

- [28] LIMA D A, SCHUCH R A, SALGUEIRO J S, et al. Evaluation of volumetric absorptive microsampling and mass spectrometry data independent acquisition of hemoglobin related clinical markers[J]. J Proteome Res, 2022, 21(8):1816-1828.
- [29] PROTTI M, SBERNA P M, SBERNA A E, et al. Enhanced urinary stability of peptide hormones and growth factors by dried urine microsampling[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 204:114234.
- [30] MOORTHY G S, DOWNES K J, VEDAR C, et al. A whole blood microsampling assay for vancomycin; development, validation and application for pediatric clinical study[J]. Bioanalysis, 2020, 12(18):1295-1310.
- [31] PANIAGUA-GONZALEZ L, DIAZ-LOUZAO C, LENDOIRO E, et al. Volumetric absorptive microsampling (VAMS) for assaying immunosuppressants from venous whole blood by LC-MS/MS using a novel atmospheric pressure ionization probe (UniSpray™)[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 189:113422.
- [32] VAN DER HEIJDEN L T, UITTENBOOGAARD A, NIJSTAD A L, et al. A sensitive liquid chromatographic-mass spectrometry method for the quantification of vincristine in whole blood collected with volumetric absorptive microsampling[J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 225:115232.
- [33] YE Z, GAO H. Evaluation of sample extraction methods for minimizing hematocrit effect on whole blood analysis with volumetric absorptive microsampling[J]. Bioanalysis, 2017, 9(4):349-357.
- [34] XIE I, XU Y, ANDERSON M, et al. Extractability-mediated stability bias and hematocrit impact; high extraction recovery is critical to feasibility of volumetric adsorptive microsampling (VAMS) in regulated bioanalysis[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 156:58-66.
- [35] SCUDERI C E, PARKER S L, JACKS M, et al. Kidney transplant recipient's perceptions of blood testing through microsampling and venepuncture[J]. Bioanalysis, 2020, 12(13):873-881.

(收稿日期:2022-12-26 修回日期:2023-05-01)

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.19.030

碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌耐药基因的研究进展*

张晓静^{1,2}, 孟祥瑞³综述, 李静^{4△}审校

1. 菏泽医学专科学校药学与检验系, 山东菏泽 274000; 2. 青岛大学基础医学院病原生物学系, 山东青岛 266021; 3. 山东省郓城县人民医院检验科, 山东菏泽 274700; 4. 青岛大学附属医院崂山院区检验科, 山东青岛 266035

摘要:革兰阴性杆菌(GNB)在临床致病菌中的分离率较高,会造成患者呼吸道、泌尿道等感染及败血症的发生,使患者的痛苦增加并且延长住院时间。碳青霉烯类药物是目前临床上已经被广泛使用的β-内酰胺类抗菌药物。随着这类药物的使用越来越多,对其耐药的GNB不断增加,甚至出现更为严重的多重耐药菌,造成了临床抗感染药物的选择和医院内感染控制的难度进一步加大,增加了临床治疗难度。研究显示,菌株产生的耐药基因在不同国家、地区和不同菌株中均有差异。该文主要对不同种类碳青霉烯类耐药的革兰阴性杆菌(CRO)产生的碳青霉烯酶种类和耐药基因的分布及相应的检测方法进行综述,为CRO的治疗、预防及医院内感染的控制提供数据支持。

关键词:革兰阴性杆菌; 碳青霉烯类耐药; 耐药基因

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)19-2906-06

Research progress in drug resistance genes of carbapenem resistant Gram-negative bacilli*

ZHANG Xiaojing^{1,2}, Meng Xianglu³, LI Jing^{4△}

1. Department of Pharmacy and Laboratory Medicine, Heze Medical College, Heze, Shandong 274000, China; 2. Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Yuncheng County People's Hospital, Heze, Shandong 274700, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Laoshan Branch Hospital, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266035, China

Abstract: Gram-negative bacilli (GNB) has a high isolation rate among clinical pathogenic bacteria, which may cause the occurrence of respiratory tract, urinary tract infection and septicemia, increase the patient's pain

* 基金项目:青岛大学附属医院院级项目(QDFY201929)。

△ 通信作者, E-mail: qdjingl@163.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.r.20230823.1421.004.html\(2023-08-24\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.r.20230823.1421.004.html(2023-08-24))

and prolong the hospital stay. Carbapenems drugs are widely used β -lactam antibacterial agents in clinic. With the increasing use of such drugs, GNB resistant to them is increasing, and even more serious multi-drug resistant bacteria appear, which results in the difficulty further increase of clinical anti-infective drugs selection and the infection control in hospital, and increases the difficulty of clinical treatment. The studies show that the resistance genes produced by strains were different in different countries, regions and bacterial strains. This paper reviews the types of carbapenase produced by different carbapenem resistant Gram-negative bacteria (CRO), the distribution of drug resistance genes and the corresponding detection methods to provide the data support for the treatment, prevention and nosocomial infection control of CRO.

