

网络出版时间: 2019-1-3 17:25 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.007.html>

耐碳青霉烯粘质沙雷菌耐药基因及分子流行病学研究

袁园^{1,2}, 陈继中², 潘亚萍¹, 徐元宏¹, 王中新¹

摘要 目的 探究耐碳青霉烯粘质沙雷菌耐药表型和碳青霉烯酶基因,同时分析其分子流行病学特征。方法 收集临床分离非重复的 67 株碳青霉烯类耐药的粘质沙雷菌,以纸片扩散法和 Vitek-2 Compact 检测常见药物敏感性;采用改良碳青霉烯类灭活试验(mCIM)、Carba NP 试验、改良 Hodge 试验(MHT)对碳青霉烯酶进行筛查;PCR 检测碳青霉烯酶基因;PCR 检测肠杆菌科细菌基因重复序列(ERIC)对耐药菌进行克隆型分析。结果 碳青霉烯耐药的粘质沙雷菌主要来自重症监护室(ICU),以痰液标本为主;药敏结果显示 67 株细菌对头孢噻肟、头孢曲松 100% 耐药,对亚胺培南、美罗培南、厄他培南、氨曲南耐药率均大于 90%,对环丙沙星、庆大霉素、妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、左氧氟沙星耐药率较高,仅对阿米卡星和复方新诺明保持高度敏感;mCIM、Carba NP 试验、MHT 阳性率分别为 92.54%、89.55%、91.04%;PCR 显示 67 株粘质沙雷菌中,检出 *bla*_{KPC} 基因 32 株、*bla*_{OXA-23} 组基因 7 株、*bla*_{OXA-51} 组基因 7 株、*bla*_{GES} 基因 3 株、*bla*_{OXA-58} 组基因 1 株,其中有 8 株细菌同时含有多种耐药基因;67 株耐碳青霉烯的粘质沙雷菌可分为 8 个型别(以 A~H 表示),其中 A 型(50 株)最多。结论 分离的耐碳青霉烯粘质沙雷菌呈现多重耐药性,主要携带 *bla*_{KPC} 和 *bla*_{OXA} 基因,且有多基因联合共存现象。同种克隆集中趋势明显,有引起院内感染爆发流行可能。

关键词 粘质沙雷菌;碳青霉烯酶;耐药基因;肠杆菌科细菌基因重复序列;同源性分析

中图分类号 R 466.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)01-0033-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.007

粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*, SM)是兼性厌氧革兰阴性杆菌,属肠杆菌科沙雷菌属,是一种广泛分布于自然界和医院环境中的条件致病菌。该菌可在人体抵抗力下降、外科手术、输血、创伤、侵入性操作等条件下导致包括肺部感染、泌尿系感染、血流感

染及创口感染等,并有可能导致院内感染的爆发流行。碳青霉烯类抗生素是一类对超广谱 β -内酰胺酶和头孢菌素酶稳定的超广谱、抗菌活性极强的非典型 β -内酰胺类抗生素。因其具有高渗透性、低毒性、快速杀菌效果而被临床广泛使用。根据 2015~2017 年中国细菌耐药监测网(CHINET)细菌耐药性监测报告^[1-3]可知,碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌的临床分离率和耐药率都在逐步上升,产碳青霉烯酶是其主要的耐药机制^[4]。该研究主要针对碳青霉烯耐药粘质沙雷菌的耐药表型和碳青霉烯酶基因的携带情况进行探究,同时分析耐药菌的同源性,为临床抗感染治疗和院内感染防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2014 年 1 月~2017 年 12 月安徽医科大学第一附属医院检验科微生物室分离的对碳青霉烯类抗生素耐药(亚胺培南、厄他培南、美罗培南中任一药物耐药)的粘质沙雷菌,剔除同一患者相同部位重复分离株后,共获得 67 株作为实验样本。质控菌株为肺炎克雷伯菌(ATCC BAA-1705、ATCC BAA-1706)和大肠埃希菌(ATCC 25922)。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定分析仪、MALDI-TOF-MS 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪、麦氏比浊仪(法国梅里埃生物公司);Biometra 基因扩增仪(德国 Biometra 公司);电泳仪(上海天能科技公司);紫外线凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司);NanoDrop one 微量紫外-可见分光光度计(美国赛默飞公司)。

1.2.2 主要试剂 仪器配套 GN 鉴定卡和 GN13 药敏卡(法国梅里埃生物公司);Muller-Hinton 琼脂、药敏纸片(英国 Oxoid 公司);血平板和 MH 平板(合肥天达诊断试剂公司);亚胺培南西司他丁钠(杭州默沙东制药公司);琼脂糖(法国 BIOWEST 公司);细菌蛋白抽提液(美国赛默飞公司);6×Loading buffer、Premix Taq(日本 TaKaRa 公司);酚红粉末、Zn-

