

文章编号: 1001-8689(2020)05-0487-07

## rCIM检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的应用价值研究

刘亚萌<sup>1</sup> 胡晓芳<sup>2</sup> 刘明聪<sup>3</sup> 郑思涵<sup>3</sup> 万楠<sup>2,\*</sup>

(1 锦州医科大学北部战区总医院研究生培养基地, 锦州 121000; 2 北部战区总医院检验科, 沈阳 110016;

3 大连医科大学, 大连 116000)

**摘要:** 目的 研究快速碳青霉烯灭活试验(rapid carbapenem inactivation method, rCIM)检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌(carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, CPE)的临床价值。方法 rCIM是将耐碳青霉烯肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)与美罗培南纸片孵育, 离心所得上清液与指示菌株大肠埃希菌ATCC 25922进行二次孵育, 并用浊度仪记录指示菌株ATCC25922的生长。将2016年1月—2018年9月临床分离的55株CREs, 采用rCIM检测碳青霉烯酶, 以PCR结果为金标准, 同CNPt-Direct和改良碳青霉烯灭活试验(modified carbapenem inactivation method, mCIM)进行比较。并收集2018年10月—2019年5月临床分离的48株CREs进行前瞻性研究。结果 回顾性分析中, rCIM检测碳青霉烯酶的灵敏性、特异性分别为97.1%、100%, 高于mCIM和CNPt-Direct试验。rCIM与基因测序结果比对, 一致性Kappa值为0.961。前瞻性研究中, rCIM检测碳青霉烯酶的灵敏性为96.4%, 特异性为95%, 一致性Kappa值为0.914。结论 rCIM是一种快速(<3h)、经济、简便、可靠的筛选CPE菌株的方法。

**关键词:** 耐碳青霉烯肠杆菌科细菌; 碳青霉烯酶; rCIM和mCIM; CNPt-Direct试验

中图分类号: R978.1, R446.5 文献标志码: A

## Application value of rCIM in the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

Liu Ya-meng<sup>1</sup>, Hu Xiao-fang<sup>2</sup>, Liu Ming-cong<sup>3</sup>, Zheng Si-han<sup>3</sup> and Wan Nan<sup>2</sup>

(1 Post Graduate Training Base of General Hospital of Northern Theater Command of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000;

2 Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016;

3 Dalian Medical University, Dalian 116000)

**Abstract Objective** To study the clinical value of the rapid carbapenem inactivation method (rCIM) for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE). **Methods** The rCIM consists of the incubation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) with meropenem discs, and the supernatant obtained by centrifugation was incubated with the indicator strain *E. coli* ATCC25922 twice. Growth of the indicator strain ATCC25922 was monitored by a nephelometer. 55 CREs were collected from clinical specimens from January 2016 to September 2018. Using PCR results as the gold standard, rCIM was used to detect carbapenemase and its results were compared with the CNPt-Direct test and the modified carbapenem inactivation method (mCIM). A prospective study of 48 CREs from clinical specimens from October 2018 to May 2019 was conducted. **Results** In retrospective analysis, the sensitivity and specificity of the rCIM were 97.1% and 100%, respectively, higher than the mCIM and the CNPt-Direct test. The rCIM

---

收稿日期: 2019-07-30

作者简介: 刘亚萌, 女, 生于1994年, 在读硕士研究生, 检验师, 主要从事微生物与分子生物学研究, E-mail: 1330826675@qq.com

\*通讯作者, E-mail: wannan@outlook.com

results were compared with the results of gene sequencing, and the consistency Kappa value was 0.961. In the prospective study, the rCIM showed a sensitivity and specificity of 96.4% and 95%, respectively, and the consistency Kappa value is 0.914.

