

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.14.032

耐碳青霉烯类肠杆菌的实验室快速检测方法研究进展^{*}

张鸿娟^{1,2,3}综述,单 斌^{1,2,3△}审校

1. 昆明医科大学第一附属医院医学检验科,云南昆明 650032;2. 云南省医学检验临床研究中心,云南昆明 650032;3. 云南省检验医学重点实验室,云南昆明 650032

关键词:碳青霉烯酶; 耐碳青霉烯类肠杆菌; 胶体金免疫层析法; 实时荧光 PCR

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)14-2001-04

细菌耐药(AMR)是全球公共健康领域的重大挑战,世界卫生组织(WHO)要求各国积极行动,采取系统性措施遏制 AMR,否则感染性疾病将成为严重威胁人类健康与生命安全的首要因素。控制 AMR 是医疗机构主要的工作内容之一,是医疗机构质量评价和评级的指标之一。近年来多重耐药细菌检出率,尤其是革兰阴性菌的检出率呈快速上升趋势,且革兰阴性菌中肠杆菌目细菌占比非常高,超过 60%^[1-2]。肠杆菌目细菌中应重点关注对第三代头孢菌素或碳青霉烯类抗菌药物耐药的细菌^[3]。碳青霉烯类抗菌药物具有良好的通透性和光谱抗菌活性,被认为是治疗肠杆菌目细菌感染的最后一道防线^[4]。随着碳青霉烯类药物的广泛运用,耐碳青霉烯类肠杆菌(CRE)检出率不断升高。2020 年中国细菌耐药监测网(CHINET)结果显示,肺炎克雷伯菌对美罗培南的耐药率为 24.2%,对亚胺培南的耐药率为 23.2%,虽然与 2018 年相比呈下降趋势,但是与 2005 年 3.0%和 2.9%的耐药率相比,增长率高达 7 倍^[2]。不恰当的抗感染治疗会影响患者的治疗结局。根据不同碳青霉烯酶的特征开展联合药敏试验,有助于精准的抗感染治疗方案的制订。因此,准确、快速地对 CRE 产生的碳青霉烯酶进行检测分型,在抗感染方案的制订、医院感染防控方面具有重要的价值。碳青霉烯酶酶型/耐药基因检测的方法按检测的结果分为表型检测和基因型检测。本文主要介绍可以在 2 h 以内完成碳青霉烯酶酶型/耐药基因检测的方法。

1 CRE 概述

CRE 导致的感染病死率高。我国 CRE 血流感染 30 d 内的病死率为 46.2%^[5]。在血液病患者中,CRE 导致的血流感染病死率甚至高达 77.3%^[6]。编码碳青霉烯酶的基因通常位于可移动的元件上,如质粒、整合子、插入序列等,易在细菌间横向传播^[7]。CRE 菌株常同时携带其他的耐药基因,导致多重耐药菌株,甚至全耐药菌株的出现。目前,我国的 CRE 菌株

主要分离自住院患者,但是该类菌株存在社区播散的可能性,需要高度重视。CRE 的流行病学特征是医院获得性病原体传播的典型模式。医疗器械的使用、碳青霉烯酶类抗菌药物的使用、侵入性医疗操作、ICU 入住史等均均为医院获得性 CRE 的风险因素^[8]。CRE 定植或感染患者的流动造成了医疗机构的 CRE 暴发。对 ICU 患者进行进入病房前筛查,同时对产碳青霉烯酶菌株(CPO)检测阳性的患者分区隔离,能够有效地降低 CPO 的感染率^[9]。在器官移植中,对移植受者在接受移植或化疗前进行 CRE 直肠定植筛查,对供者进行 CRE 直肠定植筛查,能够有效地降低移植后 CRE 的感染率^[10]。目前,临床医生只能通过药敏结果判定肠杆菌目细菌是否为 CRE,但不能对其耐药机制做出判定。

产碳青霉烯酶是肠杆菌目细菌对碳青霉烯类药物耐药最主要的机制^[11],其他耐药机制包括产超广谱 β 内酰胺酶(ESBL)和(或)产 AmpC 酶合并外膜孔蛋白表达下调或缺失,但占比较低。碳青霉烯酶是一种能水解碳青霉烯类抗菌药物(如厄他培南、多尼培南、亚胺培南和美罗培南)的 β 内酰胺酶。通常情况下,碳青霉烯酶也可水解 β 内酰胺类抗菌药物,如青霉素类、β 内酰胺类/酶抑制复合制剂、单酰胺环类和头孢菌素类等,所以 CPO 对所有 β 内酰胺药物均耐药^[11]。

