

population[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8): 4823-4831.

[19] MILLEN A E, VOLAND R, SONDEL S A, et al. Vitamin D status and early age-related macular degeneration in postmenopausal women[J]. Arch Ophthalmol, 2011, 129(4): 481-489.

[20] WILSON L R, TRIPKOVIC L, HART K H, et al. Vitamin D deficiency as a public health issue: using vitamin D2 or vitamin D3 in future fortification strategies[J]. Proc Nutr Soc, 2017, 76(3): 392-399.

[21] MATTHEW S. Seasonal, ethnic and gender variations in serum vitamin D3 levels in the local population of peterborough[J]. Bioscience Horizons, 2010, 3(2): 124-131.

[22] BIKLE D D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications[J]. Chem Biol, 2014, 21(3): 319-329.

[23] WANG H, HARTNETT M E. Regulation of signaling events involved in the pathophysiology of neovascular AMD[J]. Mol Vis, 2016, 22(1): 189-202.

[24] PARMEGGIANI F, ROMANO M R, COSTAGLIOLA C, et al. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012(1): 546786.

[25] ZAJAC-PYTRUS H M, PILECKA A, TURNO-KRECIKA A, et al. The dry form of age-related macular degeneration (AMD): the current concepts of pathogenesis and prospects for treatment[J]. Adv Clin Exp Med, 2015, 24(6): 1099-1104.

[26] WANG J, OHNO-MATSUI K, MORITA I. Elevated amyloid β production in senescent retinal pigment epithelium, a possible mechanism of subretinal deposition of amyloid β in age-related macular degeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(1): 73-78.

[27] DENG L, PUSHPITHA K, JOSEPH C, et al. Amyloid β induces early changes in the ribosomal machinery, cytoskeletal organization and oxidative phosphorylation in retinal photoreceptor cells[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12(1): 24.

[28] LEE V, REKHI E, HOH K J, et al. Vitamin D rejuvenates aging eyes by reducing inflammation, clearing amyloid beta and improving visual function[J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(10): 2382-2389.

[29] GEHRS K M, ANDERSON D H, JOHNSON L V, et al. Age-related macular degeneration: emerging pathogenetic and therapeutic concepts[J]. Ann Med, 2006, 38(7): 450-471.

[30] CHEN M, MUCKERSIE E, FORRESTER J V, et al. Immune activation in retinal aging: a gene expression study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(11): 5888-5896.

(收稿日期: 2022-05-19 修回日期: 2023-01-29)

• 短篇论著 •

5 例多发性骨髓瘤中枢神经系统浸润患者的临床及实验室特征分析*

张 岚, 陈 朴, 朱建锋, 陈 楠, 张 莉, 潘柏中, 郭 玮, 王蓓丽[△]
复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032

摘 要:目的 分析 5 例多发性骨髓瘤(MM)中枢神经系统(CNS)浸润患者的临床及实验室特征。方法 收集 2018 年 1 月至 2021 年 12 月该院确诊、治疗并随访的 MM 患者 314 例病例资料, 其中 5 例 MM 患者发生 CNS 浸润(简称 CNS MM), 回顾这 5 例 CNS MM 患者的临床和实验室资料。结果 CNS MM 的发生率为 1.6%(5/314)、病死率为 100.0%(5/5)。5 例 CNS MM 患者包括初诊时 MM 患者合并 CNS 浸润 1 例(病例 4), 以及治疗过程中 MM 患者出现 CNS 浸润 4 例(病例 1~3、5)。5 例 CNS MM 患者中位生存时间 12.0 个月, 发生中枢浸润的中位发病时间距 MM 初诊 10.5 个月, 累及中枢后中位生存时间仅 0.5 个月。脑脊液检查一般表现为脑脊液压力增加、脑脊液蛋白水平升高且找到克隆性浆细胞。初诊时, 4 例(病例 1~3、5)患者血清 $\beta 2$ 微球蛋白升高, 3 例(病例 1、2、4)患者血清乳酸脱氢酶升高, 5 例患者骨髓中出现形态异常骨髓瘤细胞, 4 例(病例 1~4)患者合并髓外病灶, 3 例(病例 1、4、5)患者骨髓中骨髓瘤细胞 CD56 表达下调, 4 例(病例 1~3、5)患者存在高危细胞遗传学异常。结论 初诊时 MM 患者出现髓外病灶、CD56 表达下调、高危细胞遗传学异常等特征可能与 CNS 浸润存在密切关系, 存在这些特征临床医生需引起警惕。