**Conclusion** The rCIM is a fast (<3h), inexpensive, simple and reliable method for screening CPEs.

**Key words** Carbapenem resistant Enterobacteriaceae; Carbapenemase; rCIM and mCIM; CNPt-Direct test

由耐碳青霉烯肠杆菌科细菌(CRE)造成的感染在世界范围内逐年增加<sup>[1-2]</sup>, 已造成高的发病率、死亡率, 并增加医疗卫生的支出<sup>[3]</sup>。尽管CRE对碳青霉烯类药物的耐药机制分为两类: 一为产碳青霉烯酶, 二是一些非产酶的机制, 比如: 外排泵高表达、外膜孔道蛋白通透性下降或缺失合并AmpC酶和(或)ESBL的过表达<sup>[4-5]</sup>, 但前者为主要机制, 且已有文献证实产碳青霉烯肠杆菌科细菌比非产碳青霉烯肠杆菌科细菌(non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, NPE)毒性高、预后差、易传播且病死率高<sup>[6]</sup>, 因而早期、有效地检出CPE, 对疾病预防、治疗和感染控制有着非常重要的意义。2018版CLSI将mCIM和EDTA碳青霉烯灭活试验(EDTA-carbapenem inactivation method, eCIM)纳入微生物药敏试验执行标准<sup>[7]</sup>, 用于筛选CPE并区分碳青霉烯酶的类型, 然而mCIM所需温育时间较长(22~28h), 不利于早期诊断和干预。本研究是基于mCIM建立的一种快速碳青霉烯灭活试验(rCIM), 旨在评估rCIM快速、准确筛选CPE的性能, 为临床治疗和流行病学调查提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

收集北部战区总医院2016年1月—2019年5月临床标本中分离的耐碳青霉烯(亚胺培南MIC≥4μg/mL和/或美罗培南MIC≥4μg/mL)肠杆菌科细菌103株(含回顾性分析55株和前瞻性研究48株), 其中包括大肠埃希菌24株、阴沟肠杆菌16株、肺炎克雷伯菌54株、产酸克雷伯菌6株、阿氏肠杆菌1株、奇异变形菌1株和产气肠杆菌1株。所有菌株均使用MALDI-TOF MS进行鉴定, 使用Vitek 2 Compact全自动微生物分析系统进行药敏试验, 同时用K-B纸片扩散法加以验证, 折点判定按照2018版CLSI指南进行<sup>[7]</sup>。质控菌株大肠埃希菌ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705、ATCC BAA1706 均购自卫生部临床检验中心。

### 1.2 主要仪器和试剂

MALDI-TOF MS(德国Bruke公司); Vitek 2 Compact全自动微生物分析仪和浊度仪(法国Bio-

Merieux公司); PCR扩增仪(上海宏石医疗科技有限公司); 电泳仪和凝胶成像仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。哥伦比亚血平板和M-H琼脂平板(郑州安图生物工程股份有限公司); 药敏纸片和胰蛋白胨大豆(TSB)肉汤培养基(英国Oxoid公司)。亚胺培南西司他丁钠(杭州默沙东制药有限公司); 细菌DNA抽提试剂盒、PCR试剂盒、琼脂糖、DNA Ladder、引物合成和PCR产物测序(上海生工生物工程股份有限公司)。

### 1.3 mCIM<sup>[8]</sup>和rCIM<sup>[9]</sup>

(1)mCIM: 取1μL过夜培养待测菌株加入2mL TSB肉汤中, 涡旋混匀, 将10μg美罗培南纸片(1片)加入菌悬液中, 涡旋, (35±2)℃温育4h。制备1.5×10<sup>8</sup>CFU/mL大肠埃希菌ATCC25922菌悬液, 均匀涂布MH平板, 干燥3~10min。用10μL接种环取出纸片, 将纸片贴于管壁挤去多余液体, 贴于MH平板。(35±2)℃温育18~24h, 量取抑菌圈直径。结果判断: 若美罗培南抑菌圈直径为6~15mm或直径为16~18mm但抑菌圈内有针尖样散在菌落, 则结果为阳性, 判为产碳青霉烯酶菌株。若抑菌圈直径为16~18mm或直径≥19mm但抑菌圈内有针尖样散在菌落, 则结果为中介, 需再次验证。若抑菌圈直径≥19mm, 则结果为阴性, 判为非产碳青霉烯酶菌株。

(2)rCIM: 取20μL过夜培养待测菌株加入1mL无菌水中, 涡旋混匀, 将20μg美罗培南纸片(2片)加入菌悬液中, 涡旋, (35±2)℃温育30min。10000r/min离心5min(高黏液菌株需二次离心)。取500μL上清液, 加入到2.5mL 3×10<sup>8</sup>CFU/mL的ATCC25922 TSB肉汤菌悬液中。(35±2)℃孵育2h, 每30min进行1次浊度计数(记录结果为减去基线后的浊度增长)。mCIM和rCIM中, 肺炎克雷伯菌ATCC BAA1705为阳性质控, ATCC BAA1706为阴性质控。