根据 β 内酰胺酶底物谱、抑制剂谱、序列同源性的不同,建立了两个内酰胺酶分类系统,将其分为 Ambler 类(即基于氨基酸序列同源性的 A、B、C 和 D 类)和 Bush-Jacoby-Medeiros 组(即基于底物和抑制剂谱的第 1、2、3 和 4 组),其中 Ambler 分子分类方法更常用。按照 Ambler 分子分类方法,碳青霉烯酶可分为 A、B、D 3 类^[12]。A 类为丝氨酸碳青霉烯酶,B 类为金属 β 内酰胺酶,D 类为丝氨酸碳青霉烯酶。目前,我国临床分离的 CRE 菌株产生的碳青霉烯酶以 A 类 KPC 型、B 类 NDM 型和 D 类 OXA-48 型为主。不同种类的抗菌药物对不同 CPO 的抗菌活性不

^{*} 基金项目:科技部科技基础资源调查专项(2019FY101200,2019FY101209)。

[△] 通信作者,E-mail:shanbin6@139.com。

同^[5],如头孢他啶-阿维巴坦对产 KPC 和 OXA-48 型丝氨酸 CPO 具有高度抗菌活性,但对产金属 β 内酰胺酶菌株无抗菌活性^[13]。

2 表型检测法

表型检测法通过对 CRE 产生的碳青霉烯酶酶型进行检测,常用的胶体金免疫层析法与基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(MALDITOF MS)能够在 2 h 内完成碳青霉烯酶酶型检测。

2.1 胶体金免疫层析法 胶体金免疫层析法是近年发展起来的一种快速检测 CRE 中碳青霉烯酶酶型的方法^[14]。该技术体外定性检测培养后可获取细菌标本产 KPC、OXA-48、VIM、IMP 和 NDM 型碳青霉烯酶的情况。方法为将待测菌落和提取缓冲液在 EP 管中进行混合,混合液加入检测卡的标本孔后,待测菌落中的 KPC、OXA-48、VIM、IMP 和 NDM 型碳青霉烯酶与胶体金结合垫上的碳青霉烯酶单克隆抗体反应,形成相应的“抗原-金标抗体复合物”,在层析作用下沿着硝酸纤维素膜移动,被固定在检测卡检测线上的 KPC、OXA-48、VIM、IMP 和 NDM 型碳青霉烯酶单克隆抗体捕获,形成“抗体-抗原-金标抗体复合物”,并在测试区相应检测线上出现一条或多条红线。混合物中多余的金标抗体移至检测卡质控线(C 线)被连接生物素-BSA 的羊抗鼠多克隆抗体捕获,形成质控信号,即在 C 线上出现一条红线。该方法具有检测速度快、不需要特殊仪器、结果容易判读的优点。该技术能够在 30 min 内快速准确地给出 KPC、OXA-48、VIM、IMP 和 NDM 结果,操作方便,结果可靠,同时能够快速直接检测血培养阳性标本的 CPO 感染情况。有助于加速由 CPO 引起的血流感染的诊断和治疗。该方法的不足之处为只能检测靶向酶,对某些亚型及罕见酶型无法检出。

2.2 MALDI-TOF MS MALDI-TOF MS 是近年发展起来的一种微生物种属鉴定技术,该技术具有快速、准确、成本低的优势。该方法根据不同细菌间质谱峰强度,通过质谱仪采集待检标本质谱图与数据库中已知菌种的图谱进行统计学聚类分析,获得鉴定结果^[15]。在碳青霉烯酶酶型检测中,通过待检菌株与碳青霉烯类抗菌药物(如亚胺培南和美罗培南)共同孵育,待测菌株如果产碳青霉烯酶,将会水解抗菌药物,造成抗菌药物的相对分子质量发生变化,随后使用 MALDITOF MS 进行抗菌药物的相对分子质量的检测,间接证明该菌株是否产碳青霉烯酶。该方法操作方便、通量高、耗时短,而且特异度和灵敏度较高,但是该方法对实验室的条件要求高,不仅需要质谱仪,而且不能使用常规的微生物种属鉴定分析软件,需要专用的分析软件,软件价格昂贵,同时使用的碳青霉烯类抗菌药物的种类、质量、浓度及培养过程均会影

