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 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)

·短篇论著·

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　　**中图法分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2023)06-0760-03　　**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

型[3-4]。见表 2。

表 1　PCR 引物序列及片段大小

基因	引物名称	序列 5′－3′	片段大小(bp)
TEM-1	TEM-1-F	TAA GAG AAT TAT GCA GTG CTG CC	458
	TEM-1-R	TCC ATA GTT GCC TGA CTC CCC	
ROB-1	ROB-1-F	AAG CCC GCA TTG GCG TTT AT	231
	ROB-1-R	GGG CAA TCG TCA TGC CTT TG	
PBP3-S	PBP3-S- F	GAT ACT ACG TCC TTT AAA TTA AG	551
	PBP3-S- R	GCA GTA AAT GCC ACA TAC TTA	
PBP3-BLN	PBP3-BLN- F	TTC AAG TAA CCG TGG TGT GAC	465
	PBP3-BLN- R	GCA GTA AAT GCC ACA TAT TTC	

表 2　流感嗜血杆菌基因型

基因型	bla	PBP3-S	PBP3-BLN
gBLNAS	－	＋	－
gBLNARⅡ	－	－	－
gBLNARⅢ	－	－	＋
gBLPAR	＋	＋	－
gBLPACRⅡ	＋	－	－
gBLPACRⅢ	＋	－	＋

注：bla 为 β-内酰胺酶基因，gBLNAS 为氨苄西林敏感菌株，gBLNAR 为 β-内酰胺酶阴性氨苄西林耐药菌株，gBLPAR 为 β-内酰胺酶阳性氨苄西林耐药菌株，gBLPACR 为 β-内酰胺酶阳性阿莫西林克拉维酸耐药菌株。

1.3.4　PCR 扩增　PCR 反应体系为 25 μL，其中上下游引物各 1 μL，模板 DNA 3 μL，扩增试剂 15 μL，无酶水 7 μL。扩增反应条件：95 ℃ 预变性 1 min，95 ℃10 s，60 ℃10 s，72 ℃10 s，循环 30 次，最后 72 ℃延伸 30 s。将扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳后观察结果，阳性扩增产物外送测序，并于 BLAST 数据库中进行比对。

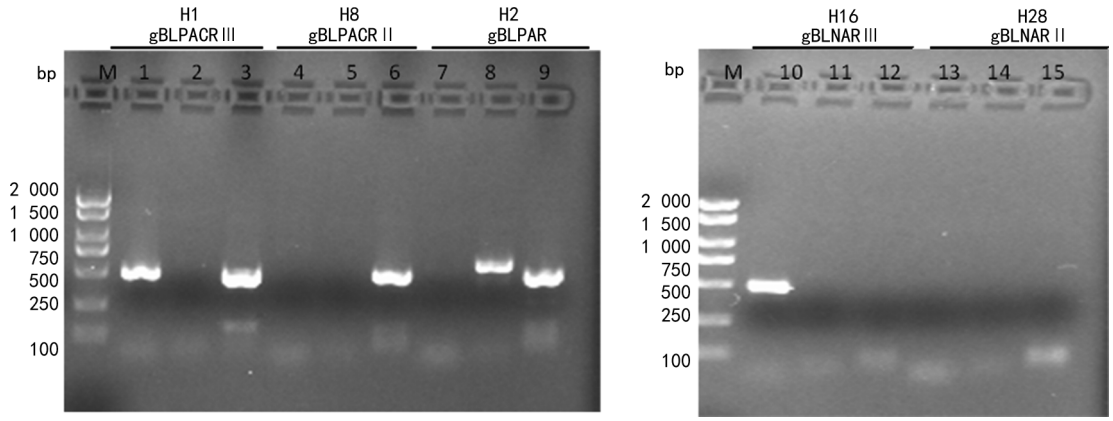
2　结　果

2.1　氨苄西林耐药菌株 β-内酰胺酶检测及耐药基因检测结果　β-内酰胺酶，TEM-1，ROB-1，PBP3-S，PBP3-BLN 基因检测结果见表 3。阳性扩增产物测序结果于 BLAST 网站比对后与所测基因序列相符。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。

表 3　113 株氨苄西林耐药菌株基因检测结果(n)

项目	n	TEM-1	ROB-1	PBP3-S	PBP3-BLN
β-内酰胺酶阳性菌株	95	95	0	22	49
β-内酰胺酶阴性菌株	18	0	0	0	16

2.2　氨苄西林耐药流感嗜血杆菌的基因分型结果　113 株氨苄西林耐药流感嗜血杆菌基因分型结果见表 4，电泳分型图见图 1，其中 H2 菌株为 gBLPAR 型，H8 菌株为 gBLPACR Ⅱ型，H1 菌株为 gBLPACR Ⅲ型，H28 菌株为 gBLNAR Ⅱ型，H16 菌株为 gBLNAR Ⅲ型。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)。



注：M 表示标志物，1、4、7、10、13 表示 PBP3-BLN，2、5、8、11、14 表示 PBP3-S，3、6、9、12、15 表示 TEM-1。

图 1　流感嗜血杆菌基因分型电泳图

表 4　113 株氨苄西林耐药菌株基因分型结果

基因型	*n*	占比(%)
gBLPAR	22	19.5
gBLPACRⅡ	24	21.2
gBLPACRⅢ	49	43.4
gBLNARⅡ	2	1.8
gBLNARⅢ	16	14.1