### 1.4 CNPt-Direct<sup>[10]</sup>

CNPt-Direct a液中含0.05%酚红、0.1mmol/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和0.1% Triton X-100, 调节pH至7.8±0.1。CNPt-Direct b液是在a液的基础上加入12mg/mL亚胺培南西司他丁钠。CNPt-Direct试验的原理是: Triton X-100增加细菌细胞膜通透性, 释放胞内碳青

霉烯酶与泰能反应，水解抗生素使其开环同时产生H<sup>+</sup>，当H<sup>+</sup>累积到一定浓度时，溶液由红变黄(酚红为pH指示剂)，表明菌株产碳青霉烯酶。在96孔板中分别加入100μL a液和100μL b液(每株菌设置3个复孔)，用1μL的接种环挑取待测菌株，涡旋混匀，(35±2)℃孵育2h后读取结果。肺炎克雷伯菌ATCC BAA1705为阳性质控，ATCC BAA1706为阴性质控。

### 1.5 碳青霉烯酶基因的检测

按细菌组DNA抽提试剂盒说明书提取细菌DNA，筛查以下常见碳青霉烯酶基因：*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>、*bla*<sub>IMP</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub>和*bla*<sub>VIM</sub>，引物序列见表1。PCR总反应体积为25μL，Mix 12.5μL，DNA模板2μL(50ng/μL)，引物各1μL(10μmol/L)，去离子水8.5μL。PCR反应条件为：预变性，94℃×5min；循环，94℃×45s，55℃×45s，72℃×1min，共36个循环；延伸，72℃×10min。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳，电压100V，时间1h，在凝胶成像仪上阅读结果。PCR扩增阳性结果测序后，用NCBI网站中的Blast程序进行比对。

### 1.6 统计学分析

用SPSS 22.0软件进行分析。以PCR结果为金标准，计算rCIM、mCIM和CNPt-Direct试验检测CPE的敏感性、特异性，分别与基因检测结果进行Kappa一致性检验分析：Kappa值>0.75，说明两种方法诊断结果一致性较好；Kappa值在0.4~0.75，说明一致性一般；Kappa值<0.4，说明一致性较差。

表1 PCR扩增碳青霉烯酶基因的引物

Tab. 1 Primers used for amplification of carbapenemase genes by PCR

| 目的基因   | 引物序列(5'-3')               | 产物大小/bp | 参考文献 |
|--------|---------------------------|---------|------|
| KPC    | F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG   |         |      |
|        | R: CTTGTCATCCTTGTAGCG     | 798     | [11] |
| NDM    | F: GGTTGGCGATCTGGTTTC     |         |      |
|        | R: CGGAATGGCTCATCACGATC   | 621     | [11] |
| IMP    | F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC |         |      |
|        | R: GGTTAAAYAAACAAACCACC   | 232     | [11] |
| OXA-48 | F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC   |         |      |
|        | R: CATCAAGTTCAACCCAACCG   | 438     | [11] |
| VIM    | F: ATCGCAACGCAGTCGTTGA    |         |      |
|        | R: CCCGCTCGATGAGAGTCCTT   | 318     | 公司合成 |

注：Y=C或T

## 2 结果

### 2.1 rCIM cut-off值的建立

在阳性质控菌株肺炎克雷伯菌ATCC BAA1705灭活抗生素后，指示菌株大肠埃希菌ATCC 25922的生长不受美罗培南的影响，在1.5h时其菌液浓度增长中位数(最小值~最大值)为 $2.52 \times 10^8$ ( $2.37 \times 10^8$ ~ $2.76 \times 10^8$ )CFU/mL，2h时为 $3.99 \times 10^8$ ( $3.93 \times 10^8$ ~ $4.11 \times 10^8$ )CFU/mL。在阴性质控菌株肺炎克雷伯菌ATCC BAA1706管中，ATCC 25922的生长受到美罗培南的抑制，其菌液浓度增长中位数(最小值~最大值)在1.5和2h分别为 $0.42 \times 10^8$ ( $0.33 \times 10^8$ ~ $0.48 \times 10^8$ )CFU/mL、 $-0.06 \times 10^8$ ( $-0.12 \times 10^8$ ~ $0.03 \times 10^8$ )CFU/mL。在1.5h之前阳性和阴性质控菌株管中25922的增长没有明显的区别，而在1.5h后出现了明显的区别。通过SPSS 22.0计算，rCIM筛选碳青霉烯酶的cut-off值为 $1.5 \times 10^8$ CFU/mL。

