

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.007

GeneXpert 检测系统分析儿童耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因*

王 维¹, 王 林^{2△}

1. 陕西省西安市儿童医院检验科, 陕西西安 710003; 2. 陕西省西安市第一医院检验科, 陕西西安 710002

摘要:目的 研究西安市儿童医院 2017 年 10 月至 2019 年 10 月临床分离耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 (CRE) 的耐药情况, 借助 GeneXpert 检测系统分析碳青霉烯酶基因携带特点, 了解其分子流行病学分布, 为各科室 CRE 的预防、控制及治疗提供依据。方法 采用 Whonet 5.6 软件筛选西安市儿童医院 2017 年 10 月至 2019 年 10 月 CRE 菌株, 采用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪鉴定细菌, 以 Vitek 2-Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统联合纸片扩散法 (K-B 法) 进行药敏试验, 采用 GeneXpert 检测系统检测碳青霉烯酶基因 KPC、NDM、VIM、IMP-1、OXA-48。结果 西安市儿童医院 2017 年 10 月至 2019 年 10 月共检出 CRE 菌株 109 株, 排名前 3 位的是肺炎克雷伯菌 57 株 (52.29%)、大肠埃希菌 20 株 (18.35%)、产酸克雷伯菌 8 株 (7.34%)。标本来源主要为尿液 (35.78%)、下呼吸道标本 (29.36%)、脓液 (16.51%)。临床科室分布主要集中在新生儿重症医学科、康复科及血液科。药敏试验结果显示, CRE 对 β -内酰胺类药物耐药率在 80.00% 以上, 对氨基糖苷类和喹诺酮类抗菌药物耐药率均小于 40.00%。GeneXpert 检测系统检测结果显示, 携带碳青霉烯酶菌株共 90 株, 耐药基因检出率分别为 KPC (52.29%)、NDM (47.70%)、IMP-1 (7.30%), 未发现 VIM 和 OXA-48 耐药基因。患儿预后与细菌耐药基因检出数量种类差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 儿童 CRE 以肺炎克雷伯菌为主, 大部分来源于重症医学科的下呼吸道标本, 对抗菌药物高度耐药, 检出耐药基因以 KPC 和 NDM 为主。耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药形势严峻, 临床应根据药敏试验结果合理选用抗菌药物, 及时针对性地采取措施, 以预防院内传播流行。

关键词: 耐碳青霉烯类肠杆菌; 儿童; GeneXpert 检测系统; 耐药性

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)10-1369-04

Analysis of resistance genes of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in children by GeneXpert detection system*

WANG Wei¹, WANG Lin^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Children Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Xi'an NO. 1 Hospital, Xi'an, Shaanxi 710002, China

Abstract: Objective To investigate the drug resistance of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) clinically isolated from Xi'an children's Hospital from October 2017 to October 2019. With the help of GeneXpert detection system, the carrying characteristics of carbapenemase gene were analyzed to understand its molecular epidemiological distribution, so as to provide the basis for the prevention, control and treatment of CRE in various departments. **Methods** The CRE strains from Xi'an children's Hospital from October 2017 to October 2019 were analysed by Whonet 5.6 software, and identified by MALDI-TOF-MS. The Vitek 2-Compact automatic microbiological identification and drug sensitivity analysis system combined with disk diffusion method (K-B method) was used for the drug sensitivity test, and GeneXpert detection system was used to detected carbapenemase genes, including KPC, NDM, VIM, IMP-1, OXA-48. **Results** A total of 109 CRE strains were detected in the hospital from October 2017 to October 2019. The top three strains were Klebsiella pneumoniae (57 strains, 52.29%), Escherichia coli (20 strains, 18.35%) and Klebsiella acidophilus (8 strains, 7.34%). The main CRE strains of specimens were urine (35.78%), respiratory tract (29.36%), and pus (16.51%). The clinical departments that isolated CRE strains were concentrated in neonatal intensive care unit, department of rehabilitation and department of hematology. The drug sensitivity results showed that the

