

• 短篇论著 •

云南地区肿瘤患者 CRE 菌株的表型筛选与耐药基因相关性研究*

杨晓芳¹, 杜艳^{2△}, 杨伟¹, 张曦¹

1. 云南省肿瘤医院检验科, 云南昆明 650118; 2. 昆明医科大学第一附属医院检验科, 云南昆明 650118

摘要:目的 探讨云南地区肿瘤患者碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(CRE)菌株的表型筛选与耐药基因的相关性。方法 收集 2015 年 1 月至 2018 年 12 月云南省肿瘤医院临床科室送检标本中分离得到的 31 株 CRE, 采用改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)、乙二胺四乙酸碳青霉烯类灭活试验(eCIM)进行碳青霉烯酶表型筛选, PCR 特异性扩增 CRE 耐药基因 A、B、D 类, 比较分析 CRE 菌株 mCIM、eCIM 表型筛选与耐药基因扩增的相关性。结果 31 株 CRE 中, 26 株碳青霉烯酶基因阳性菌株, 其 mCIM 检测全部为阳性。以碳青霉烯酶 PCR 检测结果为“金标准”, mCIM 检测碳青霉烯酶的灵敏度和特异度分别为 100.0%、80.0%, 与 PCR 检测的一致性程度为“几乎完全一致”(Kappa=0.870, $P<0.001$); eCIM 检测金属酶的灵敏度和特异度分别为 100.0%、53.8%, 与 PCR 检测的一致性程度为“中等一致”(Kappa=0.518, $P<0.001$); mCIM 联合 eCIM 检测碳青霉烯酶总的灵敏度和特异度分别为 73.1%、80.0%, 检测丝氨酸碳青霉烯酶的灵敏度为 50.0%, 检测金属酶的灵敏度为 100.0%, 与 PCR 检测的一致性程度为“高度一致”(Kappa=0.624, $P<0.001$)。结论 mCIM、eCIM 表型筛选试验在云南地区肿瘤患者中与耐药基因有高度的一致性, 值得推广使用, 但要注意 eCIM 对于携带 blaKPC-2 型的碳青霉烯酶存在假阳性。

关键词:碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌; 改良碳青霉烯灭活试验; 乙二胺四乙酸碳青霉烯类灭活试验; 耐药基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.03.028

中图法分类号:R387.2

文章编号:1673-4130(2021)03-0376-04

文献标志码:A

碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(CRE)临床治疗失败率高, 病死率高, 严重威胁患者健康。CRE 耐药机制最常见的是产碳青霉烯酶, 2017 年美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐采用改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)检测碳青霉烯酶, 但是其不能区分酶的类型, 2018 年 CLSI 又加入了乙二胺四乙酸(EDTA)碳青霉烯类灭活试验(eCIM), 与 mCIM 联合, 用于区分肠杆菌科中产金属酶和丝氨酸碳青霉烯酶的菌株^[1], 这对于临床用药有非常重要的指导意义。用药习惯的不同使不同时期、不同地域 CRE 的临床感染特点和耐药性各有差异, 肿瘤患者是 CRE 的易感人群, 一旦发生 CRE 感染, 后果十分严重。有研究显示, 肿瘤医院耐药菌的检出率高于综合性医院^[2], 还有研究发现, 使用了大剂量化疗药物的患者, 长期应用广谱抗菌药物后, 其医院感染率高达 20%, 说明肿瘤患者的耐药情况有别于一般患者^[3]。本研究选取云南省肿瘤医院肿瘤患者分离的 CRE 菌株, 进行 mCIM 与 eCIM 表型筛选, 并与耐药基因进行比较, 明确表型筛选试验在肿瘤患者当中的临床适用度, 为 CRE 院内感染的防控和优化临床用药提供参考, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2015 年 1 月至 2018 年 12 月云南省肿瘤医院临床科室送检的 31 株 CRE, 菌株采用法国生物梅里埃公司生产的全自动微生物鉴定与药敏分析系统 VITEK-2 及其配套的 GN 卡、AST-GN14 卡进行检测, 分离出至少对亚胺培南(IPM)、美罗培南或厄他培南中的一种耐药的肠杆菌科细菌, 定义为 CRE。收集到的 31 株菌株分离提纯后纸片法留菌冻存于 -80 °C 冰箱。质控菌株:肺炎克雷伯菌 ATCCBAA1705、ATCCBAA1706、ATCCBAA2146。