### 2.2 回顾性分析

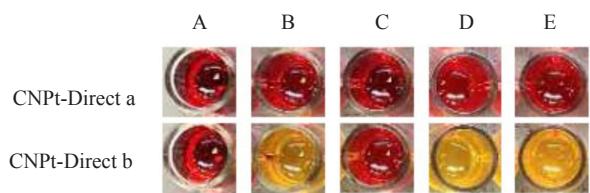
55株CREs的细菌种类、基因测序结果、rCIM、mCIM和CNPt-Direct结果见表2和图1。指示菌株大肠埃希菌ATCC 25922菌液浓度增长见图2，在1.5h，rCIM准确检测出31/35株CPEs，其菌液浓度增长中位

表2 55株CRE菌株rCIM、mCIM和CNPt-Direct回顾性分析的结果

Tab. 2 The results from the retrospective analysis of 55 CREs of the rCIM, mCIM and CNPt-Direct

| 分组             | 细菌种类   | 数量 | rCIM  | mCIM  | CNPt-Direct |
|----------------|--------|----|-------|-------|-------------|
| 碳青霉烯酶阳性菌株      |        |    |       |       |             |
| A类碳青霉烯酶        |        |    |       |       |             |
| <i>KPC</i>     | 肺炎克雷伯菌 | 9  | +     | 8/9+  | 8/9+        |
| <i>NDM</i>     | 大肠埃希菌  | 8  | +     | 7/8+  | +           |
|                | 阴沟肠杆菌  | 10 | 9/10+ | 9/10+ | +           |
|                | 肺炎克雷伯菌 | 2  | +     | +     | +           |
|                | 产酸克雷伯菌 | 2  | +     | +     | +           |
| <i>IMP</i>     | 产酸克雷伯菌 | 2  | +     | +     | 1/2+        |
| <i>KPC+NDM</i> | 肺炎克雷伯菌 | 1  | +     | +     | +           |
|                | 产酸克雷伯菌 | 1  | +     | +     | +           |
| 碳青霉烯酶阴性菌株      |        |    |       |       |             |
|                | 大肠埃希菌  | 8  | -     | -     | -           |
|                | 阴沟肠杆菌  | 1  | -     | -     | -           |
|                | 肺炎克雷伯菌 | 10 | -     | -     | -           |
|                | 产酸克雷伯菌 | 1  | -     | -     | -           |

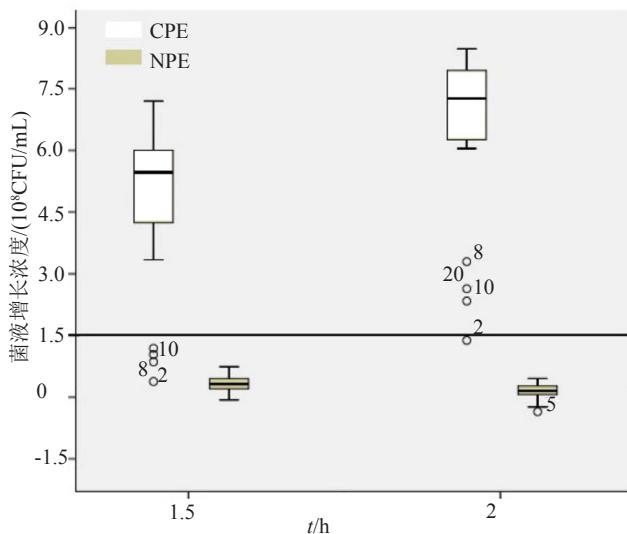
注：+：阳性，-：阴性



A: 未加菌株的空白对照; B: 阳性质控菌株肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705( $bla_{KPC}$ 基因); C: 阴性质控菌株肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706(NPE); D:  $bla_{NDM}$ 基因阳性大肠埃希菌; E:  $bla_{IMP}$ 基因阳性产酸克雷伯菌; 图片在孵育2h后采集

图1 耐碳青霉烯肠杆菌科细菌CNPt-Direct检测的结果

Fig. 1 The results of CNPt-Direct test in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae



空心圆代表离群值，其周围的数字表示该离群值对应的菌株编号， $1.5 \times 10^8$ CFU/mL处的水平黑线表示阳性cut-off值。温育2h，每30min测量1次菌液浓度，结果为减去基线后的菌液浓度增长

