

论著·临床研究

## 利用 GeneXpert 法检测耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因及耐药性分析\*

宋林键, 叶丽艳, 赵强, 沈跃云, 罗燕萍<sup>△</sup>

(解放军总医院第一医学中心医学检验中心, 北京 100853)

**摘要:**目的 利用 GeneXpert Carba-R<sup>®</sup>全自动病原体快速检测系统检测碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的耐药基因, 了解该院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)耐药情况和耐药基因分布, 为了解临床 CRE 感染趋势提供依据。**方法** 采用回顾性调查方法, 收集 2016 年 3 月至 2017 年 10 月分离自非呼吸道标本的 141 株耐碳青霉烯类肠杆菌科菌株。**结果** 肺炎克雷伯杆菌 114 株, 大肠埃希菌 13 株, 阴沟肠杆菌 8 株, 产气肠杆菌 2 株, 弗氏枸橼酸杆菌 3 株, 魏氏柠檬酸杆菌 1 株。bla<sub>KPC</sub> 103 株, bla<sub>NDM</sub> 22 株, bla<sub>OXA-48</sub> 5 株, 含两种及两种以上耐药基因 12 株。**结论** GeneXpert Carba-R<sup>®</sup>全自动病原体快速检测系统能快速检测出耐碳青霉烯类肠杆菌的耐药基因, 耐碳青霉烯类抗菌药物的细菌对多种抗菌药物同时耐药, 检出的耐药基因型为 KPC、NDM、OXA-48 及 IMP。含不同耐药基因的肠杆菌科细菌其耐药情况不同。

**关键词:** GeneXpert; 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 耐药基因**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.24.014**中图法分类号:** R446.5**文章编号:** 1673-4130(2019)24-2999-04**文献标识码:** A

### Detection of Carbapenem-resistant genes in Enterobacteriaceae using the GeneXpert molecular diagnostic system and the resistance analysis\*

SONG Linjian, YE Liyan, ZHAO Qiang, SHEN Yueyun, LUO Yanping<sup>△</sup>

(Clinical Laboratory Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract: Objective** To detect Carbapenem resistant genes in Enterobacteriaceae by GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> molecular diagnostic system, in order to investigate the drug resistance and the distribution of resistance genes of CRE in a hospital and provide a basis for clinical control and prevention of CRE infection. **Methods** By means of retrospective survey, 141 strains of CRE, from March 2016 to October 2017, isolated from non-respiratory specimens are collected. **Results** 114 strains of Klebsiella pneumoniae, 13 strains of Escherichia coli, 8 strains of Enterobacter cloacae, 2 strains of Enterobacter aerogenes, 3 strains of Citrobacter freundii and 1 strain of Citrobacter westermanni. bla<sub>KPC</sub> 103 strains, bla<sub>NDM</sub> 22 strains, bla<sub>OXA-48</sub> 5 strains, 12 strains contain two or more resistance genes, 9 strains detect no resistance gene. **Conclusion** GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> molecular diagnostic system provide a rapid and accurate detection of Carbapenem resistant genes in Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae resistant to Carbapenem antibiotics are resistant to many kinds of antibiotics. The main resistance genotypes are KPC, NDM, OXA-48 and IMP. The drug resistance of Enterobacteriaceae bacteria with different resistance genes vary different.

**Key words:** GeneXpert; Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; resistance genes

随着抗菌药物在临床治疗中的广泛应用, 在抗菌药物的选择压力下, 细菌的耐药能力逐渐增强, 多药耐药菌的检出率也逐年上升<sup>[1]</sup>。其中, 耐碳青霉烯类抗菌药物细菌的出现和传播, 引起了广泛的关注。作为抗菌谱最广, 抗菌活性最强的第三线临床抗感染药

物, 碳青霉烯类抗菌药物常用于治疗产超广谱 β-内酰胺酶和头孢菌素酶的肠杆菌科细菌所引起的感染。但近年来, 耐碳青霉烯类抗菌药物的肠杆菌科细菌(CRE)已经出现并呈上升趋势, 其中以肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌最为严重, 这给相

\* 基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1601405)。

作者简介: 宋林键, 女, 技师, 主要从事微生物检验研究。△ 通信作者, E-mail: ypluo301@aliyun.com。

本文引用格式: 宋林键, 叶丽艳, 赵强, 等. 利用 GeneXpert 法检测耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 2999-3002.