1.2 试剂与仪器 美罗培南药敏纸片购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; TSB 干粉购自杭州滨和微生物试剂有限公司; PCR 所用试剂、琼脂糖、5×TBE、DNA 分子量标准、凝胶染色试剂(GelRed)、引物均购自上海生工生物工程有限公司; 乙二胺四乙酸二钾购自上海试剂一厂; 哥伦比亚血琼脂平板、MH 琼脂平板购自郑州安图生物工程股份有限公司; Vitek-2 全自动微生物鉴定与药敏分析仪购自法国生物梅里埃公司; 恒温金属浴(HB120-S)购自大龙兴创实验仪器(北京)有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪(ViiA7 Dx)

* 基金项目:2017 年云南省医学学科带头人培养项目(D-2017023)。

△ 通信作者, E-mail:489600411@qq.com。

本文引用格式:杨晓芳, 杜艳, 杨伟, 等. 云南地区肿瘤患者 CRE 菌株的表型筛选与耐药基因相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42

购自美国 ABI 公司;电泳仪(power pac200)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种复苏 取出冻存于-80℃冰箱中的细菌恢复至室温,用无菌镊子夹取适量沾有细菌的纸片分区划线接种于血琼脂平板,平板上做好标记后放于 37℃孵箱中孵育 18~20 h。

1.3.2 mCIM 与 eCIM 联合检测 31 株菌株均进行 mCIM 与 eCIM 联合检测,操作及结果判读严格按照 2018 年 CLSI-M100 文件执行^[1]。

1.3.3 碳青霉烯酶基因检测 煮沸法提取细菌 DNA 模板,PCR 扩增碳青霉烯酶类耐药基因,包括 blaKPC-2、blaSME、blaNDM-1、blaIMP、blaVIM、blaOXA-48 共 6 种^[4],见表 1。PCR 扩增体系为 25 μL:2×Tap PCR Master Mix 12.5 μL,DNA 模板 1 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,ddH₂O 9.5 μL。反应条件为:95℃预变性 5 min(blaKPC-2 为 94℃ 3 min,blaIMP 和 blaVIM 为 94℃ 5 min);94℃变性 45 s(blaNDM-1 为 94℃ 30 s),55℃退火 45 s(blaKPC-2 为 56℃ 45 s,blaNDM-1 为 63℃ 30 s,blaIMP 为 53℃ 45 s),72℃延伸 1 min(blaNDM-1 为 72℃ 45 s),30 个循环;72℃终延伸 10 min(blaNDM-1 为 72℃ 3 min)。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后,紫外凝胶成像仪观察结果。

表 1 碳青霉烯酶基因 PCR 扩增引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
blaKPC-2	F:GCT ACA CCT AGC TCC ACC TTC	989
	R:ACA GTG GTT GGT AAT CCA TGC	
blaSME	F:AAC GGC TTC ATT TTT GTT TAG	830
	R:GCT TCC GCA AIA GTT TIA TCA	
blaNDM-1	F:GGG CAG TCG CTT CCA ACG GT	475
	R:GTA GTG CTC AGT GTC GGC AT	
blaIMP	F:CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG	587
	R:AAC CAG TTT TGC CTT ACC AT	
blaVIM	F:AGT GGT GAG TAT CCG ACA G	261
	R:ATG AAA GTG CGT GGA GAC	
blaOXA-48	F:GCG TGT ATT AGC CTT ATC GGC	722
	R:GGC ATA TCC AIA TTC ATC GC	

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件处理数据,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。以 PCR 结果为“金标准”,计算 mCIM 和 eCIM 检测的灵敏度和特异度,并分别与基因检测结果进行一致性分析,其中 Kappa 0.0~0.20 为极低一致,>0.20~0.40 为一般一致;>0.40~0.60 为中等一致,>0.60~0.80 为高度一致,>0.80~1.00 为几乎完全一致。以 $P<0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株信息 云南省肿瘤医院 CRE 菌株以肺炎克雷伯菌(15 株,占 48.4%)为主,其次依次为大肠埃希菌 7 株,阴沟肠杆菌 3 株,产酸克雷伯菌和弗氏柠檬酸杆菌各 2 株,产气肠杆菌和克氏柠檬酸杆菌各 1 株。31 株 CRE 分离自 8 种不同类型的标本,其中尿液 12 例,体液 9 例,痰 3 例,血 2 例,咽拭子 2 例,脑脊液、分泌物、引流液各 1 例,其中尿液标本所占比例最高(38.7%)。感染年龄多集中在中老年人群,40 岁以下患者仅 1 例(3.2%),60 岁以上患者 14 例(45.2%)。科室分布主要集中在外科,其中重症医学科 7 株,泌尿外科 7 株,神经外科 5 株,腹部外科 5 株,结直肠外科 2 株,放射治疗科、姑息医学科、骨科、微创介入科、胸外科各 1 株。直肠癌、膀胱癌、颅内肿瘤是分离 CRE 最多的 3 种肿瘤类型。

