

• 论 著 •

肠杆菌目细菌常见碳青霉烯酶耐药基因多重 PCR 检测方法的建立及应用评价^{*}

杨冰雪¹, 易 森², 袁亚玲¹, 黄金珠¹, 夏培雯¹, 党梓军¹, 廖佳佳¹, 罗胜利¹, 夏 云^{1△}

1. 重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400042; 2. 成都市第二人民医院医学检验科, 四川成都 610000

摘 要:目的 探讨多重 PCR 检测 5 种常见肠杆菌目细菌碳青霉烯酶耐药基因方法的建立及应用评价。方法 收集临床分离对碳青霉烯类药物耐药的 118 株非重复肠杆菌目细菌和对碳青霉烯类药物敏感的肠杆菌目细菌 9 株, 以普通 PCR 检测 blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaIMP, blaOXA-48-like 结果为参考。采用碳青霉烯酶抑制剂增强试验对试验菌株进行碳青霉烯酶表型检测; 构建多重 PCR 检测 5 种常见碳青霉烯酶耐药基因。对多重 PCR、抑制剂增强试验与普通 PCR 检测肠杆菌目细菌耐药的灵敏度、特异度和准确度进行比较。结果 与普通 PCR 相比, 多重 PCR 灵敏度为 88.54%, 特异度为 100.00%, κ 值为 0.79; 抑制剂增强试验灵敏度为 92.71%, 特异度为 93.55%, κ 值为 0.81。在 CRE 的检测中, 虽然多重 PCR 检测的灵敏度稍低于碳青霉烯酶抑制剂增强试验, 但其在特异度上更具优势; 二者在阳性率检测上比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 检测一致性良好 ($\kappa = 0.63$)。结论 该研究成功构建多重 PCR 体系, 能快速、准确检测肠杆菌目细菌中 5 种常见碳青霉烯酶耐药基因, 与临床现行的碳青霉烯酶抑制剂增强试验相比, 二者对肠杆菌目细菌耐药检测具有良好的 consistency, 能极大缩短检测时间。

关键词:碳青霉烯酶耐药基因; 多重 PCR; 肠杆菌目细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.15.018

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2023)15-1883-07

文献标志码: A

Establishment and application evaluation of Multiplex PCR Assay for detection of the common carbapenemase genes in Enterobacteriales^{*}

YANG Bingxue¹, YI Miao², YUAN Yaling¹, HUANG Jinzhu¹, XIA Peiwen¹,
DANG Zijun¹, LIAO Jiajia¹, LUO Shengli¹, XIA Yun^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400042, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chengdu Second People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China

Abstract: **Objective** To establish and application evaluation of multiplex PCR for detection five common carbapenemase genes in Enterobacteriales. **Methods** The results of blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaIMP, blaOXA-48-like resistance genes detection from non-repetitive 118 carbapenem-resistant Enterobacteriales strains and 9 carbapenem-sensitive bacteria was regarded as the reference by the common PCR. Carbapenemase inhibitor enhancement test was used to detect the phenotype in Enterobacteriales. Multiplex PCR was established to detect five common resistance genes. The sensitivity, specificity and accuracy of multiplex PCR, carbapenemase inhibitor enhancement test and common PCR were compared for the detection of Enterobacteriales. **Results** Compared with the common PCR, the sensitivity of the multiple PCR was 88.54%, the specificity was 100.00%, and the κ was 0.79; the sensitivity of carbapenemase inhibitor enhancement test was 92.71%, and the specificity was 93.55% and κ was 0.81. Although the sensitivity of multiplex PCR was slightly lower than that of carbapenemase inhibitor enhancement test assay, the multiplex PCR had more advantages in terms of specificity. There was no statistically significant difference in positive rate ($P > 0.05$) and the agreement was rated as fair to good ($\kappa = 0.63$) between the multiplex PCR and carbapenemase inhibitor enhancement test assay. **Conclusion** Herein, multiple PCR is successfully constructed for rapid and accurate detection of 5 carbapenemase genes in Enterobacteriales. It has a good agreement with the current clinical appli-

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金项目(81572055)。

作者简介: 杨冰雪, 女, 硕士研究生在读, 主要从事感染性疾病的早期诊断和治疗及细菌耐药机制等研究。△ 通信作者, E-mail: xia-yun12cn@aliyun。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230517.1233.002.html\(2023-05-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230517.1233.002.html(2023-05-17))

cation of carbapenemase inhibitor enhancement test assay to detect the phenotype in Enterobacteriales, and the detection time is decreased remarkably.

