

- posttreatment with synthetic C-reactive protein in murine bacterial peritonitis via activation of FcγRI-expressing kupffer cells[J]. J Innate Immun, 2021, 13(5):306-318.
- [5] 王倩,魏小萌,万品文,等. LncRNANEAT1、miR-146a 及 TLR2 通路相关因子在特应性皮炎小鼠模型中的表达[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2021, 35(8):869-875.
- [6] 杨芳芳,尚朋娟. 盐酸氨溴索联合常规治疗对新生儿肺炎的支气管黏膜纤毛结构及炎症因子的影响[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(2):229-232.
- [7] 庄箭波,顾岚,马岩,等. 经鼻高流量湿化氧疗对新生儿肺炎血清 CRP、PCT、IL-6 水平的影响[J]. 河北医药, 2020, 42(23):3552-3555.
- [8] 刘倩,闫俊梅. 人免疫球蛋白联合经鼻高流量湿化氧疗辅助治疗重症新生儿肺炎的临床效果[J]. 国际免疫学杂志, 2021, 44(3):274-279.
- [9] ZHANG D, LEE H, WANG X, et al. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation[J]. Thorax, 2019, 74(9):865-874.
- [10] 田静,惠晓君,张靖,等. PPAR γ 基因多态性与新生儿肺炎易感性及血清炎症细胞因子的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(3):31-35.
- [11] 范旭升,陈杰华. 氨溴索联合布地奈德混悬液雾化吸入治疗新生儿肺炎疗效观察[J]. 海南医学, 2020, 31(11):1415-1418.
- [12] WANG L, WANG Y, QUAN J. Exosomal miR-223 derived from natural killer cells inhibits hepatic stellate cell activation by suppressing autophagy[J]. Mol Med, 2020, 26(1):81.
- [13] 王星果,曲亮,窦套存,等. miR-223 的表达调控及生物功能研究进展[J]. 生命科学, 2019, 31(9):945-951.
- [14] YUAN S, WU Q, WANG Z, et al. MiR-223: an immune regulator in infectious disorders [J]. Front Immunol, 2021, 12:781815.
- [15] 谢文静,江裕,陈溶微,等. 血清 miR-223、miR-155 检验对小儿肺炎支原体感染的诊断价值分析[J]. 右江医学, 2022, 50(4):275-279.
- [16] 王琳,高洁,耿芳. 脓毒症患儿外周血 miR-146a、miR-223 的表达及与预后的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(10):1172-1176.
- [17] 梁淳,尹蕾,田伟. 肺炎支原体肺炎患儿血浆 miR-223、miR-21 水平变化及其与 T 淋巴细胞亚群、炎症因子的关系研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(3):274-277.
- [18] 方旭仙,施忆玫,谢海清. 肺炎新生儿和健康新生儿血清内皮素与表皮生长因子水平差异及相关性分析[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(9):2083-2085.
- [19] D'ANTONA P, CATTONI M, DOMINIONI L, et al. Serum miR-223: a validated biomarker for detection of early-stage non-small cell lung cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28(11):1926-1933.
- [20] 石安惠,牟杰. 重症肺炎患者外周血 TLR2、TLR4 表达情况及与炎症因子的关系[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(7):933-936.

(收稿日期:2022-05-10 修回日期:2022-09-18)

• 短篇论著 •

基于免疫显色法分析 137 例儿童耐碳青霉烯革兰阴性菌的碳青霉烯酶表型

李 焯, 陈 楠

天津市儿童医院检验科, 天津 300134

摘要:目的 对免疫显色法与 PCR 检测耐碳青霉烯酶表型的结果进行对比分析;分析 2019—2020 年住院患儿耐碳青霉烯类革兰阴性菌的耐药性,为临床合理使用抗菌药物及控制院内感染提供参考。**方法** 选用 VITEK MS 和 VITEK 2 Compact 全自动微生物质谱检测系统和全自动微生物鉴定仪对肠杆菌科细菌及非发酵菌开展鉴定和药敏试验;收集 2019—2020 年分离的耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)75 株,非发酵菌 62 株;选用 PCR 和免疫显色法分别检测这 137 株细菌的耐碳青霉烯酶表型。**结果** 肠杆菌科细菌以 blaKPC 和 blaNDM 表型为主;非发酵菌中,鲍曼不动杆菌以 blaNDM 表型为主,铜绿假单胞菌以 blaKPC 为主。免疫显色法与 PCR 法检测结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 本院住院患儿分离的肠杆菌科细菌和非发酵菌的耐碳青霉烯酶表型有多种,免疫显色法检测结果与 PCR 检测结果一致。

