

- Surg, 1989, 13(6): 715-720.
- [7] 于海静, 王颀, 杨剑敏, 等. 抗分枝杆菌药物治疗窦道型导管周围乳腺炎[J]. 中华外科杂志, 2012, 50(11): 971-974.
- [8] 高雅军, 马祥君, 汪洁, 等. 非手术治疗脓肿、窦道及瘘管型浆细胞性乳腺炎[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2013, 7(5): 59-60.
- [9] 马祥君, 汪洁, 高雅军, 等. 应用地塞米松和甲硝唑治疗急性期浆细胞性乳腺炎的疗效观察[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2008, 2(1): 110-111.
- [10] BUNDRED N J. Smoking and periductal mastitis[J]. BMJ, 1993, 307(6907): 772-773.
- [11] DIXON J M. Periductal mastitis and duct ectasia; different conditions with different aetiologies[J]. Brit J Surg, 1996, 83(6): 820-822.
- [12] 洪胜龙, 钱呈兴, 焦建平. 抗精神病药物致浆细胞性乳腺炎 11 例[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2008, 12(6): 695-696.
- [13] 刘云峰, 王宏, 段永亮. 浆细胞性乳腺炎高危因素分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2013, 27(12): 1247-1248.
- [14] YANG Y, HUANG Y, LI P, et al. Differential diagnosis for breast ductal carcinoma in situ and plasma cell mastitis by magnetic resonance imaging[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2018, 43(10): 1123-1130.
- [15] 赵惠琤, 边晔萍, 陈俊英, 等. 浆细胞性乳腺炎的超声诊断价值[J]. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(7): 556.
- [16] WANG S, MA H F, WANG X F, et al. Diagnosis of plasma cell mastitis with multi-slice spiral CT[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2005, 3(3): 199-202.
- [17] WANG G, QIN Y, ZHANG J, et al. Nipple discharge of CA153, CA125, CEA and TSGF as a new biomarker panel for breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6): 9546-9565.
- [18] FOSTER C A. VCAM-1/ α 4-integrin adhesion pathway: Therapeutic target for allergic inflammatory disorders[J]. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98(6): S270-S277.
- [19] DONG Y, YU J J, SHIBAHARA Y, et al. Intercellular adhesion molecule 1/2 and E-selectin in plasma cell mastitis: immunohistochemical study of 35 cases[J]. Hum Pathology, 2014, 45(3): 606-610.
- [20] BORASCHI D, TAGLIABUE A. The interleukin-1 receptor family[J]. Semin Immunol, 2013, 25(6): 394-407.
- [21] 王小龙, 刘兴, 苏依图, 等. 浆细胞性乳腺炎组织中 IL-1 β 及 TNF- α 的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(6): 1110-1112.
- [22] MARINE F, OPHÉLIE C, JEAN L, et al. Plasma cell mastitis in women with rheumatoid arthritis treated with TNF α antagonists: report of 2 cases[J]. Joint Bone Spine, 2016, 83(5): 593-594.
- [23] LIU Y, ZHANG J, ZHOU Y H, et al. Activation of the IL-6/JAK2/STAT3 pathway induces plasma cell mastitis in mice[J]. Cytokine, 2018, 110: 150-158.
- [24] FONSECA I, SILVA P V, LANGE C C, et al. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle[J]. Gene Mol Biol, 2009, 32(4): 776-781.
- [25] 夏亚茹, 陈红凤, 叶媚娜, 等. 非哺乳期乳腺炎患者外周血 T 淋巴细胞、免疫球蛋白及补体水平的变化[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2012, 6(5): 504-514.
- [26] 陆清, 夏亚琳, 李琼, 等. 不同时期浆细胞性乳腺炎患者的免疫功能[J]. 广西医学, 2017, 39(12): 1788-1790.
- [27] 许锐, 郭倩倩, 杨乐平, 等. 非哺乳期乳腺炎患者血液中自身抗体和免疫指标的变化及其临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(8): 1157-1159.
- [28] MERONI P L, SCHUR P H. ANA screening: an old test with new recommendations[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(8): 1420-1422.