Key words: carbapenemase gene; multiplex PCR; Enterobacteriales

耐碳青霉烯的肠杆菌目细菌(CRE)是近年来备受关注的条件致病菌,其与院内感染性疾病的发病率和病死率密切相关^[1]。CRE 的出现导致多耐药细菌感染治疗最后手段——碳青霉烯类药物失活,对全球感染控制和疾病治疗形成了极大挑战^[2],CRE 的流行病学调查和监测对临床感染性疾病的预防和治疗具有重要意义。产碳青霉烯酶是 CRE 最主要的耐药机制,根据 Ambler 分类法可将碳青霉烯酶分为 A、B、D 类酶^[3];其中肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)是 A 类酶的典型代表,作为 KPC 的主要生产者,肺炎克雷伯菌是世界范围内最常见的产碳青霉烯酶的肠杆菌目细菌(CPE)^[4-5]。2020 年我国国家耐药监测网(CHINET, www.chinets.com)数据显示,2005—2018 年肺炎克雷伯菌对亚胺培南(IPM)和美罗培南(MEM)的耐药率分别从 3.0% 上升至 25.0% 和 2.9% 上升至 26.3%^[6]。B 类酶又称金属 β -内酰胺酶,常见的金属 β -内酰胺酶包括维罗纳整合子编码金属 β -内酰胺酶(VIM)、亚胺培南金属 β -内酰胺酶(IMP)和新德里金属 β -内酰胺酶(NDM)^[7];自 2008 年首次在印度发现 NDM 以来^[8],其在肠杆菌科、不动杆菌属及假单胞菌属细菌中多有出现^[9],我国 2017 年一项在肠杆菌科细菌和不动杆菌属细菌中进行的多中心研究表明含有 NDM 型基因的致病菌在国内广泛传播^[10]。文献[11]调查显示,2018—2019 年在四川地区,NDM 在 CRE 中的检出率达到 42.1%。在 D 类酶中,OXA-48-like 则是全球某些地区肠杆菌目细菌中最常见的碳青霉烯类型,并且正在逐步进入非流行地区,造成院内感染暴发^[12]。编码碳青霉烯酶的耐药基因多位于可移动元件上,比如转座子、整合子和质粒^[13]。耐药基因的水平转移和传播可导致 CRE 在全球范围内蔓延^[14]。目前用于检测 CRE 的方法主要有表型检测和分子检测。常见的表型检测方法包括 Triton Hodge 试验、改良 Hodge 试验、Carba NP 试验、碳青霉烯灭活法[包括改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)和乙二胺四乙酸(EDTA)改良碳青霉烯灭活试验(eCIM)]及碳青霉烯酶抑制剂增强试验等^[15-16]。大多数检测方法的优点是操作简单,经济成本低,但最显著的问题是耗时较长。分子检测法通常被认为是碳青霉烯酶检测的金标准^[3],普通 PCR 是最常用的分子检测方法,但使用 PCR 逐一检测耐药基因的时间成本高,本研究旨在建立一种快速、准确的多重 PCR 体系,能同时检测包括 KPC、NDM、VIM、IMP、OXA-48-like 在内的 5 种碳青霉烯酶耐药基因,并将其运用于临床分离的 CRE 菌株检测,与普通 PCR 及碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测结果相比较,从灵敏度、特异度、准确度、一致性等方面进行分析,评价该

方法的可行性,从而为临床提供早期诊断、治疗依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集重庆医科大学附属第一医院检验科 2020 年 6 月至 2021 年 9 月临床鉴定为对碳青霉烯类药物耐药的(亚胺培南或美罗培南最低抑菌浓度 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$)非重复肠杆菌目细菌共 118 株和对碳青霉烯类药物敏感的肠杆菌目细菌 9 株。其中 CRE 包括肺炎克雷伯菌 68 株,大肠埃希菌 29 株,阴沟肠杆菌 16 株,布氏柠檬酸杆菌 1 株,产气克雷伯菌 2 株,产酸克雷伯菌 1 株,弗氏柠檬酸杆菌 1 株;敏感菌株包括 7 株肺炎克雷伯菌,2 株大肠埃希菌。主要标本来源包括血液、尿液、伤口分泌物、穿刺液、呼吸道标本及胆汁、肛门拭子等。携带 blaKPC、blaIMP、blaOXA-48-like 的肺炎克雷伯菌,携带 blaVIM 的铜绿假单胞菌和携带 blaNDM 的大肠埃希菌作为阳性对照,均由重庆医科大学附属第一医院医学检验科微生物实验室保存。