Key words: Gram-negative bacillus; Carbapenem resistance; drug resistance gene

抗菌药物的长期不规范使用或滥用是导致细菌耐药性增加的重要因素之一。目前国内大多数医院根据国家卫生健康委员会下发的文件,主要监测的多重耐药菌包括碳青霉烯类耐药的肠杆菌(CRE)、碳青霉烯类耐药的铜绿假单胞菌(CRPA)、碳青霉烯类耐药的鲍曼不动杆菌(CRAB)、耐万古霉素肠球菌(VRE)及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)。2017年,世界卫生组织公布的急需研发新型药物的重点病原体名单中,CRE、CRPA与CRAB被列为优先I级(危急)^[1]。

在临床分离的致病菌中,革兰阴性杆菌(GNB)的分离率较高,GNB可导致呼吸道、泌尿道等感染及败血症的发生,使患者的痛苦增加并且延长住院时间^[2]。在治疗严重感染性疾病的药物中,碳青霉烯类药物是目前临床上已经被广泛使用的抗菌药物,主要用于GNB感染的治疗,该类物质还能对革兰阳性球菌起到良好的抗菌作用,同时对厌氧菌也有很好的疗效。但是,随着该类药物的使用越来越多,碳青霉烯类耐药的革兰阴性杆菌(CRO)不断增加,为临床抗感染药物的选择造成困难,CRO感染已经成为全球化的公共卫生问题。CRO定义为对亚胺培南(IPM)、美罗培南(MEM)和厄他培南中任意一种药物耐药的GNB。CRO感染的临床治疗具有挑战性,目前临床上仅有头孢他啶-阿维巴坦等少数几种新型药物有效,并且此类药物针对性强,对于产金属酶的菌株抗菌活性差,因此很有必要检测细菌是否产碳青霉烯酶及产哪种类型的碳青霉烯酶。这就要求临床根据体外药敏试验结果、产酶的类型及患者感染的严重程度,采用个体化治疗方案来治疗CRO的感染。

1 CRO的种类

1.1 CRE 肠杆菌是最常见的引起感染性疾病的GNB,约占GNB感染的80%。资料显示2014—2020年,全国GNB致病菌分离率居前3位的是大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌(KPN)、铜绿假单胞菌(PA)^[3]。碳青霉烯类药物是目前临床上已经被广泛使用的抗菌药物,随着这类药物的使用频率增加,对其耐药的肠杆菌也不断增加,CRE在临床医疗机构快速播散。头孢他啶-阿维巴坦被认为是治疗CRE的首选药物,与其他抗菌药物(包括多黏菌素)相比,头孢他啶-阿维巴坦可提高临床治愈率^[4]。我国CRE以KPN为主,此

