

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002408

mCIM、eCIM 对碳青霉烯酶检测能力评估及 CRE 耐药特点分析

黄军社¹, 董爱英¹, 周海健², 汪亚斯¹, 付玉冰¹, 张 嫒¹, 李 宁¹(1. 华北理工大学附属医院检验科, 唐山 063000; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、
传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206)

【摘要】目的:评估碳青霉烯酶失活试验(modified carbapenem inactivation method, mCIM)、EDTA 碳青霉烯酶失活试验(EDTA-carbapenem inactivation method, eCIM)及改良 Hodge 试验对肠杆菌科细菌不同基因型碳青霉烯酶的检测能力, 分析碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)对临床常用药物最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 便于临床合理选择用药。**方法:**收集华北理工大学附属医院 2018 年 6 月至 12 月临床标本中分离的 CRE 菌株 40 株, 经 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏系统进行鉴定及药敏试验, E-test 法检测亚胺培南、美罗培南、替加环素、阿米卡星、左氧氟沙星、复方新诺明对 CRE 的 MIC, 微量肉汤稀释法检测多粘菌素的 MIC。用 mCIM、eCIM 和改良 Hodge 试验检测 CRE 菌株产碳青霉烯酶的情况, 用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测碳青霉烯类耐药基因(*bla*_{KPC}、*bla*_{NDM}、*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{OXA-48})、超广谱 β -内酰胺酶基因(*SHV*、*TEM*、*CTX*、*OXA-1*)、AmpC 酶编码基因(*FOX*)及膜孔蛋白 *ompK35*、*ompK36* 基因。**结果:**40 株 CRE 中 38 株确定携带碳青霉烯酶基因, 其中携带 *bla*_{KPC} 35 株, 包括同时携带 *bla*_{NDM} 7 株, *bla*_{KPC}+*bla*_{NDM} 4 株。改良 Hodge 试验和 mCIM、eCIM 试验对 KPC 型碳青霉烯酶的阳性率均为 100% (38/38); mCIM、eCIM 试验对 NDM 型碳青霉烯酶的阳性率为 100% (3/3), 改良 Hodge 试验对 NDM 型碳青霉烯酶的阳性率为 0。耐药性分析: 40 株 CRE 菌株对临床常用抗菌药物如三代、四代头孢菌素, 酶抑制剂复合制剂, 氨基糖苷, 亚胺培南及美罗培南的耐药率均为 100%, 对左氧氟沙星、阿米卡星、复方新诺明的耐药率分别为 90.0%、60.0% 和 42.5%, 尚未发现对替加环素及多黏菌素耐药的菌株。**结论:**mCIM、eCIM 试验和改良 Hodge 试验对 KPC 型碳青霉烯酶的敏感度高, mCIM、eCIM 试验对 NDM 型的敏感性高于改良 Hodge 试验; 不同基因型的 CRE 菌株耐药情况不同, 建议针对不同耐药表型的 CRE 感染, 合理选择抗菌药物。

【关键词】mCIM、eCIM 试验; 改良 Hodge 试验; 碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌; 耐药

【中图分类号】R978.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-07-10

Modified carbapenem inactivation method/EDTA-carbapenem inactivation method test to evaluate detection ability of carbapenemase and analyzing drug-resistance characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*

Huang Junzhi¹, Dong Aiyang¹, Zhou Haijian², Wang Yasi¹, Fu Yubing¹, Zhang Lei¹, Li Ning¹

(1. Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of North China University of Technology;

2. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control/National Institute for Communicable Disease Control and Prevention/Chinese Center for Disease Control and Prevention)

【Abstract】Objective: To evaluate the detection ability of modified carbapenem inactivation method(mCIM)/EDTA-carbapenem inactivation method(eCIM) test and modified Hodge test for carbapenemase of different genotypes in *Enterobacteriaceae*, and to analyze the minimum inhibitory concentration(MIC) of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae(CRE) on common clinical medicines, so as to aid the clinician to choose reasonable medicines. **Methods:** Forty CRE strains isolated from clinical specimens in our hospital from June 2018 to December 2018 were collected. VITEK 2 Compact automatic bacterial identification/drug sensitivity system was used to

conduct the identification and drug sensitivity; E-test method was used to detect the imipenem, meropenem, tegacycline, amikacin, levofloxacin and compound sulfamethoxazole on MICs of CRE; broth microdilution method was used to detect the MIC of polymyxin. The mCIM/eCIM test and modified Hodge test were used to detect the situation of CRE to produce carbapenemase. PCR was used to detect carbapenem resistance genes