1.2 仪器与试剂 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统及配套板卡(法国生物梅里埃公司);PCR 扩增仪(ABI 公司);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);哥伦比亚血琼脂平板及 MH 平板(重庆庞通公司);美罗培南药敏纸片(Oxoid 公司);DNA 分子量标记物 DL2000、Taq 酶(TaKaRa 公司);琼脂糖(Hydragene 公司);本试验所用引物合成及扩增产物测序均来自北京擎科生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定及药敏试验 收集非重复临床标本分离株,使用 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析仪进行细菌鉴定及药敏试验,将收集的碳青霉烯类药物耐药菌株及敏感菌株-80℃ 冷冻保存。

1.3.2 碳青霉烯酶抑制剂增强试验 根据 A 类丝氨酸碳青霉烯酶的活性可被 3-氨基苯硼酸(APB)抑制,金属 β -内酰胺酶的活性可被 EDTA 抑制原理,使用碳青霉烯酶抑制剂增强试验对试验菌株进行碳青霉烯酶表型鉴定,具体操作步骤如下:将待测菌调节成 0.5 麦氏浓度的菌液,均匀涂布于 MH 培养基上,随后贴 4 张美罗培南纸片($10 \mu\text{g}$),在其中两张纸片上分别滴加 APB、EDTA 溶液,另一张纸片上同时滴加两种溶液,最后一张纸片不滴加任何溶液留作空白对照。空气环境, $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ 培养 16~18 h 后分别测量 4 个抑菌圈直径(dr)。判读标准:若 $\text{dr}_{\text{美罗培南}+\text{APB}} - \text{dr}_{\text{美罗培南}} \geq 5 \text{ mm}$,则可认为受试菌株产 A 类酶,若 $\text{dr}_{\text{美罗培南}+\text{EDTA}} - \text{dr}_{\text{美罗培南}} \geq 5 \text{ mm}$,则可认为受试菌株产 B 类酶,若 $\text{dr}_{\text{美罗培南}+\text{EDTA}+\text{APB}} - \text{dr}_{\text{美罗培南}} \geq 5 \text{ mm}$,则可认为受试菌株同时产 A 类酶和 B 类酶。

1.3.3 DNA 提取 本试验采用煮沸裂解法提取细

菌 DNA。将-80℃储存的分离菌复苏后接种在哥伦比亚血平板上培养 16~18 h,取单个菌落悬浮于 1 000 μL 蒸馏水中,95℃煮沸 10 min,在 4℃,13 000 r/min 离心混合物 10 min,分离上清液作为 DNA 样本保留,并储存于-20℃。

1.3.4 引物设计 下载 Bate-Lactamase 数据库([http://bldb.eu/BLDB.php? prot = A # GES](http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#GES))已公布

的 blaKPC 基因序列^[17],使用软件 ClustalXe 2.0 进行序列比对,选择高度同源区域,使用 primer premier 5 进行 blaKPC 引物设计。根据已发表的文献下载 blaNDM, blaIMP, blaVIM, blaOXA-48-like 引物^[18-19,1]。引物序列由北京擎科生物科技有限公司合成。见表 1。

表 1 5 种碳青霉烯酶耐药基因扩增引物

耐药基因	引物名称	序列(5'-3')	引物量(μL)	产物长度(bp)	序列来源
blaKPC	KPC-F	GGAACCATTGCTAAACTCG	0.25	784	自主设计
	KPC-R	GTTGACGCCCAATCCCTC	0.25		
blaNDM	NDM-F	TCATGTTTGAATTCGCCC	0.90	1 014	文献[18]
	NDM-R	ACTCGTCGCAAAGCCCAG	0.90		
blaOXA-48-like	OXA-48 F	TGAGCACTTCTTTTGTGATGGCT	0.20	585	文献[19]
	OXA-48 R	AACGGGCGAACCAAGCATTTT	0.20		
BlaIMP	IMP-F	TCTCRATCTATCCCCACGTATGC	0.90	269	文献[1]
	IMP-R	GCGGACTTTGGCCAAGCTTCT [*]	0.90		
blaVIM	VIM-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	0.25	155	文献[1]
	VIM-R	CCAATTTGCTTCTTCAATCTCCG	0.25		

注:引物名称中 F 表示正向引物,R 表示反向引物。

1.3.5 普通 PCR 普通 PCR 反应体系:premix taq 12.5 μL,正反向引物各(10 μm)1.0 μL,DNA 模板 1.5 μL,加双蒸水(ddH₂O)补足至 25.0 μL。反应条件:95℃ 5 min,94℃ 30 s,57℃ (blaKPC、blaNDM、blaVIM)/55℃ (blaIMP、blaOXA-48-like) 30 s,72℃ 1 min,共 30 个循环,72℃ 7 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析,产物送基因测序,测序结果在 NCBI 网站进行 Blast 比对([www. ncbi. nlm. nih. gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)),确定基因型。

