DOI:10.16016/j.1000-5404.201909092

mCIM 与 eCIM 检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的临床评价

王永红[1,2],刘 航[1],邹家齐[1],马华兰[2],夏 云[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科[1];409099 重庆,重庆市黔江中心医院检验科[2]

[摘要] **目的** 评价改良碳青霉烯灭活试验(modified carbapenem inactivation method, mCIM)和EDTA碳青霉烯灭活试验(EDTA-carbapenem inactivation method, eCIM)对肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的检测性能。**方法** 收集2017年1月至2018年9月重庆市16家区县医院临床分离的136株碳青霉烯耐药或敏感的肠杆菌科细菌,采用PCR方法检测碳青霉烯酶基因,mCIM和eCIM筛选碳青霉烯酶表型,并对基因检测结果与表型筛选试验结果进行分析和评价。**结果** 85株碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌中79株检出碳青霉烯酶基因,共表达A类和B类碳青霉烯酶基因8株,占比10.13%(8/79),碳青霉烯酶表型筛选试验mCIM阳性78株,eCIM阳性44株。51株碳青霉烯敏感菌株未检测到碳青霉烯耐药基因且mCIM均为阴性。mCIM筛选肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的灵敏度为98.7%(95%*CI*:92.2~99.9),特异性为100.0%(95%*CI*:92.1~100.0),Kappa值为0.985;eCIM筛选金属酶灵敏度为85.7%(95%*CI*:72.1~93.6),特异性为94.4%(95%*CI*:80.0~99.0),Kappa值为0.787;eCIM筛选丝氨酸酶灵敏度为89.5%(95%*CI*:74.3~96.6),特异性为100.0%(95%*CI*:90.6~100.0),Kappa值为0.904。**结论** mCIM联合eCIM检测可有效筛选产碳青霉烯酶菌株,但随着共表达A类和B类碳青霉烯酶菌株的分离率增加会降低对金属酶筛选的灵敏度。

[关键词] 碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌;碳青霉烯酶;改良碳青霉烯灭活试验;EDTA碳青霉烯灭活试验

[中图法分类号] R378.2; R446.9; R915 [文献标志码] A

Evaluation on clinical application of mCIM and eCIM in detection of cabapenemase from *Enterobacteriaceae Bateremia*

WANG Yonghong[1,2], LIU Hang[1], ZOU Jiaqi[1], MA Hualan[2], XIA Yun[1] [1]Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Clinical Laboratory, Chongqing Qianjiang Central Hospital, Chongqing, 409099, China

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the performance of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA carbapenem inactivation method (eCIM) in detection of carbapenemase in *Enterobacteriaceae Bateremia*. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect carbapenemase gene in 136 strains of carbapenem-resistant and -sensitive *Enterobacteriaceae* clinically isolated from 16 county-level hospital during January 2017 and September 2018. Meanwhile, the phenotype of obtained carbapenemase gene was screened by mCIM and eCIM. The results of gene detection and phenotypic screening test were analyzed and evaluated. **Results** Seventy-nine strains out of 85 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* strains (CRE) were positive to carbapenemase gene by PCR, and 8 strains expressed class A and B carbapenemase gene, accounting for 10.13% (8/79). Seventy-eight strains of 85 CRE strains were positive detected by mCIM, and 44 strains were identified to be positive by eCIM among them. The

[基金项目] 重庆市科卫联合医学科研项目(2018MSXM104)

[通信作者] 夏 云,E-mail:xiayun12cn@aliyun.com

carbapenem-resistant genes were not detected in the 51 carbapenem-sensitive strains by mCIM results. Screening the carbapenemase by mCIM had the sensitivity of 98.7% (95%*CI*: 92.2~99.9), the specificity of 100.0% (95%*CI*: 92.1~100.0), and the Kappa value of 0.985. When eCIM screened metallo-β-lactamase, the sensitivity was 85.7% (95%*CI*: 72.1~93.6), the specificity was 94.4% (95%*CI*: 80.0~99.0), and the Kappa value was 0.787. Screening serine carbapenemase, the sensitivity of eCIM was 89.5% (95%*CI*: 74.3~96.6), the specificity was 100.0% (95%*CI*: 90.6~100.0), and the Kappa value was 0.904. **Conclusion** Combination of mCIM and eCIM can screen carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* effectively. However, the sensitivity of the combined detection to screen metallo-β-lactamase will be reduced with the emergence of a large number of co-expressed class A and B carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.

