

· 耐药防控策略 ·



曲芬 解放军第三〇二医院临床检验医学中心主任医师，教授。独立承担全军“十二五”重点课题等共8项；以第一作者或通讯作者在国内期刊发表论文200余篇；主编副主编专著4部；获军队科技成果一等奖1项，获军队医疗成果奖二等奖4项、三等奖5项；中华预防医学会科学技术成果二等奖1项。社会兼职包括解放军第十届医学科学技术委员会检验医学委员、中国药学会抗生素专业委员会委员、中国研究型医院学会检验医学专业委员会委员等。

碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌诊断进展

徐旋^{1,2}, 曲芬²

1 北京大学医学部, 北京 100083

2 解放军第三〇二医院 临床检验医学中心, 北京 100039

徐旋, 曲芬. 碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌诊断进展. 生物工程学报, 2018, 34(8): 1338–1345.

Xu X, Qu F. Progress in the diagnosis of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Chin J Biotech, 2018, 34(8): 1338–1345.

摘要: 碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 在全球快速上升, 已出现了不同的基因型, 为临床诊治提出新的挑战。CRE 分为具有不同特点和耐药基因的三大类五大家族; 诊断方法包括 Kirby-Bauer 法初筛试验, 碳青霉烯类药物的协同试验 (EDTA 与美罗培南、苯硼酸与美罗培南的双纸片抑制法)、改良的 Hodge 试验、显色培养基检测等 CRE 筛选试验, 而 Carba NP 比色微管试验、PCR 及测序等为 CRE 确认试验。上述方法均各有其优缺点, 可根据当地的主要流行 CRE 型别和实验条件选择应用。

关键词: 碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌 (CRE), 诊断, 耐药

Progress in the diagnosis of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*

Xuan Xu^{1,2}, and Fen Qu²

1 Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

2 The Medical Center of Clinical Laboratory of 302th Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Abstract: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) is rising rapidly all over the world, and challenges clinical diagnosis and treatment by various genotypes. This paper summarizes the characteristics and diagnostic methods of CRE. CRE can be divided into three categories and five families with various characteristics and resistant genes. The diagnosis method

Received: December 27, 2017; **Accepted:** May 23, 2018

Supported by: the Science and Technology Plan Program of Beijing, China (No. 2151100003915151).

Corresponding author: Fen Qu. Tel: +86-10-66949691; E-mail: QF302@163.com

北京市科技计划课题 (No. 2151100003915151) 资助。

include the Kirby-Bauer screening test, double disc synergetic inhibition test with carbapenems collaboration (double disc EDTA and meropenem, phenylboronic acid and meropenem), modified Hodge test, chromogenic medium detection for selected test of CRE, and Carba NP colorimetric test, PCR and sequencing for CRE confirmation test. Each method has its own advantages and disadvantages, and can be applied according to the local main popular CRE genotypes and experimental conditions.

Keywords: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE), diagnosis, resistance

美国疾病控制中心 (Center of diseases control, CDC) 定义碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌 (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 为肠杆菌科细菌对多利培南、厄他培南、美罗培南或亚胺培南不敏感, 或者证实肠杆菌科细菌产生碳青霉烯酶^[1]。其中肠杆菌科包括 62 个属, 常见引起人类感染的有 10 个属, 是重要的临床感染病原菌^[2]。碳青霉烯类抗生素具有抗菌谱广、抗菌活性强并对 β -内酰胺酶稳定以及毒性低等特点。随着其广泛应用, 耐药快速增长, 其中 CRE 由于高度耐药、传播速度快、致死率高而备受关注, 被世界卫生组织 (World health organization, WHO) 列为全球耐药的紧急威胁。WHO 于 2014 年公布肺炎克雷伯菌的 CRE 产生率在欧洲、东南亚和地中海东部地区分别高达 68%、55% 和 54%^[3]; CRE

在美国的发生率分别为: 肺炎克雷伯菌 11%, 大肠埃希菌 2%, 相关死亡率高达 40%–50%^[4-5]; 而中国的 CRE 的产生率在快速上升, 最高地区达 14.97%, 总体病死率达 33.5%^[6]。入院携带 CRE 的患者直接增加住院期间的感染率及死亡率^[7-9]; CRE 的出现及种类的不断增多, 也造成严重的社会与经济负担^[10], 更为临床诊治提出新的挑战。有效治疗的前提是及时诊断。本文对 CRE 的特点及诊断方法作一综述。