1.3.6 多重 PCR 多重 PCR 反应条件采用 25.0 μL 体系:premix taq 12.5 μL,5 种不同引物构成比例见表 1,DNA 模板 1.5 μL,加 ddH₂O 补足 25.0 μL。反应条件:95℃ 5 min;95℃ 40 s,57℃ 40 s,72℃ 1 min,共 30 个循环;72℃ 7 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 统计学处理 采用统计软件 SPSS25.0 进行数据分析,配对卡方检验用于试验结果分析,采用灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确度评价多重 PCR、碳青霉烯酶抑制剂增强试验与普通 PCR 的有效性。Cohen's kappa (κ)系数评估多重 PCR、碳青霉烯酶抑制剂增强试验与普通 PCR 的检测一致性。κ 系数的比较含义:κ>0.75,一致性极好;κ 为 0.40~0.75,检测方法之间存在一致性;κ<0.40,检测方法之间一致性较差,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

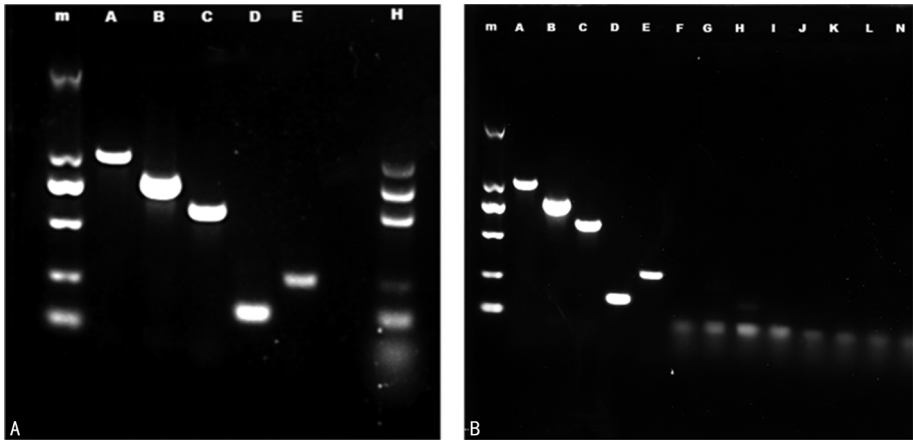
2.1 多重 PCR 检测 5 种碳青霉烯酶耐药基因 建立多重 PCR 体系,分别扩增含有 blaKPC、blaNDM、blaVIM、blaIMP、blaOXA-48-like 基因的 DNA 阳性对照模板;另将 5 种阳性对照 DNA 模板按等比例混

合后进行多重 PCR 扩增;考虑到多重 PCR 反应过程中存在引物二聚体及非特异扩增风险增加的问题,另对 8 株碳青霉烯类药物敏感的肠杆菌目细菌进行扩增,用于评估多重 PCR 的正确性。扩增结果使用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析。在最佳反应条件下,多重 PCR 能分别正确扩增出 5 种不同的耐药基因,也能在单次反应中同时识别出多种耐药基因(图 1A),整体扩增体系较为稳定,对敏感菌的扩增产物中几乎不含有非特异性扩增产物(图 1B)。

2.2 普通 PCR 与多重 PCR 检测结果比较 药敏试验确定 127 株细菌中包含 9 株对碳青霉烯类药物敏感菌及 118 株对碳青霉类药物耐药菌。普通 PCR 检测含有碳青霉烯酶耐药基因 CRE 菌株 96 株(81.36%,96/118),耐药但不含碳青霉烯酶耐药基因菌株 22 株(18.64%,22/118),碳青霉烯酶耐药基因以 blaKPC 和 blaNDM 为主,分别占 39.83%(47/118)和 38.14%(45/118);含有 blaKPC 的菌株全部为肺炎克雷伯菌,而含有 blaNDM 的菌株包括肺炎克雷伯菌 9 株,大肠埃希菌 22 株,阴沟肠杆菌 12 株,弗氏柠檬酸杆菌 1 株,产酸克雷伯菌 1 株;共表达 blaK-PC+blaNDM 3 株,包括产气克雷伯菌,布氏柠檬酸杆菌及肺炎克雷伯菌。多重 PCR 检测 118 株 CRE 中包含碳青霉烯酶耐药基因菌株 85 株(72.03%;85/118);耐药但不含碳青霉烯酶耐药基因菌株 33 株(27.97%;33/118),其中 22 株与普通 PCR 检测结果完全一致,另外 11 株为普通 PCR 检测含有碳青霉烯酶耐药基因但多重 PCR 检测为不含碳青霉烯酶耐药基因的 CRE。在检测结果不一致的 11 株 CRE 菌株中,包括表达 blaKPC 的 4 株肺炎克雷伯菌和表达

