株,VIM 型 11 株)。菌株以甘油肉汤-20℃保存备用。肺炎克雷伯菌 ATCC700603 作为质控菌,IPM-1 型及 VIM-2 型 PAE 购自卫生部临检中心。1.1.2 材料 美罗培南(MEM)纸片购自英国 OXOID 公司(10  $\mu$ g/片),MH 琼脂平皿(上海科玛嘉公司),Cica-Beta Test 试剂盒(日本 Kanto Chemical 公司)。

#### 1.2 方法

1.2.1 PAE-MHT 法<sup>[4]</sup>: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

\* 基金项目:上海市崇明社会发展基金(ck201136)。

作者简介:谢国艳(1974-),女,硕士,副主任检验师,研究方向:主要从事微生物学检验与耐药基因分子诊断研究,E-mail:xieguoyan93@163.com。

通讯作者:高志生(1974-),男,硕士,副教授,副主任医师,E-mail:gaozhishen93@sina.com。

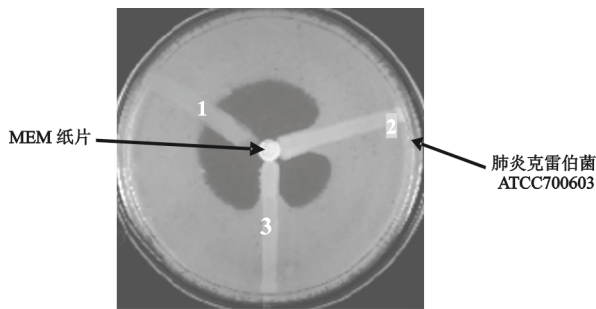
置 10 min 后,贴 MEM 纸片。挑取 3~5 个过夜生长的待测菌,从纸片边缘向外划直线,35℃ 培养 16~20 h,观察指示菌有无出现向 MEM 纸片增强生长现象,若增强生长,即为 MBLs 阳性。

1.2.2 Cica-Beta Test 试剂盒检测 MBLs:根据试剂盒操作说明对 82 株耐亚胺培南 PAE 及质控菌进行 MBLs 检测。对头孢硝噻吩纸片检测阳性的菌株使用试剂 1,试剂 1 阴性结果判断为产青霉素酶或窄谱头孢菌素酶,阳性(显示红色)则继续使用试剂 2 进行检测;试剂 2 阴性结果判断为产 MBLs。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件,采用 McNemar 检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。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 PAE-MHT 法检测 MBLs PAE-MHT 法测得 11 株菌株产 MBLs,阳性率为 13.4%,见图 1。



注:1,3 为 PAE-MHT 法阴性;2 为 PAE-MHT 法阳性

图 1 PAE-MHT 法检测 MBLs

2.2 Cica-Beta Test 试剂盒检测 MBLs 根据试剂盒操作说明对待测菌株进行 MBLs 检测。82 株耐亚胺培南 PAE,通过此方法共测出 10 株产 MBLs,阳性率为 12.2%。

2.3 两种检测方法的比较 选取的 82 株耐亚胺培南 PAE 已被文献[5]经过基因扩增、测序证实 13 株为 MBLs 基因阳性株,其中 IMP 型 2 株,VIM 型 11 株。以 PCR 法结果为金标准,对两种方法进行比较(见表 1),PAE-MHT 法假阴性 2 株,Cica-Beta Test 试剂盒 3 株假阴性,两者均无假阳性现象出现。两种方法在敏感度、特异度和准确率的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。PAE-MHT 法的敏感度略高于 Cica-Beta Test 试剂盒。

表 1 三种表型筛选方法的比较(%)