响检验结果。该方法可以检测目前已知的碳青霉烯酶,也可检测尚未被发现的碳青霉烯酶,但是无法分辨碳青霉烯酶的具体类型,而且只能检出产碳青霉烯酶的耐药菌,可能会造成漏检。

3 基因型检测

基因型检测方法通过对产碳青霉烯酶的耐药基因进行检测,如 blaKPC、blaNDM、blaIMP、blaVIM、blaOXA-48 耐药基因,常用的方法有多重聚合酶链式反应(PCR)、环介导恒温扩增技术(LAMP)、实时荧光 PCR 一体化平台等。

3.1 多重 PCR 法 PCR 是一项 DNA 体外合成放大技术,能够短时间内、特异地扩增任何目的 DNA。多重 PCR 又称多重引物 PCR 或复合 PCR,与普通 PCR 法相比,多重 PCR 反应体系有两对以上引物,可以同时扩增多个核酸片段,操作过程与普通 PCR 相同。碳青霉烯酶基因检测主要使用多重 PCR 法,该方法可以实现同时对多个编码碳青霉烯酶基因进行检测。多重 PCR 检测碳青霉烯酶基因时,通过一次扩增多个常见耐药基因,不仅提高了检测效率,而且降低了检测成本。同时有研究表明,使用多重 PCR 可有效减少非特异性扩增,提高了检测的特异性^[16]。多重 PCR 能够在 2 h 左右检测出常见的 5 个编码碳青霉烯酶的基因,但是对实验室条件、工作人员要求高,不能检测其他的碳青霉烯酶基因,可能会造成漏检。

3.2 LAMP LAMP 是一种新的核酸体外扩增技术,已广泛用于检测病毒、细菌和寄生虫。该技术可以在恒温条件下实现核酸的体外扩增^[17]。LAMP 通过针对目的基因设计 3 对特异性引物(FIP 和 BIP、F3 和 B3、LF 和 LB),65 °C 扩增 30 min,通过比色变化观察放大产物,或通过副产物(焦磷酸镁)浊度的存在目测放大产物。在碳青霉烯酶基因检测中,LAMP 通过与凝胶电泳、浊度、SYBR green 或 calcein 等方法结合测量副产物,从而实现碳青霉烯酶基因的检测^[18]。LAMP 具有效率高、特异性强、速度快,以及在等温条件下不需要使用复杂的精密热循环器进行温度循环等优点,但不能检测碳青霉烯酶基因的变体,在产物检测方面只有扩增和不扩增两种结果,对靶序列长度要求高,不能进行长链 DNA 的扩增。

3.3 实时荧光 PCR 一体化平台 实时荧光 PCR 一体化平台采用 PCR 技术对主要的碳青霉烯酶基因进行检测,实现了标本制备、核酸提取和扩增等功能为一体的自动分析,检测时间一般在 1 h 左右,检测灵敏度和特异度均在 96% 以上。平台设计了引物和探针用于检测与革兰阴性菌对碳青霉烯类药物不敏感有关的 blaKPC、bla_{oxa}-48、blaIMP、blaNDM、blaVIM 基因序列中的特有序列,以及用于监测目标细菌是否被正确处理,监测 PCR 反应中是否存在抑制剂的标

本处理质控 (SPC) 是否在控, 如 GeneXper、Verigene 和 Filmarray 等系统^[19]。该方法可以直接检测临床标本, 如直肠拭子、肛周拭子、纯菌落, 以及经过简单处理的痰标本, 具有检测快速 (可直接从标本中检测) 和结果容易判读的优点, 但缺点是价格昂贵, 需要特殊的试剂和设备, 检测特异性靶基因, 若待测基因与目标基因不同, 则呈假阴性结果。这些基因序列的检出不代表存在活的微生物, 不能进行细菌鉴定。该类试剂盒在国内上市时间较晚, 市面上价格较高, 而且需要购买特殊的仪器, 可用于对特殊人群, 如危重症患者、移植患者的检测。