关细菌感染的控制和治疗带来了诸多困难。因此,快速准确地了解鉴定耐药基因的类型,对临床治疗及预防耐药菌的传播具有重要的意义。

GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 系统由美国 Cepheid 研发、生产的核酸提取扩增检测一体化系统,可在体外快速定性或定量检测感染性疾病病原、耐药性基因及肿瘤基因等,结果高度准确,可及时为临床决策提供诊疗依据<sup>[2]</sup>。已有研究结果表明赛沛 GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 全自动病原体快速检测系统能快速准确的检测出耐碳青霉烯酶基因<sup>[3-5]</sup>。为快速鉴定耐碳青霉烯类抗菌药物及其携带的耐药基因,也为指导临床医生合理用药提供早期依据,现将本院 2016 年 3 月至 2017 年 10 月利用 GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 全自动病原体快速检测系统检出的非呼吸道标本中的 CRE 菌株的分布和耐药基因特点分析结果如下。

### 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集 2016 年 3 月至 2017 年 10 月本院临床患者的非呼吸道标本(尿液、引流液、静脉血、胆汁等)中分离出的亚胺培南耐药的肠杆菌科菌株。同一患者,同一部位的标本只收集 1 株。细菌分离鉴定按《全国临床检验操作规程》要求执行。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

**1.2 仪器与试剂** 全自动快速微生物质谱检测系统 VITEK MS 和 VITEK 2 Compact 型全自动微生物鉴定药敏仪(法国生物梅里埃公司),GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 全自动病原体快速检测系统(美国赛沛公司)。

**1.2.1 菌株鉴定和药敏试验** 收集 141 株菌株,利用全自动快速微生物质谱检测系统 VITEK MS 进行细菌鉴定。同时采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定和药敏分析系统对分离菌株进行药敏试验,检测其对阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦、氨基曲南、头孢

他啶、亚胺培南、庆大霉素、复方磺胺甲噁唑的耐药情况。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

**1.2.2 细菌耐药相关基因检测** 用含有 Xpert Carba-R 的试剂盒将菌株在 Cepheid GeneXpert IV 系统上进行分析<sup>[4]</sup>。采用中国蓝平板培养 141 株 CRE 细菌,挑取单个菌落,使用生理盐水分别配置成 0.5 麦氏浓度的菌悬液,将 10 μL 菌悬液加入 GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 样本试剂中混匀,将混匀后的液体 15 mL 加入到试剂盒中,扫码上机,采用全自动病原体快速检测系统,48 min 后读取结果。

**1.3 统计学处理** 采用世界卫生组织(WHO)推荐的 WHONET5.6 软件对菌株分布及药敏结果进行统计分析。SPSS17.0 软件进行统计分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 CRE 分布情况

**2.1.1 标本来源分布** 141 株 CRE 主要来源为尿液 37 株(26.2%),引流液 32 株(22.7%),静脉血 21 株(14.9%),导管 17 株(12%),胆汁 11 株(7.8%),伤口分泌物 7 株(5%),组织 7 株(5%),胸腔积液 4 株(2.8%),其他标本来源 5 株(3.5%)。

**2.1.2 菌种分布** 肺炎克雷伯菌最多(114 株),占总数的 81%,与文献报道的耐药菌株流行情况一致<sup>[5]</sup>。大肠埃希菌 13 株(9%),阴沟肠杆菌 8 株(6%),弗氏枸橼酸杆菌 3 株(2%),产气肠杆菌 2 株(1%),魏氏柠檬酸杆菌 1 株(1%)。