1 CRE 的特点

CRE 根据分子结构分为 A (A 组丝氨酸酶)、B (B 组金属酶)、D (D 组丝氨酸酶) 三大类, 各类酶的种类及特点见表 1。A 组酶活性部位为丝氨酸, 可被 3-氨基苯硼酸抑制, 常见基因型包括

表 1 CRE 的种类与特点

Table 1 Types and characteristics of CRE

碳青霉烯酶分类	分组	活性部位	抑制作用	常见基因型	常见肠杆菌科菌种	特性
碳青霉烯酶分类	A 组丝氨酸酶, 编码基因位于质粒上	丝氨酸	AVB、APBA、ATM 水解、CLA 可能	KPC, IMI, GES, NMC, SME, PER, AME, SMC	阴沟肠杆菌和黏质沙雷菌种由染色体介导的 NMC-A、IMI、SME 以及肺炎克雷伯菌中质粒介导的 KPC、GES 酶	青霉素酶, 对亚胺培南的水解活性强于美罗培南, 可引起青霉素类、氨基糖苷类、碳青霉烯类耐药
	B 组金属酶, 编码基因位于质粒/染色体上	锌离子	EDTA	VIM, IMP, GIM, SME, SPM, IND, NDM-1, SIM, DNM	存在于肠杆菌科细菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、变形杆菌、弗劳地枸橼酸菌、产酸克雷伯菌、摩根摩根菌、普罗威登菌	金属酶, 可明显水解亚胺培南, 能水解除单环类氨基糖苷类以外的绝大多数 β -内酰胺类抗菌药物
	D 组丝氨酸酶, 编码基因位于质粒上	丝氨酸	AVB、CLA 可能	OXA (23–27, 40, 48, 49, 54, 162, 181, 204)	肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌	苯唑西林 (OXA) 酶, 对碳青霉烯类和广谱头孢菌素水解作用相对较弱, 常合并膜通透性下降

AVB: avibactam; APBA: 3'-Aminophenylboronic acid; EDTA: ethylene diamine tetra-acetic acid; ATM: aztreonam; CLA: clavulanic acid.

KPC、IMI、GES、NMC 等；B 组酶的活性部位为金属锌离子，可被 EDTA 抑制，常见基因型为 VIM、IMP、GIM、NDM 等；D 组酶也为丝氨酸酶，主要基因型为 OXA 型^[11]。

2 CRE 的诊断方法

目前 CRE 的筛选及诊断方法在不断地发展与完善，从最简单的 Kirby-Bauer 法 (K-B 纸片扩散) 初筛试验，到碳青霉烯类药物的协同试验 (乙二胺四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 和美罗培南、苯硼酸与美罗培南的双纸片抑制法)、改良 Hodge 试验 (Modified Hodge test, MHT)、显色培养基检测等为 CRE 的筛选试验，而 Carba NP 试验、聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 及测序为 CRE 的确认试验。每种方法各有其优缺点，可根据当地的主要流行 CRE 型别和实验条件选择应用。

2.1 K-B 初筛试验

K-B 初筛试验是最简便易操作的常规项目，不需特殊设备，适合于开展微生物检验的任何实验室。不同的碳青霉烯类抗生素、不同的细菌、不同的耐药机制，K-B 法的选择用药不同，如法罗培南目前被认为是检测产 KPC 酶菌株最好的指示药物，如果细菌产 KPC 酶，法罗培南的抑菌圈直径往往是 6 mm；厄他培南是检测产碳青霉烯酶菌株最敏感的药物选择，产碳青霉烯酶菌通常耐三代头孢菌素，但 SME 或者 IMI 基因型对三代头孢菌素敏感；对亚胺培南天然非敏感的细菌 (包括摩根摩根菌、变形杆菌属、普罗威登菌属) 的 CRE 筛选则需要参考亚胺培南以外的其他碳青霉烯类抗菌药物。FDA 推荐厄他培南、亚胺培南、美罗培南均可用于肠杆菌科的碳青霉烯类耐药的筛选，而亚胺培南扩展到对碳青霉烯类耐药的不动杆菌属和铜绿假单胞菌的筛选，美罗培南再扩展到对碳青霉烯类耐药的嗜水气单胞菌、蜂

