

· 专家论坛 ·

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

喻 华¹, 徐雪松², 李 敏³, 杨启文⁴, 杨 青⁵, 张 嵘⁶, 褚云卓⁷, 单 斌⁸, 郭大文⁹,
胡志东¹⁰, 简 翠¹¹, 李 轶¹², 廖 康¹³, 刘根焰¹⁴, 季 萍¹⁵, 金 炎¹⁶, 倪语星¹⁷, 沈 瀚¹⁸,
苏丹虹¹⁹, 卓 超¹⁹, 王 辉²⁰, 魏莲花²¹, 俞云松²², 张 泓²³, 张利侠²⁴, 周铁丽²⁵, 朱 镭²⁶,
王明贵²⁷, 朱德妹²⁷, 胡付品²⁷

关键词: 肠杆菌目细菌; 碳青霉烯酶; Carba NP; 碳青霉烯灭活试验; 碳青霉烯酶抑制剂增强试验; 酶免疫层析技术; 分子检测技术

中图分类号: R378.2 **文献标识码:** C **文章编号:** 1009-7708(2020)06-0671-10

DOI: 10.16718/j.1009-7708.2020.06.015

Consensus statement on laboratory detection and clinical report of carbapenemases among *Enterobacterales*

YU Hua, XU Xuesong, LI Min, YANG Qiwen, YANG Qing, ZHANG Rong, CHU Yunzhuo, SHAN Bin, GUO Dawen, HU Zhidong, JIAN Cui, LI Yi, LIAO Kang, LIU Genyan, JI Ping, JIN Yan, NI Yuxing, SHEN Han, SU Danhong, ZHUO Chao, WANG Hui, WEI Lianhua, YU Yunsong, ZHANG Hong, ZHANG Lixia, ZHOU Tieli, ZHU Lei, WANG Minggui, ZHU Demei, HU Fupin (Center of Laboratory Medicine, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

当前, 细菌耐药已成为全球公共健康领域的重大挑战, 其中尤以碳青霉烯类耐药肠杆菌目细

菌 (carbapenem-resistant *Enterobacterales*, CRE) 引起的感染形势最为严峻。碳青霉烯类抗菌药物

作者单位: 1. 四川省医学科学院 四川省人民医院临床医学检验中心, 成都 610072;

2. 吉林大学中日联谊医院;

3. 上海交通大学医学院附属仁济医院;

4. 北京协和医院;

5. 浙江大学医学院附属第一医院;

6. 浙江大学医学院附属第二医院;

7. 中国医科大学第一附属医院;

8. 昆明医科大学附属第一医院;

9. 哈尔滨医科大学附属第一医院;

10. 天津医科大学总医院;

11. 华中科技大学同济医学院附属同济医院;

12. 河南省人民医院;

13. 中山大学附属第一医院;

14. 江苏省人民医院;

15. 新疆医科大学附属第一医院;

16. 山东省立医院;

17. 上海交通大学医学院附属瑞金医院;

18. 南京大学医学院附属鼓楼医院;

19. 广州医科大学附属第一医院;

20. 北京大学人民医院;

21. 甘肃省人民医院;

22. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院;

23. 上海市儿童医院;

24. 陕西省人民医院;

25. 温州医科大学附属第一医院;

26. 山西省儿童医院;

27. 复旦大学附属华山医院。

第一作者简介: 喻华 (1967—), 女, 大学本科, 主任技师, 主要从事临床微生物检验和细菌耐药监测研究。

通信作者: 胡付品, E-mail: hufupin@fudan.edu.cn。

包括亚胺培南、美罗培南和厄他培南等,是治疗多重耐药革兰阴性杆菌所致感染最有效的抗菌药物之一。随着该类药物在临床的广泛应用,肠杆菌目细菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率呈逐年快速上升趋势。CHINET中国细菌耐药监测网历年监测结果显示^[1-2],我国临床分离肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率从2005年的3%快速攀升至2019年的25%以上,上升幅度高达8倍。2018年全国细菌耐药监测网(CARSS)数据显示,全国1429所医院临床分离的肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物的平均耐药率为10.1%,部分省市甚至超过20%^[3]。由于CRE菌株通常还携带有对其他抗菌药物耐药的基因,对抗菌药物呈广泛耐药甚至全耐药的特征,使临床的抗感染治疗面临无药可用的困境^[4]。

1 CRE的定义

美国疾病预防控制中心关于CRE的定义^[5]为满足以下任意一个条件:①对亚胺培南、美罗培南、厄他培南或多利培南任何一种碳青霉烯类耐药者;对于天然对亚胺培南敏感性降低的细菌(如摩根菌属、变形杆菌属和普罗威登菌属等),需参考除亚胺培南外的其他碳青霉烯类抗菌药物的药敏结果。②产生碳青霉烯酶。

2 CRE的耐药机制

产生碳青霉烯酶是肠杆菌目细菌对碳青霉烯类药物耐药最主要的机制^[6]。按照Ambler分子分类方法,碳青霉烯酶可分为A、B和D三类。A类为丝氨酸碳青霉烯酶,以 bla_{KPC} (bla_{KPC-2} - bla_{KPC-55})、 bla_{SME} (bla_{SME-1} - bla_{SME-5})、 bla_{IMI} (bla_{IMI-1} - bla_{IMI-18})、 bla_{NMC} 和 bla_{GES} (bla_{GES-1} - bla_{GES-43})型为主;B类为金属 β 内酰胺酶,以 bla_{NDM} (bla_{NDM-1} - bla_{NDM-29})、 bla_{IMP} (bla_{IMP-1} - bla_{IMP-85})、 bla_{VIM} (bla_{VIM-1} - bla_{VIM-69})、 bla_{GIM} (bla_{GIM-1} - bla_{GIM-2})和 bla_{SPM} 型为主;D类为OXA-48型丝氨酸碳青霉烯酶,以 $bla_{OXA-181}$ 和 $bla_{OXA-232}$ 为主。除产生碳青霉烯酶外,少数菌株对碳青霉烯类药物耐药的机制是产生超广谱 β 内酰胺酶和/或AmpC酶合并外膜孔蛋白表达下调或缺失。