作者介绍: 黄军社, Email: 1669585985@qq.com,

研究方向: 临床微生物感染诊断。

通信作者: 董爱英, Email: heweijun@126.com。

基金项目: 2018 年河北省省级科技计划自筹资助项目(编号: 182777207)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200324.1519.048.html>
(2020-03-25)

(*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{OXA-48}), extended-spectrum β -lactamase genes(*SHV*, *TEM*, *CTX* and *OXA-1*), AmpC enzyme-encoding genes(*FOX*), and membrane pore proteins *ompK35* and *ompK36* genes. **Results:** Among 40 CREs, 38 strains carried the carbapenemase gene, including *bla*_{KPC} of 35 strains, *bla*_{NDM} of 7 strains, *bla*_{KPC}+*bla*_{NDM} of 4 strains. Positive rates of the modified Hodge test, mCIM/eCIM test to KPC carbapenemase were 100% (38/38). Positive rates of mCIM/eCIM test to NDM carbapenemase were 100% (3/3). Positive rates of the modified Hodge test to NDM carbapenemase were 0. Drug resistance analysis: drug-resistance rates of 40 CRE strains to common clinical antibiotics, such as the third and the fourth generation of cephalosporins, enzyme inhibitor mixture, aztreonam, imipenem and meropenem, were all 100%; those to levofloxacin, amikacin and compound neotamin were 90.0%, 60.0% and 42.5%, respectively. It is not found that strains were resistant to tigecycline and polymyxin. **Conclusion:** Both mCIM/eCIM test and modified Hodge test have high sensitivity to KPC carbapenemase, but mCIM/eCIM test is more sensitive than modified Hodge test to NDM carbapenemase, suggesting to select suitable antibiotics for CRE to different drug resistance phenotypes.

[Key words] modified carbapenem inactivation method/EDTA-carbapenem inactivation method test; modified Hodge test; carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; drug resistance

近年来,对碳青霉烯类药物不敏感的肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)检出率呈逐年上升趋势^[1-3]。因其对多种抗生素耐药,给临床感染治疗带来很大困难,引起国内外广泛关注。目前,临床上对于 CRE 耐药机制的检测主要依靠表型筛选实验,2009 年美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)提出改良 Hodge 试验^[4]来检测肠杆菌科细菌中的碳青霉烯酶,但由于其结果的局限性,2017 和 2018 年 CLSI 又相继推出碳青霉烯酶失活试验(modified carbapenem inactivation method, mCIM)和 EDTA 碳青霉烯酶失活试验(EDTA-carbapenem inactivation method, eCIM)作为 CRE 检测的表型确认实验^[5]。研究发现 CRE 对碳青霉烯类耐药的主要机制有产碳青霉烯酶、膜孔蛋白缺失或合并产 AmpC 酶或超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)以及外排泵机制过度表达等^[6], mCIM、eCIM 试验能否准确检测以上几种情况尚未在国内得到验证。而且,临床工作中发现 CRE 对氨基糖苷类等抗生素耐药表现不一致,是否与不同基因型有关,尚需进一步探讨。因此本研究旨在对 mCIM 试验联合 eCIM 试验检测碳青霉烯酶的能力进行评估,并对 CRE 体外药敏的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)分布情况进行分析,为 CRE 的临床诊断及治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集华北理工大学附属医院 2018 年 6 月

至 12 月所有临床标本中分离的肠杆菌科细菌,筛选出对碳青霉烯类抗生素中介或耐药的菌株 40 株(剔除同一患者同一部位的重复菌株)。

1.1.2 主要仪器与试剂 法国梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏系统及配套试剂,德国 LabCycler Standard P 的 PCR 扩增仪,北京擎科公司生产的 PCR 试剂,北京君意东方 TY-600C 的电泳仪,药敏纸片购自英国 Oxoid 公司,中国蓝琼脂培养基、MH 琼脂培养基、E-test 试条(分别为替加环素、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、复方新诺明、左氧氟沙星)均购自温州市康泰生物科技有限公司。

1.1.3 质控菌株 铜绿假单胞菌 ATCC27853、大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 为药敏质控菌株,肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 为改良 Hodge 试验阳性对照菌株、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706 为改良 Hodge 试验阴性对照菌株。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及药敏试验 使用法国梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定/药敏系统进行鉴定及药敏试验。敏感、中介与耐药判读标准参照美国临床实验室标准化研究协会(CLSI)M100-S28 文件 2018 年推出的判读标准^[5]。