4 小 结

碳青霉烯类抗菌药物的抗菌谱广、抗菌活性强, 对产 ESBL 肠杆菌科细菌具有很强的抗菌活性, 被认为是治疗肠杆菌目细菌感染的最后一道防线^[20]。随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛应用, CRE 在全球范围内的流行播散已成为公共健康领域的重大挑战。CRE 所致感染具有“三高一快”的特点, 即高病死率、高耐药性、高传播性、快速增长。同时碳青霉烯酶耐药基因可以通过质粒介导, 在不同种之间高度传播, 导致医院、社区感染的暴发。国家、地区、医院、人群及细菌的不同, 检出的碳青霉烯酶种类均有差异^[21]。不同种类的抗菌药物对不同 CPO 抗菌活性不同。有效而规范的治疗方案是提高 CRE 感染救治率的关键^[22]。面对这样的“超级细菌”, 快速诊断在控制院内感染方面具有重要意义。在标准预防的基础上, 通过检测对确定或高度疑似多重耐药菌感染患者或定植患者实施接触隔离措施, 可以有效遏制 CRE 在不同患者和不同区域间的流行播散。同时, 应开展耐药性监测, 定期分析院内 CRE 检出率变化, 为院内感染控制提供数据和技术支持。因此, 快速进行 CRE 碳青霉烯酶酶型或耐药基因检测, 对于院内感染预防控制、临床抗感染治疗方案制订、改善患者结局具有重要的价值。

参考文献

[1] 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.

[2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4): 377-387.

[3] 胡必杰. 中国碳青霉烯耐药革兰阴性菌 (CRO) 感染预防与控制技术指引[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(13): 2075-2080.

[4] NORDMANN P, POIREL L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria [J]. Clin Infect Dis, 2019, 69(Suppl 7): S521-S528.

[5] ZHOU C, JIN L, WANG Q, et al. Bloodstream infections caused by carbapenem-resistant enterobacterales: risk fac-

tors for mortality, antimicrobial therapy and treatment outcomes from a prospective multicenter study[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 731-742.

[6] ZHANG W, GUO Y, YANG Y, et al. Study of in vitro synergistic bactericidal activity of dual beta-lactam antibiotics against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Microb Drug Resist, 2020, 26(3): 204-210.

[7] TAMMA P D, AITKEN S L, BONOMO R A, et al. Infectious diseases society of america guidance on the treatment of extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacterales (ESBL-E), carbapenem-resistant enterobacterales (CRE), and pseudomonas aeruginosa with difficult-to-treat resistance (DTR-P. aeruginosa) [J]. Clin Infect Dis, 2021, 72(7): e169-e183.

[8] 廖兰凯, 廖雪莲, 康焰. 耐碳青霉烯类肠杆菌防控现状及研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(11): 1750-1755.

[9] ZHOU M, KUDINHA T, DU B, et al. active surveillance of carbapenemase-producing organisms (CPO) colonization with xpert carba-r assay plus positive patient isolation proves to be effective in CPO containment[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 162.

[10] 蔡常洁, 范欣, 黄海辉, 等. 中国实体器官移植供者来源感染防控专家共识 (2018 版) [J]. 中华器官移植杂志, 2018, 39(1): 41-52.

[11] SEGAGNI L L, PRESTERL E, ZATORSKA B, et al. Infection control and risk factors for acquisition of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. A 5 year (2011 - 2016) case-control study [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2020, 9(1): 18.

[12] TZOUVELEKIS L S, MARKOGIANNAKIS A, PSICHOGIOU M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4): 682-707.

[13] SHEU C C, CHANG Y T, LIN S Y, et al. Infections caused by carbapenem-resistant enterobacteriaceae: an update on therapeutic options[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 80.

[14] KIEFFER N, POIREL L, NORDMANN P. Rapid immunochromatography-based detection of carbapenemase producers[J]. Infection, 2019, 47(4): 673-675.

[15] 胡继红, 马筱玲, 王辉, 等. MALDI-TOF MS 在临床微生物鉴定中的标准化操作专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(4): 241-249.

[16] 余柏增, 孙宁, 王颖, 等. 检测 5 种碳青霉烯酶基因的多重 PCR 方法的建立及临床应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(15): 2281-2286.

[17] ZHU X, WANG X, HAN L, et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19 [J]. Biosens Bioelectron,

2020,166:112437.

- [18] FENG W, NIU S, CHANG Y, et al. Design of rapid detection system for five major carbapenemase families (bla KPC, bla NDM, bla VIM, bla IMP and bla OXA-48-like) by colorimetric loop-mediated isothermal amplification [J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 1865-1874.
- [19] MECHAL Y, BENAÏSSA E, EL M N, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF system performances in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 1069.
- [20] NORDMANN P, POIREL L. Epidemiology and diagnosis

tics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria [J]. Clin Infect Dis, 2019, 69(Suppl 7): S521-S528.