房哈弗尼亚菌、多杀巴斯德菌、沙门菌属和志贺菌属的筛选。

2.2 纸片筛选及协同试验

美国临床与实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2017 年推荐的改良碳青霉烯类灭活试验 (Carbapenem inactivation method, CIM) 简便易行，方法是取 1 μ L 接种环的过夜培养纯菌落于 2 mL TSB 肉汤中，振荡混匀后放入含 10 μ g 美罗培南的无菌纸片，35 $^{\circ}$ C 孵育 4 h，将美罗培南纸片取出，贴于已涂布有大肠埃希菌 ATCC25922 的 MHA 平板上，35 $^{\circ}$ C 孵育 18–24 h，美罗培南抑菌圈直径为 6–15 mm 或直径为 16–18 mm 但抑菌圈内有散在菌落，判断碳青霉烯酶阳性^[12]。CIM 可以检测出肠杆菌科的多种耐药基因包括 KPC、NDM、VIM、IMP、OXA-48 和 OXA-23，根据基因的不同，与 PCR 方法检测的结果符合率达 83%–100%^[13–14]。美国 CDC 建议的另一种纸片筛选 CRE 的方法是将待测细菌接种于 2 mL 的胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 中，混匀后加入 10 μ g 的厄他培南或 5 μ g 美罗培南纸片，再转种到麦康凯琼脂平皿，生长的乳糖发酵革兰氏阴性杆菌即为 CRE，但此方法存在假阴性。如果在此基础上加入 3 种抗生素 (厄他培南、氟康唑、利奈唑胺) 筛选可降低假阴性 6 倍，且节省时间和费用^[15]。相比较，纸片协同试验也不失为一种简单、价廉且可靠的检测和鉴别 CRE 表型的检测方法，可在 7 h 内快速鉴定 KPC、金属酶和 OXA-48 型碳青霉烯酶，对指导临床救治和感染控制及流行病学监测意义重大。方法是以美罗培南纸片 (10 μ g) 与美罗培南加 EDTA (750 μ g) 纸片抑菌圈直径大于 5 mm 为金属酶阳性；美罗培南纸片与苯硼酸 (400 μ g) 加美罗培南纸片的抑菌圈直径大于 5 mm 为 KPC 酶阳性；替莫西林纸片 (30 μ g) 抑菌圈直径大于 10 mm 为 OXA-48 型碳青霉烯酶，特异性及敏感性均达 100%，并证明不同的

碳青霉烯类药物筛选的敏感性无差异^[16-17]。不同的酶抑制剂可以检测某些类别的耐药机制, 如有研究用硼酸、克拉维酸、EDTA 协同抑制试验筛选 178 株 CRE, 56.7% 被硼酸抑制, 判断为 KPC, 7.3% 同时被硼酸和克拉维酸抑制, 为质粒介导的 AmpC 酶, 3.4% 被 EDTA 抑制, 为可能金属酶阳性。另有 32.6% 硼酸、克拉维酸和 EDTA 抑制试验均阴性, 分析可能产生另一类的 β -内酰胺酶和/或其他耐药机制^[18]。进一步, Pournaras 等应用苯硼酸和 EDTA 与美罗培南的协同试验可直接检测标本中的 CRE (KPC 和 VIM), 显示了很好的敏感性 (94.8%) 和特异性 (100%), 进一步加快了报告速度^[19]。