1.2.2 基因检测 对 40 株 CRE 菌株菌进行碳青霉烯酶基因及其他基因检测。采用煮沸法提取 DNA 模板:从分离平板上挑取菌落,加 500 μ L 无菌水重悬细菌;100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,于 12 000 r/min 离心 10 min,上清液为 DNA 模板。用 PCR 技术检测碳青霉烯类耐药基因(*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}),如果碳青霉烯酶基因阴性,则检测超广谱 β -内酰胺酶基因(*SHV*, *TEM*, *CTX*, *OXA-1*)、AmpC 酶编码基因(*FOX*)以及膜孔蛋白 *ompK35*、*ompK36* 基因。如果碳青霉烯酶阳性,则对扩增片段进行序列测定,将序列提交美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库,通过基本局部匹配查询工具(basic local alignment search

tool, blaST) 比对, 确定碳青霉烯酶基因型别。具体相关引物信息见表 1。

1.2.3 改良 Hodge 试验^[4] 将 0.5 麦氏浊度的大肠埃希菌 (ATCC25922) 菌悬液均匀涂布到 MH 平板上, 将美罗培南的纸片贴在平板中央, 用无菌接种环将待测菌从药敏纸片的边缘划向平板边缘。35 °C 孵育过夜。美罗培南抑菌圈内出现矢状生长即为改良 Hodge 试验阳性。

1.2.4 mCIM、eCIM 试验^[5] 取 1 μ L 接种环满环的 (肠杆菌科细菌) 生长于血琼脂平板上过夜培养纯菌落, 置于 2 mL TSB (eCIM 试验在肉汤中加入 20 μ L 0.5 mol/L EDTA 溶液) 试管中, 混匀。将含 10 μ g 美罗培南的无菌纸片浸润于菌悬液中。(35 $\pm$ 2) °C 孵育 (4.00 $\pm$ 0.25) h。用接种环将纸片取出贴于已涂布有大肠埃希菌 ATCC25922 (0.5 麦氏浊度) 的 MH 平板上。倒置平板, (35 $\pm$ 2) °C 孵育 18~24 h, 量取抑菌圈直径。mCIM 和 eCIM 试验同步进行。mCIM 和 eCIM 试管中的美罗培南纸片贴于同一块已涂布有大肠埃希 ATCC25922 菌悬液的 MHA 平板上。结果判定: mCIM 阳性; 美罗培南抑菌圈直径 6~15 mm 或直径 16~18 mm 但抑菌圈内有散在菌落。

mCIM 阴性; 抑菌圈直径 $\geq$ 19 mm。eCIM 结果解释: 与 mCIM 结果相比, 美罗培南抑菌圈直径 $\geq$ 5 mm 则为金属酶阳性, $\leq$ 4 mm 则为丝氨酸酶阳性 (当 mCIM 阴性时, 则不对 eCIM 结果进行解释)。

1.2.5 E-test 试验 用 E-test 试条复核亚胺培南、美罗培南、氨基糖苷、阿米卡星、复方新诺明、左氧氟沙星、替加环素对 CRE 菌株的 MIC 值。

2 结果

2.1 菌株分布情况

本院 2018 年 6 月至 12 月共筛选出 CRE 菌株 40 株, 其中肺炎克雷伯菌 37 株 (92.5%); 大肠埃希菌 2 株 (5.0%), 粘质沙雷 1 株 (2.5%)。科室分布为重症医学科 22 株 (55.0%), 神经内科重症病房 12 株 (30.0%), 呼吸内科 3 株 (7.5%), 老年病科、神经外科及胸心外科病区各 1 株。标本主要来自痰标本 33 株 (82.5%), 其次为尿标本 3 株 (7.5%), 血和灌洗液标本各 2 株 (5.0%) (表 2)。