2018-09-27 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2010A174)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

² 铜陵市人民医院输血科,铜陵 244000

作者简介:袁园,男,主管检验师,住院医师,硕士研究生;

王中新,男,主任技师,硕士生导师,责任作者, E-mail: ay-wzhx87@163.com

SO₄ · 7H₂O、NaOH、HCl、50 × TAE、引物、核酸染料、DNA Marker DL2000(上海生工生物公司)。

1.3 细菌鉴定与药敏试验

1.3.1 细菌鉴定 采用 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定分析仪进行,使用 MALDI-TOF-MS 质谱仪进行细菌鉴定的复核,以确保入选菌株的准确性。

1.3.2 药敏试验 采用 2017 年美国临床和实验室标准化协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)推荐的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)法或纸片扩散法(kirby-bauer, K-B 法)进行并判读结果^[8], MIC 范围不能满足 CLSI 折点判断要求的药物,采用纸片扩散法测定。

1.4 碳青霉烯酶表型筛选

1.4.1 改良碳青霉烯类灭活试验(modified carbapenem inactivation method, mCIM) 按 CLSI 2017 推荐的方法进行,用 1 μl 接种环挑取血平板上培养过夜的菌落,加入 2 ml/管的胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)中,涡旋震荡混匀 10 ~ 15 s。每管中加入 1 片 10 μg 美罗培南纸片后,放入(35 ± 2) °C 的 CO₂ 培养箱中,孵育 4 h ± 15 min。在完成 TSB-美罗培南纸片菌悬液孵育前后,立即用生理盐水制备大肠埃希菌 ATCC 25922 的 0.5 麦氏浓度标准菌液。将菌液在 15 min 内完成 MHA 琼脂平板的涂布,干燥 3 ~ 10 min。将美罗培南纸片用 10 μl 接种环取出,并注意贴壁挤压,挤去多余水分后贴在 MHA 平板上。倒置放入(35 ± 2) °C 的 CO₂ 培养箱中,培养 18 ~ 24 h,测量抑菌圈直径。结果判读:①碳青霉烯酶阳性:抑菌圈 6 ~ 15 mm 或 16 ~ 18 mm 但圈内有散在菌落;②碳青霉烯酶阴性:抑菌圈 ≥ 19 mm,不论圈内有菌落;③中性结果:抑菌圈 16 ~ 18 mm,需检查 ATCC 25922 纯度,检查美罗培南质控,重复 mCIM,或检测碳青霉烯酶基因。阳性和阴性质控菌株,分别使用肺炎克雷伯 ATCC BAA-1705/ATCC BAA-1706,同时加做空白对照。

1.4.2 Carba NP 试验 按 CLSI 2015 推荐的方法进行,配制 A 液:在 50 ml 容器中,分别加入 16.6 ml 实验室试剂用水、2 ml 的 0.5% 酚红溶液、180 μl 的 10 mmol/L 硫酸锌溶液,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液或 10% 的 HCl 溶液调整 pH 值至 7.8 ± 0.1, 4 ~ 8 °C 避光保存,2 周内有效。配制 B 液:称取亚胺培南西司他丁钠药粉(以亚胺培南有效成分计),每毫升 A 液加入 6 mg 亚胺培南,4 ~ 8 °C 储存,3 d 内有效。待测菌株、质控菌株、空白对照各取两只微量离心管分别标记为 A、B,每管加入 100 μl 细菌蛋白抽提

液。菌株在血平板上培养过夜,用 1 μl 接种环取 1 环加入各管中(空白对照不加),旋涡振荡器振荡混匀。A 管中加入 100 μl A 液, B 管中加入 100 μl B 液,再次震荡混匀,放入(35 ± 2) °C 培养箱中,孵育 2 h 后观察结果。结果判读,碳青霉烯酶阳性: A 管红色、B 管黄色/橙色;碳青霉烯酶阴性: A 管红色、B 管红色;无效结果: A、B 两管皆为黄色/橙色。质控菌株同 1.4.1。

1.4.3 改良 Hodge 试验(modified hodge test, MHT)

按 CLSI 2012 推荐的方法进行,美罗培南抑菌圈边缘与待测菌株或质控菌株划线交叉处,出现增强性(矢状)生长为产碳青霉烯酶阳性,反之为阴性。质控菌株同 1.4.1。

1.5 引物合成 耐药基因引物和肠杆菌科细菌基因重复序列(*Enterobacterial* repetitive intergenic consensus, ERIC)引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,序列及参考文献见表 1。