**2.2 CRE 的耐药基因分布** 141 株 CRE 中,使用 Xpert Carba-R<sup>®</sup> 的试剂盒,共检测出 *bla*<sub>KPC</sub> 103 株,检出率为 73%;*bla*<sub>NDM</sub> 22 株,检出率为 15.6%;*bla*<sub>OXA-48</sub> 4 株,检出率为 2.8%;含两种及两种以上耐药基因 12 株,检出率为 8.5%。菌株基因型详细分布见表 1。

表 1 141 株 CRE 耐药基因分布情况(n)

细菌种类	不同基因型			混合型基因型			
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> + <i>bla</i> <sub>NDM</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
肺炎克雷伯菌	99	2	2	2	7	1	1
大肠埃希菌	2	9	1	1	0	0	0
阴沟肠杆菌	0	7	1	0	0	0	0
产气长杆菌	0	2	0	0	0	0	0
弗氏枸橼酸杆菌	0	1	0	0	0	0	0
魏氏枸橼酸杆菌	0	1	0	0	0	0	0
合计	103	22	4	3	7	1	1

**2.3 药敏结果** 141 株 CRE 对除碳青霉烯类抗菌药物以外的常见 8 种抗菌药物的药敏结果见表 2。将 113 株含耐药基因的肺炎克雷伯菌与 28 株含耐药基

因的其他肠杆菌科细菌耐药率结果进行对比,结果见表 3。将携带耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> (103 株)、*bla*<sub>NDM</sub> (22 株) 的药敏结果进行对比,结果见表 4。

表 2 141 株 CRE 的药敏结果(%, n)

抗菌药物	耐药	中介
复方磺胺甲噁唑	41.8(59)	3.5(5)
头孢吡肟	90.0(127)	2.8(4)
头孢他啶	96.5(136)	0.0(0)
阿米卡星	48.2(68)	0.7(1)
庆大霉素	55.3(78)	0.0(0)
左氧氟沙星	84.4(119)	0.0(0)
环丙沙星	86.5(122)	1.4(2)
氨曲南	93.6(132)	0.0(0)

表 3 肺炎克雷伯菌与其他肠杆菌科细菌药敏结果

抗菌药物	肺炎克雷伯菌(n=113)		其他肠杆菌科(n=28)		P
	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	
复方磺胺甲噁唑	38.0	43	57.1	16	0.067
头孢吡肟	94.7	107	71.4	20	<0.001
头孢他啶	97.3	110	92.9	26	0.250
阿米卡星	50.4	57	39.3	11	0.290
庆大霉素	55.7	63	53.6	15	0.835
左氧氟沙星	87.6	99	71.4	20	0.035
环丙沙星	97.0	110	42.9	12	<0.001
氨曲南	96.4	109	82.1	23	0.006

表 4 bla<sub>KPC</sub>/bla<sub>NDM</sub> 感染的菌株药敏结果耐药对比

抗菌药物	bla <sub>KPC</sub> (n=103)		bla <sub>NDM</sub> (n=22)		P
	耐药率(%)	株数(n)	耐药率(%)	株数(n)	
复方磺胺甲噁唑	39.8	41	63.6	14	0.041
头孢吡肟	96.1	99	81.8	18	0.013
头孢他啶	98.0	101	90.9	20	0.084
阿米卡星	54.4	56	13.6	3	<0.001
庆大霉素	60.2	62	40.9	9	0.097
左氧氟沙星	86.4	89	90.9	20	0.566
环丙沙星	99.0	102	50.0	11	<0.001
氨曲南	98.0	101	77.2	17	<0.001

### 3 讨论

细菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制主要包括产碳青霉烯酶、外膜蛋白的缺失或改变及主动外排泵机制,其中以产碳青霉烯酶耐药为主<sup>[7]</sup>。本试验中检测的 KPC 酶属于由质粒介导的 A 类碳青霉烯酶;IMP、VIM 及 NDM 酶属于由质粒介导的 B 类金属酶。OXA48 属于 D 类苯唑西林酶<sup>[8]</sup>,其中 KPC 型最多<sup>[9]</sup>。