2.2 mCIM 与 eCIM 检测 31 株 CRE 中,mCIM 检测阳性 27 株(87.1%),eCIM 检测阳性 20 株(64.5%),不解释的有 4 株(12.9%)。mCIM 和 eCIM 联合检测判断为丝氨酸碳青霉烯酶 7 株(22.6%),金属酶 20 株(64.5%),碳青霉烯酶阴性 4 株(12.9%)。

2.3 耐药基因检测情况 31 株 CRE 菌株中,26 株检出碳青霉烯酶耐药基因,阳性率为 83.9%。31 株 CRE 菌株包括 11 株 blaKPC-2 基因(阳性率 35.5%),12 株 blaNDM-1 基因(阳性率 38.7%),2 株 blaIMP 基因(阳性率 6.5%),1 株同时扩增出 blaKPC-2 和 blaNDM-1 基因(3.2%),5 株未扩增出 6 种耐药基因(16.1%),blaSME、blaVIM、blaOXA-48 3 种耐药基因经 PCR 检测均为阴性。肺炎克雷伯菌以 blaKPC-2 基因型为主(10 株),占肺炎克雷伯菌的 66.7%;大肠埃希菌以 blaNDM-1 基因型为主(5 株),占大肠埃希菌的 71.4%。

2.4 mCIM、eCIM 表型筛选与耐药基因的相关性 26 株碳青霉烯酶基因阳性菌株中,mCIM 检测全部为阳性。以 PCR 检测结果为“金标准”,mCIM 检测碳青霉烯酶的灵敏度和特异度分别为 100.0%、80.0%,与 PCR 检测的一致性程度为“几乎完全一致”(Kappa=0.870, $P<0.001$);eCIM 检测金属酶的灵敏度和特异度分别为 100.0%、53.8%,与 PCR 检测的一致性程度为“中等一致”(Kappa=0.518, $P<0.001$);mCIM 联合 eCIM 检测碳青霉烯酶总的灵敏度和特异度分别为 73.1%、80.0%,检测丝氨酸碳青霉烯酶的灵敏度为 50.0%,检测金属酶的灵敏度为 100.0%,与 PCR 检测的一致性程度为“高度一致”(Kappa=0.624, $P<0.001$)。有 1 株弗氏柠檬酸杆菌耐药基因检测为阴性,但 mCIM 为阳性。1 株同时含有 KPC-2 和 NDM-1 基因型的菌株 mCIM 为阳性,

eCIM 为阴性。有 6 株基因型为 KPC-2 的肺炎克雷伯菌 eCIM 检测为阳性。见表 2、3。

表 2 31 株 CRE 碳青霉烯酶基因检测和 mCIM、eCIM 结果分布 (n)

基因检测	n	mCIM		eCIM	
		阳性	阴性	阳性	阴性
基因阳性	26	26	0	20	6
KPC-2	11	11	0	6	5
NDM-1	12	12	0	12	0
IMP-4	2	2	0	2	0
KPC-2 和 NDM-1	1	1	0	0	1
基因阴性	5	1	4	0	1&4(-)

注：-表示当 mCIM 为阴性时，eCIM 结果不解释。

表 3 mCIM 联合 eCIM 与 PCR 检测结果判读的比较 (n)

mCIM 联合 eCIM	基因检测				合计
	丝氨酸碳青霉烯酶	金属酶	阴性	丝氨酸+金属酶	
阳性	11	14	1	1	27
丝氨酸碳青霉烯酶	5	0	1	1	7
金属酶	6	14	0	0	20
阴性	0	0	4	0	4
合计	11	14	5	1	31

3 讨论

近 30 年来,CRE 流行足迹已遍布美洲、欧洲、亚洲、非洲等多个国家和地区,在我国,CRE 的流行情况同样十分严峻。全国细菌耐药监测网(1 307 家医院)数据显示 CRE 的检出率逐年上升,碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌检出率从 2013 年的 4.9% 上升至 2017 年的 9.0%,且 CRE 检出呈现地域性差异,2017 年 CRE 检出率在上海市和河南省高达 25.0% 以上^[5]。可见,CRE 菌株的迅速蔓延是国内外共同面临的严峻挑战。