blaNDM 的 1 株肺炎克雷伯菌、3 株大肠埃希菌、2 株阴沟肠杆菌及 1 株产酸克雷伯菌;9 株敏感菌的多重 PCR 检测结果与普通 PCR 检测结果一致。共表达

blaKPC+blaNDM 的 3 株 CRE 的多重 PCR 检测结果与普通 PCR 检测结果一致。见表 2。



注:A 表示使用多重 PCR 扩增含有 5 种碳青霉烯酶耐药基因的阳性 DNA 模板,泳道 m 为 2 000 bp DNA 分子量标记物;泳道 A~E 依次为 NDM、KPC、OXA、VIM、IMP;泳道 H 为单次多重 PCR 扩增同时含有 5 种耐药基因的模板混合物;B 表示多重 PCR 体系扩增对碳青霉类药物敏感的肠杆菌目细菌 DNA;泳道 m~E 与 A 的注解相同,泳道 F~N 为多重 PCR 扩增 8 株对碳青霉烯类药物敏感菌 DNA 结果。

图 1 1.5%琼脂糖凝胶分析多重 PCR 体系构建结果

表 2 普通 PCR 和多重 PCR 检测肠杆菌目细菌结果对比(n)

细菌种类	菌株数量(株)	blaKPC		blaNDM		blaOXA	
		普通 PCR	多重 PCR	普通 PCR	多重 PCR	普通 PCR	多重 PCR
肺炎克雷伯菌	75	47	43	9	8	1	1
大肠埃希菌	31	0	0	22	19	0	0
阴沟肠杆菌	16	0	0	12	10	0	0
布氏柠檬酸杆菌	1	0	0	0	0	0	0
产气克雷伯菌	2	0	0	0	0	0	0
弗氏柠檬酸杆菌	1	0	0	1	1	0	0
产酸克雷伯菌	1	0	0	1	0	0	0
总计	127	47	43	45	38	1	1

细菌种类	菌株数量(株)	blaKPC+ blaNDM		不含碳青霉烯酶基因的 CRE		碳青霉烯敏感菌	
		普通 PCR	多重 PCR	普通 PCR	多重 PCR	普通 PCR	多重 PCR
肺炎克雷伯菌	75	1	1	10	15	7	7
大肠埃希菌	31	0	0	7	10	2	2
阴沟肠杆菌	16	0	0	4	6	0	0
布氏柠檬酸杆菌	1	1	1	0	0	0	0
产气克雷伯菌	2	1	1	1	1	0	0
弗氏柠檬酸杆菌	1	0	0	0	0	0	0
产酸克雷伯菌	1	0	0	0	1	0	0
总计	127	3	3	22	33	9	9

2.3 多重 PCR 与碳青霉烯酶抑制剂增强试验的耐药表型检测结果比较 碳青霉烯酶抑制剂增强试验耐药表型检测共含有 94 株产 A 类酶或 B 类酶的 CRE 和 24 株不产碳青霉烯酶的 CRE。在产 A 类酶 46 株耐药菌中,多重 PCR 检测含有 blaKPC 基因 CRE 43 株;产 B 类酶的 48 株耐药菌中,多重 PCR 检测含有 blaNDM 基因 CRE 38 株;碳青霉烯酶抑制剂增强试验表型检测中未检测到同时产 A+B 类酶的菌株,但多重 PCR 检测到 3 株共表达 blaKPC +

blaNDM 基因耐药菌株;多重 PCR 检测含有 blaOXA-48-like 的菌株碳青霉抑制剂增强试验表型检测为不产酶 CRE。见表 3。

2.4 多重 PCR、碳青霉烯酶抑制剂增强试验结果分析 以普通 PCR 检测方法作为参考,多重 PCR 检测灵敏度为 88.54%,特异度为 100.00%,κ 值为 0.79。碳青霉抑制剂增强试验检测灵敏度为 92.71%,特异度为 93.55%,κ 值为 0.81。在 CRE 检测中,多重 PCR 检测的灵敏度稍低于碳青霉烯酶抑制剂增强试

验(88.54% *vs.* 92.71%),但多重 PCR 比抑制剂增强试验检测拥有更好的特异度(100.00% *vs.* 93.55%),见表 4。多重 PCR 和碳青霉烯抑制剂增强试验在阳性率检测上比较差异无统计学意义($P>0.05$),并且二者拥有良好的检测一致性($\kappa=0.63$)。见表 5。