3　讨　论

流感嗜血杆菌作为引起呼吸道感染的重要病原菌之一，随着抗菌药物的广泛使用及时间的推移，流感嗜血杆菌对多种药物的耐药性呈上升趋势。根据 CHINET 中国细菌耐药监测网 2014 年、2019 年统计的数据显示，流感嗜血杆菌对氨苄西林的耐药率分别为 41.8%和 67.8%，呈明显升高趋势，氨苄西林不考虑作为首选药物用来治疗流感嗜血杆菌感染，阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦及二代头孢的耐药率呈上升趋势，三代头孢、阿奇霉素及环丙沙星等抗菌药物的非敏感率在逐年升高，临床需要根据药敏试验结果选择用药，应重视该细菌的耐药性监测及耐药机制研究[5-6]。针对流感嗜血杆菌的氨苄西林耐药机制，国内外进行了广泛的研究，研究内容主要为以质粒介导的产 β-内酰胺酶及 PBP 蛋白突变机制[1,7]。目前发现的 β-内酰胺酶主要有 TEM-1 和 ROB-1 两种酶型，其中以 TEM-1 型为主。有研究显示，流感嗜血杆菌产酶株中，93.7%为产 TEM-1 型酶，4.6%为产 ROB-1 型酶，同时产两种酶的菌株较为罕见，国内检出的 β-内酰胺酶型以 TEM-1 型为主，多数地区医疗机构未检出 ROB-1 型酶，仅少数机构有检出[1,8-10]。本研究中收集的 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)，均检出 TEM-1 型基因，未检出 ROB-1 型基因，说明本研究中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。流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药的另一个重要机制为编码 PBP 蛋白的基因突变导致 β-内酰胺类抗菌药物对细菌细胞壁的亲和力减弱，从而产生耐药性。根据流感嗜血杆菌编码 PBP3 蛋白的 fts Ⅰ基因不同位点的氨基酸置换形式，流感嗜血杆菌分为 3 型[4-5,10]，在 KTG 基序附近发生 Arg-517-His 置换为Ⅰ型，在 KTG 基序附近发生 Asn-526-Lys 置换为Ⅱ型，在 KTG 基序附近发生 Asn-526-Lys 置换外，在 SSN 基序附近发生 Ser-385-Thr，Met-377-Ile 和(或)Leu-389-Phe 置换为Ⅲ型。在本研究中，氨苄西林耐药的流感嗜血杆菌无论是 β-内酰胺酶阳性菌株或 β-内酰胺酶阴性菌株中，均以Ⅲ型检出为主，说明本研究中流感嗜血杆菌的 fts Ⅰ基因突变以Ⅲ型为主，与上海等地区报道的 fts Ⅰ基因分型检出情况相符，但国内外的不同地区分型存在差异性[10-11]。通过对收集的氨苄西林耐药菌株进行基因检测和分型后发现，以 gBLPACR Ⅲ型的检出率最多，其次为 gBLPACR Ⅱ型，gBLNAR Ⅱ型的检出率最少，这提示产 β-内酰胺酶结合 fts Ⅰ基因突变是本研究中流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药的主要联合机制，实验室及临床需重视该菌的检出及防控，减少流感嗜血杆菌多重耐药的发生。

参考文献

[1] 钱利强，程薇，华春珍. 流感嗜血杆菌对氨苄西林耐药性及耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志，2009，34(2)：69-73.

[2] 秦惠宏，王春，潘芬，等. 儿童分离流感嗜血杆菌的耐药性及 β-内酰胺酶基因分型[J]. 临床检验杂志，2019，37(1)：48-50.

[3] HASEGAWA K，YAMAMOTO K，CHIBA N，et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in Haemophilus influenzae in Japan and the United States[J]. Microb Drug Resist，2003，9(1)：39-46.

[4] KIM I S，KI C S，KIM S，et al. Diversity of ampicillin resistance genes and antimicrobial susceptibility patterns in Haemophilus influenzae strains isolated in Korea[J]. Antimicrob Agents Chemother，2007，51(2)：453-460.

[5] 孙燕，孔菁，张泓，等. 2005－2014 年 CHINET 流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志，2016，16(2)：153-159.

[6] 胡付品，郭燕，朱德妹，等. 2019 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志，2020，20(3)：233-243.

[7] 杨帆，方长香. 流感嗜血杆菌的耐药性及耐药机制[J]. 检验医学与临床，2012，9(24)：3129-3132.

[8] 张泓，吴文娟，李万华，等. 流感嗜血杆菌氨苄西林耐药基因研究[J]. 中国感染与化疗杂志，2006，3(6)：377-379.

[9] 王晓蕾，王战豪，郭慧敏，等. 新生儿流感嗜血杆菌分离株 β-内酰胺类最低抑菌浓度与 β-内酰胺类分子耐药机制研究[J]. 中国小儿急救医学，2020，27(7)：531-535.

[10] 秦惠宏，王春，潘芬，等. 儿童呼吸道分离流感嗜血杆菌的耐药性和基因分型[J]. 中国感染与化疗杂志，2017，17(5)：532-537.

[11] 王姜琳，孙杰，杨慧健，等. 儿童耐氨苄西林流感嗜血杆菌耐药机制及同源性研究[J]. 检验医学，2020，35(6)：513-518.

(收稿日期：2022-03-29　修回日期：2023-02-01)