3 碳青霉烯酶分布特征

不同国家、不同地区、不同医院、不同人群以及不同细菌所产的碳青霉烯酶种类均有差

异^[7-9]。我国临床分离的CRE菌株产生的碳青霉烯酶以KPC和NDM型为主,少数菌株产生OXA-48、IMP和VIM型碳青霉烯酶^[10-12]。KPC-2型酶为KPC型碳青霉烯酶最主要的亚型,NDM-1和NDM-5是NDM型金属酶中最主要的亚型,而OXA-181和OXA-232型酶是OXA-48型碳青霉烯酶中最主要的亚型。CHINET中国细菌耐药监测网对2018年收集自全国39所医院935株CRE菌株的研究结果显示,产KPC、NDM和OXA-48型碳青霉烯酶菌株所占比例分别为51.6%(482/935)、35.7%(334/935)和7.3%(68/935),其中少数菌株产碳青霉烯酶复合酶。儿童和成人患者中分离的碳青霉烯类耐药菌株产生的碳青霉烯酶型别有所差异,儿童患者分离的碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌主要产生KPC、NDM和OXA-48型碳青霉烯酶,而成人患者分离株主要产KPC型碳青霉烯酶;但儿童和成人患者分离的碳青霉烯类耐药大肠埃希菌主要产生NDM型金属 β 内酰胺酶。

4 碳青霉烯酶检测的临床意义

由于不同种类的抗菌药物对产生不同碳青霉烯酶菌株的体外抗菌活性不同,准确、快速地对CRE产生的碳青霉烯酶进行检测并分型,对于临床抗感染治疗的精准用药和医院感染预防控制具有重要的价值^[13-15]。如目前刚上市的抗菌新药头孢他啶-阿维巴坦^[16-17],对产KPC和OXA-48型丝氨酸碳青霉烯酶菌株具有高度抗菌活性,但对产金属 β 内酰胺酶菌株无抗菌活性。目前处于临床研究阶段的美罗培南-韦博巴坦(meropenem-vaborbactam)^[18-19]和亚胺培南-雷利巴坦(imipenem-relebactam)^[20],对产KPC型碳青霉烯酶菌株具有高度抗菌活性,但对产金属 β 内酰胺酶和D类OXA-48型碳青霉烯酶菌株无抗菌活性。同时,尚有多种新型碳青霉烯酶抑制剂正处于临床研究阶段,包括enmetazobactam^[21]、taniborbactam^[22-24]和齐达巴坦(zidebactam)^[25-27]等。同时,实验室亦可根据不同碳青霉烯酶的特征,如金属 β 内酰胺酶不能水解氨曲南,KPC型碳青霉烯酶的活性可被阿维巴坦、韦博巴坦或雷利巴坦抑制,被克拉维酸弱抑制,通过开展联合药敏试验制定精准的抗感染治疗方案^[28-29]。目前已上市及处于临床研究阶段的不同碳青霉烯酶抑制剂的抑酶活性见表1(表1内容参考文献[30-31])。

表 1 不同酶抑制剂抑酶活性

酶抑制剂种类	化学结构分类	抑酶效果是否可逆	抑制的 β 内酰胺酶种类							
			青霉素酶和广谱酶	ESBL	A 类			B 类	C 类	D 类
					丝氨酸碳青霉烯酶			金属酶	头孢菌素酶	OXA-48
					KPC	NMC-A	SME			
克拉维酸 他唑巴坦 舒巴坦	有 β 内酰胺环结构	否	√	√	×	×	×	×	×	×
阿维巴坦	三乙烯二胺类	是	√	√	√	√	√	×	√	√
韦博巴坦	硼酸复合物	是	√	√	√	√	√	×	√	×
雷利巴坦	三乙烯二胺类	是	√	√	√	√	√	×	√	×
Enmetazobactam	青霉素类	否	√	√	×	×	×	×	×	×
Taniborbactam	双环硼酸酯	是	√	√	√	√	√	√	√	√
齐达巴坦	二氮杂环辛烷	是	√	√	√	√	√	√	√	√

√: 有活性; ×: 无活性。

5 碳青霉烯酶实验室检测

目前实验室检测碳青霉烯酶的方法分为表型检测和基因型检测。表型检测方法包括Carba NP试验、改良碳青霉烯灭活试验（包括mCIM和eCIM）、碳青霉烯酶抑制剂增强试验和时间飞行质谱技术等；基因型检测方法包括酶免疫层析技术和基因检测技术。执行上述碳青霉烯酶检测方法时，均需按要求选择相应的阳性质控菌株和阴性质控菌株进行质控，以确保检测方法的可靠性。下文简单介绍目前临床微生物实验室较为常用的碳青霉烯酶检测方法的原理、结果判读、检测性能以及优缺点等，以供不同层次的实验室根据实际情况选择合适的检测方法。不同碳青霉烯酶实验室检测方法比较见表2。