表 1 PCR 引物序列及扩增片段长度

引物名称	引物序列(5'-3')	预计长度 (bp)	参考文献
IMI	F: TCTGCGATTACTTTATCCTC R: ATAGCCATCTTGTTAGCTC	818	[8]
NMC	F: ATTTTTCATGATGAAGTTAAGCC R: TGCAGCTTAATTATTTTCAGATTAG	2122	[8]
SME	IRS-F: AGATAGTAAATTTTATAG IRS-R: CTCTAACGCTAATAG	1138	[7]
GES	F: GTTTTGCAATGTGCTCAACG R: TGCCATAGCAATAGCCGTAG	371	[7]
VIM	F: GTCTATTTACCGCGTC R: CTACTCAACGACTGAGCG	774	[8]
IMP	F: TCACATTTCCATAGCGACAG R: AGTGGTACTTTTTTGCCTTCAT	450	[8]
NDM	F: ATGGAATTGCCCAATATTATGCACCCG R: TCAGCGCAGCTTGCGGCCATGCC	813	[9]
KPC	F: ATGCTACTGTATCGCCGCTCT R: TTAAGTCCCGTTGACGC	882	[9]
OXA-48	F: TTGCTGGCATCGATTATCGG R: GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	743	[8]
OXA-23-like	F: GGACATAATCAGGTGATTCA R: TAGATGCCGCAATTTCTGAC	670	[8]
OXA-24-like	F: ATGAAAAAATTTACTTCTATATTACGC R: TTAAATGATTCCAAGATTTTCTAGC	780	[8]
OXA-51-like	F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG R: TGGATTGCACTTCATCTTGG	720	[8]
OXA-58-like	F: AGTATTGGGCTTGTGCT R: AACTTCCGTGCTTATTG	740	[8]
ERIC	F: ATGTAAGCTCCTGGGATTACAC R: AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG	-	[10]

1.6 提取细菌 DNA 模板 取血平板上培养过夜

的菌落,用灭菌水调至成 2.0 麦氏浓度的菌悬液。取 1 ml 置于 1.5 ml 微量离心管中,100 ℃ 金属浴 10 min,然后立即冰浴 10 min。使用高速低温离心机 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液。使用 NanoDrop one 微量紫外-可见分光光度计检测模板浓度和纯度,确保 A260/A280 比值在 1.8~2.0, -20 ℃ 冷冻保存。

1.7 PCR 扩增耐药基因与测序 PCR 反应体系总体积设置 50 μ l,其中包含: Premix Taq 试剂 25 μ l,引物 F(10 μ mol/L) 1 μ l,引物 R(10 μ mol/L) 1 μ l,待测菌株 DNA 模板 4 μ l,双蒸水 19 μ l。PCR 反应温度程序: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环; 72 ℃ 延伸 8 min,4 ℃ 保存待电泳。不同的碳青霉烯酶基因,其 PCR 反应条件略有差异,主要是退火温度和延伸时间不同,通过预实验摸索确定。配制 1.2% 的琼脂糖凝胶,对 PCR 扩增产物进行电泳,紫外线凝胶成像系统观察结果并保存图片。委托生工生物工程(上海)有限公司进行 PCR 扩增产物测序,基因序列经 NCBI 网站 BLAST 程序进行比对,以确定是否为目的基因及其分型。

1.8 ERIC-PCR 同源性分析 PCR 反应体系设置和 1.7 相同,PCR 扩增条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 1 min、35 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 3 min,进行 20 个循环; 95 ℃ 变性 1 min、42 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 3 min,进行 30 个循环; 72 ℃ 最终延伸 10 min,并结合实际略做修改^[14]。配制 1.8% 琼脂糖凝胶,将扩增产物在电压 100 V 的条件下电泳 100 min,紫外线凝胶成像系统观察结果并保存图片。基因型判断依据: 同一基因型,电泳条带应完全相同; 同一基因的亚型,电泳条带相差 1~2 条; 不同基因型,条带相差 3 条以上^[15]。

1.9 统计学处理 采用 WHONET 5.6 软件对 K-B 法的抑菌圈直径,自动化仪器的 MIC 药敏结果和样本种类进行统计分析。

2 结果

2.1 样本来源基本情况 患者年龄 14~100(60 $\pm$ 20.95)岁,其中男 50 例(74.63%)、女 17 例(25.37%)。样本种类以痰液最多,共 51 份,占 76.12%; 尿液 7 份、分泌物 3 份、血液 2 份、胸腹水、脑脊液、导管、留置针各 1 份。分离自 ICU 28 株、干部二科 ICU 12 株、神经外科 8 株,此三科室占 71.64%; 其他科室也有分离,见表 2。