关键词:免疫显色法; 碳青霉烯酶; 肠杆菌; 非发酵菌; 耐药基因; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.04.027

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2023)04-0509-04

文献标志码:A

革兰阴性菌是医院感染的关键病原菌,大部分具备多重耐药性,在全部 β -内酰胺抗菌药物中,碳青霉烯类抗菌药物的抑菌活力最强。近年来,伴随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛及不合理应用,革兰阴性菌对这种抗菌药物形成了越来越多的耐药性,不断有在儿

童或新生儿群体中暴发感染的报道^[1-2]。根据全国细菌耐药监测网(CRASS)数据显示,2019 年儿童医院的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌检出率为 14%,高于三级医院的 11.6%和二级医院的 5.5%,同时比 2018 年儿童医院的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌检出率

(13.8%)增加 0.2%。同时,耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌(CRAB)和耐碳青霉烯铜绿假单胞菌(CRPA)检出率随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛和不合理使用也日益增多。产生碳青霉烯酶是肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物耐药最主要的机制^[3]。本研究使用免疫显色法检测了本地区儿童临床分离的耐碳青霉烯革兰阴性菌产生的碳青霉烯酶表型,为临床合理使用抗菌药物提供依据,同时采用 PCR 检测对免疫显色法检测的结果进行验证,以明确此方法的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2019—2020 年从本院住院患儿临床标本中分离得到的对亚胺培南或美罗培南耐药的肠杆菌科细菌(共 75 株,其中肺炎克雷伯菌 53 株、大肠埃希菌 22 株)和非发酵菌(共 62 株,其中鲍曼不动杆菌 20 株、铜绿假单胞菌 42 株),去除同一患者的重复菌株。

1.2 仪器与试剂 VITEK MS、VITEK 2 Compact、PCR 扩增仪购自赛默飞世尔科技有限公司;KPC 型与 NDM 型碳青霉烯酶免疫显色试剂盒、VIM 型碳青霉烯酶免疫显色试剂盒、OXA-23 型碳青霉烯酶免疫显色试剂盒、OXA-48 型碳青霉烯酶免疫显色试剂盒购自北京金山川公司;亚胺培南和美罗培南药敏纸片购自赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌的鉴定与药敏试验 采用 VITEK MS 和 VITEK 2 Compact 全自动微生物质谱检测系统和全自动微生物鉴定仪对肠杆菌科细菌及非发酵菌各自开展鉴定和药敏试验。选用纸片法(K-B 法)核查全自动仪器对亚胺培南和/或美罗培南耐药性的检测结果,确定待测菌株对亚胺培南和/或美罗培南的耐药性与全自动仪器法检测结果一致,折点参照 CLSI M100 S29 中的规范。

1.3.2 PCR 检测耐药基因 (1)待测菌核酸提取:将挑选出的菌株接种于血平板,35℃恒温箱孵育 18~24 h,挑单独菌落添加 50 μL 无菌 dd H₂O 搅拌,100℃水浴 10 min,裂解细菌释放出来 DNA,以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液检测吸光度(A)比值 A₂₆₀/A₂₈₀,评估 DNA 提取质量。将得到的上清液分装,于-20℃保存。(2)引物设计及扩增 5 种碳青霉烯酶基因:耐药基因引物序列参考文献[4-5],由金唯智生物科技(北京)有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
blaKPC	F: TGCTACTGTATCGCGTC	900
	R: CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	
blaNDM	F: GCAGCTTGTGCGCCATGCGGGC	782
	R: GGTCGCGAAGCTGAGCACC GCAT	

续表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
blaVIM	F: GTTTGGTTCGCAATCGCAAC	389
	R: AATGCGCAGCACCAGGATAG	
blaOXA-23	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA	501
	R: ATTTCTGACCGCATTTCCAT	
blaOXA-48	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
	R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	