[**Key words**] carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; carbapenemase; modified carbapenem inactivation method; EDTA-carbapenem inactivation method

Supported by the Project of Medical Research of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2018MSXM104).
Corresponding author: XIA Yun, E-mail: xiayun12cn@aliyun.com

在过去的10年中,随着碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)临床分离率不断增加,碳青霉烯酶介导的碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CP-CRE)感染成为医务工作者关注的热点问题[1]。临床发现的碳青霉烯酶主要包括A类酶(如KPC)、B类酶(如IMP、NDM)及D类酶(如OXA-48)[2-3]。由于新型β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂复合物(如头孢他啶/阿维巴坦、美罗培南/法硼巴坦)及正在研发的新药(亚胺培南西司他丁/瑞来巴坦)对大多数丝氨酸碳青霉烯酶(A类和D类)有效,但对金属β-内酰胺酶(B类)无效[4],同时针对这些新药的药敏试验没有被广泛应用。因此,临床需要一种快速、经济、准确的方法来检测碳青霉烯酶并区分碳青霉烯酶类型而指导临床用药。近年来,已有报道多种用于检测碳青霉烯酶基因型和表型的分析方法[3,5]。相较于基因型检测,表型检测更方便和经济。改良碳青霉烯灭活试验(modified carbapenem inactivation method, mCIM)主要用于CRE碳青霉烯酶表型检测,同时该试验具有较高的灵敏度和特异性[6],但它不能区分碳青霉烯酶类型。EDTA碳青霉烯灭活试验(EDTA-carbapenem inactivation method, eCIM)是利用EDTA抑制金属酶的原理,并结合mCIM结果,在产碳青霉烯酶菌株中可进一步区分金属酶和丝氨酸酶。而目前针对mCIM联合eCIM在临床中的应用评价尚无系统性研究报道。因此,本研究采用多中心标本数据资料,涵盖多种肠杆菌科细菌及菌株来源类型,对mCIM和eCIM碳青霉烯酶的检测能力进行临床评价,为流行病学研究和临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集重庆市16家区县医院2017年1月至2018年9月临床分离的碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌85株及碳青霉烯敏感肠杆菌科细菌51株,剔除重复菌株。菌株鉴定采用Vitek 2 Compact全自动微生物分析仪。质控菌株大肠埃希菌ATCC25922及肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706、ATCC BAA-1705、ATCC BAA-2146均购自重庆索特公司。

1.1.2 仪器及试剂 Vitek 2 Compact及配套鉴定卡购自法国生物梅里埃;PCR扩增仪购自ABI公司;电泳仪购自北京六一仪器厂;凝胶成像仪购自美国Bio-Rad公司;血平板和M-H平板购自重庆庞通公司,胰蛋白胨大豆肉汤培养基(tryptic soy broth, TSB)购自杭州滨和公司;美罗培南药敏纸片及厄他培南、亚胺培南、美罗培南抗生素均购自Oxoid公司;MH肉汤(mueller-hinton broth, MHB)购自北京奥博公司;DNA marker DL2000、*Taq*酶购自TaKaRa公司;琼脂糖购自Hydragene公司;引物由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 微量肉汤稀释法 MHB配制:参照培养基配制比例,称取2.1 g MHB粉末于100 mL超纯水中,混匀后高压灭菌,放于4 ℃保存备用。抗生素溶液配制:电子天平称取抗生素粉末51.2 mg,各加2.5 mL对应溶剂溶解混匀,溶剂选择参照美国临床和实验室标准协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)2018年标准[7],使其浓度达到20 480 μg/mL,滤菌器除菌备用。将20 480 μg/mL抗生素用MHB稀释至2 048 μg/mL,并继续倍比稀释从1 024 μg/mL到