表 1 耐药基因引物序列及引物长度

靶基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 /bp	退火温度 /°C	参考文献
碳青霉烯类耐药基因				
<i>KPC</i>	F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R: CTGTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	55	[7]
<i>NDM</i>	F: GGTTCGCGATCTGCTTTTC R: CGGAATGGCTCATCAGGATC	621	57	[7]
<i>OXA-48</i>	F: GCGTGCTTAAGGATGAACAC R: CATCAAGTTCAACCAACCG	438	55	[7]
<i>VIM</i>	F: GATGCTGTTTGCTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	390	55	[7]
<i>IMP</i>	F: GGAATAGACTGGCTTAAYTC R: TCGGTTTAAYAAAACAACCACC	232	50	[7]
ESBLs 耐药基因				
<i>OXA-1</i>	F: ATATCTCTACTGTTGCATCTCC R: AAACCCCTTCAAACCATCC	619	54	[8]
<i>SHV</i>	F: AGGATTGACTGCCTTTTTC R: ATTTGCTGATTTCGCTCG	392	52	[8]
<i>TEM</i>	F: ATCAGCAATAAACCAGC R: CCCGAAGAAGCTTTTC	516	51	[8]
<i>CTX</i>	F: CGCTTTGCGATGTCAG R: ACCGCGATATCGTTGGT	551	56	[8]
AmpC 耐药基因				
<i>FOX</i>	F: AACATGGGATATCAGGGAGATG R: CAAAGCGGTAACCGGATTGG	190	59	[8]
膜孔蛋白基因				
<i>ompK35</i>	F: CAGACACCAAACTCTCATCAATGG R: AGAATTGGTAAACGATACCCAGC	1 183	52	[9]
<i>ompK36</i>	F: CAGCACAATGAATATAGCCGAC R: GCTGTTGTCGTCCAGCAGGTTG	1 115	53	[9]

2.2 碳青霉烯酶基因检测结果

经 PCR 检测,40 株 CRE 有 38 株检出碳青霉烯酶基因,检出率为 95.0% (38/40),携带 *bla*_{KPC-2} 35 株,包括 34 株肺炎克雷伯菌,1 株黏质沙雷菌;携带 *bla*_{NDM} 7 株,包括 5 株肺炎克雷伯菌,2 株大肠埃希菌;同时检出 *bla*_{KPC}+*bla*_{NDM} 4 株,均为肺炎克雷伯菌;未检出 *bla*_{IMP}、*bla*_{VIM}、*bla*_{SIM} 及 *bla*_{OXA-48} 基因。2 株碳青霉烯酶基因检测阴性的肺炎克雷伯菌,ESBLs 基因检测阳性同时合并膜孔蛋白 *ompK36* 基因缺失 (表 2)。

2.3 不同基因型碳青霉烯酶表型筛选实验结果

40 株 CRE 分别进行了改良 Hodge 试验、mCIM 及 eCIM 试验。38 株碳青霉烯酶基因检测阳性的菌株中,改良 Hodge 试验阳性的有 35 株,阳性率为 92.1% (35/38),分别为携带碳青霉烯酶基因型 *bla*_{KPC-2} (31 株)、*bla*_{KPC-2}+*bla*_{NDM-1} (3 株)、*bla*_{KPC-2}+*bla*_{NDM-5} (1 株);mCIM 试验阳性的菌株有 38 株,阳性率为 100% (38/38),eCIM 阳性的菌株有 35 株,携带碳青霉烯酶基因型分别为 *bla*_{KPC-2} (31 株)、*bla*_{KPC-2}+*bla*_{NDM-1} (3 株)、*bla*_{KPC-2}+*bla*_{NDM-5} (1 株);eCIM 阳性的菌株有 3 株,携带碳青霉烯酶基因型均为 *bla*_{NDM-5} (3 株)。2 株 ESBLs 基因及 AmpC 酶基因阳性合并膜孔蛋白 *ompK36* 基因缺失,未检出碳青霉烯酶基因的菌株,改良 Hodge 试验及 mCIM 试验均表现为阴性 (表 3)。