表 2 67 株耐碳青霉烯粘质沙雷菌的病区分布

科室名称	菌株数	构成比(%)
ICU	28	41.79
干部二科 ICU	12	17.91
神经外科	8	11.94
急诊外科 ICU	3	4.48
感染科	3	4.48
呼吸内科	3	4.48
心内科	3	4.48
肾内科	2	2.99
康复运动科	2	2.99
泌尿外科	1	1.49
急诊内科	1	1.49
儿科	1	1.49
合计	67	100

2.2 药敏试验结果及分析 此次分离的 67 株耐碳青霉烯粘质沙雷菌,呈多重耐药特征。其中对头孢噻肟、头孢曲松 100% 耐药; 对亚胺培南、美罗培南、厄他培南、氨曲南耐药率分别为 94.03%、95.52%、98.51%、97.01%; 对环丙沙星、庆大霉素、妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、左氧氟沙星耐药率较高,均大于 60%; 对阿米卡星和复方新诺明耐药率分别为 5.97% 和 7.46%,见表 3。

表 3 67 株耐碳青霉烯粘质沙雷菌对常见药物耐药情况(%)

抗菌药物	耐药率	中介率	敏感率
阿米卡星	5.97	0.00	94.03
复方新诺明	7.46	0.00	92.54
左氧氟沙星	67.16	19.40	13.43
头孢吡肟	67.16	31.34	1.49
头孢他啶	68.66	14.93	16.42
哌拉西林/他唑巴坦	70.15	28.36	1.49
妥布霉素	71.64	26.87	1.49
庆大霉素	73.13	1.49	25.37
环丙沙星	86.57	8.96	4.48
亚胺培南	94.03	2.99	2.99
美罗培南	95.52	0.00	4.48
氨曲南	97.01	1.49	1.49
厄他培南	98.51	0.00	1.49
头孢曲松	100.00	0.00	0.00
头孢噻肟	100.00	0.00	0.00

2.3 碳青霉烯酶表型检测结果

2.3.1 mCIM mCIM 结果显示 67 株待测菌株中,阳性 62 株,阴性 5 株(阴性样本号: 15、16、17、24、56),阳性率 92.54%,部分结果解析如图 1 所示。

2.3.2 Carba NP 试验 Carba NP 试验结果显示 67 株待测菌株中,阳性 60 株,阴性 7 株(阴性样本号: 15、16、17、21、24、27、56),阳性率 89.55%,部分结

果解析如图2所示。

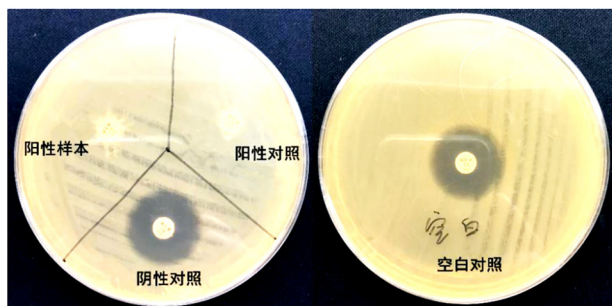


图1 部分 mCIM 试验结果

阳性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705; 阴性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706

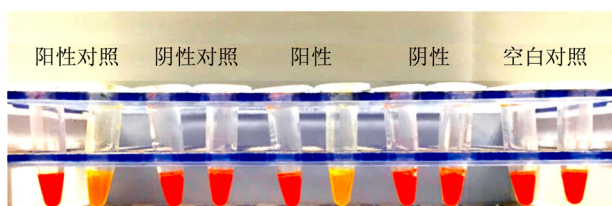


图2 部分 Carba NP 试验结果

阳性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705; 阴性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706

2.3.3 MHT 结果 67 株待测菌株中, 阳性 61 株, 阴性 6 株(阴性样本号: 15、16、17、24、27、56), 阳性率 91.04%, 部分结果解析如图3所示。

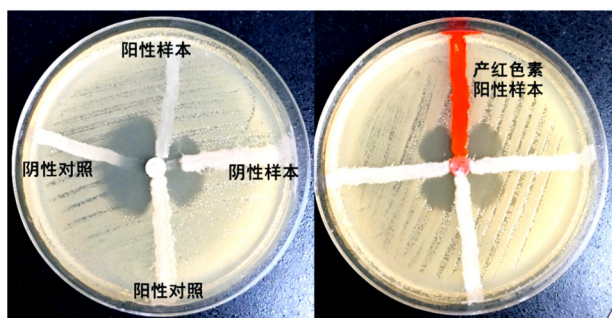


图3 部分 MHT 试验结果

阳性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705; 阴性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706

2.4 耐药基因 PCR 扩增结果 67 株碳青霉烯耐药粘质沙雷菌中, 41 株检出碳青霉烯酶基因, 检出率为 61.19%, 其中检出含 *bla*_{KPC} 基因 32 株, 含 *bla*_{OXA-23} 组基因 7 株, 含 *bla*_{OXA-51} 组基因 7 株, 含 *bla*_{GES} 基因 3 株, 含 *bla*_{OXA-58} 组基因 1 株, 其中有 8 株细菌同时含有多种耐药基因。耐药基因 *bla*_{IMI}、