(收稿日期: 2019-12-02 修回日期: 2020-03-28)

• 综 述 •

耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药机制及实验室检测研究进展

孙 艳 综述, 多丽波[△]审校

(哈尔滨医科大学附属第二医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘 要: 肠杆菌科细菌是重要的人类感染病原菌, 近年来, 由于抗菌药物的大量、不合理使用, 导致耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌在临床上的分离率逐年增加, 耐药情况日趋严重, 其耐药机制包括产碳青霉烯酶、外膜蛋白的缺失或合并产 AmpC 酶或超广谱 β -内酰胺酶、青霉素结合蛋白对碳青霉烯类药物亲和力下降及药物外排泵高度表达。该文就耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药机制及实验室检测研究进展进行综述。

关键词: 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 耐药机制; 碳青霉烯酶

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2020. 16. 022

中图法分类号: R446. 5

文章编号: 1673-4130(2020)16-2011-06

文献标识码: A

[△] 通信作者, E-mail: duolibob@163. com.

Research progress on the mechanism of carbapenems enterobacteriaceae drug resistance and its laboratory testing

SUN Yan, DUO Libo[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Enterobacteriaceae is an important pathogen of human infection. In recent years, due to the large number and unreasonable use of antibiotics, the isolation rate of carbapenem resistant Enterobacteriaceae has increased year by year, and the drug resistance has become increasingly serious. The mechanism of drug resistance includes the production of carbapenemase, the absence of outer membrane protein or the combination of high-yield AmpC enzyme or ESBLs, the decrease of affinity of penicillin binding protein on carbapenem and high expression of drug efflux pump. This review presents the resistance mechanism of carbapenem resistant Enterobacteriaceae and the progress of laboratory detection.

Key words: carbapenem resistant Enterobacteriaceae; resistance mechanism; carbapenemase

肠杆菌科细菌是社区和医院感染中的常见病原菌之一,20 世纪 80 年代以来,碳青霉烯类抗菌药物一直被认为是对抗产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)和 AmpC 酶肠杆菌感染的最有效手段,但近年来临床上抗菌药物的过度使用导致耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的产生,并在全球范围内呈广泛流行的趋势。2017 年中国细菌耐药监测数据显示,肠杆菌科细菌对 3 种碳青霉烯类药物的耐药率已接近 10.0%,而肺炎克雷伯菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率已上升至 20.9%和 24.0%^[1]。克隆传播及通过质粒介导的传播使 CRE 感染发病率持续升高,进而使临床上应用抗感染药物治疗的困难逐年上升。CRE 耐药机制主要包括以下几个方面:(1)产碳青霉烯酶;(2)外膜蛋白的缺失或合并产 AmpC 酶或 ESBLs;(3)青霉素结合蛋白对碳青霉烯类药物亲和力下降;(4)药物外排泵高度表达。研究 CRE 的耐药机制及实验室早期检测对临床上治疗其感染具有重要指导意义。

1 CRE 定义

2015 年美国疾病控制中心(CDC)对 CRE 定义为对任意一种碳青霉烯类抗菌药物耐药,或产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌。此外,对亚胺培南天然非敏感的细菌,如摩根摩根菌、变形杆菌、普罗威登斯菌,需对其他碳青霉烯类抗菌药物耐药。

2 CRE 耐药机制

2.1 产碳青霉烯酶 产碳青霉烯酶是肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物耐药的最重要机制。根据 Ambler 分类,碳青霉烯酶主要分为 A、B 和 D 类。其中 A 类碳青霉烯酶和 D 类碳青霉烯酶属丝氨酸酶,主要通过水解丝氨酸活性位点使药物失活;B 类碳青霉烯酶又叫金属酶,其活性中心需结合金属锌离子才能发挥催化活性。

