

关重要。理想状态下,侵袭性真菌感染抗原标志物应符合以下条件:存在时间不能太短;与感染而非定植的相关性更大;在疾病早期出现;不同真菌种属间标志物具有保守性;不与人类或其他微生物抗原发生交叉反应。另外,抗原检测应当易于操作且经济有效,不同抗原联合检测可以提高检测的准确性。临床工作中应将各项检测指标与传统的培养、染色方法、特异性抗体检测、分子生物学方法及患者自身临床症状相结合而作出综合的判断。

参考文献

[1] Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(2):199-205.

[2] Mokaddas E, Khan ZU, Ahmad S, et al. Value of (1-3)-β-d-glucan, Candida mannan and Candida DNA detection in the diagnosis of candidaemia[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(10):1549-1553.

[3] Levin J, Poore TE, Zauber NP, et al. Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to Gram-negative bacteria[J]. N Engl J Med, 1970, 283(24):1313-1316.

[4] Shimizu A, Oka H, Matsuda T, et al. (1→3)-beta-D glucan is a diagnostic and negative prognostic marker for Pneumocystis carinii pneumonia in patients with connective tissue disease[J]. Clin Exp Rheumatol, 2005, 23(5):678-680.

[5] Persat F, Ranque S, Derouin F, et al. Contribution of the (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3):1009-1013.

[6] Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, et al. Evaluation of a (1→3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(12):5957-5962.

[7] 刘春玉, 王红. 侵袭性真菌感染非培养诊断方法的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(1):57-60.

[8] Marty FM, Lowry CM, Lempitski SJ, et al. Reactivity of (1→3)-beta-D-glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(10):3450-3453.

[9] Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1→3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1):299-305.

[10] Yoshida M, Roth RI, Grunfeld C, et al. Soluble (1→3)-beta-D-

glucan purified from Candida albicans; biologic effects and distribution in blood and organs in rabbits[J]. J Lab Clin Med, 1996, 128(1):103-114.

[11] Martin C, Roberts D, van Der Weide M, et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(10):3735-3742.

[12] Zäller L, Krämer I, Kappe R, et al. Enzyme immunoassays for invasive Candida infections: reactivity of somatic antigens of Candida albicans[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(9):1860-1867.

[13] Misaki H, Iwasaki H, Ueda T. A comparison of the specificity and sensitivity of two Candida antigen assay systems for the diagnosis of deep candidiasis in patients with hematologic diseases[J]. Med Sci Monit, 2003, 9(2):MT1-MT7.

[14] Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3):465-484.

[15] Yeo SF, Zhang Y, Schafer D, et al. A rapid, automated enzymatic fluorometric assay for determination of D-arabinitol in serum[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(4):1439-1443.

[16] Chambon-Pautas C, Costa JM, Chaumette MT, et al. Galactomannan and polymerase chain reaction for the diagnosis of primary digestive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia[J]. J Infect, 2001, 43(3):213-214.

[17] Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease[J]. Clin Infect Dis, 2002, 34(7):939-943.

[18] Antinori S, Radice A, Galimberti L, et al. The role of cryptococcal antigen assay in diagnosis and monitoring of cryptococcal meningitis[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11):5828-5829.

[19] Durkin M, Witt J, Lemonte A, et al. Antigen assay with the potential to aid in diagnosis of blastomycosis[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4873-4875.

[20] Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12):3278-3283.

[21] Chaiyaroj SC, Chawengkirttikul R, Sirisinha S, et al. Antigen detection assay for identification of Penicillium marneffeii infection[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1):432-434.

(收稿日期:2013-02-28)

• 综 述 •

肠杆菌科细菌中耐药质粒分型技术的研究进展*

曹小利, 张之烽 综述, 张 葵 审校

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 江苏南京 210008)

关键词: 研究进展; 耐药性; 质粒; 分型; 肠杆菌科
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 16. 039

文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2013)16-2145-03

质粒是染色体外能够自主复制的环状 DNA 分子, 可以编码抗菌药物耐药基因、毒力基因等遗传信息, 导致其宿主菌的

* 基金项目: 南京市医学科技发展资金资助(QRX11191)。 作者简介: 曹小利, 女, 医师, 主要从事临床微生物学与检验研究。

耐药性和致病性的产生^[1]；也可以通过水平转移在相同或不同种属的细菌之间播散，易化了潜在的有利基因如抗菌药物耐药基因在细菌群体之间快速播散^[2]；此外，质粒能够捕获外源性 DNA，以利于细菌定植于新环境，在宿主菌的适应和进化中有着重要的作用^[2]。