2.3 Hodge 试验

CLSI 于 2015 年推荐改良 Hodge 试验 (Modified Hodge test, MHT) 筛查 CRE, 优点是操作简便、价廉, 无需特殊的试剂或培养基, 仅适用于肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的筛查。应用厄他培南 (10 μ g) 或美罗培南 (10 μ g) 纸片, 放在涂有 0.5 麦氏浊度稀释 10 倍的 ATCC 25922 的大肠埃希菌的平皿上, 经孵育 16–20 h, 标准菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 与待检菌株抑菌环的交汇处大肠埃希菌生长增强, 并呈矢状, 为该待检菌碳青霉烯酶阳性^[20]。MHT 检测 CRE 的敏感性和特异性分别为 89.65% 和 96.77%^[21]。但对金属酶的检测敏感性较差, 假阳性和假阴性的存在是此方法的弊端。假阳性出现在质粒和染色体酶过度表达的产 ESBL (Extended-spectrum β -lactamase) 或 AmpC 酶合并空蛋白缺失的细菌, 假阴性出现在某些产 NDM (New delhi metallo-lactamase)、OXA 和 SME 的菌株^[22-23], 通过加入表面活性剂聚乙二醇辛基苯基醚可以提高金属酶等的检测敏感性^[24]。

2.4 显色培养基

近年来, 显色培养基在临床微生物诊断方面得到广泛应用, 美国 CDC 推荐其为 CRE 的快速初筛方法。显色培养基检测原理是应用合成显色

酶底物来特异性地鉴定病原体, 使目标致病体生长成有色菌落, 而使非目标生物体受抑制 (如使用抗生素或其他抑制剂)。显色培养基具有节约成本、缩短检测时间及减少生化与血清学试验的繁琐与花费, 使病原体确诊, 并提高了检出率。自 2008 年 Samra 等首次应用并评价科玛嘉显色培养基筛选 KPC, 内含有抑制革兰氏阳性菌和 CSE 的成分, 作者比较科玛嘉 KPC 筛选用麦康凯琼脂培养 (贴碳青霉烯类纸片) 和 PCR 方法检测 KPC 基因, 敏感性和特异性分别达到 92.7% 和 95.9%, 而 PCR 方法为 100% 和 98.4%^[25]。此后, 很多商用显色培养基的试剂不断开发, 并通过选择革兰氏阳性菌和酵母菌的抑制剂、抗生素的浓度、碳青霉烯类敏感肠杆菌科的抑制剂等来增强敏感性和特异性。不同的品牌显色培养基敏感性和特异性不同, 如 Brilliance CRE 为 78%–82% 和 60%–66%; chromID Carba 为 91%–96% 和 76%–89%; Colorex KPC 为 56%–88% 和 70%–76%; TSB 加厄他培南为 78%–99% 和 10%–69%^[26]。Simner 进一步评价以上 3 种显色培养基的敏感性、特异性和费用, Brilliance CRE、chromID Carba 和 Colorex KPC 的检测敏感性分别为 77.6%、89.8% 和 83.7%, 特异性分别为 87.1%、95% 和 92.1%, 费用分别为 7.56 美元、3.25 美元和 2.79 美元, 检测时间均为 18–24 h^[27]。而标本拭子直接筛选的敏感性和特异性通常低于纯培养菌落的检测, 肠拭子标本的预富集可以提高敏感性, 但增加培养时间无意义^[28]。敏感性和特异性较低与产 AmpC 酶或者 ESBL 酶影响有关, 如果 NDM-1 对美罗培南的 MIC \leq 2 μ g/mL, 则显色培养基筛选效果不佳。提示应根据不同的地域不同的碳青霉烯酶主导基因型来选择显色培养基。