1.3.3 免疫显色法检测碳青霉烯酶表型 使用免疫显色试剂盒进行检测,严格按说明书进行操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用 WHO-NET5.6 软件分析细菌耐药性。

2 结果

2.1 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)的碳青霉烯酶表型分析

2.1.1 PCR 检测耐药基因 共检测出 blaKPC 型 11 株,全部为肺炎克雷伯菌;blaNDM 型 37 株,包含 23 株肺炎克雷伯菌和 14 株大肠埃希菌;blaKPC+blaNDM 混合型 19 株,均为肺炎克雷伯菌;blaNDM+blaOXA-23 混合型 3 株,均为大肠埃希菌;另有 5 株大肠埃希菌的耐药机制不在检测的 5 种碳青霉烯酶表型范围内。

2.1.2 免疫显色法检测碳青霉烯酶表型 共检测出 blaKPC 型 12 株,全部为肺炎克雷伯菌;blaNDM 型 40 株,分别为 23 株肺炎克雷伯菌和 17 株大肠埃希菌;blaKPC+blaNDM 混合型 18 株,均为肺炎克雷伯菌;blaOXA-23 型 1 株,确认为大肠埃希菌;另有 4 株大肠埃希菌耐药机制不在检测的 5 种碳青霉烯酶表型范围内。

2.1.3 免疫显色法检测碳青霉烯酶表型的效能评估 以 PCR 检测结果作为金标准,对免疫显色法检测碳青霉烯酶从符合率、灵敏度、特异度等方面进行评估,经 χ^2 检验,两种方法检测碳青霉烯酶主要表型的结果比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。75 株 CRE 用两种方法检测,blaVIM 和 blaOXA-48 两种表型结果均为阴性。

2.2 62 例儿童耐碳青霉烯非发酵菌的碳青霉烯酶表型分析

2.2.1 PCR 检测耐药基因 20 株 CRAB 检测到 3 种碳青霉烯酶基因,分别为 blaNDM 型(12 株)、blaNDM+blaKPC 型(2 株)、blaNDM+blaOXA-23 型(1 株),以 blaNDM 型为主;42 株 CRPA 检测到 blaKPC 型 23 株。

2.2.2 免疫显色法检测碳青霉烯酶表型 使用免疫显色法对碳青霉烯酶表达阳性的菌株进行检测,

CRAB 中检测到 blaNDM 型 12 株、blaNDM+blaK-PC 型 1 株、blaNDM+blaOXA-23 型 1 株, CRPA 中检测到 21 株 blaKPC 型。

2.2.3 免疫显色法检测碳青霉烯酶表型的效能评

估 以 PCR 结果为金标准, 免疫显色法检测 CRAB 和 CRPA 碳青霉烯酶表型的灵敏度、特异度均较高。经 χ^2 检验, 两种方法检测的碳青霉烯酶表型结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 两种方法检测碳青霉烯酶主要表型的比较

表型	检测方法	阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)	灵敏度(%)	特异度(%)	符合率(%)	<i>P</i>
blaKPC	PCR 法	30	45	100.0	100.0	100.0	1.000
	免疫显色法	30	45				
blaNDM	PCR 法	59	16	98.3	100.0	98.7	0.844
	免疫显色法	58	17				

表 3 两种方法检测碳青霉烯酶主要表型的比较

表型	检测方法	阳性(<i>n</i>)	阴性(<i>n</i>)	灵敏度(%)	特异度(%)	符合率(%)	<i>P</i>
blaKPC	PCR 法	25	37	88.0	100.0	95.2	0.579
	免疫显色法	22	40				
blaNDM	PCR 法	15	47	93.3	100.0	98.4	0.832
	免疫显色法	14	48				

2.3 产碳青霉烯酶革兰阴性菌的耐药情况分析

CRE 菌株对阿米卡星、庆大霉素和妥布霉素耐药率较低, 而对头孢类抗菌药物的耐药率几乎都在 90% 以上; CRAB 菌株对阿米卡星、四环素、妥布霉素等耐药率低; CRPA 对阿米卡星耐药率低, 对庆大霉素和妥布霉素耐药率在 50% 左右, 见表 4。