本院 141 株非呼吸道来源的标本中分离出的 CRE 中,bla<sub>KPC</sub> 基因的检出率高达 73%,广泛存在于各标本中,96% 为肺炎克雷伯菌。与 2013 年中华医

疗感染杂志的报道相符<sup>[10]</sup>。其次 bla<sub>NDM</sub> 基因检出率为 15.6%,多分布于尿液标本,仅有两株为肺炎克雷伯菌,其余 20 株均为其他肠杆菌科细菌,分别是大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、弗氏枸橼酸杆菌及魏氏枸橼酸杆菌。这与文献报道一致<sup>[11]</sup>。bla<sub>OXA-48</sub> 检出率仅为 2.8%,标本来源于静脉血、导管、分泌物。菌种来源于肺炎克雷伯杆菌、大肠埃希菌及阴沟肠杆菌。bla<sub>KPC</sub> 基因和 bla<sub>NDM</sub> 基因先后从肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中首次发现,后通过质粒或移动元件介导的基因的水平转移广泛流行于肠杆菌中,造成了碳青霉烯耐药性的广泛传播。近年来,bla<sub>KPC</sub> 基因和 bla<sub>NDM</sub> 基因在检出率逐年上升。在英国、美国、哥伦比亚、比利时、中国、法国、日本、希腊、巴西、波兰、阿根廷及意大利等国家是重度流行国家,这些现象或许与抗菌药物的不合理使用及特定时间人口的迁徙有关。值得注意的是本研究中还出现了 8 株携带两种碳青霉烯酶基因和 1 株携带上述 3 种碳青霉烯酶基因的肺炎克雷伯菌。混合基因型中以携带 bla<sub>KPC</sub> 和 bla<sub>OXA-48</sub> 基因为主,而且混合基因型主要来自肺炎克雷伯菌。这种多种碳青霉烯酶基因共存的现象,更进一步说明了在抗菌药物选择的压力下,菌株存在多种耐药基因共存。

141 株 CRE 对亚胺培南、氨苄西林、头孢唑林、厄他培南、氨苄西林/舒巴坦全耐药,其他抗菌药物的耐药率由高到低依次为头孢他啶、氨曲南、头孢吡肟、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素、阿米卡星、复方磺胺甲噁唑。其中庆大霉素、阿米卡星和复方磺胺甲噁唑的耐药率较低。不同菌株类型及携带不同耐药基因种类统计学分析结果显示携带耐药基因的肺炎克雷伯菌与其他肠杆菌科细菌在氨曲南、环丙沙星、头孢吡肟、左氧氟沙星这 4 种抗菌药物耐药率比较,差异有统计学意义(P<0.05)。这就说明在不明确菌株耐药基因的条件下,以上 4 种抗菌药物可能对治疗除肺炎克雷伯菌以外的肠杆菌科细菌感染可能有效。携带 bla<sub>KPC</sub>,bla<sub>NDM</sub> 耐药基因的菌株药敏结果分析中显示其在阿米卡星、氨曲南、环丙沙星、头孢吡肟、复方磺胺甲噁唑这 5 种抗菌药物耐药率比较,差异有统计学意义(P<0.05)。尤其携带 bla<sub>NDM</sub> 耐药基因的菌株对阿米卡星的耐药率仅为 13.6%。研究结果显示不同细菌种类,不同的耐药基因对抗菌药物的耐药情况不同。这就表明在含有耐药基因的 CRE 中,用药时要综合考虑细菌种类及所含耐药基因类型。

综上所述,本研究利用 GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 全自动病原体快速检测系统检测出 bla<sub>NDM</sub> 4 例,混合耐药基因 bla<sub>KPC</sub> + bla<sub>NDM</sub> 3 例,bla<sub>KPC</sub> + bla<sub>OXA-48</sub> 7 例,bla<sub>IMP</sub> + bla<sub>OXA-48</sub> 1 例,bla<sub>KPC</sub> + bla<sub>NDM</sub> + bla<sub>OXA-48</sub> 1 例。GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 用时短,操作简单,可在 40 min