2.5 Carba NP 试验

CLSI 2015 年 (M100-S25) 抗微生物药物敏感性试验的执行标准推荐 Carba NP (CNP) 试验,

为检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的表型确证方法。该方法是通过细菌提取物对亚胺培南的水解而改变 pH 值, 导致指示剂的颜色变化而判断, 特点是快速、简便、低耗, 不需要特殊设备, 大部分微生物实验室可以开展, 并可检测多种碳青霉烯酶。在一项对比研究中, CNP 试验阳性检测 66 株 CRE 的敏感性和特异性分别为 89% 和 100%, 检测的基因包括 KPC、NDM、IMP、VIM 和 SME, 只有 OXA-48-like 7 株均阴性, 被推荐为常规的筛选试验^[29]。另有研究体现 CNP 诊断 CRE 快速、低耗。CNP 试验检测 106 株 CRE 的敏感性和特异性分别为 66.04% 和 90.48%, MHT 的敏感性和特异性分别为 54.72% 和 93.88%, 且有 48 株 CRE 用 MHT 检测阴性而 CNP 检测阳性, 甚至厄他培南纸片敏感的菌株 CNP 检测阳性 18 例, 每个检测仅花费 0.08 欧元, 提示 CNP 诊断对指导临床早期用药治疗有重要意义^[30]。在另一方法的比较研究中, CNP 试验鉴定正确率 93.9%, 而 MHT 鉴定正确率 90.8%, 其中 OXA-48、IMP、NDM-1 各 1 株 MHT 检测阴性, 而 OXA-48、IMP 和 VIM 各 1 株 CNP 试验检测阴性。MHT 假阳性 31 株, CNP 试验无假阳性。两种方法比较其敏感性无差异, 而特异性 CNP 高于 MHT (分别为 100% 和 60.3%, $P < 0.000 1$), 且 CNP 试验 26% 在 15 min 内阳性, 85% 在 1 h 内阳性; 建议 MHT 不宜单独用于确证 CRE 的存在^[23]。目前 CLSI 推荐 Carba NP 试验主要用于流行病学研究或感染控制, 对某些分离株如 OXA 型及染色体编码型菌株的筛选效果不好, 但在临床实验室开展对临床选择治疗有重要参考意义。基于同样的原理, 类似的试验方法不断被改良和优化, 包括 Blue Carba 试验、Rosco Rapid Carb 筛查和 Rapidec Carba NP 试验, 可在临床实验诊断过程中借鉴和评价^[31-33]。

2.6 PCR 及测序

PCR 除检测是否产生碳青霉烯酶外, 亦可检

测碳青霉烯酶基因类型, 具有准确、灵敏、特异的优越性; 但其缺点为: 需要特殊的实验室条件及仪器设备、只对靶基因特异、对未检测的特异性碳青霉烯酶基因可出现假阴性。在方法学观察研究中, PCR 的敏感性为 97%, 明显高于科玛嘉显色培养或者选择性培养, 检测时间仅为 24 h, 较培养法 (64-72 h) 明显缩短 ($P < 0.000 1$), PCR 是最好的筛选 CRE 的方法^[34]。同时 PCR 的优势是可以精确鉴别一类耐药基因的每个基因型, 单链 DNA 非标记探针法双联溶解高分辨溶解扩增 blaOXA-48-like 基因, 可以清晰区分 OXA162、OXA244、OXA181、OXA232 等多种基因^[35]。多重 PCR 的精确设计进一步克服单纯 PCR 方法的某些不足。如有作者设计引物包括 4 种基因, 验证 100 株产碳青霉烯酶的革兰氏阴性菌, PCR 检测有一种或多种耐药基因阳性 65 株, 包括 KPC15 株、NDM-1 59 株、VIM 6 株, 35 株阴性。而 MHT 检测仅 70% 阳性, 双纸片协同法检测 65% 阳性, 所有的纸片协同试验的菌株, 均为金属酶及 KPC, 体现了分子检测的高敏感性及其特异性^[36]。

2.7 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight, MALDI-TOF)

MALDI-TOF 是近年来快速发展的微生物鉴定技术, 其工作原理是利用激光作为能量来源辐射样品与基质形成的共结晶体, 基质分子吸收能量与样品解吸附并使样品电离, 经过飞行时间检测器, 将不同质荷比 (m/z) 的离子分开, 形成细菌特异性的质谱图。用于细菌鉴定在于不同微生物的指纹图谱各异, 指纹图谱中的某些峰 (分子质量) 具有属、种甚至亚种特异性。MALDI-TOF 用于检测多重 CRE 耐药基因包括 VIM、IMP、KPC 和 NDM, 源于碳青霉烯类药物的特征峰的改变, 如将试验菌与美罗培南缓冲液混合, 经 3 h 孵育后, 将混合液离心取上清检测, 代表美罗培南的