2.1.1 A 类碳青霉烯酶 至今发现肠杆菌科细菌产

生的 A 类碳青霉烯酶包括 KPC、GES、IMI、SME 及 SFC 等,最常见的是 KPC,其他酶在我国相关报道尚少,在其他国家肠杆菌科细菌中有检出或流行。A 类碳青霉烯酶可水解几乎所有 β -内酰胺类药物,包括碳青霉烯类药物、青霉素类药物、氨曲南,其活性可被含酶抑制剂部分抑制,被硼酸完全抑制,不能被乙二胺四乙酸抑制。

肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPCs)是 A 类碳青霉烯酶中最重要的酶,由质粒编码,既可通过克隆菌株垂直传播,也可通过遗传性移动元件如转座子、质粒等水平传播,KPCs 可水解所有 β -内酰胺类药物,产 KPCs 型 CRE 仅对替加环素、多黏菌素及氨基糖苷类抗菌药物敏感。现已发现 22 种 KPCs^[2],各种 KPCs 显示出高度同源性,并通过非同义突变而不同,KPC-2 和 KPC-3 在全球范围内最常见,我国华东地区 KPC-2 检出率较高,而在我国台湾 KPC-2 及 KPC-17 检出率较高。

含有不同质粒,但具有相同遗传结构的不同克隆 Tn4401 被认为是 blaKPC 在世界范围内广泛传播的起源。有研究发现,blaKPC-2 位于 Tn4401 转座子上,其上游为 Tn4401-tnpR、Tn4401-tnpA、ISKpn7 序列,下游为 ISKpn6 序列^[3]。与上述研究不同,2014 年,LUO 等^[4]通过对从北京某医院获得的 12 株 CRE 携带的 blaKPC-2 遗传背景研究发现,blaKPC-2 位于基于转座子 Tn3 和部分 Tn4401 区段的整合结构上,其中 ISKpn8 代替了 ISKpn7。

2.1.2 B 类碳青霉烯酶 B 类碳青霉烯酶为金属酶,主要包括 5 种:VIM、IMP、NDM、GIM 和 SPM,最常见的是 IMP、NDM、VIM。B 类碳青霉烯酶能水解青霉素类、头孢菌素类和碳青霉烯类药物,不能水解氨曲南,可被乙二胺四乙酸抑制而不受含酶抑制剂的影响。

2010 年,在印度发现的 NDM-1 引起广泛关注,产 NDM-1 细菌对除替加环素与多黏菌素之外的抗菌药物均耐药,部分细菌甚至表现为泛耐药。GRUBER 等^[5]通过建立体内感染产 NDM-1 黏质沙雷菌小鼠模型,证明产 NDM-1 菌不仅广泛耐药,其半数致死量比非产 NDM-1 菌高出许多。NDM-1 主要流行于印度、巴基斯坦等南亚国家,跨境旅行是 NDM-1 在国际间传播的重要原因,而国内报道的 NDM-1 案例多无国外旅居史,因此,我国被认为是继印第安次大陆和巴尔干半岛之后的第三大 NDM 传播源。目前,已发现 24 种 NDM,在肠杆菌科细菌中检出 21 种,主要由肺炎克雷伯菌与大肠埃希菌产生。与 NDM-1 相比,各亚型通过单个或多个氨基酸的替换而不同,进而酶稳定性和活性也不同,NDM-4、NDM-5 及 NDM-7 的水解活性强于 NDM-1^[6]。blaNDM-1 位于转座子 Tn125 上两个插入序列 ISAbal25 之间,Tn125 能促进 blaNDM-1 表达而增强菌株对碳青霉烯类药物的水解活性,blaNDM-1 下游存在 bleMBL 基因,能够稳定 NDM-1 基因,其他变异型中也存在两种序列,表明遗传环境并未发生变化。

VIM 是金属酶中水解碳青霉烯类药物能力最强的酶,2003 年,MIRIAGOU 等^[7]从希腊 1 例患者尿液标本中分离的大肠埃希菌检出 VIM-1,随后,VIM 在意大利、法国和俄罗斯等欧洲国家均有检出,主要由肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌产生,blaVIM 常定位于 I 类整合子。目前,发现至少 46 种 VIM,VIM-2 在全球最常见,2013 年,我国 WEI 等^[8]首次从芜湖一家医院分离的弗氏柠檬酸杆菌中检出 VIM-4。