关键词:多发性骨髓瘤; 中枢神经系统浸润; 实验室特征
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.06.024 **中图法分类号:**R733.3
文章编号:1673-4130(2023)06-0756-05 **文献标志码:**A

多发性骨髓瘤(MM)是一种单克隆浆细胞异常增殖的恶性血液系统肿瘤, 发病率仅次于非霍奇金淋巴

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81972000, 82172348); 国家自然科学基金青年项目(81902139); 复旦大学附属中山医院临床研究专项基金(2018ZSLC05); 上海市临床重点专科建设项目(shslczdk03302); 厦门市医疗卫生重点项目(YDZX20193502000002)。

[△] 通信作者, E-mail: wang.beili1@zs-hospital.sh.cn。

瘤,位居第 2 位^[1],常常伴有相关脏器的功能损伤。MM 的肿瘤性浆细胞通常局限于骨髓微环境,但有研究报道 1.7%~4.5% 初诊及 3.4%~10.0% 复发 MM 患者发生髓外软组织和器官浸润(如肝、肺、脾、胰腺、肾和淋巴结等)^[2]。MM 患者发生中枢神经系统(CNS)浸润(简称 CNS MM)的相关病例报道较少,为了解 CNS MM 患者的临床、实验室特征及预后,本研究对 5 例 CNS MM 患者临床和实验室资料进行回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 1 月至 2021 年 12 月于本院确诊、治疗并随访的 MM 患者 314 例病例资料,其中 5 例为 CNS MM 患者,回顾性分析这 5 例 CNS MM 患者的临床和实验室资料。5 例 CNS MM 患者包括初诊时 MM 患者合并 CNS 浸润 1 例(病例 4 患者),以及治疗过程中 MM 患者出现 CNS 浸润 4 例(病例 1~3、5 患者),后者 MM 患者在 CNS 浸润前均接受系统化治疗。

1.2 研究方法 5 例 CNS MM 患者均记录初诊 MM 及 CNS 浸润时临床症状、诊治过程中出现 CNS 浸润时间、随访期限及疗效评估等。记录实验室检查结果包括:(1)初诊 MM 时血清 $\beta 2$ 微球蛋白和血清乳酸脱氢酶(LDH);(2)初诊 MM 时骨髓细胞学、流式细胞术及荧光原位杂交技术检查;(3)CNS 浸润时脑脊液常规、生化、细胞学及流式细胞术检查。采用国际骨髓瘤工作小组(IMWG)诊断及疗效评定标准,疗效评定分为严格意义的完全缓解(sCR)、完全缓解(CR)、非常好的部分缓解(VGPR)、部分缓解(PR)、轻微反应(MR)、疾病稳定(SD)、疾病进展(PD)^[3-4]。MM 患

者发生 CNS 浸润的诊断标准:MM 患者在诊断 MM 同时或治疗过程中出现 CNS 受累,包括脑膜及脑实质的浸润,需除外颅内孤立性浆细胞瘤。CNS 受累的证据依赖于组织病理学及脑脊液细胞学^[5]。

2 结 果

2.1 CNS MM 患者的临床特征分析 314 例 MM 患者中 5 例为 CNS MM 患者,发生率为 1.6%,CNS 浸润部位分别是脑实质(3 例)、软脑膜(2 例)。5 例 CNS MM 患者中男性 2 例、女性 3 例,初诊时中位年龄 53 岁,年龄为 41~73 岁。5 例 CNS MM 患者的临床资料见表 1。5 例 CNS MM 患者根据 Durie-Salm-on 分期(简称 D-S 分期)标准均为Ⅲ期 A 组。5 例 CNS MM 患者在 CNS 浸润时临床症状,包括烦躁不安 2 例(病例 3、4),意识淡漠、应答迟钝 1 例(病例 1),头痛、头晕 1 例(病例 5),发热和疲劳 1 例(病例 2)。除病例 5 患者外其余 4 例 CNS MM 患者在初诊时均合并髓外病灶。病例 4 患者在初诊时合并 CNS 浸润,其余病例患者在治疗过程中出现 CNS 浸润。病例 1、3、5 患者在 CNS 侵犯前疾病状态评估分别为 VGPR、PR、PR 状态,病例 2 患者处于 PD 状态。5 例 CNS MM 患者在发现 CNS 浸润后均采用糖皮质激素、甲氨蝶呤和阿糖胞苷三联药进行鞘内注射治疗。