菌具有强大的将获得的耐药基因进行传播的能力。目前,随着医院使用抗菌药物越来越规范,2019年和2020年,KPN对MEM和IPM的耐药率有所降低,但是检出的KPN菌株数仍然比较多^[5]。邹凤梅等^[6]报道显示,51株CRE临床分离菌株中20株为KPN。CRE的主要耐药机制是产碳青霉烯酶,不同国家临床分离菌株产碳青霉烯酶的种类有所差异,这种差异取决于不同菌株携带的耐药基因不同^[7]。在希腊医院进行的一项多中心全国监测中,临床分离的CRE菌株携带的bla_{KPC}基因占首位,bla_{NDM}基因占第2位^[8];在阿拉伯半岛,bla_{NDM-1}是最常见的耐药基因(46.5%);在阿拉伯联合酋长国并未检测到表达bla_{KPC}基因的分离株;在欧洲,38%的CRE可检测到bla_{OXA-48}基因,仅次于携带bla_{KPC}基因的肠杆菌科细菌(42%),但高于携带bla_{NDM}基因的肠杆菌(12%);我国西南地区临床分离的CRE菌株以携带bla_{IMP-9}基因和bla_{VIM-2}基因为主,而我国大部分地区CRE菌株主要携带bla_{KPC}和bla_{NDM}基因^[10]。临床分离菌株携带的耐药基因在不同种类细菌之间不同,其中KPN主要携带bla_{KPC-2}基因,阴沟肠杆菌主要携带bla_{NDM-1}基因亚型,大肠埃希菌主要携带bla_{NDM-5}基因亚型。从CRE分离出的耐药基因在成人与儿童患者中也存在差异:从成人分离出的CRE中以bla_{KPC-2}型耐药基因为主,而儿童主要以bla_{NDM}型耐药基因为主。有报道称,bla_{OXA-232}基因在儿童患者的KPN中检测出,并且bla_{OXA-232}基因可能会成为继bla_{KPC-2}和bla_{NDM}基因之后我国“第三种流行”的碳青霉烯酶基因^[11]。HAN等^[12]对CRE菌株进行多位点序列分型(MLST)发现,ST11型在我国最常见,主要分布在我国北部、南部、东部、中部、东北部和西南部,其次是ST17型,主要分布在西北部地区。

1.2 CRPA PA是临床常见的机会性感染病原菌之一,是一种对生存环境要求不高的专性需氧菌。在机体免疫功能低下时,PA极易发生严重的皮肤、泌尿系统等感染,还可进入血液中导致菌血症乃至败血症。临床标本中分离的PA分为黏液型和非黏液型,虽然药敏结果显示黏液型对抗菌药物相对敏感,但在临床治疗过程中并不能达到理想的效果,主要由于黏液型PA可以在菌体外形成生物膜而阻止抗菌药物进入菌体,生物膜的形成可使黏液型PA在抗菌药物环

境下生存,导致临床治疗的失败。自 20 世纪 80 年代,碳青霉烯类药物被推荐作为该病原体引起的感染治疗后,就出现了 CRPA 及更为严重的多药耐药性(MDR)、广泛耐药性(XDR)甚至全耐药(PDR),同时由于 PA 对于多种抗菌药物存在固有耐药现象,因此该菌的治疗难度比其他 GNB 更大,使 CRPA 成为全球性的公共卫生问题^[13]。近几年,随着临床抗菌药物使用的规范化,我国对 MEM 及 IPM 耐药的 PA 检出率有所下降^[5],但 CRPA 的耐药机制比其他大部分 GNB 更为复杂,大致上包括产碳青霉烯酶和非产酶两种,在非产酶因素中,外排泵过表达是 CRPA 产生的主要原因,而外膜蛋白 Opr-D₂ 缺失可导致 PA 对 MEM 的敏感性降低。产酶机制中金属 β-内酰胺酶的产生是导致 CRPA 耐药的主要因素,目前已发现的主要有 IMP、KHM、DIM、VIM、SPM、GIM、SIM、AIM 和 NDM 9 种,我国主要以 IMP 和 VIM 碳青霉烯酶为主。自 2006 年在广州分离的 7 株 CRPA 菌株中发现 bla_{IMP-9} 基因后,携带 bla_{IMP-9} 和 bla_{VIM-2} 基因的菌株已成为我国 CRPA 的常见亚型。检测出丝氨酸碳青霉烯酶或 OXA 型丝氨酸碳青霉烯酶的 CRPA 也被报道:杨春等^[14]在济南某儿童医院检测出 1 株 CRPA 携带 bla_{OXA-10} 型耐药基因。