* 基金项目: 陕西省重点研发计划 (2017SF-119)。

作者简介: 王维, 女, 主管技师, 主要从事临床检验诊断学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 719332278@qq.com。

本文引用格式: 王维, 王林. GeneXpert 检测系统分析儿童耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(10): 1369-

resistance rate of CRE strain to β -lactam was more than 80.00%, and that to aminoglycoside and quinolones was less than 40.00%. GeneXpert test showed that there were 90 strains carrying carbapenemase, and the detection rates of drug-resistant genes of KPC, NDM, IMP-1 were 52.29%, 47.70% and 7.30% respectively. VIM and OXA-48 drug-resistant genes were not found. There was no statistical difference between the prognosis of children and the number or types of bacterial drug-resistant genes detected ($P > 0.05$). **Conclusion** The CRE strains in children are mainly *Klebsiella pneumoniae*, most of which are isolated from the lower respiratory tract specimens in intensive care units. They are highly resistant to antibiotics, and the drug-resistant genes are mainly KPC and NDM. The drug resistance situation of CRE bacteria is serious, so antibiotics should be selected reasonably according to drug sensitivity results in clinical practice. Timely and targeted measures should be taken to prevent nosocomial transmission and epidemic.

Key words: carbapenem-resistant enterobacteriaceae; children; GeneXpert detection system; drug resistance

肠杆菌科细菌是儿童专科医院引起临床感染的重要病原菌之一,有研究统计显示,儿童 60% 的感染由革兰阴性菌引起^[1-2]。耐碳青霉烯类抗菌药物因其抗菌谱广且作用强,经常作为强效 β -内酰胺类抗感染药物治疗肠杆菌感染^[3]。伴随碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用,全球耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(CRE)菌株也逐年升高,耐药菌株对抗菌谱较窄的儿童感染的控制和治疗造成诸多困难,已成为紧迫的公共卫生问题^[4-6]。肠杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制大体相同,但耐药基因具体流行分布情况在不同种属间仍存在差异。因此,CRE 耐药基因的鉴定及分子机制的深入研究,对临床治疗及预防耐药菌传播意义重大。GeneXpert 分子诊断平台是核酸提取扩增检测一体化系统,半巢式实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)可快速检测感染性疾病病原及耐药性基因,此方法较传统细菌培养及普通 PCR 具有快速、准确、灵敏度高等特点。GeneXpert 检测系统现已应用于结核分枝杆菌利福平耐药基因、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)及 CRE 等耐药基因的检测^[7]。本文采用 GeneXpert 检测系统快速鉴定分析 CRE 的耐药基因表型,为临床合理用药及科学预防控制 CRE 的流行提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、仪器及试剂 选取西安市儿童医院 2017 年 10 月至 2019 年 10 月各类标本分离的 CRE,剔除同一患者的重复菌株,共收集 109 株。基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司);药敏板卡 AST-GN13(法国梅里埃生物制品有限公司);琼脂培养基(中国郑州安图生物工程股份有限公司);GeneXpert 仪器试剂(美国赛佩公司);Vitek 2-Compact 全自动微生物鉴定及药敏分析系统(法国梅里埃生物制品有限公司);细菌培养箱(日本索尼公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定和药敏试验 将收集保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱的菌株复苏培养 18~24 h 后用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱仪进行鉴定;同时采用 Vitek 2-

Compact 全自动微生物鉴定和药敏分析系统进行药敏试验。结果判断参考美国临床和实验室标准协会 2019 年标准,ATCC25922 为质控菌株。

1.2.2 GeneXpert 检测系统检测细菌耐药基因 挑取单个菌落配制浓度 0.5 麦氏单位的菌悬液,吸取 10 μL 加至 GeneXpert 试剂标本处理液中,漩涡震荡混匀,吸取 1.7 mL 混合液沿管壁加入试剂盒内,扫码上机启动检测。