- [21] 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.
- [22] 张露方, 耿荣华, 曲芬. 耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的流行病学特点以及抗生素应用策略[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(9): 1008-1014.

(收稿日期: 2021-11-11 修回日期: 2022-04-13)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.14.033

胆固醇在肝癌中的作用机制研究进展

张娇弟¹综述, 刘欣跃^{1,2△}审校

兰州大学第二医院: 1. 药物基因组学实验室; 2. 检验医学中心, 甘肃兰州 730000

关键词: 胆固醇; 肝癌; 作用机制; 药物靶点
中图法分类号: R446.1 **文献标志码:** A

文章编号: 1672-9455(2022)14-2004-04

胆固醇是维持细胞结构所必需的基本分子, 对各种正常的生物功能至关重要, 其代谢异常除增加肥胖、心血管疾病等发生风险外, 也与肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[1-2]。HCC是最常见的原发性肝癌类型, 与慢性肝病尤其是病毒性肝炎和代谢性脂肪性肝炎密切相关, 是全球第六大常见的癌症, 也是全球癌症死亡的第四大原因^[3]。尽管近年来肝癌的治疗已有所突破, 但预后仍较差, 治疗效果不理想^[4]。因此, 寻找新的生物标志物或进一步开发新的预测模型对肝癌的预防、治疗及干预具有重要的临床意义。最近的研究显示胆固醇在HCC的发生、发展、耐药性及预后判断等方面发挥着重要的作用^[5-7]。因此深入研究胆固醇在肝癌中的作用, 并阐明其关键的分子机制, 进而对患者采取有效干预措施, 将有可能进一步提高肝癌的诊治水平及改善患者整体生存预后。本文对近年来胆固醇在肝癌中的作用机制与潜在的药物靶点做一综述。

1 胆固醇在肝癌中的作用

1.1 膳食中胆固醇在肝癌中的作用 肝脏是维持体内胆固醇稳态的主要器官, 通过血液循环合成、储存、摄取和分泌胆固醇。研究表明高胆固醇摄入与肝癌发生、发展之间存在联系, 高膳食胆固醇可促进非酒精性脂肪性肝炎(NASH), 并使小鼠易于罹患NASH相关的肝癌^[8], 然而, 过量胆固醇摄入引起的肝毒性和肝癌发生的确切机制仍不清楚。有研究发现给予转基因丙型肝炎病毒核心基因(HCVcpTg)小鼠高胆固醇饮食可诱导肝细胞增殖增强, 肝内氧化和内质网

应激增强, 并且长期食用富含胆固醇的饮食可激活核转录因子(NF- κ B)和p62/Sqstm1-NRF2轴, 增强肝纤维化, 从而加速肝癌的发生^[9]。因此, 丙型肝炎病毒感染患者应避免高胆固醇饮食, 以防止脂肪性肝炎、肝纤维化和肝癌的发展。此外, ZHANG等^[10]研究发现, 高胆固醇膳食可通过诱导小鼠肠道菌群和代谢物的改变, 促进非酒精性脂肪性HCC(NAFLD-HCC)的形成, 长期高胆固醇膳食引起肠道细菌代谢产物改变, 导致小鼠脂肪肝变性、脂肪性肝炎、肝纤维化, 最终导致NAFLD-HCC。LIANG等^[11]也发现在二乙基亚硝胺处理的小鼠中, 胆固醇膳食诱导的NASH-HCC细胞比非胆固醇膳食诱导的脂肪变性-HCC细胞更大、数量更多, 与脂肪变性-HCC细胞相比, NASH-HCC细胞表现出更多的异常基因表达信号通路和更多的非同义体细胞突变, 在高胆固醇膳食小鼠相关的NASH-HCC细胞中发现了一些新的异常基因表达、突变和核心致癌途径, 其中包括代谢相关基因和复发突变基因。这些发现进一步深入了解了膳食中胆固醇与NASH和NASH-HCC之间的联系, 并提供了潜在的治疗靶点。

1.2 血清胆固醇在肝癌中的作用

1.2.1 血清胆固醇促进肝癌发生 虽然多项研究表明高胆固醇饮食与肝癌发生呈正相关^[9-11], 但血清胆固醇与肝癌风险之间的关系存在争议。韩国一项大规模研究显示, 随着血清胆固醇水平的升高, 肝癌的发病率降低^[12]。国内学者温艳等^[13]也发现随着总胆固醇水平的升高, 原发性肝癌的发病风险逐渐降低,