图2 回顾性分析中指示菌株大肠埃希菌菌液浓度增长图

Fig. 2 *E. coli* indicator strain subtracted growth index in the retrospective analysis

数(最小值~最大值)为 $5.76 \times 10^8$ ( $0.66 \times 10^8$ ~ $7.50 \times 10^8$ )CFU/mL，此外有3株阴沟肠杆菌(8号菌、10号菌、20号菌)菌液增长未达到 $1.5 \times 10^8$ ( $1.32 \times 10^8$ 、 $1.14 \times 10^8$ 、 $1.47 \times 10^8$ )CFU/mL，但在30min后均超过 $1.5 \times 10^8$ ( $3.30 \times 10^8$ 、 $2.34 \times 10^8$ 、 $2.64 \times 10^8$ )CFU/mL。在2h，rCIM准确检测出34/35株CPEs，其菌液增长中位数(最小值~最大值)为 $7.41 \times 10^8$ ( $1.38 \times 10^8$ ~ $9.18 \times 10^8$ )CFU/mL，另有1株NDM基因型阴沟肠杆菌(2号菌)在1.5和2h时菌液增长分别为 $0.66 \times 10^8$ 和 $1.38 \times 10^8$ CFU/mL，出现假阴性结果。rCIM检出20/20株NPEs，在

表3 48株CRE菌株rCIM、mCIM和CNPt-Direct前瞻性研究的结果

Tab. 3 The results of the prospective study of 48 CREs of the rCIM, mCIM and CNPt-Direct

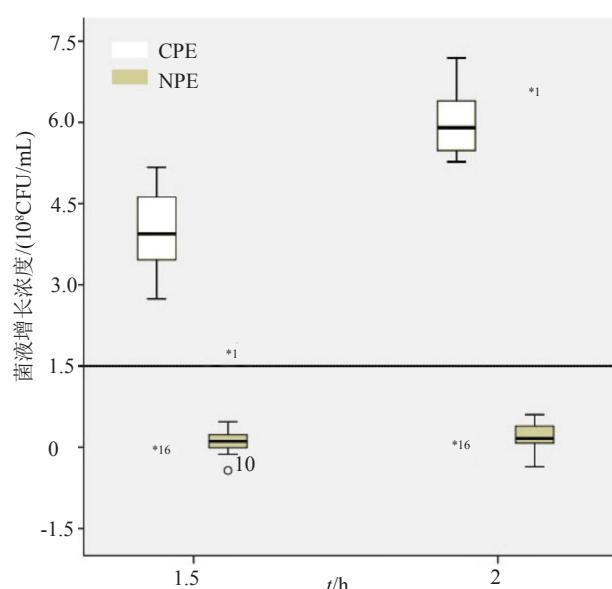
| 分组(数量)            | 细菌种类(n)    | rCIM   | mCIM   | CNPt-Direct |
|-------------------|------------|--------|--------|-------------|
| 碳青霉烯酶阳性菌株<br>(28) |            |        |        |             |
| A类碳青霉烯酶           |            |        |        |             |
| KPC(16)           | 肺炎克雷伯菌(15) | +      | 13/15+ | 13/15+      |
|                   | 大肠埃希菌(1)   | +      | -      | -           |
| B类碳青霉烯酶           |            |        |        |             |
| NDM(8)            | 大肠埃希菌(1)   | +      | -      | +           |
|                   | 阴沟肠杆菌(1)   | +      | -      | +           |
|                   | 肺炎克雷伯菌(4)  | +      | 3/4+   | +           |
|                   | 奇异变形菌(1)   | -      | -      | -           |
|                   | 产气肠杆菌(1)   | +      | -      | -           |
| KPC+NDM(1)        | 阴沟肠杆菌(1)   | +      | +      | +           |
| KPC+IMP(1)        | 肺炎克雷伯菌(1)  | +      | +      | +           |
| NDM+IMP(2)        | 阴沟肠杆菌(2)   | +      | -      | +           |
| 碳青霉烯酶阴性菌株<br>(20) |            |        |        |             |
|                   | 大肠埃希菌(6)   | -      | -      | -           |
|                   | 阴沟肠杆菌(1)   | -      | -      | -           |
|                   | 肺炎克雷伯菌(12) | 11/12- | 11/12- | 11/12-      |
|                   | 阿氏肠杆菌(1)   | -      | -      | -           |