1.3 统计学处理 采用 Whonet5.6 软件分析药敏试验结果,其他数据采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRE、标本及科室分布情况 109 株 CRE 以肺炎克雷伯菌最多,为 57 株(52.29%),其余依次为大肠埃希菌[20 株(18.35%)],产酸克雷伯菌[8 株(7.34%)],奇异变形杆菌[6 株(5.50%)],阴沟肠杆菌[5 株(4.59%)],其他菌株[13 株(11.93%)]. CRE 标本来源以尿液为主[39 株(35.78%)],其次为下呼吸道标本[32 株(29.36%)]及脓液[18 株(16.51%)],以上 3 种标本占有所有检出标本的 81.65%,具体标本来源分类见表 1。CRE 在新生儿重症医学科及儿童重症医学科分离得最多,共 34 株,占 31.19%,其他分离较多的科室依次为康复科[18 株(16.51%)],血液科[15 株(13.76%)],呼吸科[13 株(11.93%)],肾脏科[10 株(9.17%)],普外科[8 株(7.34%)].

表 1 109 株 CRE 标本来源及构成比

标本类型	CRE 株数 (n)	分离总数 (n)	分离率(%)	构成比(%)
尿液	39	237	16.46	35.78
下呼吸道标本	32	367	8.72	29.36
脓液	18	124	14.52	16.51
血液	6	29	20.69	5.50
分泌物	5	235	2.13	4.59

续表 1 109 株 CRE 标本来源及构成比

标本类型	CRE 株数 (n)	分离总数 (n)	分离率(%)	构成比(%)
胸腔积液	5	19	26.32	4.59
胆汁	3	32	9.38	2.75
腹水	1	21	4.76	0.92
合计	109	1 064	10.24	100.00

2.2 CRE 药敏试验结果 药敏试验结果显示,CRE 对头孢类药物呈高度耐药,耐药率 > 80.0%,对阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星及左氧氟沙星有相对较好的敏感性,耐药率均 < 30.0%,其中阿米卡星敏感性最好,耐药率仅为 7.1%,未分离到多黏菌素耐药的菌株,具体耐药情况见表 2。

表 2 CRE 对 18 种抗菌药物的药敏试验结果(%)

抗菌药物	耐药率	中介率	敏感率
美罗培南	94.0	0.0	6.0
亚胺培南	91.5	0.0	8.5
氨曲南	68.9	0.0	31.1
阿米卡星	7.1	0.0	92.9
妥布霉素	25.6	0.0	74.4
庆大霉素	29.3	0.0	70.7
环丙沙星	28.4	0.0	71.6
左氧氟沙星	26.6	3.8	69.6
氨苄西林/舒巴坦	93.1	0.0	6.9
哌拉西林/他唑巴坦	95.3	0.0	4.7
头孢呋辛	92.2	0.0	7.8
头孢唑啉	96.8	0.0	3.2
头孢他啶	91.5	0.0	8.5
头孢曲松	97.9	0.0	2.1
头孢噻肟	92.6	0.0	7.4
头孢吡肟	86.8	0.0	13.2

2.3 CRE 耐药基因检测结果 GeneXpert 检测系统共检测了 KPC、NDM、IPM-1、VIM、OXA-48 等 5 种耐药基因,携带碳青霉烯酶菌株共 90 株,耐药基因检出率分别为 KPC(52.29%)、NDM(47.70%)、IMP-1(7.30%),未发现 VIM 和 OXA-48 耐药基因。仅携带 KPC 酶 33 株(30.28%),仅携带 NDM 酶 31 株(28.44%),仅携带 IMP-1 酶 2 株(1.83%),同时携带 KPC 和 NDM 酶 18 株(16.51%),同时携带 KPC 和 IMP-1 酶 3 株(2.75%),同时携带 IMP-1、KPC 和 NDM 酶 3 株(2.75%),未检出 VIM 及 OXA-48,19 株菌株未检出任何耐药基因,总体耐药基因检出率为 82.57%。质控菌株 ATCC25922 未检出耐药基因。