IMP-1 首次发现于日本黏质沙雷菌的整合子上,之后日本广泛传播产 IMP-1 型 CRE。目前至少检出 52 种 IMP,主要分布在日本、巴西等国家,国内 IMP-4 和 IMP-8 较常见,且相继在上海、湖北、广东和台湾等地有检出。

2.1.3 D 类碳青霉烯酶 D 类碳青霉烯酶又称苯唑西林酶(OXA),对青霉素类药物水解作用强而水解碳青霉烯类药物弱,不能水解超广谱头孢菌素类药物,不被克拉维酸和乙二胺四乙酸抑制,常合并其他耐药机制而增强菌株耐药性:如合并其他产碳青霉烯酶表达,外膜蛋白改变,由作为启动子的 IS 元件介导的转录增加,基因拷贝数增加,以及外排泵作用。

目前,发现 D 类碳青霉烯酶 400 余种,肠杆菌科细菌最常见为 OXA-48 及亚型。OXA-48 最初于 2004 年在土耳其分离的 CRKP 中被报道^[9],随后在包括黎巴嫩、突尼斯、埃及及摩洛哥等许多环地中海国家相继被分离并报道。2013 年美国首次报道了两株携带 OXA-48 的 CRKP 之后,在美国 OXA-48 检出率逐年上升^[10]。国内产 OXA-48 肠杆菌科细菌的传

播和暴发报道较少,目前,在我国台湾、北京及浙江等地有报道,2015 年,MA 等^[11]首次报道了分离自我国台湾地区的 4 株携带 OXA-48 的 CRKP。2016 年,GUO 等^[12]报道了产 OXA-48 肺炎克雷伯菌在北京一家医院呼吸科的暴发。

blaOXA-48 携带于 60×10^3 大小的 InCl/M 型接合质粒(JN626286)的 Tn1999 复合转座上两个插入序列 IS1999 之间,其下游是可编码调节蛋白的 ly-sR 基因。意大利学者 GIANI 等^[13]通过对大肠埃希菌携带的 blaOXA-48 基因结构分析,发现转座子 Tn1999 的变异亚型 Tn1999. 2 (JN714122) 于 blaOXA-48 上游插入了 IS1R 元件,而 Tn1999. 3 (HE617182)则在 blaOXA-48 上下游均有 IS1R 元件插入,IS1R 可充分激活 blaOXA-48,使 blaOXA-48 过度表达。

除 OXA-48 还发现多种亚型,最常见的是 OXA-181,其次包括 OXA-162、-204、-232、-244、-245、-370、-436、-438 和 -484,以及不水解或弱水解碳青霉烯类药物的 OXA-163、-247 和 -405。

2.2 外膜蛋白的缺失或合并产 AmpC 酶或 ESBLs 细菌耐药机制之一是产生外膜屏障,即通过改变膜孔蛋白结构使其与抗菌药物的结合降低。2012 年,FINDLAY 等^[14]对 1 株产 CTX-M-15 肺炎克雷伯菌进行研究,通过十二烷基硫酸钠-脉冲场凝胶电泳(SDS-PFGE)发现该菌缺乏 OmpK35 及 OmpK36,且显示对美罗培南耐药,最小抑菌浓度(MIC)值为 $8 \mu\text{mol/L}$ 。2013 年,我国学者 SHI 等^[15]报道了产 DHA-1 型 AmpC 酶合并 OmpK36 蛋白缺失的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物耐药,但该菌不产碳青霉烯酶。以上研究表明,外膜蛋白缺失或合并产 AmpC 酶或 ESBLs 可介导肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物的耐药。