表 4 耐碳青霉烯革兰阴性菌的耐药情况(%)

抗菌药物	CRE	CRAB	CRPA
氨苄西林	100.0	—	—
哌拉西林	100.0	100.0	54.8
氨苄西林/舒巴坦	100.0	50.0	—
哌拉西林/他唑巴坦	100.0	92.8	57.1
头孢唑啉	100.0	100.0	100.0
头孢呋辛	100.0	100.0	100.0
头孢他啶	100.0	60.0	50.0
头孢曲松	98.7	55.0	—
头孢噻肟	98.7	55.0	—
头孢吡肟	100.0	100.0	64.3
头孢替坦	78.7	100.0	100.0
头孢吡辛酯	98.7	90.0	100.0
氨曲南	82.7	—	78.0
亚胺培南	92.0	60.0	69.0
美洛培南	93.3	60.0	81.0
阿米卡星	25.3	0.0	2.4
庆大霉素	38.7	50.0	52.4
妥布霉素	26.7	0.0	50.0
环丙沙星	68.0	5.0	47.6
左旋氧氟沙星	65.3	5.0	47.6
莫西沙星	89.3	5.0	88.1
复方磺胺甲噁唑	48.0	55.0	—
呋喃妥因	49.3	100.0	100.0
四环素	45.3	5.0	—

注: —表示该项无数据。

2.4 产碳青霉烯酶革兰阴性菌的临床分布特征 <1 岁的幼儿分离到 CRE 的比例明显高于 ≥1 岁的儿童, 而非发酵菌(CRAB 和 CRPA)则主要分离自 1~10 岁的儿童(64.5%)的临床标本。分离到 CRE 的患儿中, 男性所占比例高于女性; 分离到非发酵菌的患儿中, 男性所占比例(58.1%)比女性(41.9%)略高; 分离到 CRE 最多的临床标本类型是尿液(37.3%), 分离到非发酵菌最多的临床标本则是痰液(48.6%)。见表 5。

表 5 分离到产碳青霉烯酶革兰阴性菌的感染患儿临床特征及标本来源分析

项目	CRE 菌株 (<i>n</i> =75)	CRAB 和 CRPA 菌株 (<i>n</i> =62)
年龄[<i>n</i> (%)]		
<28 d	29(38.7)	—
28 d 至 <1 岁	30(40.0)	20(32.3)
1~10 岁	15(20.0)	40(64.5)
>10 岁	1(1.3)	2(3.2)
性别[<i>n</i> (%)]		
男	56(74.7)	36(58.1)
女	19(25.3)	26(41.9)
标本类型[<i>n</i> (%)]		
尿液	28(37.3)	5(8.1)
痰液	16(21.3)	29(46.8)
脓液	14(18.7)	20(32.3)
血液	8(10.7)	2(3.2)
腹水	4(5.3)	—
分泌物	3(4.0)	6(9.7)
脑脊液	1(1.3)	—
支气管肺泡灌洗液	1(1.3)	—

3 讨 论

铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和肠杆菌科细菌多见于自然界、医疗环境中以及皮肤上。它们是目前临床中检出最多的革兰阴性菌,是医院门诊继发感染的关键致病菌,尤其是鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌,可引起全身多个部位的感染,是泛耐药菌中最常见的细菌。革兰阴性菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药性的报道越来越多,对于儿童该类报道的数量也在逐年增多,但大多数是小范围报道^[6-7]。