表 3 多重 PCR 和碳青霉酶抑制剂增强试验检测 127 株肠杆菌目细菌基因型及耐药表型(*n*)

细菌类型	多重 PCR 检测细菌基因型					
	blaKPC	blaNDM	blaOX ^a	blaKPC+blaNDM	不含碳青霉烯酶基因的 CRE	敏感菌株
肺炎克雷伯菌	43	8	1	1	15	7
大肠埃希菌	0	19	0	0	10	2
阴沟肠杆菌	0	10	0	0	6	0
布氏柠檬酸杆菌	0	0	0	1	0	0
产气克雷伯菌	0	0	0	1	1	0
弗氏柠檬酸杆菌	0	1	0	0	0	0
产酸克雷伯菌	0	0	0	0	1	0
总计	43	38	1	3	33	9

细菌类型	碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测耐药表型				
	产 A 类酶	产 B 类酶	产 A+B 类酶	不产碳青霉烯酶的 CRE	敏感菌株
肺炎克雷伯菌	46	9	0	13 ^a	7
大肠埃希菌	0	23	0	6	2
阴沟肠杆菌	0	12	0	4	0
布氏柠檬酸杆菌	0	1	0	0	0
产气克雷伯菌	0	1	0	1	0
弗氏柠檬酸杆菌	0	1	0	0	0
产酸克雷伯菌	0	1	0	0	0
总计	46	48	0	24	9

注:^a 表示有 3 株耐药的肺炎克雷伯菌的碳青霉烯酶类型不能确定,归类为不产碳青霉烯酶的 CRE。

表 4 多重 PCR 和碳青霉烯酶抑制剂增强试验和普通 PCR 检测结果分析

方法	普通 PCR(<i>n</i>)		灵敏度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	κ
	阳性	阴性						
多重 PCR								
阳性	85	0	88.54	100.00	91.33	100.00	73.81	0.79
阴性	11	31						
碳青霉烯酶抑制剂增强试验								
阳性	89	2	92.71	93.55	92.91	97.80	80.56	0.81
阴性	7 ^a	29						

注:^a 表示含有 3 株碳青霉烯酶类型不能确定的肺炎克雷伯菌、3 株共表达 blaKPC+blaNDM 但在抑制剂增强试验表型检测中被认定为仅产一类酶的菌株及 1 株含有 blaOXA 基因但在抑制剂增强试验表型检测中被认定为不产碳青霉烯酶的 CRE 菌株。

表 5 多重 PCR 与碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测结果分析(*n*)

多重 PCR	碳青霉烯酶抑制剂增强试验		
	阳性	阴性	合计
阳性	78	7 ^a	85
阴性	13	29	42
合计	91	36	127

注:^a 表示含有 3 株碳青霉烯酶类型不能确定的肺炎克雷伯菌、3 株共表达 blaKPC+blaNDM 但在抑制剂增强试验表型检测中被认定为仅产一类酶的菌株及 1 株含有 blaOXA 基因但在抑制剂增强试验表型检测中被认定为不产碳青霉烯酶的 CRE 菌株。

3 讨 论

CRE 的出现,尤其是对碳青霉烯类药物耐药的肺

炎克雷伯菌和大肠埃希菌,给发达国家和发展中国家的公共医疗卫生事业造成极大威胁和负担^[20-21]。CRE 的传播具有极高的隐匿性,相对于无症状感染者或定植人群,CRE 的实验室阳性病例报告数比例约为 1 : 100^[22],而其他两类人群可以向阳性病例转化^[23]。因此建立一种快速、准确的实验室方法用于检测 CRE,为临床早期提供诊断治疗依据具有重要意义。目前,一线临床实验室用于检测 CRE 及其耐药表型最常用的方法包括抗菌药物药敏试验和纸片扩散法等,虽然操作简便但其耗时较长,临床报告时间在 16~24 h,且无法明确具体的碳青霉烯酶类型。本研究建立多重 PCR 检测法,可在单次试验中快速筛查 5 种常见的碳青霉烯酶耐药基因,并可基于耐药基因检