2.3 青霉素结合蛋白(PBP)对碳青霉烯类药物亲和力下降 碳青霉烯类药物可与细菌内膜表面的 PBP 结合,如 PBP2 和 PBP3,破坏细胞壁合成,使细菌溶解。2013 年,有学者通过将大肠埃希菌的 MutS 及 toiC 基因敲除,构建了 1 株 PBP2 高突变率,且无外排泵活性的大肠埃希菌($\Delta\text{mutS}\Delta\text{toiC}$),发现 PBP2 不同位置的突变可导致菌株对不同类型的碳青霉烯类药物耐药^[16]。另有研究发现,编码 PBP2 和 PBP3 的基因 mrdA 和基因 fst I 的突变可分别导致 PBP2 和 PBP3 对美罗培南和厄他培南的亲和力下降,进而增强菌株对碳青霉烯类药物的耐药性^[17]。

2.4 药物外排泵的高度表达 外排泵过度表达与 CRE 的产生密切相关。我国台湾 YANG 等^[18]曾报道,通过抑制外排泵 AcrAB-TolC 的活性,可使阴沟肠杆菌对厄他培南敏感性增加。巴西 ROSA 等^[19]从

耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌中检出 AcrAR 基因,而在耐碳青霉烯类产气肠杆菌未检出该基因,但通过加入泵抑制剂羰基氰化物间氯苯腙(CCCP),证明外排泵活性存在,表明存在其他未知的外排泵。

3 CRE 的实验室检测

由 CRE 引起的感染流行是全球健康问题,早期检测 CRE 对指导临床抗菌治疗及控制感染具有重要意义。目前,可用于碳青霉烯酶的检测方法主要包括表型检测、分子技术及免疫层析法。

3.1 表型检测方法

3.1.1 改良霍奇试验(MHT)及相关试验 将指示菌与待测菌共同孵育,结果指示菌在待测菌接种线与抑菌环相交处出现增强生长,即判断为 MHT 阳性。MHT 检测 A 类碳青霉烯酶和 D 类碳青霉烯类酶的灵敏度及特异度均超过 90%,但检测 NDM 的灵敏度低于 50%。2016 年 PASTERAN 等^[20]在此基础上进行改良,通过加入非离子表面活性剂 Triton X-100(可释放固定于膜上的脂蛋白-NDM),对 145 株产酶株和 40 株非产酶株进行研究,检测 NDM 的灵敏度高达 90%。但若存在其他耐药机制(如产 ESBLs 或产 AmpC 酶联合膜孔蛋白缺失),MHT 会出现假阳性,TAKAYAMA 等^[21]发现通过加入氯唑西林可消除假阳性。MHT 所用试剂价格便宜,操作简便,2010 年美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐 MHT 为 CRE 的表型确证试验,但其耗时长,难以解释某些结果,不能区分酶类型,2018 年已从 CLSI M100-S28 文件中删除。

3.1.2 Carba NP(CNP)试验及相关试验 CNP 试验原理是碳青霉烯酶水解 β -内酰胺酶,使 pH 下降,指示剂酚红由红色变为黄色。其对 A 类碳青霉烯酶及 B 类碳青霉烯酶检测的灵敏度及特异度高达 100.0%和 94.4%,但对 OXA-48 的检测灵敏度低于 75.0%。随后,研究者对 CNP 试验进行系列改进,联合他唑巴坦及乙二胺四乙酸开发的 CNP II 试验可区分产碳青霉烯酶类型,且灵敏度及特异度均为 100.0%^[22]。改良的 BYG Carba 试验通过检测电化学信号判断结果,使结果更具有客观性,且检测 OXA-48 的灵敏度高达 93.2%^[23]。CNP 试验快速、准确,2015 年 CLSI M100-S25 文件推荐其为检测 CRE 的表型确证试验,用于流行病学和医院感染的监控。但 CNP 试验操作繁杂,需特殊试剂,不适合在常规实验室开展。

3.1.3 碳青霉烯灭活试验(CIM)及相关试验 CIM 首次由 VAN DER ZWALUW 等^[24]报道,其原理是将浸泡过待测菌液的美罗培南纸片与标准菌共同培养,通过抑菌环大小来判定产酶与否,且该研究报道检测 CRE 的结果与 PCR 一致。随后,改良碳青霉烯类失活法(mCIM)试验出现,用营养肉汤代替水制备