2.2 CNS MM 患者随访情况 5 例 CNS MM 患者在随访过程中均出现死亡,病死率为 100%,随访时间为 4.0~24.0 个月,中位生存时间 12.0 个月,发生 CNS 浸润的中位发病时间距 MM 初次诊断 10.5 个月,CNS 浸润后的中位生存时间仅 0.5 个月。见表 1。

表 1 5 例 CNS MM 患者的临床资料

病例	性别 年龄 (岁)	D-S 分期	CNS 浸润时 临床症状	初诊髓外病灶	CNS 浸润时 疾病状态	CNS 浸润 后治疗	生存时间 (个月)	MM 至 CNS 浸润的时间 (个月)	CNS 浸润后 的生存时间
1	女性 45	Ⅲ期 A 组	意识淡漠、应答迟钝	腰椎毗邻肌肉	VGPR	鞘内注射	24.0	24.0	4.0 d
2	女性 41	Ⅲ期 A 组	发热、疲劳	胰尾	PD	化疗、鞘内注射	11.5	10.5	1.0 个月
3	女性 62	Ⅲ期 A 组	烦躁不安	椎体	PR	化疗、鞘内注射	4.0	3.5	0.5 个月
4	男性 53	Ⅲ期 A 组	烦躁不安	右腿软组织、多处淋巴结	—	化疗、鞘内注射	20.0	0.0	20.0 个月
5	男性 73	Ⅲ期 A 组	头晕、头痛	无	PR	鞘内注射	12.0	12.0	1.0 d

注:—表示无数据。

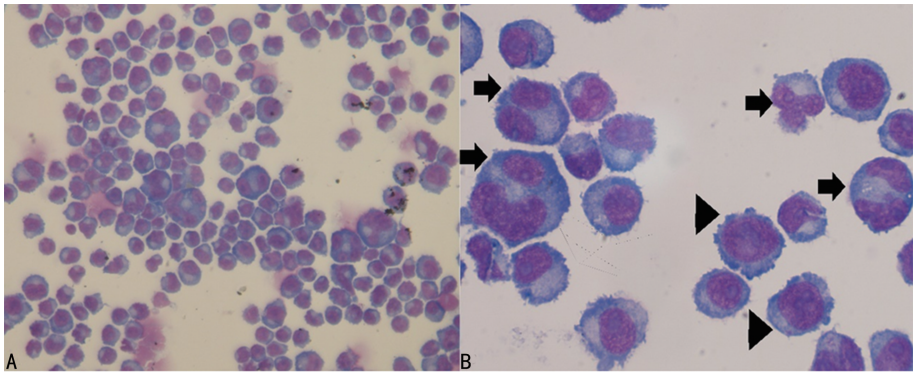
2.3 CNS MM 患者的实验室特征 MM 出现 CNS 浸润后脑脊液常规及生化结果显示,5 例患者脑脊液压力增加、4 例患者脑脊液蛋白水平升高,4 例患者脑脊液 LDH 升高。5 例 CNS MM 患者的脑脊液细胞学检查中均见到浆细胞,流式细胞术检查证实为克隆性浆细胞,其中 4 例 CNS MM 患者的脑脊液骨髓瘤细胞存在形态学异常,畸形核及幼稚浆细胞较易见,病例 5 患者的脑脊液细胞学检查结果见图 1。病例

3~5 患者的脑脊液中骨髓瘤细胞 CD56 表达缺失。5 例 CNS MM 患者的脑脊液特征见表 2。

5 例 CNS MM 患者在初诊 MM 时,M 蛋白分型:IgG- λ 2 例,IgA- λ 2 例,IgG- κ 1 例;4 例患者血清 $\beta 2$ 微球蛋白升高;3 例患者血清 LDH 升高。5 例 CNS MM 患者骨髓中骨髓瘤细胞出现形态学异常,可见核畸形或幼稚浆细胞。初诊 MM 时病例 1、4、5 患者的骨髓中骨髓瘤细胞 CD56 表达缺失,病例 3~5 患者的