1.3 CRAB 鲍曼不动杆菌(AB)是一种非发酵的 GNB,是造成医院感染的重要病原菌。此菌易在医院用水、医疗物品等医院环境中及患者皮肤表面广泛存在并长期存活。有报道显示,AB 的感染主要以呼吸系统为主,一般造成医院获得性肺炎,尤其是长期住院、有基础疾病、接受侵入性医疗操作、使用广谱抗菌药物的重症监护室内的老年患者,极易引起严重的感染^[15]。我国 AB 临床分离率较高,2020 年和 2021 年在非发酵的 GNB 中均位于第 2 位,分别为 33.3% 和 31.9%^[5]。近年来随着碳青霉烯类药物被用作治疗 AB 感染,CRAB 的分离率逐年增高,并且 CRAB 也会产生对其他种类抗菌药物耐药的情况,这就给抗 AB 感染的治疗带来了巨大困难。AB 耐药机制复杂多样,与 CRE 和 CRPA 相似,其最常见的耐药机制是产生水解碳青霉烯类药物的酶,这种酶是由细菌自身产生,可降解进入患者体内的抗菌药物,导致抗菌药物不能与形成细胞壁的物质——青霉素结合蛋白有效结合,从而使菌株对抗菌药物产生耐药。其中最常见的是 OXA 型丝氨酸碳青霉烯酶,国内 80% 的 CRAB 分离菌株均可产生 OXA-23 型酶,该酶是苏格兰人在 AB 中发现的第 1 种碳青霉烯酶^[16]。随后又在菌株中分离出 OXA-24、OXA-25、OXA-51 等 OXA 型酶,其中与菌株耐药没有关系的是 OXA-51,OXA-51 型酶的检出只是用于证实菌株的存在^[17]。同时,AB 中还检测出了 IMP、SIM、VIM 类等金属 β-内酰胺酶,产金属 β-内酰胺酶的 CRAB 在我国各地区的检出率存在差异。除此之外,RND 外排泵激活与菌株耐药性有很大的关系。外排泵在赋予菌株耐药表型的同时,

也使菌株获得了其他类型的耐药机制。AdeABC 系统、AdeIJK 系统、AdeFGH 系统是其类型,其中 AdeABC 系统是第 1 个被发现的 RND 外排泵,一旦菌株环境改变或者发生基因突变,其中任何一个外排泵过度表达都会使菌株对药物的敏感性降低。同时,与 CRAB 有关的使细菌通透性改变的主要是外膜孔蛋白 CarO 的表达^[15]。AB 还会通过多种机制使 β-内酰胺类的抗菌药物与青霉素结合蛋白的结合力降低,导致菌株的耐药现象出现。

2 碳青霉烯酶的分类

CRO 的耐药机制呈现复杂性和多样性,主要有以下几种:产碳青霉烯酶,水解碳青霉烯类药物;主动外排功能亢进,使菌株主动将抗菌药物排出体外;外膜孔径蛋白减少或丢失后导致孔径蛋白通透性降低,从而使抗菌药物不能进入菌体内;药物作用靶位青霉素结合蛋白的改变,使药物不能抑制细菌细胞壁的合成,从而不能发挥抑菌或杀菌作用;生物膜形成后,能够阻止药物进入细菌体内,使药物不能达到有效的抗菌浓度等。其中,最重要的耐药机制是产碳青霉烯酶。

2.1 丝氨酸碳青霉烯酶 该酶是全球肠杆菌目细菌特别是 KPN 主要产生的耐药性酶类^[11],产生该类酶的菌株对乙二胺四乙酸(EDTA)不敏感,对大多数 β-内酰胺类抗菌药物耐药,目前处于临床研究阶段的美罗培南-韦博巴坦和亚胺培南-瑞来巴坦对产 KPC 型丝氨酸碳青霉烯酶菌株具有高度抗菌活性^[18]。bla_{KPC} 是 CRO 产生的最常见的耐药基因,主要有 bla_{KPC-2}、bla_{KPC-3}、bla_{KPC-15} 等多种亚型,我国 CRE 分离株以携带 bla_{KPC-2} 亚型最常见,bla_{KPC-2} 可通过质粒在不同菌种之间传播,多数情况下这些质粒还携带多种其他耐药基因,导致菌株能水解多种抗菌药物,对多种药物表现出耐药性。近两年来产 KPC 型丝氨酸碳青霉烯酶在治疗过程中快速突变而导致临床抗感染治疗失败是当前全球需重点关注的问题^[7]。也有 PA 中检出 bla_{KPC-2} 亚型的报道,除此之外,SHV、GES、TEM 等丝氨酸碳青霉烯酶也可以在 PA 中检出,其中 VEB 是 PA 中最常见的 A 类酶^[19]。