5.1 Carba NP试验

美国临床和实验室标准化协会（CLSI）于2015年推荐Carba NP试验检测肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌产生的碳青霉烯酶^[32]。Carba NP试验具体操作步骤可参考最新版CLSI M100文件要求。该试验原理为细菌产生的碳青霉烯酶可以水解亚胺培南，导致溶液pH值改变而发生颜色变化。研究显示，Carba NP试验检测碳青霉烯酶（包括产KPC、NDM、VIM、IMP、SPM或和SME型碳青霉烯酶菌株）的灵敏度和特异度均超过90%^[33]。Carba NP试验具有操作简单和快速的特点（4~6 h），适合所有临床微生物实验室开展。缺点是需特殊试剂，其中一些需自制（有效期短）；一些分离株会出现无效结果；可能无法检测某些类型碳青霉

烯酶（如染色体介导OXA型碳青霉烯酶）。

5.2 改良碳青霉烯灭活试验

CLSI推荐改良碳青霉烯灭活试验（mCIM）和EDTA改良碳青霉烯灭活试验（eCIM）用于肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌中碳青霉烯酶的检测^[32]。mCIM和eCIM试验具体操作步骤可参考最新版CLSI M100文件要求。其原理是将美罗培南与受试菌悬液混合，若受试菌产生碳青霉烯酶，可破坏美罗培南的抗菌活性；若受试菌不产碳青霉烯酶，美罗培南仍可保持其对大肠埃希菌ATCC 25922的抗菌活性。根据金属 β 内酰胺酶的活性可被EDTA抑制的特点，mCIM和eCIM联合可区分细菌产生的丝氨酸碳青霉烯酶或金属 β 内酰胺酶。mCIM试验可用于检测肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌中的碳青霉烯酶，而mCIM联合eCIM仅适用于肠杆菌目细菌以区分其产生的碳青霉烯酶类型（丝氨酸碳青霉烯酶或金属 β 内酰胺酶）。研究显示，mCIM试验检测肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌中碳青霉烯酶的灵敏度和特异度均超过97%，特异度为100%^[34-36]。mCIM试验检测不动杆菌属实验室间的特异度和重复性均较差，方法未获得CLSI认可。eCIM试验区分肠杆菌目细菌中金属 β 内酰胺酶和丝氨酸碳青霉烯酶的灵敏度>95%、特异度>92%。mCIM和eCIM试验具有操作简单、无需特殊试剂和成本低的特点，适合所有临床微生物实验室开展。缺点是需过夜孵育，耗时长。

5.3 碳青霉烯酶抑制剂增强试验

5.3.1 A类丝氨酸碳青霉烯酶和B类金属 β 内酰胺酶的检测

根据A类丝氨酸碳青霉烯酶的活性可被

表 2 不同碳青霉烯酶检测方法原理、适用标本、检测时间、结果报告及其优缺点

方法	原理	标本	时间	结果报告	优点	缺点	常规检测推荐级别
表型检测方法							
Carba NP	碳青霉烯酶可水解亚胺培南	碳青霉烯类不敏感的肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌	4~6 h	阳性: 碳青霉烯酶阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	快速	需特殊试剂, 其中一些需自制 (有效期短); 一些分离株会出现无效结果; 可能无法检测某些类型碳青霉烯酶 (如染色体介导 OXA 型)	推荐 (低)
mCIM 和 eCIM	碳青霉烯酶可水解美罗培南, 以及 EDTA 可抑制金属 β 内酰胺酶活性	碳青霉烯类不敏感的肠杆菌目细菌和铜绿假单胞菌	18~20 h	阳性: 丝氨酸碳青霉烯酶或金属 β 内酰胺酶阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	需特殊试剂或培养基	需过夜培养, 如果一株细菌同时产生丝氨酸型碳青霉烯酶和金属 β 内酰胺酶, 由于两种酶特征不同将导致 eCIM 试验结果出现假阴性	推荐 (高)
碳青霉烯酶抑制剂增强试验	3-氨基苯硼酸和 EDTA 可分别抑制 A 类丝氨酸碳青霉烯酶和 B 类金属 β 内酰胺酶的活性	碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌	18~20 h	阳性: A 类丝氨酸碳青霉烯酶、金属 β 内酰胺酶阳性或 A 类丝氨酸碳青霉烯酶和金属 β 内酰胺酶均阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	需特殊试剂	需过夜培养	推荐 (高)
基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱	检测耐药菌株的蛋白特征峰, 或分析碳青霉烯类药物化学结构的完整性	碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌	20 min	阳性: 碳青霉烯酶阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	快速	需自配抗菌药物溶液	不推荐**
基因型检测方法							
酶免疫层析 (金标法)* 技术	抗原抗体结合技术	碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌	15 min	阳性: 报告检测到的碳青霉烯酶基因, 如 KPC 型碳青霉烯酶阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	快速, 除明确是否存在碳青霉烯酶外, 还能明确碳青霉烯酶基因型	需要特殊的试剂, 检测特异性靶基因; 若待测基因与目标基因不同, 呈假阴性结果	推荐 (中)
Filmarray® 血流感染或肺炎检测试剂盒	荧光定量 PCR	呼吸道标本或阳性血培养标本	1 h	阳性: 报告检测到的碳青霉烯酶基因, 如 KPC 型碳青霉烯酶阳性、NDM 型碳青霉烯酶阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	快速, 除明确是否存在碳青霉烯酶外, 还能明确碳青霉烯酶基因型	需要特殊的试剂和设备, 只能检测 KPC 酶基因	不推荐**
Verigene® 革兰阴性菌血培养鉴定试剂盒	荧光定量 PCR	碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌或阳性血培养标本	1 h	阳性: 报告检测到的碳青霉烯酶基因, 如 KPC 型碳青霉烯酶阳性、NDM 型碳青霉烯酶阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	快速, 除明确是否存在碳青霉烯酶外, 还能明确碳青霉烯酶基因型	需要特殊的试剂和设备, 检测特异性靶基因; 若待测基因与目标基因不同, 呈假阴性结果	不推荐**
GeneXpert® Carba-R	荧光定量 PCR	碳青霉烯类耐药肠杆菌目细菌或肛拭子标本	1 h	阳性: 报告检测到的碳青霉烯酶基因, 如 KPC 型碳青霉烯酶阳性、NDM 型碳青霉烯酶阳性 阴性: 碳青霉烯酶阴性	快速, 除明确是否存在碳青霉烯酶外, 还能明确碳青霉烯酶基因型	需要特殊的试剂和设备, 检测特异性靶基因; 若待测基因与目标基因不同, 呈假阴性结果	推荐 (中)