美国 9 个实验室对 mCIM 进行评估,表明其检测碳青霉烯酶的灵敏度和特异度均达到 90% 以上^[6]。本研究 mCIM 检测的阳性率为 87.1%,检测碳青霉烯酶的灵敏度达到了 100.0%,与相关文献研究结果一致^[6-10],但特异度低于有关文献的报道^[6,8,11-13]。mCIM 与 PCR 检测的一致性程度为“几乎完全一致”(Kappa=0.870, P<0.001),与马玉兰等^[8]报道的一致性程度相符(Kappa=0.851)。本研究 mCIM 特异度偏低,推测可能的原因为:(1)菌株总数及基因阴性菌株数量较少,存在标本数量的差异性。(2)PCR 扩增只能对已知的编码基因进行检测,若该菌株存在少见或未知的耐药基因则会导致碳青霉烯酶基因检测结果呈假阴性。TAMMA 等^[14]对 11 种碳青霉烯酶表型筛选方法针对产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的筛选能力进行了比较,研究表明 mCIM 试验对 KPC、NDM、IMP 基因型的灵敏度分别为 98%、100%、83%。ZHOU 等^[15]研究报道显示,mCIM 检测的灵敏度均>98%,而本研究中 3 种基因型的灵敏度均为

100%,说明 mCIM 对于肿瘤患者 KPC、NDM、IMP 基因型也具有较高的灵敏度。

本研究结果显示,eCIM 对于 KPC-2 基因型的鉴别能力不足,容易出现假阳性结果,应引起重视。虽然张凡等^[9]、马玉兰等^[10]的研究中也发现 KPC-2 基因型为阳性同时 eCIM 也为阳性的菌株。笔者查阅文献推测可能的原因为:(1)菌株间存在地区差异性,及肿瘤患者自身用药问题;(2)eCIM 本身方法学问题:①EDTA 对细菌生长也有一定抑制作用,可能通过增强细胞膜的通透性导致对抗菌药物敏感;②EDTA 对少量丝氨酸碳青霉烯酶,如 KPC、OXA-48 等,也存在抑制现象,会导致假阳性。但 EDTA 对细菌生长的抑制作用对 eCIM 结果影响有多大及多少剂量的 EDTA 可以引起假阳性结果还有待后续实验进一步证实。本研究有 1 株同时含有 KPC-2 和 NDM-1 基因型的菌株 eCIM 为阴性,马玉兰等^[10]的研究也发现 3 株同时含有 KPC-2 和 NDM-1 基因型的菌株 eCIM 为阴性,这与相关研究结果一致^[1],eCIM 阴性结果不能排除金属酶的可能性,菌株可能同时含有 2 种耐药基因。

通过 Kappa 一致性比较分析发现,mCIM、eCIM 在云南地区肿瘤患者中与耐药基因有高度的一致性,联合检测能同时区分碳青霉烯酶的类型,且该方法操作简便,不需要特殊仪器,成本低廉,值得推广使用。

本研究肺炎克雷伯菌以 blaKPC-2 基因型为主,大肠埃希菌以 blaNDM-1 基因型为主。查阅文献发现,对耐碳青霉烯酶的大肠埃希菌的研究报道较少,本研究虽然大肠埃希菌只有 7 株,却发现 5 株均为 blaNDM-1 基因型,故本研究对于临床用药有指导意义,提示可以根据检出菌的种类来指导用药,如果为大肠埃希菌,可优先考虑对金属酶有效的药物,新型抗菌药物头孢他啶/阿维巴坦可能无效,同时应提高对此类菌的院内感染监测,防止耐药菌的传播。

本研究中老年人更易感染 CRE,老年患者由于脏器功能减退及自身免疫力下降,是感染的高危人群,在 CRE 的防治中应重点关注老年人。本研究 CRE 分布最多的科室是重症医学科,这与重症医学科患者大多感染重及脏器功能弱有关。本研究中尿液标本所占比例最大,可能因为部分肿瘤患者长期留置导尿管,增加了病原菌的感染机会,所以在临床诊治过程中应注意及时更换或者拔除尿管,减少不必要的有创操作,以免引起多重耐药菌的感染。

参考文献

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty eighth informational supplement: M100-S28[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.

[2] 王丽丽, 吴晓燕, 张金业. 肿瘤专科医院肺炎克雷伯菌耐药性特征[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(11): 1666-1669.