2.2 金属 β-内酰胺酶 EDTA 可抑制该类酶的活性,产生该类酶的菌株对碳青霉烯类、头孢菌素类、青霉素类抗菌药物均耐药,但是对氨基糖苷类敏感。目前处于临床研究阶段的美罗培南-韦博巴坦和亚胺培南-瑞来巴坦对产金属 β-内酰胺酶菌株无抗菌活性^[18]。到目前为止,已发现的金属 β-内酰胺酶有 VIM、IMP、NDM、SPM 等 9 种,我国临床分离的 CRE 菌株主要产生的金属 β-内酰胺酶为 bla_{NDM} 和 bla_{IMP} 基因型。我国临床分离的 CRPA 菌株产生的金属 β-内酰胺酶以 bla_{IMP-9} 和 bla_{VIM-2} 基因型为主。临床菌株携带的金属酶编码基因有天然来源的,也有获得性的。天然来源的金属酶编码基因在临床使用碳青霉烯类药物之前就已经产生,基因主要存在于细菌染色体上,只能垂直传播并且传播范围相对较小;而获得性的金属酶

编码基因可以通过质粒结合后传递或者移动元件在不同菌种之间传播,给监控医院感染带来了很大困难。

2.3 OXA 型丝氨酸碳青霉烯酶 该酶的活性可以被一些含酶抑制剂的复合药物灭活或抑制。产此酶的菌株活性能被头孢他啶-阿维巴坦所抑制,但美罗培南-韦博巴坦和亚胺培南-瑞来巴坦对产此酶的菌株无抗菌活性。此酶只水解青霉素类和碳青霉烯类药物,对超广谱头孢菌素类药物的水解能力较弱。 bla_{OXA-23} 是不动杆菌属携带的主要耐药基因,除此之外在不动杆菌属临床分离菌株中还可检测到 bla_{OXA-40} 、 bla_{OXA-58} 和 $bla_{OXA-143}$ 耐药基因^[20]。临床常见的 bla_{OXA-48} 耐药基因的亚型为 $bla_{OXA-181}$ 和 $bla_{OXA-232}$,常见于肠杆菌科细菌^[7]。

3 CRO 的检测方法

表型检测和基因型检测是常见的两大类检测碳青霉烯酶的方法,其中基因型检测主要包括酶免疫层析技术、聚合酶链反应(PCR)技术等。但是在基层医院,耐药基因型的检测由于需要专门的仪器设备,且价格昂贵,推广和开展难度较大。表型检测虽然比较单一,不能全面检测产生的碳青霉烯酶,但是具有操作简单、价格低等优点,已在各县级医院常规开展。临床常用的表型检测主要有碳青霉烯酶抑制剂增强试验、Carba NP 试验等。

3.1 碳青霉烯酶抑制剂增强试验 碳青霉烯酶抑制剂增强试验根据丝氨酸碳青霉烯酶和金属 β -内酰胺酶的特点而设计,利用了 3-氨基苯硼酸(APB)可以抑制 A 类丝氨酸碳青霉烯酶的活性,而 EDTA 可以抑制金属 β -内酰胺酶的活性的特点^[21]。APB 联合 EDTA 既可以检测单产 A 类丝氨酸酶、单产金属 β -内酰胺酶,又可以检测同时产生两种不同类型酶的肠杆菌目细菌。王璐等^[22]对 227 株临床分离菌株的研究表明,该方法对单产 A 类丝氨酸酶或金属 β -内酰胺酶检测的灵敏度及单产金属 β -内酰胺酶的特异度均为 100.0%,与 PCR 相比,具有较高的检测一致性。此方法操作简便,对技术要求不高。与改良的碳青霉烯酶灭活试验(mCIM)联合 EDTA 改良碳青霉烯酶灭活试验(eCIM)相比,此方法可以检测同时产生两类酶的菌株,但不能检测携带 bla_{OXA-48} 耐药基因的菌株,检测时间较长。

3.2 Carba NP 试验 Carba NP 试验是美国临床和实验室标准协会(CLSI)在 2015 年提出的一种新的表型检测试验。该试验的检测原理主要依据细菌裂解液能体外水解碳青霉烯类药物 IPM,以苯酚红为指示剂,药物水解后使溶液的 pH 值发生变化而发生指示剂颜色变化来判断结果。Carba NP 试验具有高灵敏度和特异度的优点,对产生 KPC、VIM、NDM 酶的肠杆菌目细菌具有高于 90.0%的灵敏度和特异度,对含有碳青霉烯酶的假单胞菌属具有 100.0%的特异度和 94.4%的灵敏度。但是如果菌株产生染色体介导