*bla*_{NMC}、*bla*_{SME-IRS}、*bla*_{NDM}、*bla*_{VIM}、*bla*_{IMP}、*bla*_{OXA-48}、*bla*_{OXA-24} 组均未检出。基因分布情况见表4, 部分阳性基因扩增电泳见图4。

表4 67 株耐碳青霉烯粘质沙雷菌的耐药基因分布(%)

碳青霉烯酶基因	菌株数	构成比
<i>bla</i> _{KPC}	32	47.76
<i>bla</i> _{OXA-23}	7	10.45
<i>bla</i> _{OXA-51}	7	10.45
<i>bla</i> _{GES}	3	4.48
<i>bla</i> _{OXA-58}	1	1.49
<i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-51}	4	5.97
<i>bla</i> _{KPC} + <i>bla</i> _{OXA-23}	2	2.99
<i>bla</i> _{GES} + <i>bla</i> _{OXA-51}	1	1.49
<i>bla</i> _{KPC} + <i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58}	1	1.49
未检出	26	38.81

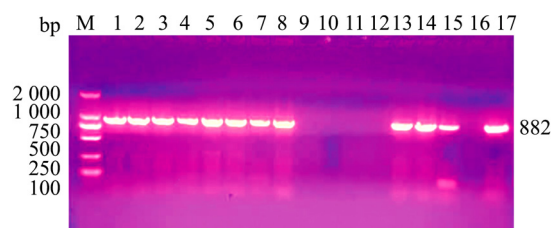


图4 部分 *bla*_{KPC} 阳性基因电泳图

M: DL2000 DNA Maker; 1~8、13~15: 阳性样本, 在 882 bp 处出现条带; 9~12: 阴性样本; 16: 阴性对照; 17: 阳性对照

2.5 ERIC-PCR 基因分型 67 株耐碳青霉烯的粘质沙雷菌可分为 8 个型别(以 A~H 表示), 其中 A 型 50 株为最多, B 型 5 株, C 型 5 株, D 型 3 株, E 型、F 型、G 型、H 型各 1 株。见图5。

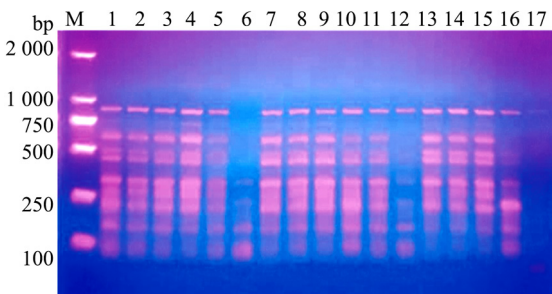


图5 部分菌株的 ERIC-PCR 基因分析图谱

M: Maker; 1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、13、14、15: A 型; 6: B 型; 12: E 型; 16: F 型; 17: G 型

3 讨论

粘质沙雷菌占肠杆菌科沙雷菌属的 90%, 因其在自然界中的广泛分布且毒力较低, 而一度被认为是无害的非致病菌。然而, 近年来该菌在临床感染

患者中的分离率逐步升高,随着临床对碳青霉烯类抗菌药物的广泛应用,耐碳青霉烯类的粘质沙雷菌检出率也在同步升高。根据 2015、2016、2017 年 CHINET 全国细菌耐药监测报告^[1-3] 可知,沙雷菌属的临床分离率分别为 1.08%、1.16%、1.22%,对亚胺培南、美罗培南和厄他培南的耐药率分别由 2016 年的 4.2%、4.1% 和 3.8% 上升到 2017 年的 5.5%、4.6% 和 5.3%,分离率和耐药率都呈现出稳步提高的趋势。2015 年该院粘质沙雷菌对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 13.7% 和 17.6%^[1],显著高于全国平均水平,耐药情况更加严重。

该研究中 67 株细菌标本类型以痰液为主,说明粘质沙雷菌在各种因素所导致的人体免疫力降低时,主要引起呼吸系统感染。分离科室以 ICU 为主,说明患者严重基础疾病、接受大手术、使用呼吸机、气管切开、侵入性检查以及大剂量、长时间的使用相关抗生素可能是引起粘质沙雷菌感染的高危因素,这与田磊等^[2] 研究一致。