2.4 体外药敏结果

40 株 CRE 菌株对替加环素及多黏菌素的耐药率均为 0, MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 均为 0.5 μg/mL,对亚胺培南、美罗培南的耐药率均为 100%, MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 均为 32 μg/mL;对第三代、四代头孢菌素、酶抑制剂合剂及氨曲南的耐药率均为 100%;对左氧氟沙星、阿米卡星、复方新诺明的耐药率分别为 90.0%、60.0% 和 42.5%。31 株携带 *bla*_{KPC} 的菌株对左氧氟沙星、阿米卡星及复方新诺明的耐药率分别为 90.3%、61.3% 和 38.7%, MIC₅₀ 分别为 24 μg/mL、16 μg/mL 和 2 μg/mL;3 株携带 *bla*_{NDM} 的菌株对左氧氟沙星及复方新诺明均表现为耐药,2 株对阿米卡星表现为耐药。4 株携带 *bla*_{KPC}+*bla*_{NDM} 的菌株对左氧氟沙星及阿米卡星均表现为耐药,2 株对复方新诺明的敏感。2 株携带 ESBLs 基因+AmpC 酶基因+膜孔蛋白基因缺失的菌株均对左氧氟沙星和复方新诺明敏感,1 株对阿米卡星的耐药,2 株菌对亚胺培南及美罗培南均表现为耐药, MIC 为 32 μg/mL。由于携带 *bla*_{NDM}、*bla*_{KPC}+*bla*_{NDM} 及 ESBLs 基因+AmpC 酶基因+膜孔蛋白基因缺失的菌株数量过少,不再单独进行耐药率、MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 的计算。耐药情况见表 4。

表 2 40 株 CRE 菌株分布及碳青霉烯酶基因检出情况

菌群	数量	标本来源	数量	科室分布 (n)	碳青霉烯酶基因	数量
肺炎克雷伯菌	36	血	1	神经内科重症病房 (1)	<i>bla</i> _{KPC-2}	1
			2	重症医学科 (2)	<i>bla</i> _{KPC-2}	2
			2	重症医学科 (2)	<i>bla</i> _{KPC-2}	2
			32	重症医学科 (16)	<i>bla</i> _{KPC-2}	12
		尿			<i>bla</i> _{NDM-5}	1
					<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{NDM-1}	3
				神经内科重症病房 (11)	<i>bla</i> _{KPC-2}	11
				呼吸内科 (3)	<i>bla</i> _{KPC-2}	2
					<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{NDM-5}	1
				老年病科 (1)	ESBLs+AmpC+ 膜孔蛋白缺失	1
大肠埃希菌	2	尿	1	重症医学科 (1)	<i>bla</i> _{NDM-5}	1
			1	胸心外科病区 (1)	<i>bla</i> _{NDM-5}	1
黏质沙雷菌	1	血	1	重症医学科 (1)	<i>bla</i> _{KPC-2}	1

表 3 碳青霉烯酶基因检测结果与表型筛选试验结果

表型筛选实验	<i>bla</i> _{KPC} (n=31)	仅 <i>bla</i> _{NDM} (n=3)	<i>bla</i> _{KPC} + <i>bla</i> _{NDM} (n=4)	ESBLs+AmpC 酶 + 膜孔蛋白缺失 (n=2)	合计
mCIM 试验 +	31	0	4	0	35
eCIM 试验 -					
mCIM 试验 +	0	3	0	0	3
eCIM 试验 +					
mCIM 试验 -	0	0	0	2	2
改良 Hodge 试验 +	31	0	4	0	35
改良 Hodge 试验 -	0	3	0	2	2

表 4 不同基因型 CRE 菌株常用抗菌药物的耐药率 (%)

抗生素种类	总耐药率 (n=40)	<i>bla</i> _{KPC} (n=31)	<i>bla</i> _{NDM} (n=3)	<i>bla</i> _{KPC} + <i>bla</i> _{NDM} (n=4)	ESBLs+AmpC 酶 + 膜 孔蛋白缺失 (n=2)
亚胺培南	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
美罗培南	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
头孢哌酮 / 舒巴坦	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
哌拉西林 / 他唑巴坦	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
头孢曲松	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
头孢吡肟	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
氨曲南	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
左氧氟沙星	90.0	90.3	100.0	100.0	0.0
阿米卡星	60.0	61.3	66.7	100.0	50.0
复方新诺明	42.5	38.7	100.0	50.0	0.0
替加环素	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
多黏菌素	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

3 讨论

华北理工大学附属医院近 5 年 CRE 总体检出率约为 5.5%^[10], 与我国同期耐药监测数据比较^[11], 呈较高水平。在本院检出的 40 株 CRE 中, 经检测碳青霉烯酶基因的携带率为 95.0%, 其中最主要的是 KPC 型, 占 92.1%。对于 KPC 型碳青霉烯酶的检测, 改良 Hodge 试验一直具有较好的灵敏度及特异度, 但对其他型别碳青霉烯酶的检测缺乏敏感性。在 2018 年 CLSI 推出 mCIM、eCIM 试验作为碳青霉烯酶检测的确认实验^[9], 不仅可以检测碳青霉烯酶, 还可进一步区分金属酶及丝氨酸酶。