- [3] IOANNIDIS O, SEKOULI A, PARASKEVAS G, et al. Metachronous early gastric adenocarcinoma presenting coinstantaneously with complete remission of stage IV gastric MALT lymphoma [J]. Arab J Gastroenterol, 2013, 14(1): 20-23.
- [4] 刘淑敏. 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌检测及其临床感染特征和危险因素分析[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [5] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 2017 年全国细菌耐药监测报告[EB/OL]. (2018-11-30)[2020-02-10]https://max.book118.com/html/2018/1206/7056020045001163.shtm.
- [6] PIERCE V M, SIMNER P J, LONSWAY D R, et al. The modified carbapenem inactivation method (mcim) for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2321.
- [7] SFEIR M, HAYDEN J A, FAUNTLEROY K A, et al. EDTA-modified carbapenem inactivation method (eCIM): a phenotypic method for detecting metallo-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2019, 12(2): 333-346.
- [8] 马玉兰, 宋文杰, 梁屹, 等. CIM 与 mCIM 筛选肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶能力比较[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(8): 943-948.
- [9] 张凡, 李耘, 甘露. 改良碳青霉烯灭活试验在检测肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶中的应用评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(24): 2857-2860.
- [10] 马玉兰, 宋文杰, 李继红, 等. mCIM 与 eCIM 筛选肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的效果评价[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 650-654.
- [11] PRAGASAM A K, VEERARAGHAVAN B, BAKTH AVA TCHALAM Y D, et al. Strengths and limitations of various screening methods for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae including new method recommended by clinical and laboratory standards institute, 2017: a tertiary care experience [J]. Indian J Med Microbiol, 2017, 35(1): 116-119.
- [12] 闫玲, 翟菁华, 顾兵, 等. mCIM 法检测产碳青霉烯酶菌株的性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(4): 321.
- [13] KUCHIBIRO T, KOMATSU M, YAMASAKI K, et al. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. J Infect Chemother, 2018, 24(4): 262-266.
- [14] TAMMA P D, OPENE B N, GLUCK A, et al. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(4): 1046.
- [15] ZHOU M, WANG D, KUDINHA T, et al. Comparative evaluation of four phenotypic methods for detection of class A and B Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in China [J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(8): 312-315.

(收稿日期: 2020-05-05 修回日期: 2020-08-16)

• 短篇论著 •

p16/Ki-67 细胞双染对 HR-HPV 阳性的宫颈高级别鳞状上皮内病变的预测价值*

东 蓓, 周素芳[△], 张 璇

苏州高新区人民医院妇产科, 江苏苏州 215129

摘要:目的 探讨 p16/Ki-67 细胞双染对宫颈高级别鳞状上皮内病变(HSIL)的预测价值。方法 以 2018 年 7 月至 2019 年 7 月该院高危型人乳头状瘤病毒检测阳性患者为研究对象, 进行 p16/Ki-67 细胞双染、宫颈液基细胞薄层技术(TCT)及阴道镜下宫颈活检。以病理结果作为“金标准”, 评价 p16/Ki-67 细胞双染和 TCT 的筛查效能。**结果** 共 297 例患者纳入研究, HSIL 及以上者占 16.84%(50/297), p16/Ki-67 总阳性率为 32.66%(97/297), TCT 提示意义不明的不典型鳞状细胞及以上者占 21.21%(63/297)。p16/Ki-67 细胞双染对 HSIL 的灵敏度、特异度、阳性似然比、受试者工作特征曲线下面积均高于 TCT, 2 种方法对 HSIL 的检测差异有统计学意义($P < 0.001$)。**结论** p16/Ki-67 细胞双染对 HSIL 检测效果较 TCT 更佳, 建议临床推广。

关键词: p16/Ki-67 细胞双染; 高危型人乳头状瘤病毒; 宫颈液基细胞薄层技术; 宫颈高级别鳞状上皮内病变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.03.029

中图法分类号: R737.33

文章编号: 1673-4130(2021)03-0379-04

文献标志码: A

宫颈癌在发展中国家病死率较高, 及时诊治宫颈高级别鳞状上皮内病变(HSIL)在一定程度可预防该

病^[1-3]。宫颈鳞状上皮内病变(SIL)与高危型人乳头状瘤病毒(HR-HPV)感染密切相关^[4-8]。

* 基金项目: 2015 年苏州市民生科技指导项目(SYSD2015065)。

[△] 通信作者, E-mail: zhousuf@sina.com。