方法	敏感度	特异度	准确率
PAE-MHT 法	84.6	100	97.6
Cica-Beta Test 试剂盒	76.9	100	96.3

通过 Kappa 检验比较两者的一致性(见表 2),

K 值为 0.946,说明两者具有非常好的一致性。

表 2 PAE-MHT 法与 Cica-Beta Test 试剂盒的一致性比较

方法	PAE-MHT 法		Kappa
	+	-	
Cica-Beta Test 试剂盒	+	10	0.946
	-	1	

3 讨论 根据 Ambler 分类法<sup>[6]</sup> MBLs 属于 B 类酶,对  $\beta$ -内酰胺类抗生素具有广泛的水解作用,由于活性位点主要依赖 2 价锌离子,故称金属酶。目前对于 MBLs 表型检测,国际上还没有统一的标准,而 CLSI 规定改良 Hodge 试验(MHT)只适合对肠杆菌科细菌进行碳青霉烯酶表型确证试验,但对 PAE 无明确规定。Pasteran 等<sup>[4]</sup>通过改变指示菌(用肺炎克雷伯菌 ATCC700603 代替大肠埃希菌 ATCC25922)来检测 PAE 的 MBLs,克服了 MHT 试验中非发酵菌出现无法判定结果的问题,并将此法命名为 PAE 改良 Hodge 试验(PAE-MHT),笔者<sup>[5]</sup>也证实了 PAE-MHT 法是临床快速筛查非发酵菌产 MBLs 的一种新方法。

HMRZ-86 是一种新的产色头孢菌素类物质<sup>[7]</sup>,该化合物在第 7 位侧链上结合有一个羟丙基氧亚胺基,这一特性可保护  $\beta$ -内酰胺环不受一系列  $\beta$ -内酰胺酶的影响,Cica-Beta Test 试剂盒就是利用 HMRZ-86 能显色并能保护  $\beta$ -内酰胺环不受一系列  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs 和 MBLs 除外)的影响这一原理<sup>[1]</sup>,将其与某些酶抑制剂联合使用,从而简便快速地检测  $\beta$ -内酰胺酶并大致分类。

本研究以 PCR 法结果为判定标准,对两种检测方法进行比较,结果显示:两种方法均有假阴性现象,但无假阳性存在;两者的特异度、准确率都非常好,在敏感度方面,PAE-MHT 法略高于 Cica-Beta Test 试剂盒,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。由于 Cica-Beta Test 试剂盒须通过显色来判定结果,存在着显色太弱而难以判定结果的问题,因此笔者建议:在结果判定时只要出现非常弱的反应线时应判定为阳性,从而减少漏检的现象。

Cica-Beta Test 试剂盒对 PAE 产 MBLs 进行检测,操作简便、耗时短,能在 30 min 内快速完成检测,但如若出现极弱的反应时就难以判定结果,这可能是由于不同的菌株产酶量不同,从而在显色的程度上有所不同而造成。PAE-MHT 操作也较简便,但需要通过 16~20 h 孵育后进行形态观察,可是却避免了 Cica-Beta Test 试剂盒显色强弱干扰结果判定的问题。两种方法通过 Kappa 检验比较两者的一致性,K 值为 0.946,说明两者具有非常好的一致性,且适合非发酵菌 MBLs 的检测,实验室应根据自身的特点,选用适合的方法开展非发

## 酵菌 MBLs 的监测。

### 参考文献:

- [1] Colodner R, Reznik B, Gal V, et al. Evaluation of a novel kit for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006, 25(1): 49-51.
- [2] 汪雅萍, 杨俊, 应春妹, 等. 快速筛查革兰阴性杆菌  $\beta$ -内酰胺酶[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(4): 302-305.  
Wang YP, Yang J, Ying CM, et al. Quick screening test of beta-lactamase in gram-negative bacilli [J]. Chin J Infer Chemother, 2012, 12(4): 302-305.
- [3] 吴琼, 张博博, 倪语星. 细菌  $\beta$ -内酰胺酶快速检测及分型试剂盒的应用评估[J]. 检验医学, 2010, 25(1): 36-37.  
Wu Q, Zhang WB, Ni YX. Evaluation of a novel kit for identifying and differentiating of beta-lactamase [J]. Laboratory Medicine, 2010, 25(1): 36-37.
- [4] Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, et al. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(12): 4301-4303.
- [5] 谢国艳, 高志生, 许俊, 等. PAE-MHT 法检测耐亚胺培南铜绿假单胞菌金属  $\beta$ -内酰胺酶的临床适用性的评估[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(6): 982-985.  
Xie GY, Gao ZS, Xu J, et al. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa*-modified hodge test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chin J Lab Diagn, 2014, 18(6): 982-985.
- [6] Bush K, Jacoby GA, Mederios AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(6): 1211-1233.
- [7] Hanaki H, Kubo R, Nakano T, et al. Characterization of HMRZ-86; a novel chromogenic cephalosporin for the detection of extended-spectrum beta-lactamases [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53(5): 888-889.