脑脊液中骨髓瘤细胞 CD56 表达缺失,通过比较发现病例 1、3 患者在骨髓和脑脊液中的骨髓瘤细胞 CD56 表达情况相反。除病例 4 患者未进行检测外,其余 CNS MM 患者的骨髓液进行荧光原位杂交技术检测

结果均提示为高危细胞遗传学异常,包括 13q-、t(4;14)各 3 例,1q21 扩增 2 例,17p13-、t(14;16)各 1 例。见表 3。



注:A 为病例 5 患者的脑脊液甩片(瑞-吉氏染色,×400);B 为病例 5 患者的脑脊液甩片(瑞-吉氏染色,×1 000),➡表示畸形核浆细胞,►表示幼稚浆细胞。

图 1 病例 5 患者的脑脊液细胞学检查结果

表 2 5 例 CNS MM 患者的脑脊液特征

病例	脑脊液压力* (mm H ₂ O)	脑脊液蛋白 [△] (g/L)	脑脊液 LDH (U/L)	脑脊液中 骨髓瘤细胞数量	脑脊液中 骨髓瘤细胞形态	脑脊液中 骨髓瘤细胞 CD56 表达
1	250	1.49	116	大量	畸形核	+
2	190	0.23	11	数个	无异常	+
3	300	1.08	194	大量	幼稚浆细胞、畸形核	-
4	300	1.34	262	大量	幼稚浆细胞、畸形核	-
5	200	8.76	229	大量	幼稚浆细胞,畸形核	-

注: * 表示脑脊液压力参考范围 80~180 mm H₂O, [△]表示脑脊液蛋白参考范围 0.15~0.45 g/L。

表 3 5 例 CNS MM 患者的实验室特征

病例	M 蛋白 分型	血清 β2 微球 蛋白* (mg/L)	血清 LDH [△] (U/L)	骨髓中浆 细胞比例(%)	骨髓中骨髓瘤 细胞形态	骨髓中骨髓瘤 细胞 CD56 表达	骨髓荧光 原位杂交技术
1	IgG-κ	9.54	379	32.0	幼稚浆细胞、核畸形	-	13q-、1q21 扩增、t(14;16)
2	IgA-λ	10.25	887	29.0	幼稚浆细胞、核畸形	+	13q-、1q21 扩增、t(4;14)
3	IgG-λ	2.41	176	17.5	幼稚浆细胞	+	13q-、17p13-、t(4;14)
4	IgG-λ	2.19	272	15.0	幼稚浆细胞、核畸形	-	N
5	IgA-λ	8.79	188	80.0	幼稚浆细胞、核畸形	-	t(4;14)

注: * 表示血清 β2 微球蛋白参考范围 1.0~2.3 mg/L, [△]表示血清 LDH 参考范围 109~245 U/L, N 表示未进行检测。

3 讨 论

CNS MM 患者病例较为少见,国外报道该病例的发生率为 1.0%^[6],发生率远低于其他血液系统肿瘤如急性白血病、高级别淋巴瘤等。本研究回顾了本院 CNS MM 病例,发生率为 1.6%,与国外报道的结果较为接近^[6]。目前 CNS MM 病例的机制尚不明确,可能有两种途径:(1)通过血行播散至 CNS;(2)由毗邻的颅骨浆细胞瘤直接蔓延至 CNS^[7],国内外专家一致认为发病机制以前者为主,后者相关病例报道较为罕见^[8]。