药敏结果显示,67 株耐碳青霉烯粘质沙雷菌呈多重耐药特征,其中对头孢噻肟、头孢曲松 100% 耐药;对亚胺培南、美罗培南、厄他培南、氨曲南耐药率大于 90%;对环丙沙星、庆大霉素、妥布霉素、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、左氧氟沙星耐药率较高,均大于 60%;仅对阿米卡星和复方新诺明保持高度敏感,耐药率分别为 5.97% 和 7.46%。提示在此类细菌感染严重,可选抗生素有限的情况下,阿米卡星或复方新诺明可以作为首选药物进行治疗。与全国数据相比^[3],本研究 67 株细菌对哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢吡肟、厄他培南、环丙沙星的耐药率显著高于全国平均水平,头孢噻肟、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素药敏结果和全国数据相对一致,而阿米卡星和复方新诺明耐药率则显著低于全国水平。这可能与不同医院所收治患者的病情、病种、年龄、医院的诊疗水平以及临床医师的用药习惯不同有关。

粘质沙雷菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制复杂,最主要的是携带碳青霉烯酶基因,并产生能直接灭活碳青霉烯类药物的碳青霉烯酶^[4]。按照 Ambler 分子结构不同,可将碳青霉烯酶分为 A、B、D 三类:A 类在体外可以被克拉维酸和他唑巴坦抑制水解活性,主要包括 KPC、SME、NmcA/IMI、GES、PER 等;B 类因为可以被 EDTA 等金属离子螯合剂抑制而又称为金属酶,主要包括 NDM、VIM、IPM、

SPM、GIM、SIM;D 类又称 OXA 酶,不能被酶抑制剂和 EDTA 所抑制,对碳青霉烯类药物的水解活性较弱,主要包括 OXA-23 组、OXA-24 组、OXA-51 组、OXA-58 组等;碳青霉烯酶基因可借助移动基因元件,如质粒、整合子、转座子等进行细菌间的传播。

该研究从 67 株碳青霉烯耐药粘质沙雷菌中,检出 *bla*_{KPC}、*bla*_{GES}、*bla*_{OXA-23} 组、*bla*_{OXA-51} 组、*bla*_{OXA-58} 组基因,其中以 *bla*_{KPC} 型(32 株)最多,占 47.76%。值得关注的是,有 8 株细菌同时携带多种基因,以 *bla*_{OXA-23} + *bla*_{OXA-51} 型最多(4 株),*bla*_{KPC} + *bla*_{OXA-23} (2 株)、*bla*_{GES} + *bla*_{OXA-51} (1 株)次之,仍有 1 株同时包含 *bla*_{KPC} + *bla*_{OXA-51} + *bla*_{OXA-58} 三种基因型,呈现出多基因联合共存现象,可见本院耐碳青霉烯粘质沙雷菌耐药情况相当严重。

MHT、Carba NP、mCIM 分别是 CLSI 2009、2015、2017 年陆续推荐的用于检测对一种或几种碳青霉烯类抗生素不敏感肠杆菌科细菌的表型检测方法,分别有各自的优势和局限性^[5]。本研究中 MHT、Carba NP、mCIM 三种表型试验对 67 株耐碳青霉烯粘质沙雷菌的阳性率分别为 91.04%、89.55%、92.54%。本研究中所有 *bla*_{KPC} 基因阳性菌株的 MHT、Carba NP 试验、mCIM 试验都是阳性,说明三种表型试验对于 KPC 酶敏感性较高。3 株 *bla*_{GES} 基因阳性菌株中 2 株表型试验全阴,仅 1 株 mCIM 试验阳性,推测对于 GES 酶而言 mCIM 试验敏感性相对更高。7 株 *bla*_{OXA-23} 基因阳性菌株中 4 株表型试验全阳性,2 株表型试验全阴,1 株 Carba NP 试验阴性,MHT 和 mCIM 试验阳性。在 *bla*_{OXA-51} 基因阳性的 7 株细菌中,2 株与表型试验完全符合,4 株与表型试验完全不符,1 株 Carba NP 试验阴性,MHT 和 mCIM 试验阳性。仅有的 1 株 *bla*_{OXA-58} 基因阳性菌株三种表型试验均为阴性。OXA 类酶表型试验整体阳性率不高,符合该类酶对碳青霉烯类药物水解活性弱的特点。另外有 26 株细菌三种表型试验均为阳性,而基因检测全阴性,可能是产生了其他碳青霉烯酶,或者因为药物相关外膜孔蛋白缺失或下调,伴/不伴有 β 内酰胺酶(ESBLs、AmpC 等)的表达^[3],这将是未来进一步的研究方向。

ERIC 是肠杆菌科细菌所特有的,针对该序列设计引物进行 PCR 扩增,可以得到一系列大小不同的 DNA 片段,电泳后形成条带数量、位置、亮度不同的 DNA 指纹图谱,从而可在分子水平对细菌进行鉴定和同源性分析。该研究中 67 株耐碳青霉烯的粘质沙雷菌经 ERIC-PCR 分析,可分为 8 个型别(以 A ~