本研究结果显示:CRE 中,肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶表型分别为 blaNDM(43.40%)、blaKPC+blaNDM(35.85%)、blaKPC(20.75%),大肠埃希菌产碳青霉烯酶表型则分别为 blaNDM(63.64%)、blaNDM+blaOXA-23(13.64%)、其他(22.73%)。肺炎克雷伯菌以 blaNDM 型(包含与 blaKPC 混合型)为主,与国内某大型儿童医院的 77.3% blaNDM 型肺炎克雷伯菌的报道基本一致^[8]。大肠埃希菌也以 blaNDM 型为主,与 blaNDM 型大肠埃希菌的主要流行区域是亚洲大陆的中国和印度的报道一致^[9-10]。但北京地区儿童患者分离的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌是以 blaKPC 和 blaIMP-4 型金属酶为主。这种碳青霉烯酶类型不同的现象,可能与各地区使用抗菌药物种类不同有关^[11]。而 62 株非发酵菌结果中,20 株 CRAB 检测到 3 种碳青霉烯酶基因以 blaNDM 型为主,与王紫琦等^[12]研究的以 blaOXA-23 型检出为主的结论不同,可能与地区和人群不同相关;42 株 CRPA 以 blaKPC 为主。blaKPC 型 CRPA 中带 blaKPC-2 基因质粒^[13],这种耐药特性将如同其在肠杆菌科细菌一样在铜绿假单胞菌中播散。

以 PCR 检测结果为金标准,免疫显色法检测 CRE 的 3 种主要表型 blaKPC、blaNDM、blaOXA-43 与 PCR 检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。同时,免疫显色法对 62 株菌非发酵菌的结果也与 PCR 检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。但有几株菌出现 PCR 阳性而免疫显色法阴性,可能是因为菌株中目标耐药基因的表达水平低于免疫显色法试剂的检测低限,而 PCR 通过扩增过程可以检测到。综上所述,PCR 法与免疫显色法同样可以检测肠杆菌及非发酵菌的碳青霉烯酶耐药基因。

综上所述,肠杆菌和非发酵菌碳青霉烯酶耐药基因分型所使用的免疫显色法具有操作简便、报告快速、便于操作、不易污染等特点,而且可用于检测非发酵菌和肠杆菌科细菌,优于其他传统的检测方法,适合基层医疗机构实验室常规开展。但本研究的标本量偏少,需要日后积累更多的菌株后进行大样本量检

测和分析,以期临床个性化用药、及时准确地进行评估提供更多参考。

参考文献

- [1] 赵辉,贾楠,徐茶,等.产 NDM-1 肺炎克雷伯菌引起的新生儿感染及其同源性检测[J].中华医院感染学杂志,2016,26(10):2357-2360.
- [2] YU J, TAN K, RONG Z, et al. Nosocomial outbreak of KPC-2-and NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, in a neonatal ward: a retrospective study[J]. BMC Infectious Diseases, 2016, 16(1):563.
- [3] LOGAN L K, WEINSTEIN R A. The epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace[J]. J Infect Dis, 2017, 215 (suppl 1):S28-S36.
- [4] 刘萍,闫雪苗,张坚磊,等.23 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分析[J].山东医药,2016,56(24):91-93.
- [5] 彭俊华,张媛媛,付藏红,等.鲍曼不动杆菌耐药表型及碳青霉烯酶 OXA 基因分型[J].现代检验医学杂志,2009,24(5):39-42.
- [6] 刘婧娴,李媛睿,阿旺穷吉,等.分离自儿科患者肺炎克雷伯菌的常见碳青霉烯酶基因检测[J].中国感染与化疗杂志,2019,19(5):537-541.
- [7] 黄维真,潘新年,张清,等.儿童肠杆菌科细菌碳青霉烯类耐药的基因型研究[J].广西医科大学学报,2019,33(2):232-235.
- [8] ZHU J, SUN L, DING B, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35 (4):611-618.
- [9] KHAN A U, MARYAM L, ZARRILLI R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health[J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1):101.
- [10] 喻华,徐雪松,李敏,等.肠杆菌目细菌碳青霉烯酶的实验室检测和临床报告规范专家共识[J].中国感染与化疗杂志,2020,20(6):671-680.
- [11] 张冀霞,刘颖梅,陈宏斌,等.我国产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的基因型及流行病学研究[J].中华内科杂志,2014,53(2):116-120.
- [12] 王紫琦,陆学东,蒋利利,等.深圳地区耐亚胺培南临床菌株耐药机制及可移动基因元件分析[J].微生物学免疫学进展,2018,46(3):33-39.
- [13] 陈勇,史利宁,胡毓安,等.产 KPC 铜绿假单胞菌的耐药分子机制及其临床分布[J].医学研究生报,2021,34(6):575-579.

(收稿日期:2022-07-25 修回日期:2022-10-20)