* 使用前应详细阅读产品说明书, 以了解试剂可检测碳青霉烯酶基因种类及适用样本; ** 该产品当前无注册证或当前仅限于科研。

3-氨基苯硼酸 (APB) 抑制^[37], 而金属 β 内酰胺酶的活性可被EDTA抑制的特点^[38-41], APB联合EDTA可对单产A类丝氨酸碳青霉烯酶、单产B类金属 β 内酰胺酶以及同时产生A类丝氨酸碳青霉烯酶和B类金属 β 内酰胺酶的肠杆菌目细菌进行检测并区分^[42], 具体实验操作步骤见附件1。研究显示, 碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测单产KPC或金属酶菌株的灵敏度均为100%, 检测同时产KPC和金属酶菌株的灵敏度为96.8%, 特异度为98.8%^[42]。本方法具有操作简单、结果容易阅读以及可检测单产或同时产不同类型碳青霉烯酶的特点, 适合所有临床微生物实验室开展, 但缺点是需特殊试剂、耗时长以及不能检测OXA-48型碳青霉烯酶。

5.3.2 D类OXA-48型碳青霉烯酶的检测 相比于A类丝氨酸碳青霉烯酶和B类金属 β 内酰胺酶, 目前可用于检测并区分OXA-48型碳青霉烯酶的检测方法极少。Tsakris等^[43]利用APB和EDTA对不同种类碳青霉烯酶的抑制特点, 报道了一种可简单检测并区分OXA-48型碳青霉烯酶的检测方法, 具体实验操作步骤见附件2。该方法检测并区分OXA-48型碳青霉烯酶的灵敏度和特异度分别为96.3%和97.7%, 具有操作简单且结果容易阅读的特点, 适合所有临床微生物实验室开展, 但缺点是需特殊试剂、耗时长。

5.4 质谱技术

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 是近年来发展的简便、快速、准确的病原微生物鉴定方法。质谱技术通过比较不同细菌间质谱峰强度差异, 可快速对碳青霉烯类耐药细菌进行检测; 或者基于碳青霉烯酶水解碳青霉烯类而使药物的特异峰发生改变的特点进行检测^[44-48]。质谱技术虽然可快速检测碳青霉烯酶的种类, 但缺点是目前仅对某种碳青霉烯酶有为数不多的研究且无统一可行的方法, 而酶水解法需要配制抗菌药物溶液作为底物与待测菌进行共孵育 (孵育时间约1~2.5 h), 操作较繁琐, 不适于在临床微生物实验室常规开展。

5.5 酶免疫层析技术

利用抗原抗体免疫层析技术快速检测肠杆菌目细菌中的碳青霉烯酶, 是近年发展起来的目前为止以细菌菌落为基础的检测方法中最快速的检测技术^[49-50]。该方法操作简单 (不同产品实验操作步骤需参考产品说明书), 加样后测试条上相应区域标记线条出现红色 (除对照线条外), 提示该

菌产生所对应的碳青霉烯酶。目前该测试条最多可同时快速检测KPC、NDM、OXA-48、VIM和IMP五种碳青霉烯酶。与测序方法相比, 酶免疫层析技术检测碳青霉烯酶基因的灵敏度和特异度均在90%以上。酶免疫层析技术具有操作简单, 结果容易判读的优点, 但缺点是价格较高, 各实验室可根据自身条件选择性地开展碳青霉烯酶的检测, 譬如对于高危患者 (免疫抑制患者或骨髓移植患者等) 分离CRE菌株碳青霉烯酶基因的快速检测, 以协助临床尽早启动有针对性的抗感染治疗方案。

5.6 碳青霉烯酶分子检测技术

分子检测技术可直接快速检测临床标本如直肠拭子中CRE菌株中的碳青霉烯酶基因。如GeneXpert^[51-52]、Verigene^[53]和Filmarray^[54]等系统采用荧光定量PCR技术对主要的碳青霉烯酶基因包括KPC、NDM、IMP、VIM和OXA-48等进行检测, 检测时间一般在1 h左右, 检测灵敏度和特异度可达96%以上。分子检测技术具有快速 (可直接从标本中检测) 和结果容易判读的优点, 但缺点是价格昂贵, 各实验室可根据自身条件有选择性地开展碳青霉烯酶的检测。比如对于高危患者 (免疫抑制患者或骨髓移植患者等) 分离CRE菌株碳青霉烯酶基因的快速检测, 可协助临床尽早启动有针对性的抗感染治疗方案。