收稿日期: 2014-11-06

修回日期: 2014-12-23

(上接 122 页)

- Zhang Y, Wu YP, Hou LM. Serum pepsinogen detection in the diagnosis of gastrointestinal diseases[J]. Journal of Medical Forum, 2007, 28(5): 92-93.
- [2] 孟凡斌, 吴明守. 胃蛋白酶原法筛检胃癌[J]. 日本医学介绍, 2006, 27(1): 36-37.  
Meng FB, Wu MS. Pepsinogen method of screening for gastric cancer[J]. Progress in Japanese Medicine, 2006, 27(1): 36-37.
- [3] 周红凤, 刘丹, 吴瑾, 等. 胃蛋白酶原和胃癌相关抗原与胃癌的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(17): 1940-1946.  
Zhou HF, Liu D, Wu J, et al. A review of advances related to pepsinogen and MG7Ag in gastric cancer[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2007, 15(17): 1940-1946.
- [4] 曹勤, 冉志华, 箫树东. 血清胃蛋白酶原、胃泌素-17 和幽门螺杆菌 IgG 抗体筛查萎缩性胃炎和胃癌[J]. 胃肠病学, 2006, 11(7): 388-394.  
Cao Q, Ran ZH, Xiao SD. Screening of a trophic gastritis and gastric cancer using serum pepsinogen, gastrin-17 and helicobacterpylori IgG antibodies[J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2006, 11(7): 388-394.
- [5] 刘中娟, 程敬琦, 郭子建, 等. 胃癌癌前病变相关标志物的检测[J]. 国际肿瘤学杂志, 2013, 40(2): 134-137.  
Liu ZJ, Cheng XQ, Guo ZJ, et al. Detection of the tumor markers in patients with gastric precancerous lesions[J]. Journal of International Oncology, 2013, 40(2): 134-137.
- [6] 朱岚, 黄飏, 张珏, 等. 不同人群胃蛋白酶原水平检测分析[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(10): 1216-1217.  
Zhu L, Huang B, Zhang J, et al. Serum pepsinogen level in health persons and patients with chronic gastric disease or stomach cancer[J]. Chinese Journal of Public Health, 2009, 25(10): 1216-1217.
- [7] 孙丽萍, 宫月华, 王兰, 等. 辽宁庄河地区居民血清胃蛋白酶原含量检测分析[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(10): 649-653.  
Sun LP, Gong YH, Wang L, et al. Serum pepsinogen I and II in residents from Zhuanghe county in North China[J]. Chinese Journal of Digestion, 2006, 26(10): 649-653.
- [8] Osishi Y, Kiyohara Y, Kubo M, et al. The serum pepsinogen test as a predictor of gastric cancer: the Hisayama study[J]. American Journal of Epidemiology, 2006, 163(7): 629-637.
- [9] Ghoshal UC, Kumar S, Krishnani N, et al. Serological assessment of gastric intestinal metaplasia and atrophy using pepsinogen I, pepsinogen II and gastrin-17 levels in a low incidence area of gastric cancer endemic for *H. pylori* infection [J]. Trop Gastroenterol, 2011, 32(4): 292-298.
- [10] Kikuchi R, Abe Y, Iijima K, et al. Low serum levels of pepsinogen and gastrin 17 are predictive of extensive gastric atrophy with high-risk of early gastric cancer[J]. Tohoku J Exp Med, 2011, 223(1): 35-44.

收稿日期: 2014-10-07

修回日期: 2014-12-02