在本次研究中, 当菌株仅携带 *bla*_{KPC-2} 基因时, 改良 Hodge 试验均为阳性, mCIM 均为阳性, eCIM 均为阴性。当菌株仅携带 *bla*_{NDM} 基因(*bla*_{NDM-5}、*bla*_{NDM-1}) 时, 改良 Hodge 试验均为阴性, mCIM 均表现为阳性, eCIM 均表现为阳性。当菌株同时携带 *bla*_{KPC-2} 和 *bla*_{NDM} 基因时, 改良 Hodge 试验均为阳性, mCIM 均为阳性, eCIM 均为阴性。2 株 ESBLs 基因、AmpC 酶基因阳性合并膜孔蛋白 *ompK36* 基因缺失, 碳青霉烯酶基因检测阴性的菌株, 改良 Hodge 试验、mCIM 试验均表现为阴性。由此可见, 改良 Hodge 试验及 mCIM、eCIM 试验对于 KPC 型碳青霉烯酶检测的敏感度无差别; 对于 NDM 型碳青霉烯酶的检测, mCIM、eCIM 试验的敏感度优于改良 Hodge 试验; 对于 ESBLs、AmpC 酶合并膜孔蛋白缺失的耐药机制的检测, 二者均无检出能力。本院 CRE 菌株碳青霉烯酶基因携带率为 95.0%, 其中主要为 KPC-2 型, 与国内多家医院^[12-13]流行的碳青霉烯酶基因型别一致, 而改

良 Hodge 试验对 KPC 基因检测的敏感性高, 仍可继续作为本院碳青霉烯酶的表型筛选实验; mCIM、eCIM 试验对于 KPC 基因及 NDM 基因单独存在时, 可以很好地将其区分为丝氨酸酶及金属酶, 当同时携带 KPC 基因及 NDM 基因时, eCIM 试验结果均表现为阴性, 即仅能检测到 KPC 基因。mCIM、eCIM 试验在操作步骤上比改良 Hodge 试验繁琐, 操作流程有待进一步优化。另外还发现, 仅在 *bla*_{KPC} 基因检测阳性的菌株中, 出现 6 mm < mCIM 抑菌环 < 19 mm 的情况, 抑菌环直径波动在 14~16 mm, 推测丝氨酸酶水解碳青霉烯类药物的能力可能弱于金属酶。由于本次研究的菌株携带金属酶基因的菌株数量过少, 该假设有待进一步印证。

体外药敏结果显示, 40 株 CRE 菌株对亚胺培南、美罗培南、三代、四代头孢菌素、酶抑制剂复合制剂及氨曲南的耐药率均为 100%, 耐药程度较高。值得注意的是, 在 ESBLs、AmpC 酶合并膜孔蛋白缺失的组中, 亚胺培南及美罗培南的 MIC 也达 32 μg/mL。由于本试验仅检测了常见的 5 种碳青霉烯酶基因, 可能还存在其他基因型别的碳青霉烯酶或其他的耐药机制, 尚需进一步检测。所有菌株对替加环素及多黏菌素均表现为敏感, 此外携带 *bla*_{KPC} 的菌株对复方新诺明最敏感, 耐药率为 38.7%, MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 分别为 2 μg/mL 和 32 μg/mL; 携带 *bla*_{NDM} 的菌株对阿米卡星的耐药率为 66.7%, 由于携带此型碳青霉烯酶的菌株数较少, 不再进行 MIC₅₀ 及 MIC₉₀ 的计算, 但其药敏结果显示其对阿米卡星有一定的敏感性。由此可见, 当感染 CRE 时, 无疑替加环素及多黏菌素为首选用药。当进一步通过表型筛选试验大致判断碳青霉烯酶的基因型别后, 复方新诺明可作为

bla_{KPC} 型菌株的次选用药,阿米卡星可作为*bla_{NDM}* 型菌株的次选用药。

替加环素是 2009 年美国食品和药物管理局批准的第一种甘氨酸环素抗生素^[14],对皮肤、软组织及腹腔内器官具有良好的渗透性。然而,其对脑脊液和尿液的渗透性较差。因此,针对 CRE, Cunha BA 等^[15]建议每日应用高剂量的替加环素,即 200 mg 负荷剂量,接着 100 mg/24 h (替加环素的半衰期为 27 h)维持治疗。值得注意的是, Khare V 等^[16]2017 年报道在印度已经出现 CRE 菌株(肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌)对替加环素耐药的情况,耐药率为 13.9%。鉴于印度碳青霉烯酶流行的型别以 NDM 型^[17]为主,而本院以 KPC 型为主,可能存在对替加环素耐药情况不一致的现象。