6 碳青霉烯酶的实验室检测流程、结果报告及结果解释

6.1 实验室碳青霉烯酶检测流程图

实验室碳青霉烯酶检测流程图见图1。

6.2 报告模式

如以细菌为样本进行检测, 建议与细菌鉴定及药敏试验结果同时报告。除按要求提供一般细菌鉴定和药敏试验报告规定的信息外, 碳青霉烯酶检测报告信息包括①检测方法: 表型或基因型检测方法。②检测结果报告及解释: 采用mCIM和eCIM方法需同时报告“阳性”或“阴性”检测结果并判断该菌所产碳青霉烯酶种类或基因型; 采用碳青霉烯酶抑制剂增强试验可直接报告最终检测结果, 或同时报告纸片抑菌圈直径并判断该菌所产碳青霉烯酶种类; 采用免疫层析或分子检测技术, 直接报告检测到的碳青霉烯酶基因型。③碳青霉烯酶表型或基因型检测结果解释等。参考表3。

如以临床标本或细菌 (少数情况可能在药敏试验前即以菌株直接检测以早期指导临床抗感

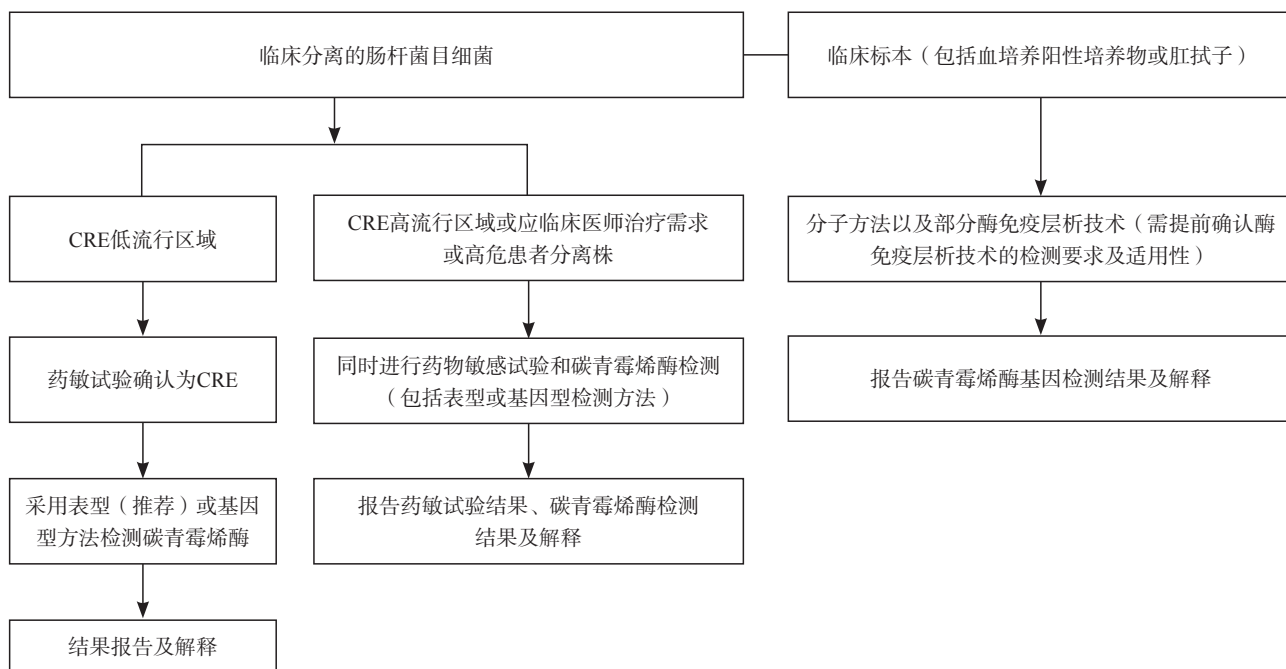


图1 实验室碳青霉烯酶检测流程图

表3 碳青霉烯酶检测结果报告

检测方法	结果报告	结果解释
表型检测	A类丝氨酸碳青霉烯酶阳性	以KPC型碳青霉烯酶为主，该酶活性可被阿维巴坦抑制；产酶菌株通常仅对替加环素、多黏菌素或头孢他啶-阿维巴坦敏感
	B类金属β内酰胺酶阳性	以NDM型金属酶为主，该酶活性不能被阿维巴坦抑制；产酶菌株通常仅对替加环素和多黏菌素敏感，少数菌株对氨曲南敏感
	D类丝氨酸碳青霉烯酶阳性	以OXA-48型碳青霉烯酶为主（包括OXA-181和OXA-232），常见于儿童患者分离的肺炎克雷伯菌，该酶活性可被阿维巴坦抑制。产酶菌株通常仅对替加环素、多黏菌素或头孢他啶-阿维巴坦敏感
基因型检测	KPC、SME、IMI、NMC、GES	A类碳青霉烯酶，其活性可被阿维巴坦抑制，产酶菌株通常仅对替加环素、黏菌素、头孢他啶-阿维巴坦敏感
	NDM、IMP、VIM、GIM、SPM	B类金属β内酰胺酶，其活性不能被阿维巴坦抑制，产酶菌株通常仅对替加环素和多黏菌素敏感，少数菌株对氨曲南敏感
	OXA-48	D类碳青霉烯酶，其活性可被阿维巴坦抑制，产酶菌株通常仅对替加环素、多黏菌素或头孢他啶-阿维巴坦敏感