1 质粒播散在肠杆菌科细菌耐药发展中的作用

目前已知，超广谱头孢菌素酶(ESCs)的编码基因、质粒介导的喹诺酮耐药基因(PMQRs)、介导氨基糖苷类高水平耐药的 16S rRNA 甲基化酶及碳青霉烯酶的编码基因等主要由质粒携带^[3-4]，广泛分布于肠杆菌科细菌中，导致细菌耐药性的不断增高，以及多药耐药的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的不断出现^[5]，致使临床常用抗菌药物失效，治疗用药物不断减少，是临床感染性疾病的一个主要问题。

2 质粒分型方法及其在流行病学调查中的应用

英国国家质粒分型部依据具有相同复制机制的不同质粒能否在同一细胞中共存的能力将肠杆菌科细菌中的质粒分成了 27 个不相容性质粒(Inc)或复制子类型。有研究者在此基础上设计了一种以 PCR 为基础的质粒复制子分型方法(PBRT)可以对肠杆菌科细菌中的 18 个主要质粒家族的复制子(HI2、HI1、II、X、L/M、N、FIA、FIB、FIC、W、Y、P、A/C、T、K、B/O)进行检测^[6]，易化了质粒的分析，得到了广泛应用。这种方法可用于检测肠杆菌科细菌中耐药质粒的播散和进化，特别是广泛分布于肠杆菌科细菌中的 ESCs 的播散特点分析。相继的研究表明，ESCs 的流行与多种耐药质粒有关^[7]。不同的 ESCs 酶具有不同的流行质粒，并与其宿主菌的地理来源有关，如，CTX-M-15 在全球范围内的流行主要与 IncFII 质粒有关^[8]；CTX-M-14 在西班牙、英国的流行与 IncK 和 IncI1 质粒相关，在澳大利亚、法国、韩国、中国的流行与 IncFII 质粒有关^[8]；而在欧洲，CMY-2 主要由 IncA/C 编码；在加拿大、冈比亚和美国，CMY-2 主要 IncI1 质粒编码^[8]。相同的耐药质粒可以编码不同的耐药酶，如 IncFII 质粒可以编码 CTX-M(-14、-15、-65、-3、-1、-9、-24、-27)、TEM-1、DHA-1、SHV(-2、-5、-12)、NDM-1、RmtB、ArmA、QnrB4、Aac(6')-Ib-cr、及 FosA3；IncI1 质粒可以编码 CMY(-2、-7、21)、CTX-M(-2、-14、-15、-24)、SHV-12、TEM(-1、-52)、IRT、MphA 和 Aac(6')-Ib-cr^[8-9]。此外，这种质粒分型有助于分析特定耐药基因在不同菌种中的传播途径，可以对特定质粒携带的耐药基因的宿主范围有所了解，如 IncI1 和 IncN 质粒编码 CTX-M-1，在零售肉及食源性动物所携带的沙门菌中播散。

3 流行性耐药质粒

一些特定的质粒家族在肠杆菌科细菌中广泛流行，在特定耐药基因如 blaCTX-M、blaCMY 的播散中起着重要的作用。这些质粒包括 IncA/C、IncI1、IncL/M、IncFII、IncN，为流行性耐药质粒。其中 IncA/C、IncI1、IncFII 与细菌的多药耐药性相关，为多药耐药质粒，这种质粒的多药耐药性与其携带的移动性元件如插入序列、整合子、转座子等有关，因为这些移动性遗传元件能够对耐药基因等进行捕获和重组，也导致了这些耐药质粒的进化，和具有多个复制子的质粒变异体的出现。

4 质粒亚型分型技术

多种质粒全基因组测序的完成为进一步发展质粒鉴定和分型技术提供了大量的背景信息，并产生了针对 IncF、IncHI2、IncI1、IncN 质粒亚型的分析技术(<http://pubmlst.org/plasmid/>)。