1 μg/mL 共 11 个浓度梯度抗生素溶液。菌液配制及加样:从培养 18~24 h 的血平板上挑取单个菌落,生理盐水调浊度为 0.5 麦氏浓度菌悬液(1×10^8 CFU/mL),并用 MHB 稀释 100 倍得到 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液,将各梯度浓度抗生素及菌悬液各 50 μL 加至 96 孔板中,使菌悬液终浓度为 5×10^5 CFU/mL,并做好抗生素名称、浓度和细菌编号标记。待加样完成后,轻轻摇晃混匀放入 5% CO_2 孵箱 37 ℃培养 18~24 h。结果判读:能够完全抑制细菌生长的最低抗生素浓度即为菌株对该抗生素的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值,药敏折点参照 CLSI-2018 标准[7]。

1.2.2 mCIM 和 eCIM 检测 经 TSB 肉汤管制备、待测菌株接种、10 μg 美罗培南纸片浸没及 M-H 琼脂板药敏等步骤,读取抑菌圈直径结果,操作步骤均参照 CLSI-2018[7] 要求。①mCIM:抑菌圈直径为 6~15 mm 或直径为 16~18 mm 但抑菌圈内有针尖状菌落,则碳青霉烯酶阳性;若抑菌圈直径≥19 mm,则碳青霉烯酶阴性;若抑菌圈直径为 16~18 mm 或直径≥19 mm 但圈内有针尖状菌落,则碳青霉烯酶不确定。②eCIM:当 mCIM 结果为阳性时,若 eCIM 纸片与 mCIM 纸片抑菌圈直径之差 Δd≥5 mm,则金属β-内酰胺酶阳性;若 Δd≤4 mm,则判为金属β-内酰胺酶阴性,报告检测到丝氨酸碳青霉烯酶。当 mCIM 结果不确定时,eCIM 结果不作解释。以肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-2146 作为金属碳青霉烯酶阳性对照,以肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 作为丝氨酸碳青霉烯酶阳性对照,以肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 作为碳青霉烯酶阴性对照。

1.2.3 碳青霉烯酶基因检测 采用 37 ℃过夜培养 18~24 h 制备纯菌落,DNA 提取按照 DNA 抽提试剂盒说明书进行。依据 GenBank 上已注册耐药基因序列设计 bla_{KPC}、bla_{IMI}、bla_{SME}、bla_{NDM}、bla_{IMP}、bla_{VIM} 及 bla_{OXA-48} 碳青霉烯酶基因引物,引物序列见表 1。PCR 反应体系(20 μL):premix *Taq* 酶 10 μL,上下游引物各 0.4 μL(浓度 10 μmol/L),DNA 模板 2 μL,ddH_2O 7.2 μL。扩增条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s、退火 30 s(退火温度见表 1)、72 ℃延伸 30 s 共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增完毕,PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,选取阳性产物送测序。测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对。

表 1 碳青霉烯酶基因引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	长度/bp	退火温度/℃
bla_{KPC}	上游 AACCATTCGCTAAACTCG 下游 TTGACGCCCAATCCC	781	50
bla_{IMI}	上游 GCGACAATGGTGCTACTA 下游 CTGCGATTACTTTATCCTCA	453	54
bla_{SME}	上游 AGACTTTGATGGGAGGAT 下游 GCATAATCATTCGCAGTA	630	52
bla_{NDM}	上游 GGTTTGGCGATCTGGTTTTC 下游 CGGAATGGCTCATCACGATC	621	55
bla_{IMP}	上游 CTACCGCAGCAGAGTCTTTG 下游 AACCAGTTTTGCCTTACCAT	587	52
bla_{VIM}	上游 TCGCATATCGCAACGCAG 下游 GTGGGCCATTCAGCCAGA	500	58
bla_{OXA-48}	上游 CCGACCCACCAGCCAATCT 下游 AAACGGGCGAACCAAGCA	494	60

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。CRE 菌株产碳青霉烯酶阳性组和阴性组药敏结果差异采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。以 PCR 结果为标准,计算 mCIM 和 eCIM 的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值,置信区间为 95%(95%*CI*),Kappa 值>0.750($P<0.05$),说明一致性程度较好。