2.4 耐药基因检出数量与患儿预后情况分析 临床分离耐碳青霉烯类菌株中未检出耐药基因,检出 1 种

耐药基因及两种及以上耐药基因对患儿预后差异无统计学意义($\chi^2=2.235, P=0.327$),见表 3。

表 3 CRE 耐药基因检出情况与患者预后分析(n)

患儿预后情况	n	未检出 耐药基因	检出 1 种 耐药基因	检出两种及以上 耐药基因
好转及痊愈	60	11	39	10
病情加重及死亡	49	8	27	14
合计	109	19	66	24

3 讨 论

作为社区和院内感染的重要病原之一,CRE 可引起人体多部位感染。碳青霉烯类抗菌药物因其稳定性高、通透性好、抗菌谱广,在临床应用较多,甚至有过度治疗的情况,该类药物的不合理使用,致使 CRE 检出率逐年升高^[8]。本研究结果显示,2017 年 10 月至 2019 年 10 月西安市儿童医院共分离出耐碳青霉烯类 CRE 109 株,分析不同菌种 CRE 构成比,肺炎克雷伯菌最多,占 52.29%,这与文献[9]报道一致。分析西安市儿童医院 CRE 标本来源发现,前 3 位标本类型为尿液、下呼吸道标本及脓液。有文献指出,儿童泌尿系感染较多且抗感染治疗时间长会导致耐药菌株大量出现,此现象与西安市儿童医院 CRE 标本来源一致,同时呼吸道标本及脓液送检量多也与此两种标本 CRE 检出率高有关^[10]。

本研究结果显示,西安市儿童医院 CRE 对常用抗菌药物呈高度耐药(耐药率 > 80.0%),但不同于成人,儿童对左氧氟沙星、庆大霉素、阿米卡星等耐药率较低(耐药率 < 30.0%),主要与此类药物对儿童不良反应大,或临床治疗较少应用有关。分析结果提示,当药物缺乏或病情相对较轻时,可考虑阿米卡星等药物经验性治疗。CRE 对第 4 代头孢菌素(头孢吡肟)的耐药率低于亚胺培南和美罗培南,此结果与文献[11-12]报道一致。此外,已对头孢吡肟敏感菌株各试验环节进行复核确认,均未发现异常情况。对于此耐药模式可能原因如下:首先,仪器检测方法学限制,VITEK 药敏不是真正意义上的浓度梯度稀释法,而是通过监测 4~6 个抑菌浓度点,由公式换算得出最小抑菌浓度(MIC)值,可能与真实 MIC 值不完全一致;其次,某些 CRE 是各种复杂耐药机制相互作用、制约、拮抗导致的结果,对体外抗菌药物敏感并不代表临床治疗有效;最后,此耐药模式还可能与菌株数量、本地区儿科用药习惯、区域流行菌株不同等有一定关系。多黏菌素被认为是治疗 CRE 最后的“杀手锏”,西安市儿童医院尚未分离出多黏菌素耐药菌株。文献[13]指出,联合用药(多黏菌素类或阿米卡星联合碳青霉烯类抗菌药物)对于 CRE 的治疗效果更佳。