bla_{OXA-48} 耐药基因,Carba NP 试验对 bla_{OXA-48} 基因的灵敏度仅为 6.0%。为提高该试验的灵敏度及检测 bla_{OXA-48} 耐药基因的灵敏度,NORDMANN 等^[23]开发了 nitrospedcarba NP 试验,该方法检测 OXA-48 型碳青霉烯酶的灵敏度为 100.0%,特异度为 97.0%。并且有研究将氧化锆珠添加到细菌悬液中促进菌体裂解,同时增加细菌量获得浓缩提取物,可将 bla_{OXA-48} 基因检测的灵敏度从 56.0%提高至 71.0%。Carba NP 试验的优点为检测速度快、操作简单、成本低、灵敏度和特异度高,适合基层实验室开展。缺点为部分试剂需要自制并且保质期短,目前已经开发了含亚胺培南的长保质期的试剂,弥补了这一不足。如果由其他机制导致细菌的耐药性产生,该试验结果会出现假阴性,且该方法对结果的颜色变化判断存在一定的主观性和实验室之间的技术差异。

3.3 酶免疫层析技术 此技术是基于抗原抗体免疫反应,以培养后获得的纯细菌菌落为基础的体外定性检测的方法。这种方法能够检测 KPC、NDM、VIM、IMP、OXA-48 5 种碳青霉烯酶中的一种或者几种,鉴定患者对碳青霉烯类药物是否产生耐药性。此技术是近年发展起来的最快速的技术,具有操作简单、快速,不需要大型的设备,结果容易判读的优点。在临床上检测自危重症患者标本中分离出的 CRE 时,可以采用此方法,以协助临床快速制订个体化治疗方案^[7]。但这种方法的缺点是价格贵,临床还不能用于常规检测。李静等^[24]采用胶体金免疫层析技术(将 5 种碳青霉烯酶的单克隆抗体与胶体金结合,再固定在醋酸纤维素薄膜上)对 79 株 CRE 菌株进行产酶检测,并与 PCR 检测的结果进行对比,结果发现胶体金免疫层析技术的灵敏度和特异度均为 100.0%。GLUPCZYNSKI 等^[25]使用 resistance-4 K-SeT 方法分别对 KPC、NDM、VIM、OXA-48 型酶进行检测后发现, resistance-4 K-SeT 检测 OXA-48、KPC 和 NDM 酶的灵敏度为 100.0%,检测 VIM 酶的灵敏度为 97.4%,检测所有碳青霉烯酶的特异度均为 100.0%。

3.4 PCR 技术 PCR 技术是目前检测碳青霉烯酶中应用最多的一代测序手段。此技术不仅可以检测菌株是否产碳青霉烯酶,而且可以检测产酶的基因型。目前,已有多种碳青霉烯酶检测的多重 PCR 技术。与单纯 PCR 相比,多重 PCR 反应的灵敏度更高。在用单纯 PCR 检测为阴性结果时,所有基因都可能被怀疑的情况下,多重 PCR 筛查方案可作为一线筛查应用,降低了多次 PCR 的成本。PCR 技术由于扩增和电泳耗时,在临床的应用受到了一定的限制。为了使检测更加方便快捷,临床已普遍采用荧光定量 PCR 技术,该技术不需要纯的菌落,用临床样本就可以检测,检测速度快,1 h 就可以出结果,具有较高的灵敏度和特异度。但是荧光定量 PCR 技术主要对 KPC、VIM、NDM、OXA-48 和 IMP 酶进行检测,并且

价格相对较贵。

3.5 二代测序技术 二代测序又称为高通量测序,此技术引入了可逆终止末端,实现边合成边测序,通过捕捉新添加的链末端荧光标志确定 DNA 序列。二代测序除可检测血液标本外,还可检测粪便、组织等各种标本,可覆盖多种病原体 and 耐药基因,尤其是未知基因。二代测序技术在人类医学的主要应用有全基因组测序^[26],寻找大量的单核苷酸变异、插入缺失变异等;全外显子组测序技术主要应用于癌症、遗传性疾病等领域,寻找癌症相关的突变;转录组测序技术用于分析转录信息,寻找个体间基因表达的差异和靶向区域测序等。二代测序技术具有通量高、读长短(不超过 500 bp)的特点,已在微生物耐药机制、新病原体的发现等方面有所应用,即将成为医院疾病检测的新工具。

4 小 结

综上所述,在抗菌药物选择压力下,在不同菌株中可检测出碳青霉烯酶,并且能够在菌种之间相互传播,对医院内感染的监测带来极大困难。由于不同院所使用抗菌药物的类型有所差异,因此,研究简单快速、特异的适合各级实验室检测 CRO 表型及基因型的方法对 CRO 的控制及治疗起了关键作用。

参考文献

[1] 温伟洪,梁英健,马芙蓉,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌碳青霉烯酶检测与多位点序列分型分析[J].检验医学,2019,34(7):577-582.