特征峰消失,判断碳青霉烯酶活性,灵敏性和特异性分别为 96.67%和 97.87%,除去孵育时间的周转时间为 4 h^[37],不同的前处理会影响质谱鉴定 CRE 的速度和效果。不同的碳青霉烯类药物研究的效果不同,MALDI-TOF MS 检测以厄他培南水解的阳性率为 100%,亚胺培南水解的阳性率为 96.6%^[38]。多研究显示质谱仪检测碳青霉烯酶与常规方法 100%的一致率,包括 KPC、VIM 和 OXA-48 基因型,厄他培南孵育 3 h,30 min 报告结果,是快速又经济的检测方法^[39]。也有作者用改良的美罗培南水解试验(MHA)后进行 MALDI-TOF 检测,5% CO₂、37 °C 血琼脂培养过夜的菌株,配置成 4.0 麦氏单位美罗培南水化物,分为 6 份(5 个低温 1 个常温)。美罗培南溶解在 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲悬浮液(pH 6.8),终浓度为 10 mmol/L,立即试验或在-20 °C 存储 2-3 d。2,5 二羟基苯甲酸酸(DHB)前处理,再加基质上样。结果在 2 h 内完成 KPC 或 VIM 碳青霉烯酶,包括 NDM、OXA-48 和 CRE,可以很好地区分产酶与非产酶株,快速且易操作,但不能检测孔蛋白改变和泵出机制^[40]。当然,不同碳青霉烯类药物的稳定性、影响因素的多样性、耐药机制的复杂性等均可能影响 MALDI-TOF 鉴定 CRE 的效果。

2.8 其他诊断方法

VITEK AST-N202 卡检测 CRE 的敏感性达 93%-100%,特异性为 89.9%。不足之处在于需要特异性试剂及引物,只对靶基因特异,对未检测的特异酶可能出现假阴性^[41]。环介导等温扩增法(LAMP)检测 KPC,在 68 °C 条件下能特异性地检测 KPC,与其他 β 内酰胺酶无交叉反应,灵敏度达 100 CFU,比常规 PCR 的灵敏度高 10 倍,检测时间 25 min。LAMP 还可以直接检测痰液、尿液、粪便和血液标本^[42]。Xpert Carba-R 检测的耐药基因包括 KPC、NDM、VIM、IMP 和 OXA-48,检测正确率 97.6%,但耗材高并需要特殊设备^[43]。

3 结语

不同的检测方法对不同的耐药基因的检测敏感性不同,没有一个单一理想的方法可以覆盖所有的耐药基因和解决所有问题,大数据的检测方法评估需要不断丰富,实际工作中可根据肠杆菌科的菌种类型、经济条件、实验设备、速度及准确性、当地流行的主要耐药基因等,综合分析选择检测方法,为临床患者的及时诊治及感染控制提供重要保障。

REFERENCES

- [1] Kallen A, Guh A. United States Centers for Disease Control and Prevention issue updated guidance for tackling carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Euro Surveill*, 2012, 17(26): pii: 20207.
- [2] Li MY. *Medical Microbiology*. 3rd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015 (in Chinese). 李明远. 医学微生物学. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [3] Banerjee R, Humphries R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence*, 2017, 8(4): 427-439.
- [4] Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(9): 785-796.
- [5] Guh AY, McDonald LC, Sinkowitz-Cochran R. Assessment of public health perspectives on responding to an emerging pathogen: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Public Health Manag Pract*, 2013, 19(4): E27-E32.
- [6] Zhang Y, Wang Q, Yin Y, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections: report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 62(2): 01882-17.
- [7] McConville TH, Sullivan SB, Gomez-Simmonds A, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS ONE*, 2017, 12(10):