CNS MM 患者临床表现多样,与其他软脑膜恶性肿瘤的临床表现类似,常见表现为精神错乱、肢体

软弱、头痛、视觉障碍等。40% MM 患者也会出现 CNS 症状,可能是由全身代谢性紊乱(如高钙血症、高黏滞血症等)、脊髓压迫或周围神经病变引起^[9],所以当 MM 患者出现 CNS 症状未必会引起警惕。有研究报道 MM 患者发生 CNS 浸润后,脑脊液常规及生化检查一般表现为脑脊液压力增加、脑脊液蛋白升高、细胞数量增多等^[10]。影像学检查如计算机断层扫描或磁共振成像可发现 CNS MM 患者发生溶骨性病变、颅内肿瘤、脑水肿及软脑膜增强,但对 CNS MM 的诊断仅具有辅助价值^[11]。CNS MM 患者不论其临床表现、脑脊液常规及生化检查还是影像学均无特异性,CNS 受累的证据以颅内病灶病理诊断为金标准,

但病理组织难以获得,所以临床上普遍依赖于脑脊液细胞学找到异常浆细胞作为确证证据。脑脊液细胞学存在灵敏度低、主观性强等缺点,但随着近年来流式细胞术普及,该技术具有灵敏度高、直接证明浆细胞克隆性的优点,将两者结合可以极大地提高 CNS 浸润的检出率^[12]。本研究 5 个 CNS MM 病例均联合脑脊液细胞学及流式细胞术诊断。

FASSAS 等^[13]研究发现,高危细胞遗传学异常(如 13-、IgH 易位等)、髓外病灶、异常形态骨髓瘤细胞等这些特征与 CNS MM 之间存在密切相关性,而这些同样也是 MM 侵袭性强、预后不良的特征之一。本研究中 4 例 CNS MM 患者在初诊 MM 时存在髓外病灶,3 例患者骨髓中骨髓瘤细胞 CD56 表达缺失,5 例患者骨髓中骨髓瘤细胞出现形态学异常,与文献^[13]报道结果较为一致。本研究中最常见的细胞遗传学异常是 13q- 及 t(4;14),与 FASSAS 等^[13]研究结果相符合。但 CHANG 等^[14]招募 9 例 CNS MM 患者,8 例出现 17p13.1-,4 例出现 13q-,无 CNS 累及的 MM 出现 17p13.1- 占 10%~15%,出现 13q- 占 40%~50%,所以该笔者认为 CNS MM 与 17p13.1- 相关,与 13q- 无关。造成此种差异可能归因于研究人群不同,还需更多病例纳入研究。2014 版国际骨髓瘤工作小组建议:荧光原位杂交技术检测到骨髓瘤细胞以下任何一项细胞遗传学异常,如 17p-、t(4;14)、t(14;16),1q+ 或 1p-,即列为高危 MM^[3],本研究 4 例 CNS MM 患者的细胞遗传学结果均为高危型,推测高危细胞遗传学异常与 MM 发生 CNS 浸润存在一定的关系。

CHANG 等^[14]募集 8 例 CNS MM 患者(38% 患者骨髓中骨髓瘤细胞表达 CD56)和 84 例 MM 患者(80% 患者骨髓中骨髓瘤细胞表达 CD56),通过比较发现 CNS MM 患者的骨髓瘤细胞 CD56 表达明显下调,所以认为 CD56 表达下调与 CNS 浸润有关。CD56 是一种神经黏附因子,在骨髓瘤细胞的归巢和黏附上起着重要作用,表达下调可能导致骨髓瘤细胞逃出骨髓腔迁入 CNS。此外,2 例患者脑脊液中骨髓瘤细胞的 CD56 与初诊时骨髓中表达相反,脑脊液中骨髓瘤细胞的生物学特征与骨髓内不同,可能是骨髓瘤细胞为了逃避机体对肿瘤细胞的免疫监视而发生的变异,从而逃逸至中枢^[15]。

本研究结果显示,除病例 4 患者在诊断 MM 同时合并 CNS 浸润,其余 4 例 CNS MM 患者在治疗过程中发展为 CNS 浸润,包括 3 例处于缓解期,1 例处于进展期,提示部分 MM 患者发生 CNS 浸润比较隐匿,较难察觉。CNS MM 患者的预后很差,本研究中 MM 发生 CNS 浸润后病死率为 100%,中位生存时间仅 0.5 个月。MM 发生 CNS 浸润尚无标准治疗方法,传统治疗方式包括全身化疗、局部放疗及鞘内注射。有发现鞘内治疗可以明显延长 CNS MM 的生存期,但也有研究发现鞘内注射及局部放疗只能暂时缓