2 结果

2.1 临床分离菌株的鉴定及药敏试验

136 株临床分离的肠杆菌科细菌中,碳青霉烯耐药菌株 85 株(肺炎克雷伯菌 49 株、阴沟肠杆菌 16 株、大肠埃希菌 15 株、弗氏柠檬酸杆菌 4 株、产气肠杆菌 1 株),碳青霉烯敏感菌株 51 株(肺炎克雷伯菌 29 株、阴沟肠杆菌 10 株、大肠埃希菌 12 株)。分离菌株主要来源于痰液(65 株)、尿液(44 株)、血液(23 株)、伤口分泌物(3 株)和胸水(1 株)。85 株 CRE 中,MIC 值表现出高水平耐药,其中碳青霉烯酶阳性组厄他培南 MIC_{50} 为 128 μg/mL,亚胺培南和美罗培南 MIC_{50} 为 64 μg/mL。除厄他培南外,碳青霉烯酶阳性菌株较碳青霉烯酶阴性菌株对碳青霉烯类抗生素耐药率差异有统计学意义($P<0.001$,表 2)。

表 2 CRE 菌株碳青霉烯类抗生素 MIC 结果

抗生素	菌株($n=85$)	碳青霉烯酶阳性菌株($n=79$)				碳青霉烯酶阴性菌株($n=6$)				*P* 值
	R(%)	R(%)	MIC_{50}	MIC_{90}	范围	R(%)	MIC_{50}	MIC_{90}	范围	
厄他培南	85(100.0)	79(100.0)	128	512	4~512	6(100.0)	4	64	4~64	-
亚胺培南	81(95.3)	79(100.0)	64	128	4~512	2(33.3)	1	32	0.5~32	<0.001
美罗培南	79(92.9)	77(97.5)	64	128	1~256	2(33.3)	0.5	8	0.5~16	<0.001

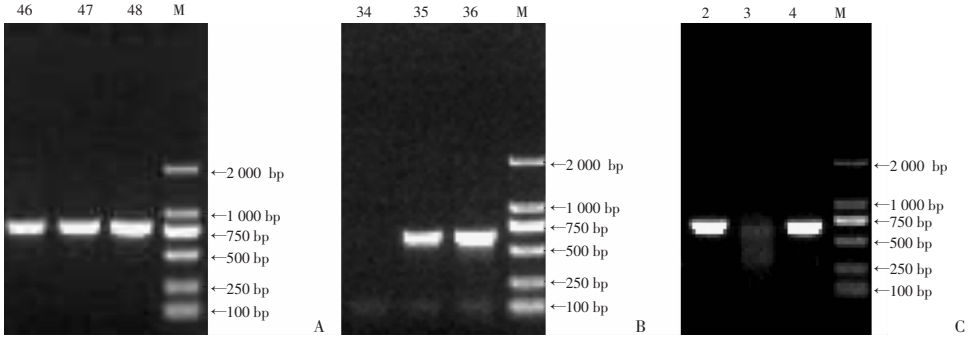
R:根据药敏折点判定为耐药

2.2　耐药基因检测结果

85 株 CRE 中,79 株检出产碳青霉烯酶基因,6 株碳青霉烯酶基因阴性。79 株碳青霉烯酶基因阳性菌株中,8 株同时携带 A 类和 B 类碳青霉烯酶基因,占比 10.13%(8/79)。79 株碳青霉烯酶阳性菌株具体分布为 bla_{KPC-2} 30 株、bla_{NDM-1} 24 株、bla_{NDM-5} 13 株、bla_{IMP-4} 3 株、同时携 bla_{NDM-1} 和 bla_{IMP-8} 1 株、携带 bla_{KPC-2} 和 bla_{NDM-1} 6 株及同时携带 bla_{KPC-2} 和 bla_{IMP-4} 2 株,未检出携带 bla_{IMI}、bla_{SME}、bla_{VIM}、bla_{OXA-48} 耐药基因菌株,结果见表 3。49 株碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌中,59.19%(29/49)携带 bla_{KPC-2},12.25%(6/49)携带 bla_{NDM-1},8.16%(4/49)携带 bla_{NDM-5},8.16%(4/49)携带 bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1},4.08%(2/49)携带 bla_{KPC-2}+bla_{IMP-4},8.16%(4/49)未检出产酶基因。15 株碳青霉烯耐药大肠埃希菌中,60.00%(9/15)携带 bla_{NDM-5},20.00%(3/15)携带 bla_{NDM-1},13.33%(2/15)携带 bla_{IMP-4},6.67%(1/15)未检出产酶基因。16 株碳青霉烯耐药阴沟肠杆菌中,6.25%(1/16)携带 bla_{KPC-2},75.00%(12/16)携带 bla_{NDM-1},6.25%(1/16)携带 bla_{IMP-4},6.25%(1/16)携带 bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1},6.25%(1/16)未检出产酶基因。51 株碳青霉烯敏感肠杆菌科细菌均未检出上述耐药基因。各碳青霉烯酶基因电泳结果见图 1。