阿米卡星为氨基糖苷类抗生素,对需氧的革兰阴性菌具有强大的抗菌作用,主要机制为抑制蛋白质合成和破坏细菌的细胞膜。尽管引入了新的抗菌药物,但阿米卡星似乎仍在严重的细菌感染治疗中发挥重要作用。Kato H 等^[18]的研究表明,当阿米卡星 MIC 为 4 $\mu\text{g/mL}$ 时,应用 15 mg/(kg·d) 的推荐剂量,99.9% 的患者可达到药代/药效动力学的目标;当阿米卡星的 MIC 为 8 $\mu\text{g/mL}$ 时,应用 25 mg/(kg·d) 的推荐剂量,80.4% 的患者可达到药代/药效动力学的目标,但此时应避免阿米卡星单药治疗,尤其对于菌血症或肺炎患者;当阿米卡星 MIC 为 16 $\mu\text{g/mL}$ 时,应用 20 mg/(kg·d) 的推荐剂量,药代/药效动力学目标极差。本院 CRE 菌株(KPC 型)对阿米卡星的 MIC₅₀ 为 16 $\mu\text{g/mL}$,建议应用 25~30 mg/(kg·d) 甚至更高的剂量,同时联合其他敏感药物治疗,密切监测患者的肾功能。复方新诺明目前只有口服用药,对于 CRE 感染较重的患者不适用。

临床工作中可依据改良 Hodge 试验联合 mCIM、eCIM 试验的结果,大致判断 CRE 菌株所携带的碳青霉烯酶基因型别,进一步依据不同基因型的 CRE 菌株耐药特点选择合适的抗菌药物。由于本次研究所选取的菌株数量较少,接下来会进一步扩大样本量,更全面地对 mCIM 和 eCIM 试验进行评估,以获得更准确的 CRE 耐药及 MIC 分布特点。

参 考 文 献

[1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(5):401-410.
[2] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2015 年 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(6):685-694.

[3] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(5):481-491.
[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement; CLSI Document M100-S19[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-eighth informational supplement; CLSI Document M100-S28[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
[6] Lazarovitch T, Amity K, Coyle JR, et al. The complex epidemiology of carbapenem-resistant enterobacter infections; a multicenter descriptive analysis[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2015, 36(11):1283-1291.
[7] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10):1791-1798.
[8] 贾楠. 儿童碳青霉烯类抗菌药物耐药肠杆菌的分子流行病学研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2018.
[9] 梁权辉, 徐温健. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌耐药机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(2):165-167, 169.
[10] 张嫻, 董爱英, 汪亚斯, 等. 2013—2017 年临床耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染检测结果分析[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(5):553-557.
[11] 丁卉, 吴大盈, 江丽莉, 等. 我院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染特点及碳青霉烯酶基因型分析[J]. 中华全科医学, 2017, 15(9):1549-1552.
[12] 李进, 黎敏, 刘雯瑜, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药特征及基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(24):3681-3684.
[13] 甘龙杰, 陈善建, 林宇岚, 等. 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌基因型检测及耐药性分析[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9):663-666.
[14] Pfaller MA, Huband MD, Jennifer M, et al. Surveillance of tigecycline activity tested against clinical isolates from a global (North America, Europe, Latin America and Asia-Pacific) collection (2016) [J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 51(6):848-853.
[15] Cunha BA, Baron J, Cunha CB. Once daily high dose tigecycline-pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness; dosing matters, revisited[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2017, 15(3):257-226.
[16] Khare V, Gupta P, Haider F, et al. Study on MICs of tigecycline in clinical isolates of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) at a tertiary care centre in North India[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(3):DC18-21.
[17] Deshpande P, Rodrigues C, Shetty A, et al. New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae; treatment options with carbapenems compromised[J]. Assoc Physicians India, 2010, 58:147-149.
[18] Kato H, Hagihara M, Hirai J, et al. Evaluation of amikacin pharmacokinetics and pharmacodynamics for optimal initial dosing regimen [J]. Drugs R D, 2017, 17(1):177-187.

(责任编辑:冉明会)