解症状,对病情进展无明显改善,所以有效的治疗方案还在探索中^[16-17]。

综上所述,MM 发生 CNS 浸润较为罕见,存在治疗效果差、病情进展快、病死率高等特点。因此,对于存在髓外病灶、CD56 表达下调、高危细胞遗传学改变等特征的初诊 MM 患者,应高度警惕 CNS 浸润的可能,一旦出现神经系统症状应及时行腰椎穿刺检查,以便早发现、早治疗,提高患者生存期。

参考文献

- [1] COWAN A J, GREEN D J, KWOK M, et al. Diagnosis and management of multiple myeloma: a review[J]. JAMA, 2022, 327(5): 464-477.
- [2] BHUTANI M, FOUREAU D M, ATRASH S, et al. Extramedullary multiple myeloma[J]. Leukemia, 2020, 34(1): 1-20.
- [3] RAJKUMAR S V, DIMOPOULOS M A, PALUMBO A, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(12): 538-548.
- [4] KUMAR S, PAIVA B, ANDERSON K C, et al. International myeloma working group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma[J]. Lancet Oncol, 2016, 17(8): 328-346.
- [5] AL-SOBHI E, OSOBA A O, KARAR A, et al. Multiple myeloma of the central nervous system: a clinicopathological review[J]. East Mediterr Health J, 2009, 15(6): 1570-1579.
- [6] EGAN P A, ELDER P T, DEIGHAN W I, et al. Multiple myeloma with central nervous system relapse[J]. Haematologica, 2020, 105(7): 1780-1790.
- [7] JURCZYSZYN A, GRZASKO N, GOZZETTI A, et al. Central nervous system involvement by multiple myeloma: a multi-institutional retrospective study of 172 patients in daily clinical practice[J]. Am J Hematol, 2016, 91(6): 575-580.
- [8] FASSAS A B, MUWALLA F, BERRYMAN T, et al. Myeloma of the central nervous system: association with high-risk chromosomal abnormalities, plasmablastic morphology and extramedullary manifestations[J]. Br J Haematol, 2002, 117(1): 103-108.
- [9] ABDALLAH A O, ATRASH S, SHAHID Z, et al. Patterns of central nervous system involvement in relapsed and refractory multiple myeloma[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2014, 14(3): 211-214.
- [10] MARJANOVIĆ S, MIJUSKOVIĆ Z, STAMATOVIĆ D, et al. Multiple myeloma invasion of the central nervous system[J]. Vojnosanit Pregl, 2012, 69(2): 209-213.
- [11] VARGA G, MIKALA G, GOPCSA L, et al. Multiple myeloma of the central nervous system: 13 cases and review of the literature[J]. J Oncol, 2018, 2018(1): 3970169.
- [12] LOPES A C, XAVIER F D, DE SOUZA B R, et al. Massive central nervous system infiltration by CD56-positive plasma cells in multiple myeloma[J]. Cytopathology,

2017,28(2):172-174.

[13] FASSAS A B, WARD S, MUWALLA F, et al. Myeloma of the central nervous system: strong association with unfavorable chromosomal abnormalities and other high-risk disease features[J]. Leuk Lymphoma, 2004, 45 (2): 291-300.

[14] CHANG H, SLOAN S, LI D, et al. Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13. 1 (p53) deletions[J]. Br J Haematol, 2004, 127(3):280-284.

[15] LEE S E, KIM J H, JEON Y W, et al. Impact of extramedullary plasmacytomas on outcomes according to

• 短篇论著 •

treatment approach in newly diagnosed symptomatic multiple myeloma[J]. Ann Hematol, 2015, 94 (3): 445-452.

[16] LEE D, KALFF A, LOW M, et al. Central nervous system multiple myeloma: potential roles for intrathecal therapy and measurement of cerebrospinal fluid light chains[J]. Br J Haematol, 2013, 62(3):371-375.

[17] VERMEIREN P, VANTILBORGH A, OFFNER F. Myeloma of the central nervous system: report of a single center case series[J]. Acta Clin Belg, 2011, 66(3):205-208.