H 表示), 其中 A 型(50 株) 为主要流行株, 提示该院可能存在 A 型克隆株的流行。因细菌耐药基因可借助质粒等可移动基因元件进行交叉传播, 造成院内感染的暴发流行, 所以必须引起重视, 加强手卫生消毒, 减少患者不必要的床位更换和科室间转诊。

综上所述, 该院耐碳青霉烯类粘质沙雷菌检出率高, 耐药情况严重, 耐药机制复杂, 耐药基因联合共存, 同种克隆集中趋势明显, 有引起院内感染大规模流行的可能, 给临床治疗带来严峻挑战。应引起高度重视, 加强细菌耐药性监测, 科学合理使用抗菌药物, 做好院内感染防控工作, 以求最大限度减少此类耐药菌的出现和传播。

参考文献

- [1] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6): 685-94.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-91.
- [3] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-51.
- [4] Pappwallace K M, Endimiani A, Taracila M A, et al. Carbapenems: past, present, and future [J]. Antimicrob Agents Ch, 2011, 55(11): 4943.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. Twentyseventh informational supplement, M100S, 27th Edition, 2017: 30-114.
- [6] 胡付品. 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的耐药机制及其所致医院感染控制研究 [J]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [7] 蔡加昌. 肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究 [J]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [8] 杨秋. 耐碳青霉烯类不动杆菌耐药基因及分子诊断研究 [J]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [9] 余倩. 临床感染患者耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药机制及毒力研究 [J]. 天津: 天津医科大学, 2016.
- [10] 王健, 潘亚萍, 徐元宏, 等. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌药物敏感性和耐药基因研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(8): 1231-5.
- [11] 王健, 沈继录, 徐元宏, 等. 2015 年安徽医科大学第一附属医院临床分离菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(4): 421-7.
- [12] 田磊, 陈中举, 孙自镛, 等. 2005-2014 年 CHINET 肠杆菌属细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3): 275-83.
- [13] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2012 年中国 CHINET 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的分布特点和耐药性分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 382-6.
- [14] Rong Z, Liu L, Zhou H, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) strains in China [J]. Ebiomedicine, 2017, 19(C): 98-106.
- [15] Miller S, Humphries R M. Clinical laboratory detection of carbapenem-resistant and carbapenemase-producing [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2016, 14(8): 705.

Study on drug resistance genes and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Serratia marcescens*

Yuan Yuan^{1,2}, Chen Jizhong², Pan Yaping¹, et al

(¹ Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

² Dept of Blood Transfusion, Tongling People's Hospital, Tongling 244000)

Abstract Objective To investigate the drug resistance phenotype and carbapenemase genes of carbapenem-resistant *Serratia marcescens*, and to analyze its molecular epidemiology. **Methods** Clinical isolates of 67 non-repeated carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates were collected for common drug susceptibility by Kirby-Bauer method and Vitek-2 Compact. Carbapenemase was screened by modified carbapenem inactivation method (mCIM), Carba NP test and modified Hodge test (MHT). Carbapenemase genes was detected by PCR. The clone type of resistant bacteria was analyzed by PCR to detected the *Enterobacterial* repetitive intergenic consensus (ERIC). **Results** Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* were mainly from intensive care unit (ICU) and mainly from sputum samples. The drug susceptibility results showed that 67 strains of bacteria were 100% resistant to cefotaxime and ceftriaxone. The resistance rates to imipenem, meropenem, ertapenem and aztreonam were all greater than 90%. Ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefepime, levofloxacin had higher resistance rates. Only highly sensitive to amikacin and cotrimoxazole. The positive rates of mCIM, Carba NP test and MHT were 92.54%, 89.55% and 91.04%, respectively. PCR showed that 32 strains of *bla*_{KPC} gene and 7 strains of *bla*_{OXA-23} gene were detected in 67 strains of *Serratia marcescens*. There were 7 strains of *bla*_{OXA-51} gene,

网络出版时间: 2019-1-3 17:25 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.008.html