- e0186195.
- [8] Viau R, Frank KM, Jacobs MR, et al. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(1): 1–27.
- [9] Zhao ZC, Xu XH, Liu MB, et al. Fecal carriage of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a Chinese university hospital. *Am J Infect Control*, 2014, 42(5): e61–e64.
- [10] Bartsch SM, McKinnell JA, Mueller LE, et al. Potential economic burden of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in the United States. *Clin Microbiol Infect*, 2017, 23(1): 48.e9–48.e16.
- [11] Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, et al. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(5): 1338–1342.
- [12] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing, Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- [13] van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, et al. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba np test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0123690.
- [14] Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, et al. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in *Enterobacteriaceae* and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(8): 3060–3063.
- [15] Darling LA, Evans AM, Stellrecht KA, et al. A triple-disk enrichment method for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) screening. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(12): 3557–3559.
- [16] Teethaisong Y, Eumkeb G, Nakouti I, et al. A combined disc method with resazurin agar plate assay for early phenotypic screening of KPC, MBL and OXA-48 carbapenemases among *Enterobacteriaceae*. *J Appl Microbiol*, 2016, 121(2): 408–414.
- [17] Birgy A, Bidet P, Genel N, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(4): 1295–1302.
- [18] Da Costa Silva D, Rampelotto RF, Lorenzoni VV, et al. Phenotypic methods for screening carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and assessment of their antimicrobial susceptibility profile. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2017, 50(2): 173–178.
- [19] Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(9): 2986–2990.
- [20] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing, Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [21] Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(6): 1631–1639.
- [22] Yamada K, Kashiwa M, Arai K, et al. Comparison of the modified-hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Methods*, 2016, 128: 48–51.
- [23] Bayramoğlu G, Uluçam G, Özgür ÇG, et al. Comparison of the modified Hodge test and the Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates. *Mikrobiyol Bul*, 2016, 50(1): 1–10.
- [24] Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, et al. Triton Hodge Test: improved protocol for modified hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(3): 640–649.
- [25] Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, et al. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(9): 3110–3111.
- [26] Wilkinson KM, Winstanley TG, Lanyon C, et al. Comparison of four chromogenic culture media for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(9): 3102–3104.
- [27] Simner PJ, Gilmour MW, de Gagne P, et al. Evaluation of five chromogenic agar media and the Rosco Rapid Carb screen kit for detection and

- confirmation of carbapenemase production in Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(1): 105–112.
- [28] Heinrichs A, Nonhoff C, Roisin S, et al. Comparison of two chromogenic media and enrichment broth for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* on screening rectal swabs from hospitalized patients. *J Med Microbiol*, 2016, 65(5): 438–441.
- [29] Morey KE, Vega R, Cassidy PM, et al. Evaluation of the carba NP Test in Oregon, 2013. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(1): e03005–15.
- [30] Shinde S, Gupta R, Raut SS, et al. Carba NP as a simpler, rapid, cost-effective, and a more sensitive alternative to other phenotypic tests for detection of carbapenem resistance in routine diagnostic laboratories. *J Lab Physicians*, 2017, 9(2): 100–103.
- [31] Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(6): 1996–1998.
- [32] Hombach M, Von Gunten B, Castelberg C, et al. Evaluation of the Rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(12): 3828–3833.
- [33] Poirel L, Nordmann P. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(9): 3003–3008.
- [34] Singh K, Mangold KA, Wyant K, et al. Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(8): 2596–2600.
- [35] Hemarajata P, Yang SX, Hindler JA, et al. Development of a novel real-time PCR assay with high-resolution melt analysis to detect and differentiate OXA-48-like β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(9): 5574–5580.
- [36] Lau AF, Fahle GA, Kemp MA, et al. Clinical performance of check-direct CPE, a multiplex PCR for direct detection of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and/or *bla*_{VIM}, and *bla*_{OXA-48} from perirectal swabs. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(12): 3729–3737.
- [37] Monteferrante CG, Sultan S, Ten Kate MT, et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(10): 2856–2867.
- [38] Kost K, Yi JM, Rogers B, et al. Comparison of clinical methods for detecting carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Pract Lab Med*, 2017, 8: 18–25.
- [39] Sakarikou C, Ciotti M, Dolfa C, et al. Rapid detection of carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiol*, 2017, 17(1): 54.
- [40] Calderaro A, Buttrini M, Piergianni M, et al. Evaluation of a modified meropenem hydrolysis assay on a large cohort of KPC and VIM carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *PLoS ONE*, 2017, 12(4): e0174908.
- [41] Bae IK, Kang HK, Jang IH, et al. Detection of carbapenemases in clinical *Enterobacteriaceae* isolates using the VITEK AST-N202 Card. *Infect Chemother*, 2015, 47(3): 167–174.
- [42] Nakano R, Nakano A, Ishii Y, et al. Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Infect Chemother*, 2015, 21(3): 202–206.
- [43] Moore NM, Cantón 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 Clin Microbiol*, 2017, 55(7): 2268–2275.

(本文责编 郝丽芳)