[2] 葛婷婷,叶鸿雁,谢红意,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的分布特点及耐药性分析[J].中国卫生检验杂志,2020,30(9):1079-1081.

[3] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,全国细菌耐药监测网.2014—2019 年细菌耐药性监测报告[J].中国感染控制杂志,2021,20(1):15-31.

[4] CHEN Y, HUANG H B, PENG J M, et al. Efficacy and safety of ceftazidime-avibactam for the treatment of carbapenem-resistant enterobacteriales bloodstream infection; a systematic review and meta-analysis[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0260321.

[5] 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.

[6] 邹凤梅,吴玲,李可可,等.耐碳青霉烯类抗菌药物革兰阴性杆菌临床分布及耐药基因调查[J].临床检验杂志,2021,39(8):607-610.

[7] 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(第二版)[J].中国感染与化疗杂志,2022,22(4):463-474.

[8] GALANI I, KARAIKOS I, KARANTANI I, et al. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016 [J/OL]. Euro Surveill, 2018, 23(31) [2023-04-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30086819/>.

[9] SONNEVEND Á, GHAZAWI A A, HASHMEY R, et al. Characterization of Carbapenem-resistant enterobac-

teriaceae with high rate of autochthonous transmission in the arabian peninsula [J]. PloS One, 2015, 10(6): e0131372.

[10] 谢佳,张雪飞,肖胤勃,等.临床常见革兰阴性菌对碳青霉烯类药物耐药性检测[J].热带医学杂志,2014,14(2):158-161.

[11] TIAN D, PAN F, WANG C, et al. Resistance phenotype and clinical molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among pediatric patients in Shanghai [J]. Infect Drug Resist, 2018, 11: 1935-1943.

[12] HAN R, SHI Q, WU S, et al. Dissemination of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) among carbapenem-resistant enterobacteriaceae isolated from adult and children patients in China [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 314.

[13] NASSAR O, DESOUKY S E, EL-SHERBINY G M, et al. Correlation between phenotypic virulence traits and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates [J]. Microb Pathog, 2022, 162: 105339.

[14] 杨春,历建芝,朱效茹,等.耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药特征及其耐药机制的研究[J].中国病原生物学杂志,2016,11(2):173-176.

[15] CHANDRA P, RAJESH V, SURULIVELRAJAN M, et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections; looming threat in the Indian clinical setting [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2022, 20(5): 721-732.

[16] LEUS I V, WEEKS J W, BONIFAY V, et al. Substrate specificities and efflux efficiencies of RND efflux pumps of *Acinetobacter baumannii* [J]. J Bacteriol, 2018, 200(13): e00049.

[17] SFEIR M M, HAYDEN J A, FAUNTLEROY K A, et al. EDTA-modified carbapenem inactivation method; a phenotypic method for detecting metallo-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(5): e01757.

[18] NOVELLI A, DEL GIACOMO P, ROSSOLINI G M, et al. Meropenem/vaborbactam: a next generation β -lactam β -lactamase inhibitor combination [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2020, 18(7): 643-655.

[19] EMANEINI M, KALANTAR-NEYESTANAKI D, JABALAMELI L, et al. Molecular analysis and antimicrobial resistance pattern of distinct strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Iran [J]. Iran J Microbiol, 2019, 11(2): 98-107.

[20] 李东明,王宇凡,武玉晶,等.耐碳青霉烯革兰阴性杆菌耐药性及基因分型[J].中华医院感染学杂志,2021,31(6): 816-820.

[21] 中华人民共和国卫生部.关于印发《产 NDM-1 泛耐药肠杆菌科细菌感染诊疗指南(试行版)》的通知[EB/OL]. [2022-01-20]. <http://www.nhc.gov.cn/zw/gkzt/pyzg1/201010/49274.shtml>.

[22] 王璐,黄新明,章杰,等.碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测肠杆菌目细菌碳青霉烯酶表型的临床应用[J].蚌埠医学院学报,2022,47(12):1707-1711.