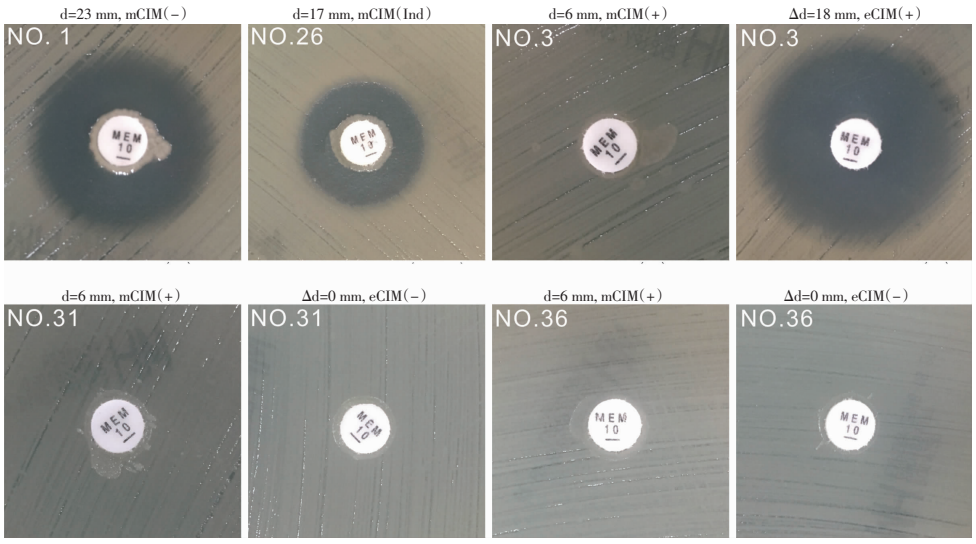
2.3　表型筛选试验

79 株碳青霉烯酶基因阳性的 CRE 中,mCIM 阳性 78 株,结果不确定 1 株。78 株 mCIM 阳性菌株中,eCIM 阳性 44 株。其中 2 株 A 类碳青霉烯酶阳性菌株通过 mCIM/eCIM 被筛选为表达 B 类碳青霉烯酶,值得注意的是 8 株同时携带 A 类和 B 类碳青霉烯酶基因的菌株(6 株携带 bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1},2 株携带 bla_{KPC-2}+bla_{IMP-4})被筛选为表达 A 类碳青霉烯酶 6 株、B 类碳青霉烯酶 2 株(eCIM 阴性 6 株,阳性 2 株)。6 株未检出碳青霉烯酶基因的 CRE 菌株 mCIM 均为阴性。51 株碳青霉烯敏感肠杆菌科细菌 mCIM 结果均为阴性。同时,对不同标本来源菌株进行基因型和表型结果分类,未发现不同标本来源菌株对表型筛选试验结果有影响。结果见图 2 和表 3、4。



A:bla_{KPC} 电泳图;B:bla_{NDM} 电泳图;C:bla_{IMP} 电泳图;M:DNA 标准;2~4、34~36、46~48 为菌株编号

图 1　碳青霉烯酶基因 PCR 产物电泳结果



1 号菌株:碳青霉烯酶基因阴性的大肠埃希菌;26 号菌株:携带 bla_{NDM-1} 基因的阴沟肠杆菌,mCIM 结果不确定(Ind);3 号菌株:携带 bla_{NDM-5} 基因的大肠埃希菌;31 号菌株:携带 bla_{KPC-2} 基因的阴沟肠杆菌;36 号菌株:携带 bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1} 基因的肺炎克雷伯菌