菌悬液,并延长孵育时间,检测 CRE 灵敏度更高。eCIM 加入金属酶抑制剂乙二胺四乙酸,其与 mCIM 联合应用可初步区分丝氨酸酶与金属酶,2018 年 CLSI 推荐二者联合使用作为鉴定产金属 β -内酰胺酶(MBL)肠杆菌科细菌的方法。CIM 操作简单,价格低廉,试剂易获得,目前已在微生物实验室开展应用。

3.1.4 流式细胞术(FC) FC 是一种快速、准确分析细胞结构及其功能参数的高通量技术,近年来,FC 被应用于 CRE 的检测。FC 原理是药物作用于细菌,细胞膜通透性改变,利用荧光染料染色,通过 FC 测得荧光强度的变化而反映药物的抗菌活性。2016 年,SILVA 等^[25]通过加入一种细胞膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料 DiBAC4(3),并结合不同产碳青霉烯酶抑制剂,建立了一种基于 FC 可区分不同类型产碳青霉烯酶的表型检测方法,其检测 CRE 灵敏度及特异度均为 100.0%。FC 具有可定量分析、简便、耗时短等优点,但其所需设备昂贵,未在常规实验室开展。

3.1.5 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-MS) 近年来,MALDI-TOF-MS 广泛应用于检测细菌耐药性,其原理是将待检菌与抗菌药物共同孵育,通过 MALDI-TOF-MS 检测抗菌药物水解或脱羧产物相对于其原始相对分子质量的变化,判断是否产生水解该抗菌药物的酶。2015 年,LASSERRE 等^[26]以亚胺培南作为反应底物,以亚胺培南与其产物峰面积的比值定义产酶株,检测结果灵敏度为 99.0%,特异度为 100.0%。由于 OXA 类酶水解活性弱,采用 MALDI-TOF-MS 检测 OXA 类酶的灵敏度仅为 76.0%,PAPAGIANNITSIS 等^[27]加入 NH_4HCO_3 ,将反应液 pH 调至 7.0,使 MALDI-TOF-MS 检测 OXA-48 的灵敏度达 98.0%。MALDI-TOF-MS 是一种快速、低成本、高通量的 CRE 检测方法,但其只能检测产酶 CRE,且质谱仪价格昂贵,方法尚未标准化。

3.2 分子检测方法 上述表型检测方法均不能确定 CHLBs 基因型,结果仍需分子检测技术确证基因型。传统 PCR 实验耗时长、效率低,且产物易污染,基于 PCR,临床上开发了更为快速、高效、准确的分子检测方法。

3.2.1 环介导等温扩增法(LAMP) LAMP 检测原理为针对靶基因上的 6 个区域设计 4 条引物,利用链置换 DNA 聚合酶在恒温条件下扩增,通过观察白色沉淀判断靶基因的存在。CHENG 等^[28]利用 Bst 聚合酶扩增基因,以 SYBR 为指示剂检测 CHLBs 基因(NDM、KPC、IMP 及 VIM),结果与传统 PCR 完全一致。基于 LAMP 的试剂盒也相继开发,eazyplexw[®] SuperBug CRE 系统有很高的通用性和准确性,可快速检测含有各种 CHLBs 耐药决定簇的菌株,该系统

可检测的基因型包括 VIM(1-37)、NDM(1-7)、KPC(2-15)、OXA-48 家族(OXA-48、-162、-204 和-244)、CTX-M-1 及 CTX-M-9 ESBL 家族^[29]。

3.2.2 二代测序(NGS) NGS 即高通量测序,是一种全基因组测序,具有高输出量和高解析度的特性,可提供丰富的遗传学信息,KHONG 等^[30]利用 NGS 对 33 株 CRE 测序,发现一种新型 NDM 质粒-pSg1-NDM,表明 NGS 可检出突变或新型基因型。NGS 还可检测整合子和转座子等,发现其他耐药机制如外膜蛋白缺失,外排泵过度表达等。NGS 可同时完成菌株流行病学和耐药机制的研究,对院内感染控制提供指导,但 NGS 成本高,需专业技术及设备,未能得到广泛应用。