(收稿日期:2022-08-22 修回日期:2022-12-30)

呼吸道分离流感嗜血杆菌的耐药基因研究

姚 瑶,高 辉,黄云昆,朱雯梅,王 佳,丁家伟
昆明医科大学附属延安医院医学检验科,云南昆明 650051

摘 要:**目的** 探讨该院呼吸道分离流感嗜血杆菌氨苄西林耐药机制模式。**方法** 对 2020 年 1 月至 2021 年 12 月该院收集的 113 株呼吸道分离的氨苄西林耐药流感嗜血杆菌进行头孢硝噻吩检测,TEM-1、ROB-1、PBP3-S、PBP3-BLAN 基因检测。**结果** 113 株氨苄西林耐药流感嗜血杆菌中,β-内酰胺酶阳性菌株占比 84% (95/113),β-内酰胺酶阴性菌株占比 16% (18/113),TEM-1 型基因检出率 84% (95/113),未检出 ROB-1 型基因,gBLPAR 基因型检出率为 19. 5% (22/113),gBLPACR II 基因型检出率为 21. 2% (24/113),gBLPACR III 基因型检出率为 43. 4% (49/113),gBLNAR II 基因型检出率为 1. 8% (2/113),gBLNAR III 基因型检出率为 14. 1% (16/113)。**结论** 呼吸道分离的流感嗜血杆菌氨苄西林耐药的主要机制为产 TEM-1 型 β-内酰胺酶,其次为Ⅲ型 fts I 基因突变。

关键词:流感嗜血杆菌; 呼吸道; 耐药基因
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2023. 06. 025
文章编号:1673-4130(2023)06-0760-03

中图法分类号:R446. 5
文献标志码:A

流感嗜血杆菌是一种可呈多形性的革兰阴性杆菌,是 HACKE 菌群中常见的重要病原菌。该菌多引起社区获得性呼吸道感染,是儿童呼吸道感染的主要病原菌之一^[1]。随着抗菌药物的广泛使用,流感嗜血杆菌的耐药性在逐年改变。本研究通过对呼吸道感染分离的流感嗜血杆菌进行耐药性分析和耐药基因检测,了解本院流感嗜血杆菌的耐药分布情况及耐药机制特征,为临床提供诊疗依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 对 2020 年 1 月至 2021 年 12 月从呼吸道感染患者合格呼吸道标本中分离的流感嗜血杆菌,剔除重复患者菌株,收集氨苄西林耐药流感嗜血杆菌 113 株保存于-70 ℃冰箱中备用。质控菌株为流感嗜血杆菌 ATCC49247,以及经测序确认基因的临床阳性菌株为对照菌株。

1.2 仪器与试剂 Thermo 二氧化碳培养箱,梅里埃电子比浊仪,布鲁克 MALDI 质谱仪,HEMA9600 基因扩增仪,BIO RAD 电泳仪及成像系统,郑州安图生物培养基,温州康泰公司头孢硝噻吩纸片,abm 扩增试剂,北京博迈德合成引物,无酶水等。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定 将收集菌株复苏后,采用布鲁克质谱仪进行菌株鉴定,采用头孢硝噻吩纸片检测 β-内酰胺酶。

1.3.2 模板 DNA 制备 采用煮沸裂解法提取 113 株氨苄西林耐药流感嗜血杆菌的 DNA。用无菌接种环挑取菌落溶于 500 μL 无酶水中,制备 1 麦氏单位比浊菌悬液,100 ℃加热 10 min,冷却后于低温高速离心机中 12 000 r/min 离心 10 min,留取上清液,-20 ℃保存待用。

1.3.3 引物合成 根据参考文献[2-3],委托北京博迈德生物科技公司设计以下基因引物,见表 1。TEM-1 和 ROB-1 为 β-内酰胺酶基因;PBP3-S 引物基因为针对流感嗜血杆菌无 Asn-526-Lys 氨基酸置换的 fts I 基因,若菌株 fts I 基因发生突变则无扩增产物出现;PBP3-BLN 引物基因为针对流感嗜血杆菌除有 Asn-526-Lys 氨基酸置换外,还存在 Ser-385-Thr 氨基酸置换的 fts I 基因,若发生以上氨基酸置换则有扩增产物出现。流感嗜血杆菌依据其 β-内酰胺酶及不同氨基酸置换形式的 fts I 基因分为不同的基因