图 2　部分菌株 mCIM 及 eCIM 结果

表 3 85 株 CRE 基因检测及表型筛选结果

Ambler 分类	碳青霉烯酶基因	细菌种类(*n*)	OMPs	MIC/μg·mL^{-1}			mCIM	eCIM
				ETP	IPM	MEM		
A	bla_{KPC-2}	肺炎克雷伯菌(24)	+	128~512	64~256	64~512	+	−
		肺炎克雷伯菌(3)	+	8~16	4~16	4~16	+	−
		肺炎克雷伯菌(2)	+	128~256	32~64	32~64	+	+
		阴沟肠杆菌(1)	+	128	32	16	+	−
B	bla_{NDM-1}	阴沟肠杆菌(11)	+	32~256	16~128	16~128	+	+
		阴沟肠杆菌(1)	+	32	16	16	Ind	N
		肺炎克雷伯菌(6)	+	8~64	8~32	4~8	+	+
		大肠埃希菌(3)	+	16~128	4~256	4~128	+	+
		弗氏柠檬酸杆菌(3)	+	16~128	16~64	8~64	+	+
	bla_{NDM-5}	大肠埃希菌(9)	+	4~256	8~128	1~128	+	+
		肺炎克雷伯菌(4)	+	64~256	32~64	32~64	+	+
	bla_{IMP-4}	大肠埃希菌(2)	+	16~64	8~16	4~16	+	+
		阴沟肠杆菌(1)	+	32	8	8	+	+
	bla_{NDM-1}+ bla_{IMP-8}	弗氏柠檬酸杆菌(1)	+	512	64	128	+	+
A+B	bla_{KPC-2}+ bla_{NDM-1}	肺炎克雷伯菌(4)	+	256~512	32~128	64~128	+	−
		产气肠杆菌(1)	+	256	64	64	+	−
		阴沟肠杆菌(1)	+	128	32	32	+	+
	bla_{KPC-2}+ bla_{IMP-4}	肺炎克雷伯菌(1)	+	32	32	64	+	−
	bla_{KPC-2}+ bla_{IMP-4}	肺炎克雷伯菌(1)	+	256	64	128	+	+
−	Neg	大肠埃希菌(1)	−	64	32	8	−	N
	Neg	阴沟肠杆菌(1)	−	4	2	2	−	N
	Neg	肺炎克雷伯菌(4)	−	4~64	0.5~32	0.5~16	−	N

Neg:碳青霉烯酶基因阴性; OMPs: 大肠埃希菌膜孔通道蛋白为 OmpF 和 OmpC, 阴沟肠杆菌膜孔通道蛋白为 Omp35 和 Omp 36, 肺炎克雷伯菌膜孔通道蛋白为 OmpK35 和 OmpK36; ETP: 厄他培南; IPM: 亚胺培南; MEM: 美罗培南; Ind: 结果不确定; N: 结果不解释

表 4 136 株肠杆菌科细菌标本来源与碳青霉烯酶基因型和表型的关系

菌株来源(*n*)	PCR 方法基因分类(*n*=136)					mCIM/eCIM 联合检测(*n*=136)			
	CRE(*n*=85)				非 CRE(*n*=51)	CRE(*n*=85)			非 CRE(*n*=51)
	A	B	A+B	−		产 A 类酶	产 B 类酶	不产碳青霉烯酶	
痰液(65)	19	15	0	4	27	17	17	4	27
尿液(44)	5	15	6	2	16	9	17	2	16
血液(23)	5	9	1	0	8	6	8	1[a]	8
伤口分泌物(3)	1	1	1	0	0	2	1	0	0
胸水(1)	0	1	0	0	0	0	1	0	0

−: 为碳青霉烯酶基因阴性; a: mCIM 结果不确定

2.4 mCIM 结果分析

对 136 株肠杆菌科细菌 mCIM 结果进行分析,mCIM 灵敏度为 98.7%,特异性为 100.0%,阳性预测值 100.0%,阴性预测值 98.3%,Kappa 值为 0.985(P<0.05,表 5),提示与基因检测结果一致性高。

2.5 eCIM 结果分析

eCIM 检测金属碳青霉烯酶灵敏度 85.7%,特异性 94.4%,阳性预测值 95.5%,阴性预测值 82.9%;检测丝氨酸碳青霉烯酶灵敏度 89.5%,特异性 100.0%,阳性预测值 100.0%,阴性预测值 92.2%。Kappa 值均大于 0.750(P<0.05,表 6),与基因检测结果一致性较好。