内快速检测碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的耐药基因,及时准确地将结果反馈给临床,为指导临床合理用药及预防耐药菌株的流行具有极其重要的意义,缺点在于试剂盒费用较高。Carba-R 试剂盒可以直接利用标本进行快速基因鉴定,不需要对标本进行培养<sup>[12]</sup>。快速检测技术为耐药基因的检测提供了更好的方法,并为及时实施感染防治措施作出了贡献<sup>[13-14]</sup>。同时,本研究试验结果显示:携带不同耐药基因的肠杆菌科细菌其用药应有所不同。快速、准确地检测出耐药基因不仅有利于掌控院内耐药基因流行趋势;同时为医生针对不同患者合理用药提供依据。面对 CRE 威胁,医疗机构应了解患者 CRE 感染危险因素,采取相应的干预措施<sup>[15-16]</sup>,制定并落实防控 CRE 感染策略,保障医疗安全,做好医院感染控制工作。

#### 4 结 论

GeneXpert Carba-R<sup>®</sup> 全自动病原体快速检测系统可快速实时监测含不同耐药基因的 CRE 分布趋势和流行特点,可即时发现并预防耐药基因的暴发流行,便于临床医生针对不同的耐药基因表型进行合理用药。

#### 参 考 文 献

- [1] 毕茹茹,姜飞,康海全,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及同源 性分析[J].临床检验杂志,2018,36(4):293-296.
- [2] MOORE N M,CANTON R,CARRETTO E,et al. Rapid identification of five classes of carbapenem resistance genes directly from rectal swabs by use of the Xpert Carba-R assay[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(7):2268-2275.
- [3] TATO M,RUIZ-GARBAJOSA P,TRACZEWSKI M,et al. Multisite evaluation of Cepheid Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54 (7): 1814-1819.
- [4] TENOVER FC,CANTON R,KOP J,et al. Detection colonization by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli patients by use of the Xpert MDRO assay[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11):3780-3787.
- [5] SMITH M,DIEDEREN B,SCHARRINGA J,et al. Rapid and accurate detection of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae with the Cepheid Xpert Carba-R assay[J]. J Med Microbiol, 2016, 65(1):951-953.
- [6] SHELLEY A,JANET A,ANGELO C,et al. Use of ancillary Carbapenemase tests to improve specificity of phenotypic definitions for Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55 (6): 1827-1836.
- [7] 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):1009-1011.
- [8] 莉佩,常燕子,竺军洋,等.肺炎克雷伯菌耐药基因及医院感染控制研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(19):4605-4608.
- [9] ARIAS C A,MURRAY B E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-a clinical super-challenge[J]. N Engl J Med, 2009, 360(5):439-443.
- [10] MARTINEZ-MARTINEZ L,PASCUAL A,HERNANDEZ-ALLES S,et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*[J]. Anti Agents Cheem, 1999, 43 (7):1669-1673.
- [11] ZHANG R,LIU L Z,ZHOU H W,et al. Nationwide surveillance of clinical Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China[J]. Bio Med, 2017, 19(1):98-106.
- [12] 纪明宇,耿大影,裴凤艳,等. KPC 型碳青霉烯酶研究概况及进展[J]. 临床检验杂志,2013,31(4):282-285.
- [13] PERRY K A,DANIELS J B,REDDY S C,et al. Direct detection of carbapenem-resistant organisms from environmental samples using the GeneXpert molecular diagnostic system[J]. mSphere, 2018, 3(4):e00113-00118.
- [14] LUTGRING J D,LIMBAGO B M. The problem of Carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-Enterobacteriaceae detection[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54 (1): 529-534.
- [15] 徐英春,肖永红,卓超,等. 中国碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的流行病学和防控策略[J]. 中国执业药师,2013,10(4):3-8.
- [16] FRIEDMAN D,CARMELI Y,WALTONA L,et al. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae:a strategic roadmap for infection contro [J]. Infect Control Hosp Epidem, 2017, 38(5):580-594.

(收稿日期:2019-03-18 修回日期:2019-07-29)