4.1 IncI1 质粒的多位点序列分型技术

有研究者在 IncI1 质

粒 DNA 完全测序的基础上，通过选择多个靶位基因，发展了 IncI1 质粒的多位点序列分型技术^[10]，可以对 IncI1 质粒亚型进行快速、方便的分析。并通过分析 16 个编码 ESCs 的 IncI1 质粒发现，IncI1 的分型和 β 内酰胺酶基因相关^[10]。相同的质粒序列分型如 ST3 型 IncI1 质粒和不同的 β 内酰胺酶基因如：blaCTX-M-1 和 blaSHV-12 及 blaTEM-1 相关；而 blaCTX-M-1 和不同的质粒序列分型如 ST3 型和 ST9 型 IncI1 质粒相关^[10]，这种快速方便的 IncI1 亚型分型法可以对多个携带相同耐药基因的 IncI1 质粒进行遗传相关性分析，有利于流行病学分析。相继的研究显示，ST1 型 IncI1 质粒编码 CTX-M-55 和 RmtB 在动物中播散^[11]。

4.2 IncHI2 质粒复制子分型和多重 PCR IncHI2 质粒是临床肠杆菌科细菌中广泛流行的质粒，编码 CTX-M、VIM、ArmA、Aac(6')-Ib-cr 等酶，在全球医院和社区获得性感染菌中播散^[9]。2010 年，García-Fernaández 等^[12]又通过对该质粒家族全基因组的保守区和可变区进行分析后，结合质粒复制子分型和多重 PCR 设计了 IncHI2 质粒的分型方法，该方法可以对不同地区、不同来源的菌株中的 IncHI2 质粒进行鉴定和分型，以分析这些质粒的分布和进化。近年来研究发现，转座子和插入序列在 IncHI2 质粒的耐药发展中有着重要的作用^[13]，导致同时携带 blaVIM-1、blaCTX-M-9、aac(6')-Ib 和 qnrA 等多种耐药基因的 ST1 型 IncHI2 质粒在西班牙巴塞一家地区医院的 3 个重症监护室中播散，致使多耐药阴沟肠杆菌和肺炎克雷伯菌的出现^[14]。

4.3 IncF 质粒复制子序列分型(RST) IncF 质粒是一组具有相似复制子和转移区域的质粒家族，具有编码多耐耐药的特定区域。虽然 IncF 样质粒是窄宿主质粒，只能流行于肠杆菌科细菌中，但该质粒能够很好地适应大肠埃希菌，容易接合转移，易化了耐药的播散，是产 CTX-M 型大肠埃希菌中流行最为广泛的质粒，在全球范围内人和动物中的肠杆菌科细菌中传播。2010 年，Villa 等^[15]通过对 IncF 质粒的全基因组分析发现，IncF 质粒主要由 RepFIA、RepFIB 和 RepFII 三个基本复制子组成。并以 FII 区的 copA 基因，FIA 和 FIB 复制子蛋白的编码基因 repE 和 repB 为靶位，设计了 IncF 质粒复制子序列分型方法，提出了 FAB 分型法，对 IncF 质粒亚型进行归类。并通过分析不同地区不同来源的 IncF 质粒发现，这些携带耐药基因和毒力基因的 IncF 型以 IncFII 型质粒的流行为主，并依次将流行于克雷伯菌属(*Klebsiella* spp)、沙门氏菌属(*Salmonella* spp)、耶尔森氏菌属(*Yersinia* spp)中的 FII 质粒命名为 FI1K、FI1S、FI1Y。目前，通过质粒测序确定为 IncFII 质粒如 R100、pC15-1a、pEK516、pHK23、pKpQIL 已在日本、加拿大、英国、中国、美国被报道^[16-18]。有研究表明，肺炎克雷伯菌中的 IncFI1K 质粒编码 CTX-M-15 在单个病房的多种肠杆菌科细菌中播散，是医院产 ESBLs 肠杆菌科细菌定植的一个重要原因^[19]。香港大学的 Ho 等^[20]学者通过分析屠宰场分离的多药耐药大肠埃希菌发现，IncFII 质粒为多药耐药毒性质粒，在肠杆菌科细菌中可以有效地播散，而其携带的 fosA3 和 bla(CTX-M)可能会导致公共健康问题^[18]。

4.4 IncN 质粒的多位点序列分型(MLST) 2011 年，García-Fernaández 等^[21]又设计了 IncN 质粒的多位点序列分型法。该方法通过选择 IncN 质粒中的 repA、traJ 和 korA 3 个位点进行序列分析而对该质粒进行快速分类。并通过分析 58 株来自欧洲人和动物的 IncN 质粒发现，ST1 型 IncN 质粒编码 CTX-M-1 酶在食物链中播散，也证明了该方法可以快速、有效