3.3 免疫学方法 最近发展起来的一种抗体介导的检测产碳青霉烯酶的免疫分析方法,利用 CHLBs 免疫小鼠获得单克隆抗体,进而通过抗原抗体特异反应检测待测菌,基于此原理开发的试剂盒 Carba5 可同时检测 5 种产碳青霉烯酶,包括:NDM-1(-4、-5、-6、-7、-9)、KPC-2(-3)、IMP-1(-8、-11)、OXA-48(-162、-181、-204、-232、-244、-517、-519、-535)及 VIM-1(-2、-4、-19),特异度和灵敏度均为 100.0%^[31]。Carba5 可直接检测单个菌落、尿液标本或血培养标本,检测下限为 10⁶ CFU/mL,快速(15 min),易于实施,可在常规实验室中进行,但此方法只能检测产酶 CRE。

4 结 语

近几十年来,CRE 在世界范围内广泛传播,对人类健康构成巨大威胁。质粒介导的碳青霉烯酶基因的水平传播是 CRE 流行激增的主要原因,目前常见的产碳青霉烯酶为 KPC、VIM、NDM、IMP 和 OXA 家族,国内以 KPC、NDM 及 IMP 为主,OXA-48 报道尚少,但也有零星报道及暴发流行^[11-12],应引起重视。另外,产酶菌株已从产单一碳青霉烯酶发展到产多种碳青霉烯酶,研究发现同时产多种产碳青霉烯酶会增加菌株耐药性,进而增加临床用药难度。面对 CRE 的快速传播,实验室应根据本地区 CRE 流行特点,选择高灵敏度及高特异度的检测方法对 CRE 早期检测,以期在一定程度上控制 CRE 的感染和流行,同时,对 CRE 耐药机制的深入研究将有助于指导临床合理用药及新型药物的研发。

参考文献

- [1] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2018,18(3):241-251.
- [2] 郭亚涛,郭静. KPC 型碳青霉烯酶研究进展[J]. 中国现代医药志,2016,18(1):98-100.
- [3] CUZON G, NAAS T, TRUONG H, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lacta-

- mase blaKPC-2 gene[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(9): 1349-1356.
- [4] LUO Y, YANG J, YE L, et al. Characterization of KPC-2-producing *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Klebsiella oxytoca* isolates from a Chinese hospital[J]. Microb Drug Resist, 2014, 20(4): 264-269.
- [5] GRUBER T M, GÖTTIG S, MARK L, et al. Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring blaNDM-1[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(4): 1026-1030.
- [6] AHMAD N, ALI S M. Detection of New Delhi Metallo- β -Lactamase Variants NDM-4, NDM-5, and NDM-7 in *Enterobacter aerogenes* isolated from a neonatal intensive care unit of a north india hospital: a first report[J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(2): 161-165.
- [7] MIRIAGOU V, TZELEPI E, GIANNELI D, et al. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1[J]. Antimicrob Agents Ch, 2003, 47(1): 395-397.
- [8] WEI YAN, WANG JIE. First detection of VIM-4 Metallo- β -Lactamase-Producing *Citrobacter freundii* in China[J]. Ann Lab Med, 2013, 33(1): 84-85.
- [9] POIREL L, HERITIER C, TOLUN V, et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Ch, 2004, 48(8): 15-22.
- [10] LASCOLS C, PEIRANO G, HACKEL M, et al. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America[J]. Antimicrob Agents Ch, 2013, 57(1): 130-136.
- [11] MA L, WANG J T, WU T L, et al. Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0139152.
- [12] GUO L, AN J, MA Y, et al. Nosocomial outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: clonal transmission of ST147 and ST383[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160754.
- [13] GIANI T, CONTE V, DI PILATO V, et al. *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative[J]. Antimicrob Agents Ch, 2012, 56(4): 2211-2213.
- [14] FINDLAY J, HAMOUDA A, DANCER S J. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(2): 140-146.
- [15] SHI W, LI K, JI Y, et al. Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin *OmpK36* loss and *DHA-1* β -lactamase production[J]. Braz J Microbiol, 2013, 44(2): 435-442.
- [16] YAMACHIKA S, SUGIHARA C, KAMAI Y. Correla-