表 5 mCIM 结果与 PCR 结果对比分析

表型试验	结果	PCR		灵敏度 [%(95%CI)]	特异性 [%(95%CI)]	阳性预测值 [%(95%CI)]	阴性预测值 [%(95%CI)]	Kappa 值
		+	−					
mCIM	+	78	0	98.7(92.2~99.9)	100.0(92.1~100.0)	100.0(94.2~100.0)	98.3(89.5~99.9)	0.985
	−	1[a]	57					

a:包含 mCIM 表型试验结果不确定菌株

表 6 eCIM 结果与 PCR 结果对比分析

表型试验	碳青霉烯酶	结果	PCR		灵敏度 [%(95%CI)]	特异性 [%(95%CI)]	阳性预测值 [%(95%CI)]	阴性预测值 [%(95%CI)]	Kappa 值
			+	−					
mCIM/eCIM	金属酶	+	42	2	85.7(72.1~93.6)	94.4(80.0~99.0)	95.5(83.3~99.2)	82.9(67.4~92.3)	0.787
		−	7[a]	34					
	丝氨酸酶	+	34	0	89.5(74.3~96.6)	100.0(90.6~100.0)	100.0(87.4~100.0)	92.2(80.2~97.5)	0.904
		−	4	47[a]					

a:包含 mCIM 表型试验结果不确定菌株

3 讨论

本研究 136 株多中心收集的肠杆菌科细菌包含 5 种常见肠杆菌科细菌,分离自 5 种不同标本类型,含 CRE 85 株,非 CRE 51 株。79 株 CP-CRE 对厄他培南、亚胺培南和美罗培南 3 种碳青霉烯抗生素 MIC_{50} 分别为 128、64、64 μg/mL,较 JIA 等[8]报道的高,呈现高水平耐药;同时碳青霉烯酶介导的 CRE 菌株较非碳青霉烯酶介导的 CRE 菌株对碳青霉烯类抗生素耐药率高,差异有统计学意义。在 79 株碳青霉烯酶介导的 CRE 菌株中,分离到 8 株菌(10.13%)同时携带 A 类和 B 类碳青霉烯酶基因,较马玉兰等[9]报道的 3.10% 高。6 株非碳青霉烯酶介导的 CRE 膜孔蛋白基因均缺失,推测其耐药机制为膜孔蛋白缺失伴超广谱 β 内酰胺酶(extended spectrum beta-lactamases, ESBLs)或 AmpC 头孢菌素酶(AmpC)表达,从而导致对碳青霉烯类抗生素耐药。同时也有报道患者感染 CP-CRE 可能比非 CP-CRE 结局更差[1]。因此,碳青霉烯酶的检测和分型显得尤为重要。

碳青霉烯酶常见的表型筛选方法有碳青霉烯灭活试验(carbapenem inactivation method, CIM)、改良 Hodge 试验、Carba NP 试验等,但存在灵敏度低、试剂成本高等缺点[10]。而采用 mCIM 和 eCIM 对碳青霉烯酶进行筛选,操作简便且结果较理想。本研究中,mCIM 检测灵敏度为 98.7%、特异性为 100%,与基因检测结果一致性高,与 TAMMA 等[11]报道相似。eCIM 筛选金属酶的灵敏度为 85.7%,特异性为 94.4%,灵敏度较 CLSI-2018 的评价低,主要与本研究中有 8 株同时携带 A 类和 B 类碳青霉烯酶基因菌株相关。8 株同时携带 A 类和 B 类碳青霉烯酶基因菌株中,有 2 株经 eCIM 筛选判定为检测到金属酶,有 6 株经 eCIM 筛选判定为检测到丝氨酸酶。6 株经 eCIM 筛选判定为检测到丝氨酸酶可能的原因是虽然 EDTA 抑制了 B 类碳青霉烯酶,但其同时携带有 A 类丝氨酸酶,同样可以水解美罗培南药敏纸片造成 Δd≤4 mm 至结果判定为金属酶阴性,而报告检测到丝氨酸酶。即本研究发现随着共表达 A 类和 B 类碳青霉烯酶基因菌株分离率的增加,eCIM 筛选金属酶的灵敏度会降低。而另外 2 株共表达 A 类和 B 类碳青霉烯酶基因菌株经 eCIM 筛选判定为金属酶阳性可能的原因为 EDTA 对丝氨酸酶也产生了抑制作用。本研究 eCIM 试验筛选丝氨酸酶的灵敏度为 89.5%,特异性为 100.0%,灵敏度较马玉兰等[9]报道的低,主要由 2 株同时携带 A 类和 B 类碳青霉烯酶菌株及 2 株单产 bla_{KPC-2} 菌株经 eCIM 筛选判定为金属酶阳性引起。推测主要原因同样与 EDTA 对丝氨酸酶产生了抑制作用相关,导致被抑制的丝氨酸酶无法完全水解美罗培南药敏纸片造成 Δd≥5 mm 而报告金属酶阳性。同时已有报道 EDTA 对部分丝氨酸碳青霉烯酶存在抑制现象[12],从而导致出现上述结果。因此,当临床分离到高 MIC 值 CRE 菌株时,应警惕共表达 A 类和 B 类碳青霉烯酶菌株存在,导致 mCIM 联合 eCIM 方法筛选金属酶的能力降低。