刷状聚磷酸酯包载阿霉素形成的纳米颗粒对胰腺癌 BxPC-3 细胞株的杀伤效应

杨席席, 任乐, 高萌, 许朝, 余跃

摘要 目的 探究不同聚乙二醇(PEG)密度的刷状聚磷酸酯包载阿霉素(Dox)形成的纳米颗粒对胰腺癌 BxPC-3 细胞的杀伤效应。方法 合成聚合物 $P(CEP_{30}-EEP_{10})/^{No}PEG-NP$ 、 $P(CEP_{25}-EEP_{15}-PPEG_5)/^{Low}PEG-NP$ 和 $P(CEP_{30}-EEP_{15}-PPEG_{10})/^{High}PEG-NP$, 包载 Dox 后形成纳米颗粒 $^{No}PEG-NP_{Dox}$ 、 $^{Low}PEG-NP_{Dox}$ 和 $^{High}PEG-NP_{Dox}$, 并对其相关性质进行表征。再将胰腺癌 BxPC-3 细胞分成 5 组, 只含细胞不加颗粒的空白对照组、细胞 + $^{No}PEG-NP_{Dox}$ 、细胞 + $^{Low}PEG-NP_{Dox}$ 、细胞 + $^{High}PEG-NP_{Dox}$ 及细胞 + 游离阿霉素, 用流式细胞仪(FACS)检测各组颗粒被 BxPC-3 细胞摄取的情况; 再用 MTT 和活死染色法检测各组纳米药物对细胞的杀伤效果。结果

成功制备出粒径为 95 nm 左右的纳米颗粒 $^{No}PEG-NP_{Dox}$ 、 $^{Low}PEG-NP_{Dox}$ 和 $^{High}PEG-NP_{Dox}$, 且它们在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中可以长时间稳定存在; FACS 结果显示各组分别被细胞摄取 2 h 后, $^{No}PEG-NP_{Dox}$ 荧光强度要强于 $^{Low}PEG-NP_{Dox}$, 其次为 $^{High}PEG-NP_{Dox}$ ($P < 0.001$); MTT 法显示在每一 Dox 浓度下, 三种纳米药物对癌细胞的杀伤效果依次为表面无 PEG 修饰的 $^{No}PEG-NP_{Dox}$ 强于中等密度 PEG 的 $^{Low}PEG-NP_{Dox}$, $^{High}PEG-NP_{Dox}$ 杀伤性相对最差 ($P < 0.01$)。结论 BxPC-3 细胞对 PEG 修饰的纳米颗粒的摄取量受 PEG 密度的影响, 密度越大, 摄取越少, 因此表面无 PEG 修饰的纳米颗粒 $^{No}PEG-NP_{Dox}$ 被胰腺癌 BxPC-3 细胞摄取相对较多, 在胞内释放的 Dox 相对最多, 对胰腺癌细胞的杀伤效应也相对较强。

关键词 刷状聚磷酸酯; 阿霉素; 纳米颗粒; 胰腺癌

中图分类号 R 735.9; R 454.2; Q 516

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)01-0039-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.008

胰腺癌是一种恶性程度高, 病情进展迅速, 且预后较差的消化道肿瘤, 5 年存活率目前已不足 5%^[1-2]。大多数患者被诊出时已错过手术机会, 目前临床中晚期多以化疗为主。阿霉素(doxorubicin, Dox)是一种广谱的肿瘤化疗药物, 临床上已应用于多种癌症的治疗, 但 Dox 对骨髓及心脏等明显的毒副作用, 限制了其在临床癌症治疗的应用^[3-4]。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰的聚磷酸酯化合物近年来越来越受到人们的关注, 在多种癌症治疗方面有显著疗效, PEG 修饰的纳米颗粒可以有效增加其药物的水溶性, 且随其密度增大, 可以显著延长血液中循环, 这些将使得其包载的药物能够在肿瘤部位富集而发挥更强的抗肿瘤效应^[5-6]。该研究旨在设计不同 PEG 密度刷状聚磷酸酯纳米颗粒, 探究其被胰腺癌细胞摄取差异, 及对胰腺癌细胞的杀伤效应, 为进一步将聚磷酸酯纳米材料应用于胰腺癌临床治疗提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料 阿霉素盐酸盐/Dox 购自北京华丰有限公司; $^{No}PEG-NP$ 、 $^{Low}PEG-NP$ 、 $^{High}PEG-NP$ 系华南理工大学杨显珠教授馈赠; 人胰腺癌细胞系 BxPC-3 购自上海细胞库; 噻唑蓝(MTT)购自美国 Sigma-Aldrich 公司; RPMI-1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司。

2018-08-31 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085SQH224)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院消化内科实验室, 合肥 230001

作者简介: 杨席席, 女, 硕士研究生;

余跃, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yuyuemd@163.com

3 strains of *bla*_{GES} gene, and 1 strain of *bla*_{OXA-58} gene, among which 8 strains contained multiple drug resistance genes. 67 strains of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* can be divided into 8 types (represented by A to H), of which type A (50 strains) was the most. **Conclusion** The isolated carbapenem-resistant *Serratia marcescens* exhibits multi-drug resistance, mainly carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{OXA} genes, and has multiple genes coexisting. The trend of the same kind of cloning is obvious, and it may cause the outbreak of nosocomial infection.

Key words *Serratia marcescens*; carbapenemase; drug resistance gene; *Enterobacterial* repetitive intergenic consensus; homology analysis