染治疗）直接检测碳青霉烯酶基因，可以单独报告检测结果，报告信息包括①患者姓名、年龄、性别、科室、标本类型；②临床诊断；③检测目的，评估治疗效果、去定植或基于感染控制目的；④基因型检测方法、结果解释。参考表3。

7 质控要求

7.1 质控频率要求

每天或每次试验时应测试阳性或阴性质控菌株。

7.2 质控菌株选择

按照不同检测方法可检测的碳青霉烯酶型

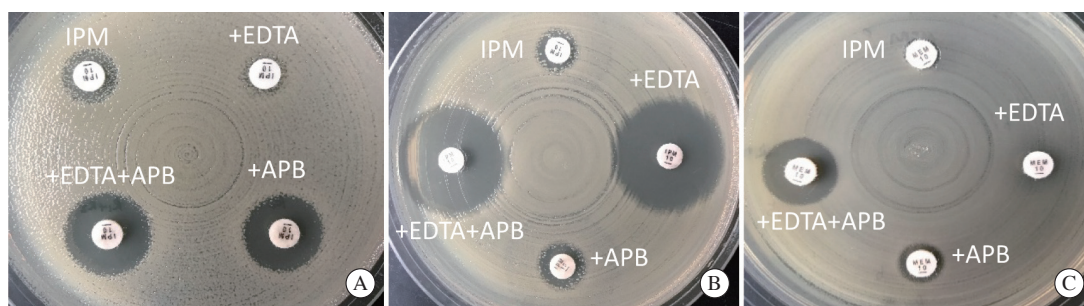
别或靶基因种类，选择相应的阳性和阴性质控菌株。阳性质控菌株首选肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1705（KPC型碳青霉烯酶阳性株）、肺炎克雷伯菌ATCC BAA-2146（NDM型金属β内酰胺酶阳性株）、肺炎克雷伯菌ATCC BAA 2524（OXA-48型碳青霉烯酶阳性株）；阴性质控菌株首选肺炎克雷伯菌ATCC BAA-1706（非产碳青霉烯酶株）。如实验室无法获得上述首选ATCC阳性或阴性质控菌株，亦可选择经DNA测序明确产相应型别碳青霉烯酶基因的菌株作为阳性质控菌，以及选择大肠埃希菌ATCC 25922作为阴性质控菌株。

附件1

A类丝氨酸碳青霉烯酶和B类金属 β 内酰胺酶的检测

实验步骤按CLSI推荐的纸片扩散法进行：将待测菌调制成0.5麦氏浊度菌悬液，均匀涂布于MH琼脂平板上，随后贴4张碳青霉烯类抗菌药物纸片（一般为亚胺培南或美罗培南）于琼脂表面。一张纸片不加任何液体，一张纸片滴加APB溶液（终浓度300 $\mu\text{g}/\text{片}$ ，初始浓度为30 mg/L 的溶液可滴加10 μL ）、一张纸片EDTA溶液（终浓度292 $\mu\text{g}/\text{片}$ ，初始浓度0.1 mol/L 的溶液可滴加10 μL ）、最后一张同时滴加APB溶液（终浓度300 $\mu\text{g}/\text{片}$ ）和EDTA溶液（终浓度292 $\mu\text{g}/\text{片}$ ）。过夜孵育后量取纸片

抑菌圈直径。结果判读如下：①添加APB溶液的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药纸片相差 ≥ 5 mm，即可判断该受试菌株产A类碳青霉烯酶（图1A）；②添加EDTA溶液的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药纸片相差 ≥ 5 mm，即可判断该受试菌株产生B类碳青霉烯酶（图1B）；③如仅同时添加APB和EDTA的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药纸片相差 ≥ 5 mm，可判断该受试菌株同时产A类碳青霉烯酶和B类金属 β 内酰胺酶（图1C）；④如含酶抑制剂的亚胺培南纸片抑菌圈直径与单药相差均 < 5 mm，可判断该菌不产A类或B类碳青霉烯酶，其耐药机制可能为产生OXA-48型碳青霉烯酶，或产生ESBL和/或AmpC酶合并膜孔蛋白的下调或缺失。



A：产A类碳青霉烯酶；B：产B类金属 β 内酰胺酶；C：同时产A类碳青霉烯酶和B类金属 β 内酰胺酶

图1 碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测 A类和B类碳青霉烯酶

附件2

D类OXA-48型碳青霉烯酶的检测

实验步骤按CLSI推荐的纸片扩散法进行：将大肠埃希菌ATCC 25922调制成0.5麦氏浊度菌悬液，均匀涂布于MH琼脂平板上，将一张亚胺培南纸片于琼脂表面。取两张无菌空白纸片，每张纸片取待测菌纯分菌落3~4个，在亚胺培南纸片左右各贴上一张已取待测菌菌落的空白药敏纸片。然后在亚胺培南纸片左侧的空白纸片加上EDTA溶液（终浓度292 $\mu\text{g}/\text{片}$ ，初始浓度0.1 mol/L 的溶

液可滴加10 μL ），在亚胺培南纸片右侧的空白纸片同时加上EDTA（终浓度292 $\mu\text{g}/\text{片}$ ，初始浓度0.1 mol/L 的溶液可滴加10 μL ）和APB溶液（终浓度600 $\mu\text{g}/\text{片}$ ，初始浓度为50 mg/L 的溶液可滴加12 μL ）。过夜孵育后判读结果：①含EDTA或3-氨基苯硼酸空白纸片均出现细菌矢状生长者，提示该菌产OXA-48型碳青霉烯酶（图2A）；②含EDTA或APB空白纸片均未出现细菌矢状生长者，提示该菌产金属 β 内酰胺酶（图2B）；③仅含EDTA空白纸片出现细菌矢状生长者，提示该菌产A类丝氨酸碳青霉烯酶（图2C）。