注：+：阳性，-：阴性

1.5和2h时其菌液增长中位数(最小值~最大值)分别为 $0.09 \times 10^8$ ( $-0.30 \times 10^8$ ~ $0.51 \times 10^8$ )CFU/mL、 $0.15 \times 10^8$ ( $-0.36 \times 10^8$ ~ $0.45 \times 10^8$ )CFU/mL。同基因测序结果相比，回顾性分析中rCIM检测CPE的灵敏性、特异性分别为97.1%和100%，与测序一致性Kappa值为0.961。而mCIM和CNPt-Direct灵敏度分别为91.4%、94.3%，特异性均为100%，与测序一致性Kappa值分别为0.886、0.923，其灵敏度、特异性、一致性均低于rCIM。

### 2.3 前瞻性研究

48株CREs的细菌种类、基因测序结果、rCIM、mCIM和CNPt-Direct结果见表3和图1。指示菌株大肠埃希菌ATCC25922菌液浓度增长见图3，rCIM检出27/28株CPEs，在1.5h其菌液浓度增长中位数(最小值~最大值)为 $3.96 \times 10^8$ ( $-0.21 \times 10^8$ ~ $5.13 \times 10^8$ )CFU/mL，2h为 $5.91 \times 10^8$ ( $-0.15 \times 10^8$ ~ $7.17 \times 10^8$ )CFU/mL，另有1株携带 $bla_{NDM}$ 基因奇异变形菌(16号菌)在1.5h和2h的菌液浓度增长分别为 $-0.21 \times 10^8$ 和 $-0.15 \times 10^8$ CFU/mL，出



空心圆代表离群值，“\*”表示极端值，其周围的数字表示该值对应的菌株编号， $1.5 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ 处的水平黑线表示阳性cut-off值。温育2h，每30min测量1次菌液浓度，结果为减去基线后的菌液浓度增长

图3 前瞻性研究中指示菌株大肠埃希菌菌液浓度增长图  
Fig. 3 *E. coli* indicator strain subtracted growth index in the prospective study

现假阴性结果。rCIM检出19/20株NPEs，在1.5h和2h其菌液增长中位数(最小值~最大值)分别为 $0.09 \times 10^8$ ( $-0.45 \times 10^8 \sim 1.65 \times 10^8$ )CFU/mL、 $0.18 \times 10^8$ ( $-0.36 \times 10^8 \sim 6.48 \times 10^8$ )CFU/mL，另有1株PCR扩增阴性的肺炎克雷伯菌(1号菌)，指示菌株25922的菌液浓度增长在1.5和2h分别为 $1.65 \times 10^8$ CFU/mL、 $6.48 \times 10^8$ CFU/mL，出现了假阳性的结果。前瞻性研究中，rCIM检出CPE的敏感性、特异性分别为96.4%、95%，阳性预测值、阴性预测值分别为96.4%、95%，与测序一致性Kappa值为0.914。而mCIM的敏感性、特异性分别为64.3%和95%，阳性预测值、阴性预测值分别为94.7%和65.5%，与测序一致性Kappa值为0.557；CNPt-Direct的敏感性、特异性分别为82.1%和95%，阳性预测值、阴性预测值分别为95.8%和79.2%，与测序一致性Kappa值为0.750，其两者灵敏度、特异性、阳(阴)性预测值、一致性均低于rCIM。

### 3 讨论

碳青霉烯酶的编码基因多位于细菌质粒、整合子和转座子等可移动的基因元件上，当细菌外膜受损和(或)通透性增加时，其可在细菌间传递，造成耐

药菌株在全球范围内的广泛传播<sup>[12-13]</sup>，因而快速、有效检出CPE是临床急需解决的一个问题。本研究用rCIM检测CRE菌株碳青霉烯酶的产生，正确检出61/63株CPEs和39/40株NPEs(共103CREs)，其整体灵敏度为96.8%，特异性为97.5%，略低于Muntean等<sup>[9]</sup>的研究，可能与样本量较少有关，但总体而言rCIM是一种性能极好的快速筛选CPE的方法。