虽然 CLSI 尚不要求对 CRE 菌株进行 mCIM 和 eCIM 常规检测,但随着 CP-CRE 在全球范围的流行,A 类和 B 类碳青霉烯酶抑制剂新药的开发和应用,临床医师迫切需要筛查出产碳青霉烯酶菌株,并对碳青霉烯酶类型进行区分。因此联合 mCIM 和 eCIM 对 CRE 进行碳青霉烯酶表型筛选和类别区分对 CRE 感染的治疗意义会越来越受到重视。但另一方面,因抗生素的不合理使用及耐药基因的水平传播,CRE 检出率及

共表达 A 类和 B 类碳青霉烯酶的 CRE 菌株分离率逐年增加,会造成 eCIM 对金属酶筛选的灵敏度降低,而错误指导碳青霉烯酶抑制剂药物种类的选择,应引起微生物工作者和临床医生的警惕。

参考文献:

[1] TAMMA P D, GOODMAN KE, HARRIS AD, *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. DOI:10.1093/cid/ciw741.

[2] QUEENAN A M, BUSH K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458. DOI: 10.1128/CMR.00001-07.

[3] LUTGRING J D, LIMBAGO B M. The problem of carbapenemase-producing carbapenem-resistant-enterobacteriaceae detection[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(3): 529-534. DOI: 10.1128/JCM.02771-15.

[4] BONOMO R A, BURD E M, Conly J, *et al*. Carbapenemase-producing organisms: A global scourge[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(8): 1290-1297.

[5] TAMMA P D, SIMNER P J. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(11):e01140-18. DOI: 10.1128/JCM.01140-18.

[6] PIERCE V M, SIMNER P J, Lonsway D R, *et al*. The modified carbapenem inactivation method (mCIM) for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2321-2333. DOI: 10.1128/JCM.00193-17.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing,28th ed. CLSI supplement M100-S28[S]. Wayne PA: CLSI, 2018:112-122.

[8] JIA X, DAI W, MA W, *et al*. Carbapenem-resistant E. cloacae in southwest china: molecular analysis of resistance and risk factors for infections caused by NDM-1-producers[J]. Front Microbiol,2018, 9: 2694.

[9] 马玉兰,宋文杰,李继红,等. mCIM 与 eCIM 筛选肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的效果评价[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 650-654.
MA Y L, SONG W J, LI J H, *et al*. Evaluation for effectiveness:mCIM and eCIM for screening carbapenemase in *Enterobacteriaceae*[J]. Chin J Clin Lab Sci, 2018, 36(9): 650-654.

[10] 张保荣,毕茹茹,顾兵. 肠杆菌科细菌碳青霉烯酶表型检测方法研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(2): 175-180.
ZHANG B R, BI R R, GU B. Advances in phenotypic detection methods for carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*[J]. Chin J Infec Contl, 2018, 17(2): 175-180.

[11] TAMMA P D, OPENE B N, GLUCK A, *et al*. Comparison of eleven phenotypic assays for the accurate detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(4): 1046-1055. DOI: 10.1128/JCM.02338-16.

[12] GISKE C G, GEZELIUS L, SAMUELSEN Ø, *et al*. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-β-lactamases and KPC in Klebsiella pneumoniae with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(4): 552-556. DOI:10.1111/j.1469-0691.2010.03294.x.

(**收稿**:2019-09-12;**修回**:2020-01-02)

(编辑 邓强庭)