- tion between penicillin-binding protein mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 3): 429-436.
- [17] ADLER M, ANJUM M, ANDERSSON DI. Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrdA*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(5): 1188-1198.
- [18] YANG F C, YAN J J, HUNG K H. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(2): 223-226.
- [19] ROSA J F, RIZEK C, MARCHI A P, et al. Clonality, outer-membrane proteins profile and efflux pump in KPC-producing *Enterobacter* sp. in Brazil[J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 69-73.
- [20] PASTERAN F, GONZALEZ L J, ALBORNOZ E, et al. Triton hodge test: improved protocol for modified hodge test for enhanced detection of ndm and other carbapenemase producers[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(3): 640-649.
- [21] TAKAYAMA Y, ADACHI Y, NIHONYANAGI S. Modified Hodge test using Mueller-Hinton agar supplemented with cloxacillin improves screening for carbapenemase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* [J]. *J Med Microbiol*, 2015, 64(7): 774-777.
- [22] DORTET L, POIREL L, NORDMANN P. Rapid identification of carbapenemase types in *enterobacteriaceae* and *pseudomonas* spp. by using a biochemical test[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2012, 56(12): 6437-6440.
- [23] BOGAERTS P, YUNUS S, MASSART M, et al. Evaluation of the BYG carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(2): 349-358.
- [24] VAN DER ZWALUW K, DE HAAN A, PLUISTER G N, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0123690.
- [25] SILVA A P, FARIA-RAMOS I, RICARDO E, et al. Rapid flow cytometry test for identification of different carbapenemases in *Enterobacteriaceae* [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2016, 60(6): 3824-3826.
- [26] LASSERRE C, DE SAINT MARTIN L, CUZON G, et al. Efficient detection of carbapenemase activity in *enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(3): 2163-2171.
- [27] PAPAGIANNITSIS C C, STUDENTOVÀ V, IZDEBSKI R, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(5): 1731-1735.
- [28] CHENG C, ZHENG F. Rapid detection of blaNDM, blaKPC, blaIMP, and blaVIM carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Microb Drug Resist*, 2014, 20(6): 533-538.
- [29] GARCÍA-FERNÁNDEZ S, MOROSINI M I, MARCO F, et al. Evaluation of the eazyplex[®] Super bug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical *Enterobacteriaceae* isolates recovered at two Spanish hospitals[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(4): 1047-1050.
- [30] KHONG W X, MARIMUTHU K, TEO J, et al. Tracking inter-institutional spread of NDM and identification of a novel NDM-positive plasmid, pSg1-NDM, using next-generation sequencing approaches [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(11): 3081-3089.
- [31] BOUTAL H, VOGEL A, BERNABEU S, et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(4): 909-915.

(收稿日期: 2019-11-16 修回日期: 2020-03-15)

• 综 述 •

硫酸酯酶代谢障碍所致疾病的研究进展

江 畅 综述, 姜晓峰[△] 审校

(哈尔滨医科大学附属第四医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘 要: 硫酸酯酶是一类通过水解类固醇硫酸盐等底物中的硫酸酯键来发挥分解代谢作用的酶类。目前对于硫酸酯酶的研究一般局限于单基因单疾病, 而缺乏系统的介绍。该文总结了硫酸酯酶家族成员包括硫酸酯酶及硫酸酯酶修饰因子, 并对硫酸酯酶家族代谢障碍所致疾病及硫酸酯酶与过敏性哮喘的关系进行了综述。

关键词: 硫酸酯酶; 代谢; 过敏性哮喘

[△] 通信作者, E-mail: jiangxiaofeng12359@163.com。

本文引用格式: 江畅, 姜晓峰. 硫酸酯酶代谢障碍所致疾病的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(16): 2016-2020.