本研究中的CRE主要为肺炎克雷伯菌(52.4%)，其次是大肠埃希菌(23.3%)和阴沟肠杆菌(15.5%)，本院肺炎克雷伯菌的耐药机制主要为产KPC酶(48.1%)，这与国内相关报道基本一致<sup>[14-15]</sup>。本院分离的CRE中，CPE数量远大于NPE，也说明了CRE的耐药机制主要与产碳青霉烯酶有关<sup>[4-5]</sup>。此外，本研究中共出现2株假阴性和1株假阳性结果。回顾性分析中1株阴沟肠杆菌(*bla*<sub>NDM</sub>基因)2h时菌液浓度增长为 $1.38 \times 10^8$ CFU/mL，接近阳性值 $1.50 \times 10^8$ CFU/mL，可能与碳青霉烯酶的活性较弱有关；前瞻性研究中也有1株奇异变形菌(*bla*<sub>NDM</sub>基因)2h的菌液浓度增长为 $-0.15 \times 10^8$ CFU/mL，且CNPt-Direct结果也为阴性，可能与碳青霉烯酶不表达或低表达有关；另有1株PCR扩增阴性的肺炎克雷伯菌，指示菌株菌液浓度增长在2h为 $6.48 \times 10^8$ CFU/mL，且CNPt-Direct结果也为阳性，可能是由于本文引物种类有限。通过Kappa一致性检验分析得知：rCIM与PCR结果一致性程度较好，优于mCIM和CNPt-Direct试验，说明rCIM是一种快速、经济、简单、可靠的筛选碳青霉烯酶的表型试验。

本研究检测的碳青霉烯酶基因主要为*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>和*bla*<sub>IMP</sub>基因，尚未发现*bla*<sub>VIM</sub>、*bla*<sub>OXA</sub>基因阳性菌株，这与国内碳青霉烯酶基因的流行病学较为相符<sup>[16-18]</sup>。回顾性分析中，有3株阴沟肠杆菌在1.5h菌液浓度增长( $1.32 \times 10^8$ 、 $1.14 \times 10^8$ 、 $1.47 \times 10^8$ )均 $< 1.50 \times 10^8$ CFU/mL，但2h时浓度进一步增长( $3.30 \times 10^8$ 、 $2.34 \times 10^8$ 、 $2.64 \times 10^8$ )，均 $> 1.50 \times 10^8$ CFU/mL，所以说额外的30min孵育是极有意义的。为减少假阴性和假阳性结果的出现，2h时浓度增长在阳性值 $1.50 \times 10^8$ CFU/mL附近的待测菌株需重新检测，或用其他试验(分子生物学、免疫学方法)进一步检测。另外，本研究所用菌株均来自血平板，rCIM应用于其他培养基的性能，有待进一步研究。

尽管分子生物学的方法仍然是检测碳青霉烯酶

**表4 几种表型方法每测试估计价格和时间的比较**  
**Tab. 4 Comparison of phenotypic methods with price estimation per test and work time**

| 方法          | rCIM  | mCIM               | CNPt-Direct          | RESIST-3 O.K.N., Carba5 | MALDI-TOF MS         |
|-------------|-------|--------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| 初次孵育时间/h    | 0.5   | 4                  |                      |                         |                      |
| 二次孵育时间/h    | 1.5~2 | 18~24              | 2                    | <15min                  | 1~4                  |
| 所需时间/h      | 2~2.5 | 22~28              | 2                    | <15min                  | 1~4                  |
| 抗生素         | 美罗培南  | 美罗培南               | 亚胺培南/西司他丁钠           |                         | 亚胺培南/美罗培南/厄他培南       |
| 抗生素量或浓度     | 20μg  | 10μg               | 6mg/mL               |                         | 0.5mg/mL             |
| 每株菌测试成本(\$) | <0.2  | <1 <sup>[22]</sup> | 2~10 <sup>[22]</sup> | 11 <sup>[20-21]</sup>   | 1~10 <sup>[23]</sup> |