A：产OXA-48型碳青霉烯酶；B：产金属 β 内酰胺酶；C：产A类丝氨酸碳青霉烯酶

图2 碳青霉烯酶抑制剂增强试验检测 OXA-48 型碳青霉烯酶

参考文献

- [1] CHINET 数据云. CHINET 中国细菌耐药监测网 [EB/OL]. [2020-07-01]. <http://www.chinets.com>.
- [2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20 (3): 233-242.
- [3] 全国细菌耐药监测网. 2018 年全国细菌耐药监测报告 (简要版) [EB/OL]. [2020-07-01]. <http://www.carss.cn/Report/Details?aId=648>.
- [4] Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 [EB/OL]. [2020-07-01]. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Facility guidance for control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) [EB/OL]. [2020-07-01]. <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/cre-guidance-508.pdf>.
- [6] TZOUVELEKIS L, MARKOGIANNAKIS A, PSICHOIOU M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions [J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25 (4): 682-707.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notes from the field: New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* associated with endoscopic retrograde cholangiopancreatography-Illinois, 2013 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2014, 62 (51-52): 1051.
- [8] GALANI I, KARAIKOS I, KARANTANI I, et al. Epidemiology and resistance phenotypes of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece, 2014 to 2016 [J]. Euro Surveill, 2018, 23 (31): 1700775.
- [9] LOPES E, SAAVEDRA M J, COSTA E, et al. Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northern Portugal: Predominance of KPC-2 and OXA-48 [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 22: 349-353.
- [10] WANG Q, WANG X, WANG J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: data from a longitudinal large-scale CRE study in China (2012-2016) [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67 (Suppl 2): S196-S205.
- [11] ZHANG R, LIU L Z, ZHOU H W, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) strains in China [J]. EBioMedicine, 2017, 19: 98-106.
- [12] HAN R, SHI Q, WU S, et al. Dissemination of carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from adult and children patients in China [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 314.
- [13] BASSETTI M, PEGHIN M, PECORI D. The management of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* [J]. Curr Opin Infect Dis, 2016, 29 (6): 583-594.
- [14] SHEU C C, CHANG Y T, LIN S Y, et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: An update on therapeutic options [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 80.
- [15] BUSH K, BRADFORD P A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17 (5): 295-306.
- [16] KAZMIERCZAK K M, de JONGE B L M, STONE G G, et al. *In vitro* activity of ceftazidime/avibactam against isolates of *Enterobacteriaceae* collected in European countries: INFORM global surveillance 2012-15 [J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73 (10): 2782-2788.
- [17] YIN D, WU S, YANG Y, et al. Results from the China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) in 2017 of the *in vitro* activities of ceftazidime-avibactam and ceftolozane-tazobactam against clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63 (4): e02431-18.
- [18] NOVELLI A, DEL GIACOMO P, ROSSOLINI G M, et al. Meropenem/vaborbactam: a next generation β -lactam β -lactamase inhibitor combination [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2020, 18 (7): 643-655.
- [19] ZHOU M L, YANG Q W, LOMOVSKAYA O, et al. *In vitro* activity of meropenem combined with vaborbactam against KPC-producing *Enterobacteriaceae* in China [J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73 (10): 2789-2796.
- [20] TOOKE C L, HINCHLIFFE P, LANG P A, et al. Molecular basis of Class A β -lactamase inhibition by relebactam [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63 (10): e00564-19.
- [21] MORRISSEY I, MAGNET S, HAWSER S, et al. *In vitro* activity of cefepime-enmetazobactam against Gram-negative isolates collected from U. S. and European hospitals during 2014-2015 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63 (7): e00514-19.
- [22] KRAJNC A, BREM J, HINCHLIFFE P, et al. Bicyclic boronate VNRX-5133 inhibits metallo- and serine- β -lactamases [J]. J Med Chem, 2019, 62 (18): 8544-8556.
- [23] HAMRICK J C, DOCQUIER J D, UEHARA T, et al. VNRX-5133 (Taniborbactam), a broad-spectrum inhibitor of serine- and metallo- β -lactamases, restores activity of cefepime in *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64 (3): e01963-19.
- [24] WANG X J, ZHAO C J, WANG Q, et al. *In vitro* activity of the novel β -lactamase inhibitor taniborbactam (VNRX-5133), in combination with cefepime or meropenem, against MDR Gram-negative bacterial isolates from China [J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75 (7): 1850-1858.
- [25] MOYA B, BARCELO I M, BHAGWAT S, et al. WCK 5107 (Zidebactam) and WCK 5153 are novel inhibitors of pbp2 showing potent " β -Lactam Enhancer" activity against *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant metallo- β -lactamase-producing high-risk clones [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61 (6): e02529-16.
- [26] LIVERMORE D M, MUSHTAQ S, WARNER M, et al. *In vitro* activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against Gram-