CRE 的主要耐药机制是携带产碳青霉烯酶基因,按 β -内酰胺酶家族 Ambler 分类分为 A、B、D 三类,A

类中最具临床意义的酶型是 KPC, B 类包括 NDM、IMP-1、VIM 等, D 类主要为 OXA-48, 其中 NDM 基因被认为是儿童产生耐碳青霉烯酶细菌的关键基因^[5,14]。本研究借助 GeneXpert 检测平台对 KPC、NDM、KPC、IPM、VIM、OXA-48 等 5 种常见耐药基因进行检测, 109 株 CRE 中耐药基因检出率为 82.57%, 其中 KPC 型 57 株、NDM 型 52 株、IMP-1 型 8 株, 未检出 VIM 和 OXA-48 型, KPC+NDM 检出率为 16.51%, 由此提示西安市儿童医院儿童分离 CRE 的主要耐药基因为 KPC 和 NDM, 此结果与文献^[15-16]报道一致, 与文献^[17]报道的 NDM 为主型存在差异。西安市儿童医院肺炎克雷伯菌检出率高且以 KPC 和 NDM 型为主, 可能与产 KPC-2 的肺炎克雷伯菌可以克隆传播有关, 其编码基因通过插入序列、质粒及整合子等基因元件进行水平传播。文献^[17]报道, 亚洲国家发现在不同大小和不相容类型的质粒中存在的耐药基因 NDM-1 基因, 其可通过接合转移在细菌间传播, 这些原因都导致了耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的广泛传播。临床回访发现, 是否检出耐药基因及检出耐药基因数量与患者病情转归差异无统计学意义($P>0.05$)。

CRE 耐药机制复杂, 常表现为多重耐药, 导致其感染后较难治愈。本研究针对儿童临床使用碳青霉烯类药物抗感染较多, 采用 GeneXpert 检测系统快速、准确分析儿童耐碳青霉烯类 CRE 的基因分型及耐药特征, 以了解医院 CRE 耐药情况及耐药机制, 指导临床合理使用抗菌药物, 同时注意医院感染的预防和控制, 以降低儿童耐药菌株的传播流行。

参考文献

- [1] 李婵, 陈楠. 儿童患者耐碳青霉烯类肠杆菌的分布及药物敏感性分析[J]. 天津医药, 2018, 46(11): 1205-1208.
- [2] 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): 241-251.
- [3] CHIOTOS K, HAN J H, TAMMA P D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections in children[J]. Curr Infect Dis Rep, 2016, 18(1): 2-9.
- [4] CHIOTOS K, TAMMA P D, FLETT K B, et al. Multi-center study of the risk factors for colonization or infection with Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in children [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(12): e01440.
- [5] ZHU J, SUN L, DING B, et al. Outbreak of NDM-1 producing Klebsiella pneumoniae ST76 and ST37 isolates in neonates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(4): 611-618.
- [6] SATLIN M J, CHEN L, PATEL G, et al. Multicenter clinical and molecular epidemiological analysis of bacteremia due to Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the CRE epicenter of the United States[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(4): e02349.
- [7] 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.
- [8] 李耘, 吕媛, 薛峰, 等. 中国细菌耐药监测研究 2013 至 2014 年肠杆菌科及嗜血杆菌监测报告[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(2): 103-119.
- [9] 叶丽艳, 马艳宁, 沈跃云, 等. 2008—2016 年某医院耐碳青霉烯类肠杆菌分布及药物敏感性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(5): 408-412.
- [10] 苏敏, 黄海林, 杜廷义, 等. 儿童泌尿道感染 980 株病原菌分布及耐药性分析[J]. 儿科药学杂志, 2017, 28(8): 35-38.
- [11] 白永凤, 祝进, 陆军, 等. 耐碳青霉烯酶肠杆菌科耐药基因及同源性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(10): 2176-2178.
- [12] 刘香花, 师志云, 李刚, 等. 宁夏地区某医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌临床分布及耐药基因的分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(5): 659-662.
- [13] DAIKOS G L, TSAOUSI S, TZOUVELEKIS L S, et al. Carbapenemase producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections; lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(4): 2322-2328.
- [14] VAN DUIN D, DOI Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Virulence, 2017, 8(4): 460-469.
- [15] KAZI M, DREGO L, NIKAM C, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a tertiary care laboratory in mumbai[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(3): 467-472.
- [16] CHITNIS A S, CARUTHERS P S, RAO A K, et al. Outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a long-term acute care hospital: sustained reductions in transmission through active surveillance and targeted interventions[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2012, 33(10): 984-992.
- [17] 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, 24(11): 1935-1943.

(收稿日期: 2020-09-26 修回日期: 2021-01-02)