测结果预测耐药表型,与现有检测方法相比,多重 PCR 可在 3~4 h 获得检测结果,大幅缩短临床报告时间,为早期临床诊疗提供可靠依据。

在本研究中发现 22 株(17.3%,22/127)不产碳青霉烯酶的 CRE,其耐药机制可能是染色体突变(如孔蛋白基因突变、外排泵过表达和(或)青霉素结合蛋白改变)和获得性非碳青霉烯耐药机制(如超广谱 β -内酰胺酶的表达获取或上调、产 AmpC 酶)^[24]。多重 PCR 对这类耐药细菌的检测能力有限,但文献[25]研究证实,CPE 病死率(32.4%)高于不产碳青霉烯酶 CRE(13.0%),故对 CPE 的检测更为重要。3 株由多重 PCR 检测发现共表达 blaKPC+blaNDM 的菌株在碳青霉烯抑制剂增强试验表型检测中仅表达一类酶,这可能是因为在缺乏抗菌药物压力的传代培养下,含有耐药基因的质粒缺乏稳定性而丢失^[26],导致表型检测假阴性。7 株碳青霉烯酶抑制剂增强试验表型检测为产 B 类酶的 CRE 在多重 PCR 检测中并未检出相应耐药基因,可能是因为多重 PCR 体系引物种类较多,在扩增过程干扰风险增加,因此更难获得较长片段产物。

此外,1 株多重 PCR 检测含有 blaOXA-48-like 耐药基因的肺炎克雷伯菌在碳青霉烯酶抑制剂增强试验表型检测中为假阴性,由于表型检测中试剂 APB、EDTA 仅能抑制 A 类酶和 B 类酶而对 D 类酶没有影响,故不能检测 OXA-48 型碳青霉烯酶^[27],说明相较于表型检测,多重 PCR 在 CRE 的监测中更具全面性。blaOXA-48-like 经测序后序列对比鉴定为 blaOXA-181。blaOXA-181 被认为是除 blaOXA-48 外最常见的 blaOXA-48-like 基因,常出现在大肠埃希菌中,目前发现的 blaOXA-181 几乎都位于含有 Tn2013 的 IncX3 质粒上^[28]。我国最早关于 blaOXA-181 的报道是文献[29]发现的 1 株大肠埃希菌,本研究中发现含有 blaOXA-181 的是肺炎克雷伯菌,耐药基因在肠杆菌目细菌之间的传播及基因分子特性值得进一步探究。

近年来,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、免疫层析法及基于生物发光技术的碳青霉烯酶药敏试验检测等多种新技术被应用于碳青霉烯酶的检测^[30-32]。这些技术拥有操作简单、省时的优点,但技术设备、耗材及人力成本昂贵,难以在大量基层医疗机构中展开。目前也有其他多重 PCR 技术的报道,例如,YOSHIOKA 等^[33]使用 COBAS® z480 同时检测 6 种碳青霉烯酶耐药基因,虽然其时间成本低于多重 PCR,但由于设备的限制需将 6 种基因分次构建为同时检测 3 组耐药基因的分组,增加了操作过程的复杂性,另外检测过程中荧光探针的使用也增加了经济成本。相比之下,多重 PCR 使用普通 PCR 设备即可完成,且操作步骤简单,能快速、方便、准确检测肠杆菌目细菌中 5 种常见碳青霉烯酶耐药基因,与目前临

床应用的碳青霉烯酶抑制剂增强试验在 CRE 及其表型检测结果上具有良好的一致性,极大缩短临床报告时间,在 CRE 的监测调查中发挥良好作用,适用于临床实践中展开推广。

参考文献

- [1] WATAHIKI M,KAWAHARA R,SUZUKI M,et al. Single-tube multiplex polymerase chain reaction for the detection of genes encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase[J]. Jpn J Infect Dis,2020,73(2):166-172.
- [2] LIU C P,LU H P,LUOR T. Clonal relationship and the association of the ST218 strain harboring blaOXA-72 gene to mortality in Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii bacteremia[J]. J Microbiol Immunol Infect,2019,52(2):297-303.
- [3] CUI X,ZHANG H,DU H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: detection and antimicrobial therapy[J]. Front Microbiol,2019,10(1):1823.
- [4] CASSINI A,HOGBERG L D,PLACHOURAS D,et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015:a population-level modelling analysis[J]. Lancet Infect Dis,2019,19(1):56-66.
- [5] MACARENO-CASTRO J,SOLANO-SALAZAR A,DONG L T,et al. Fecal microbiota transplantation for Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae;a systematic review[J]. J Infect,2022,84(6):749-759.
- [6] 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.
- [7] NORDMANN P,POIREL L. Epidemiology and diagnostics of Carbapenem resistance in Gram-negative bacteria[J]. Clin Infect Dis,2019,69(Suppl 7):S521-S528.
- [8] YONG D,TOLEMAN M A,GISKE C G,et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1),and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India[J]. Antimicrob Agents Chemother,2009,53(12):5046-5054.
- [9] WU W,FENG Y,TANG G,et al. NDM metallo-beta-lactamases and their bacterial producers in health care settings[J]. Clin Microbiol Rev,2019,32(2):115-118.
- [10] HU X F,XU X B,WANG X,et al. Diversity of new delhi metallo-beta-lactamase-producing bacteria in China[J]. Int J Infect Dis,2017,55(1):92-95.
- [11] DENG J,LIAO Q,ZHANG W,et al. Molecular epidemiology characteristics and detecting transmission of Carbapenemase-producing enterobacterales in southwestern China[J]. J Infect Public Health,2022,15(10):1047-1052.
- [12] PITOUT J,PEIRANO G,KOCK M M,et al. The global ascendancy of OXA-48-type Carbapenemases[J]. Clin Microbiol Rev,2019,33(1):102-119.