的金标准<sup>[18]</sup>,且目前也有针对几种常见碳青霉烯酶基因的PCR扩增技术(Xpert Carba-R)<sup>[19]</sup>,但其操作复杂、成本高昂、易遗漏不常见的碳青霉烯酶基因。因此,临床实验室需要一些表型试验快速、有效地筛选碳青霉烯酶。目前检出CPE的表型方法有很多,包括MALDI-TOF MS检测碳青霉烯酶的水解<sup>[18]</sup>、生物化学方法(Carba NP<sup>[18]</sup>)、免疫学方法(RESIST-3 O.K.N.试验<sup>[20]</sup>,NG-Test CARBA 5试验<sup>[21]</sup>)、改良Hodge试验(MHT)<sup>[18]</sup>以及改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)<sup>[18]</sup>等。当前MALDI-TOF MS、免疫学方法和Carba NP试验也属于检出CPE的快速诊断方法(表4),但由于质谱仪价格昂贵,在部分微生物实验室未能得到广泛应用;免疫学的方法仅包含常见的3~5种碳青霉烯酶基因,不能涵盖所有类型的CPE菌株;Carba NP仅靠肉眼通过颜色改变来判断结果,不能对实验结果进行定量,受判读结果人员的影响较大,易造成假阴性或假阳性结果。而rCIM可以定量检测所有类型的碳青霉烯酶,且检出时间在2~2.5h,不需要专业的人员和昂贵的设备;且rCIM花费低廉,根据英国Oxoid公司价格2.5mL TSB肉汤约0.077\$,2个美罗培南纸片约0.171\$,每测试样本成本不足0.2\$。然而,本研究仍存在一定的局限性,样本量有限,且临床分离株携带的碳青霉烯酶基因种类不足(缺乏D类碳青霉烯酶),本研究尚需更大的样本含量和更多样化的分离株,来准确评估rCIM的临床应用价值。

综上所述,rCIM用于CPE菌株的快速筛查简单易行、经济可靠,具有广泛的应用前景。

## 参考文献

- [1] Logan L K, Weinstein R A. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace.[J]. *J Infect Dis*, 2017, 215(suppl\_1): S28-S36.
- [2] Lee C R, Lee J H, Park K S, et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods.[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 895.
- [3] Dautzenberg M J D, Wekesa A N, Gniadkowski M, et al. The association between colonization with carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and overall ICU mortality : an observational cohort study[J]. *Crit Care Med*, 2015, 43(6): 1170-1177.
- [4] Goodman K E, Simner P J, Tamma P D, et al. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015, 14(1): 1-14.
- [5] Lutgring J D, Limbago B M. The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-Enterobacteriaceae detection.[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(3): 529-534.
- [6] 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: 257-264.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S].CLSI, 2018.
- [8] Laolerd W, Akeda Y, Preeyanon L, et al. Carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from Bangkok, Thailand, and their detection by the Carba NP and modified carbapenem inactivation method tests.[J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(7): 1006-1011.
- [9] Muntean M M, Muntean A A, Gauthier L, et al. Evaluation of the rapid carbapenem inactivation method (rCIM): A phenotypic screening test for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(4): 900-908.
- [10] Pasteran F, Tijet N, Melano R G, et al. Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(12): 3908-3911.

- [11] Poirel L, Walsh T R, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 119-123.
- [12] Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance[J]. *Int J Med Microbiol*, 2013, 303(6-7): 298-304.
- [13] Antunes N T, Lamoureaux T L, Toth M, et al. Class D  $\beta$ -lactamases: Are they all carbapenemases[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(4): 2119-2125.
- [14] 刘婧娴, 俞静, 陈峰, 等. 产KPC酶肺炎克雷伯菌的检测及传播途径初探[J]. 中华临床感染病杂志, 2015, 8(4): 306-310.
- [15] Li H N, Zhang J X, Liu Y M, et al. Molecular characteristics of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in China from 2008 to 2011: predominance of KPC-2 enzyme[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 78(1): 63-65.
- [16] Zhang R, Liu L, Zhou H, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China[J]. *E Bio Med*, 2017, 19(C): 98-106.
- [17] Zhang Y, Wang Q, Yin Y, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: report from the China CRE network[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(2): e01882-17.
- [18] Zhou M, Wang D, Kudinha T, et al. Comparative evaluation of four phenotypic methods for detection of class A and B carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(8). doi: 10.1128/JCM.00395-18.
- [19] Dortet L, Fusaro M, Naas T. Improvement of the Xpert Carba-R kit for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(6): 3832-3837.
- [20] Glupczynski Y, Jousset A, Evrard S, et al. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(7): 1955-1960.
- [21] Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(4): 909-915.
- [22] Pierce V M, Simner P J, Lonsway D R, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(8): 2321-2333.
- [23] Kost K, Yi J, Rogers B, et al. Comparison of clinical methods for detecting carbapenem-resistant[J]. *Pract Lab Med*, 2017, 8: 18-25.