[23] NORDMANN P, SADEK M, DEMORD A, et al. Nitro-

Speed-Carba NP Test for rapid detection and differentiation between different classes of carbapenemases in enterobacterales[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(9): e00932.

[24] 李静, 耿志军, 郑晶. 胶体金免疫层析法快速检测 CRE 碳青霉烯酶的效果评价[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(8): 1089-1092.

[25] GLUPCZYNSKI Y, EVRARD S, HUANG T D, et al. Evaluation of the RESIST-4 K-SeT assay, a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of

OXA-48-like, KPC, VIM and NDM carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(5): 1284-1287.

[26] SINGH S, MAHATO A K, JAYASWAL P K, et al. A 62K genic-SNP chip array for genetic studies and breeding applications in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4960.

(收稿日期: 2022-12-31 修回日期: 2023-05-16)

• 综 述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.19.031

宫颈癌及癌前病变筛查的研究进展

刘红霞, 郭娟[△]综述, 杨艳, 杨雪梅 审校
重庆市第五人民医院妇产科, 重庆 400062

摘要: 宫颈癌是目前病因明确, 可以通过注射人乳头瘤病毒(HPV)疫苗预防, 通过癌前筛查发现、及时采取措施, 阻断疾病进展的恶性肿瘤。随着医疗技术的发展, 宫颈癌筛查技术也得到了很大进步, 该文通过对宫颈细胞学检查、HPV 检测、基因甲基化检测、阴道镜和宫颈叶酸受体染色技术进行归纳总结, 以期为临床工作者的宫颈癌筛查工作提供帮助。

关键词: 宫颈癌; 癌前病变; 筛查方法

中图分类号: R737.33

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)19-2911-05

Study advances in screening for cervical cancer and precancerous lesions

LIU Hongxia, GUO Juan[△], YANG Yan, YANG Xuemei

Department of Obstetrics and Gynecology, Chongqing Municipal Fifth People's Hospital, Chongqing 400062, China

Abstract: Cervical cancer is a malignant tumor which has clear pathogenesis, can be prevented by injected of human papilloma virus (HPV) vaccine and be discovered by precancer screening, and the progress of this malignant tumor can be obstructed by timely adopting the measures. With the development of medical technology, the cervical cancer screening technology has also made great progress. This paper summarizes the techniques of cervical cytology examination, HPV detection, gene methylation detection, colposcopy and cervical folic acid receptor staining techniques, in order to provide help for clinical workers in the cervical cancer screening work.

Key words: cervical cancer; precancerous lesions; screening methods

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤, 发病率位于全球女性癌症的第 4 位, 是女性癌症相关死亡的第 4 大原因^[1]。虽然宫颈癌有较长的癌前病变期, 但是早期宫颈癌无特异性临床症状, 多数患者就诊时即为晚期, 错过了最佳治疗时机, 患者生存质量明显下降, 病死率增加。发达国家宫颈癌筛查开展得早, 宫颈癌发病率呈下降趋势, 发展中国家筛查开展得晚, 现仍呈上升趋势^[2]。及早筛查出宫颈癌前病变, 并给予及时干预和治疗, 可阻断宫颈癌前病变的进展, 减少宫颈癌的发生。本文将宫颈癌及癌前病变筛查方法的研究进展进行综述。

1 宫颈细胞学检查

1.1 巴氏细胞学涂片检查 巴氏细胞学检查历史悠久, 于 20 世纪 40 年代用于宫颈脱落细胞形态学评

估。该方法用刮片刮取宫颈表面脱落细胞, 在玻片上涂片、固定和巴氏染色, 再由专业人员读片和进行病理分级。该筛查方式简单, 患者无创伤, 检测费用低, 并且筛查所需仪器十分常见, 目前在资源匮乏的地区仍广泛使用^[3]。但在取样时可能出现漏取病变部位细胞, 制片后容易受细胞重叠、黏液和血液影响, 以及受检查者阅片技术和主观判断影响, 导致灵敏度低, 假阴性率高^[4]。

1.2 液基薄层细胞学检查 液基薄层细胞学检查是以巴氏细胞学涂片为基础发展起来的, 目前临床上被广泛使用, 是全球认可度较高的宫颈细胞学检测手段^[5]。该技术将细胞与黏液、血液等物质分离, 制备的涂片细胞均匀清晰, 层次分明, 更容易识别病变细胞, 大大提高了标本满意度和宫颈异常细胞的检出

[△] 通信作者, E-mail: 32579097@qq.com.