- [13] RAMSAMY Y, MLISANA K P, AMOAKO D G, et al. Mobile genetic elements-mediated Enterobacterales-associated Carbapenemase antibiotic resistance genes propagation between the environment and humans; a one health South African study[J]. *Sci Total Environ*, 2022, 806(Pt 3):150641.
- [14] BASSETTI M, PEGHIN M, VENA A, et al. Treatment of infections due to MDR gram-negative bacteria[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2019, 6(1):74.
- [15] PASTERAN F, GONZALEZ L J, ALBORNOZ E, et al. Triton hodge test: improved protocol for modified hodge test for enhanced detection of NDM and other Carbapenemase producers[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(3):640-649.
- [16] TAMMA P D, SIMNER P J. Phenotypic detection of Carbapenemase-producing organisms from clinical isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(11):1140-1148.
- [17] NAAS T, OUESLATI S, BONNIN R A, et al. Beta-lactamase database (BLDB)-structure and function[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32(1):917-919.
- [18] ZHANG C, XU X, PU S, et al. Characterization of Carbapenemases, extended spectrum beta-lactamases, quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants in Carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* from a teaching hospital in Chongqing, Southwest China[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 27(1):271-276.
- [19] BORDIN A, TREMBIZKI E, WINDSOR M, et al. Evaluation of the SpeedX Carba (beta) multiplex real-time PCR assay for detection of NDM, KPC, OXA-48-like, IMP-4-like and VIM Carbapenemase genes[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1):571.
- [20] FEIL E J. Enterobacteriaceae: joining the dots with pan-European epidemiology[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017, 17(2):118-119.
- [21] MCCANN E, SRINIVASAN A, DERYKE C A, et al. Carbapenem-nonsusceptible gram-negative pathogens in ICU and non-ICU settings in US hospitals in 2017: a multicenter study[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2018, 5(10):ofy241.
- [22] 缪兴全, 孟秀娟. 患者及医院环境 CRE 主动筛查及防控策略研究进展[J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(12):1257-1263.
- [23] RAMANATHAN Y V, VENKATASUBRAMANIAN R, NAMBI P S, et al. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae screening: a core infection control measure for critical care unit in India? [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2018, 36(4):572-576.
- [24] LEE Y Q, PONNAMPALAVANAR S S, CHONG C W, et al. Characterisation of non-Carbapenemase-producing Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* based on their clinical and molecular profile in Malaysia[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(11):1670.
- [25] TAMMA P D, GOODMAN K E, HARRIS A D, et al. Comparing the outcomes of patients with Carbapenemase-producing and non-Carbapenemase-producing Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(3):257-264.
- [26] GAO H, LIU Y, WANG R, et al. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51(1):102599.
- [27] 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.
- [28] PEIRANO G, CHEN L, NOBREGA D, et al. Genomic epidemiology of global Carbapenemase-producing *Escherichia coli*, 2015 – 2017 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28(5):924-931.
- [29] LIU Y, FENG Y, WU W, et al. First report of OXA-181-producing *Escherichia coli* in China and characterization of the isolate using whole-genome sequencing[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(8):5022-5025.
- [30] GATO E, ANANTHARAJAH A, ARROYO M J, et al. Multicenter performance evaluation of MALDI-TOF MS for rapid detection of Carbapenemase activity in Enterobacterales; the future of networking data analysis with online software[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12(1):789731.
- [31] GLUPCZYNSKI Y, EVRARD S, OTE I, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC Carbapenemases from cultured bacteria[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(5):1217-1222.
- [32] VAN ALMSICK V, GHEBREMEDHIN B, PFENNIGWERTH N, et al. Rapid detection of Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* and Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae using a bioluminescence-based phenotypic method[J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 147(1):20-25.
- [33] YOSHIOKA N, HAGIYA H, DEGUCHI M, et al. Multiplex real-time PCR assay for six major Carbapenemase genes[J]. *Pathogens*, 2021, 10(3):276.

(收稿日期:2022-12-12 修回日期:2023-04-16)