- negative bacteria[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72 (5) : 1373-1385.
- [27] SADER H S, RHOMBERG P R, FLAMM R K, et al. WCK 5222 (cefepime/zidebactam) antimicrobial activity tested against Gram-negative organisms producing clinically relevant β -lactamases[J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72 (6) : 1696-1703.
- [28] JI S, LV F, DU X, et al. Cefepime combined with amoxicillin/ clavulanic acid : a new choice for the KPC-producing *K. pneumoniae* infection[J]. Int J Infect Dis, 2015, 38 : 108-114.
- [29] ZHANG W X, GUO Y, YANG Y, et al. Study of *in vitro* synergistic bactericidal activity of dual β -lactam antibiotics against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microb Drug Resist, 2020, 26 (3) : 204-210.
- [30] BUSH K, BRADFORD P A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors[J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17 (5) : 295-306.
- [31] 《 β -内酰胺类抗生素 / β -内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识》编写专家组. β -内酰胺类抗生素 / β -内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识 (2020 年版) [J]. 中华医学杂志, 2020, 100 (10) : 738-747.
- [32] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. 2020, M100-S30.
- [33] CUNNINGHAM S A, LIMBAGO B, TRACZEWSKI M, et al. Multicenter performance assessment of Carba NP test[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55 (6) : 1954-1960.
- [34] LUTGRING J D, ZHU W, de MAN T J B, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacteriaceae* producing oxacillinase-48-like carbapenemases, United States[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24 (4) : 700-709.
- [35] PIERCE V M, SIMNER P J, LONSWAY D R, et al. Modified carbapenem inactivation method (mCIM) for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55 (8) : 2321-2333.
- [36] SFEIR M M, HAYDEN J A, FAUNTLEROY K A, et al. EDTA-modified carbapenem inactivation method : a phenotypic method for detecting metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57 (5) : e01757-18.
- [37] DOI Y, POTOSKI B A, ADAMS-HADUCH J M, et al. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β -lactamase by use of a boronic acid compound[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46 (12) : 4083-4086.
- [38] 卫生部办公厅. 关于印发《产 NDM-1 泛耐药肠杆菌科细菌感染诊疗指南 (试行版) 》的通知 [EB/OL]. [2020-07-01]. <http://www.nhc.gov.cn/zw/gkzt/pyzgl/201010/49274.shtml>.
- [39] POURNARAS S, ZARKOTOU O, POULOU A, et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51 (9) : 2986-2990.
- [40] 陈金云, 傅鹰, 杨青, 等. KPC-2 及 IMP-4 酶介导肠杆菌科细菌碳青霉烯类耐药研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2015, 35 (6) : 419-426.
- [41] 陈正辉, 刘淑敏, 杜艳. 携带 *bla*_{NDM-1} 基因的肠杆菌科细菌耐药流行特征分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43 (10) : 1281-1285.
- [42] TSAKRIS A, POULOU A, POURNARAS S, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65 (8) : 1664-1671.
- [43] TSAKRIS A, POULOU A, BOGAERTS P, et al. Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53 (4) : 1245-1251.
- [44] 李媛睿, 刘婧娴, 俞静, 等. 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌对厄他培南的水解能力 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16 (5) : 608-613.
- [45] LAU A F, WANG H H, WEINGARTEN R A, et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52 (8) : 2804-2812.
- [46] BURCKHARDT I, ZIMMERMANN S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2. 5 hours[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49 (9) : 3321-3324.
- [47] MIRANDE C, CANARD I, BLANCHE S B, et al. Rapid detection of carbapenemase activity : benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34 (11) : 2225-2234.
- [48] YU J, LIU J, LI Y, et al. Rapid detection of carbapenemase activity of *Enterobacteriaceae* isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2018, 17 (1) : 22.
- [49] HOPKINS K L, MEUNIER D, NAAS T, et al. Evaluation of the NG-Test CARBA 5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73 (12) : 3523-3526.
- [50] GLUPCZYNSKI Y, EVRARD S, HUANG T D, et al. Evaluation of the RESIST-4 K-Set assay, a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of OXA-48-like, KPC, VIM and NDM carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74 (5) : 1284-1287.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] MANCINI N, INFURNARI L, GHIDOLI N, et al. Potential impact of a microarray-based nucleic acid assay for rapid detection of Gram-negative bacteria and resistance markers in positive blood cultures[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52 (4) : 1242-1245.
- [54] ANGELIS D G, GROSSI A, MENCHINELLI G, et al. Rapid molecular tests for detection of antimicrobial resistance determinants in Gram-negative organisms from positive blood cultures : a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26 (3) : 271-280.

收稿日期: 2020-07-23 修回日期: 2020-08-26

读者 · 作者 · 编者

《中国感染与化疗杂志》常用缩略语

英文缩写	英文全称	中文全称
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	获得性免疫缺陷综合征
ALT	alanine aminotransferase	丙氨酸氨基转移酶
APACHE II	acute physiological and chronic health evaluation system II	急性生理与慢性健康评分
AST	aspartate aminotransferase	天冬氨酸氨基转移酶
BUN	blood urea nitrogen	血尿素氮
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	疾病控制与预防中心
CLSI	American Clinical and Laboratory Standards Institute	美国临床和实验室标准化协会
Cr	creatinine	肌酐
CRP	C-reactive protein	C反应蛋白
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
ESBL	extended spectrum β -lactamase	超广谱 β 内酰胺酶
FDA	Food and Drug Administration	食品药品监督管理局
HIV	human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
I	intermediate	中介
ICU	intensive care unit	重症监护病房
MIC	minimum inhibitory concentration	最低抑菌浓度
MRCNS	methicillin-resistant coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	甲氧西林耐药凝固酶阴性葡萄球菌
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌
MSCNS	methicillin-susceptible coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	甲氧西林敏感凝固酶阴性葡萄球菌
MSSA	methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>	甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PCT	procalcitonin	降钙素原
R	resistant	耐药
S	susceptible or sensitive	敏感
VRE	vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>	万古霉素耐药肠球菌
WHO	World Health Organization	世界卫生组织