地鉴定 IncN 流行质粒谱系^[21]。近年来, IncN 质粒编码的 CTX-M-55 和 RmtB(中国河南)^[11]、FosA3(中国广东)^[22]、IMP-4(中国香港)^[23]、KPC-4(美国)^[24]也相继被报道。

5 结 语

质粒介导的耐药已成为是最重要的抗菌药物耐药问题之一。虽然目前还没有有效的预防耐药质粒播散的方法或药物,但这些分型技术为调查耐药基因的流行性提供了很好的分析工具,可以有效地帮助工作者分析耐药质粒(耐药基因)在医疗环境中流行播散情况,并通过对这些耐药质粒分子特点的分析,为建立质粒消除方法和预防耐药菌的播散提供理论依据。

参考文献

- [1] Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*[J]. *Virulence*, 2012, 3(1):18-28.
- [2] Lynch JP 3rd, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae: focus on extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2013, 14(2):199-210.
- [3] Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update[J]. *Drug Resist Updat*, 2012, 15(3):133-148.
- [4] Voulgari E, Poulou A, Koumaki V, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back[J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(1):27-39.
- [5] Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones[J]. *Microb Drug Resist*, 2011, 17(1):83-97.
- [6] Carattoli A, Bertini A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing[J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(3):219-228.
- [7] Hopkins KL, Liebana E, Villa L, et al. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(9):3203-3206.
- [8] Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(6):2227-2238.
- [9] Carattoli A. Plasmids in gram negatives: molecular typing of resistance plasmids[J]. *Int J Med Microbiol*, 2011, 301(8):654-658.
- [10] García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A, et al. Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(6):1229-1233.
- [11] Pan YS, Liu JH, Hu H, et al. Novel arrangement of the bla(CTX-M-55) gene in an *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA methylase[J]. *J Basic Microbiol*, 2013. [Epub ahead of print].
- [11] Pan YS, Liu JH, Hu H, et al. Novel arrangement of the bla(CTX-M-55) gene in an *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA methylase[J]. *J Basic Microbiol*, 2013, 51(2):70-74.
- [12] García-Fernández A, Carattoli A. Plasmid double locus sequence

typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(6):1155-1161.

- [13] Cain AK, Hall RM. Evolution of IncHI2 plasmids via acquisition of transposons carrying antibiotic resistance determinants[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(5):1121-1127.
- [14] Coelho A, Piedra-Carrasco N, Bartolomé R, et al. Role of IncHI2 plasmids harbouring blaVIM-1, blaCTX-M-9, aac(6')-Ib and qnrA genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39(6):514-517.
- [15] Villa L, García-Fernández A, Fortini D, et al. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(12):2518-2529.
- [16] Woodford N, Carattoli A, Karisik E, et al. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25: H4-ST131 clone[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(10):4472-4482.
- [17] He L, Partridge SR, Yang X, et al. Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33: A-; B-type epidemic plasmid carrying blaCTX-M-65, fosA3 and rmtB from China[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(1):46-50.
- [18] Chen L, Chavda KD, Melano RG, et al. Complete sequence of a blaKPC-2-Harboring IncFIIK1 plasmid from a *klebsiella pneumoniae* sequence type 258 strain[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(3):1542-1545.
- [19] Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, et al. Dissemination of IncFII(K)-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing Enterobacteriaceae isolates from children in hospital paediatric oncology wards[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(6):510-515.
- [20] Ho PL, Chan J, Lo WU, et al. Plasmid-mediated fosfomycin resistance in *Escherichia coli* isolated from pig[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162(2/4):964-967.
- [21] García-Fernández A, Villa L, Moodley A, et al. Multilocus sequence typing of IncN plasmids[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(9):1987-1991.
- [22] Hou J, Yang X, Zeng Z, et al. Detection of the plasmid-encoded fosfomycin resistance gene fosA3 in *Escherichia coli* of food-animal origin[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(4):766-770.
- [23] Lo WU, Cheung YY, Lai E, et al. Complete sequence of an IncN plasmid, pIMP-HZ1, carrying blaIMP-4 in a *klebsiella pneumoniae* strain associated with medical travel to China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(3):1561-1562.
- [24] Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, et al. Complete nucleotide sequences of blaKPC-4- and blaKPC-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(1):269-276.

(收稿日期:2013-01-13)