

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.02.019

· 综述 ·

肠杆菌科细菌碳青霉烯酶表型检测方法研究进展

Advances in phenotypic detection methods for carbapenemase production in Enterobacteriaceae

张保荣(ZHANG Bao-rong)^{1,2}, 毕茹茹(BI Ru-ru)¹, 顾兵(GU Bing)^{1,3}

(1 徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004; 2 宿迁市第一人民医院, 江苏 宿迁 223899; 3 徐州医科大学附属医院, 江苏 徐州 221002)

(1 School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; 2 Suqian First Hospital, Suqian 223899, China; 3 The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China)

[关键词] 肠杆菌科细菌; 碳青霉烯酶; 表型检测; 碳青霉烯灭活试验

[中图分类号] R446.5 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2018)02-0175-06

肠杆菌科细菌是医院和社区感染最常见的病原菌,可引起多部位炎症,如肺炎、泌尿系统炎症、败血症、腹膜炎、医疗器械相关性感染等。由于几乎可水解所有头孢菌素的超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)在肠杆菌科细菌中的流行,对于重症感染患者,碳青霉烯类作为最有效的抗菌药物被广泛使用。随着碳青霉烯类药物消耗量的增加,耐药菌株开始出现,并在全球范围快速传播^[1-2]。耐碳青霉烯肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)通常表现对 β -内酰胺类药物高水平抵抗,同时伴随着对多种其他抗菌药物,如氨基糖苷类、氟喹诺酮类等耐药,使治疗成为十分棘手的问题。

CRE的耐药机制主要包括产生各种类型碳青霉烯酶、膜孔蛋白缺失或突变联合ESBLs或头孢菌素酶(AmpC)的高水平产生、外排泵的过度表达等^[3],其中产生碳青霉烯酶是最常见的耐药机制,也是对公共健康威胁最大的因素。碳青霉烯酶属于 β -内酰胺酶家族,能够水解包括头孢菌素及碳青霉烯在内的几乎所有 β -内酰胺类药物。基于分子特征的不同,目前已知的碳青霉烯酶分别属于Ambler分类中的A、B及D类,A类碳青霉烯酶活性部位有丝氨酸结构,主要包括KPC、GES、IMI、SME和SFC,

能水解青霉素类、头孢菌素、氨曲南和碳青霉烯类抗生素,活性可被克拉维酸、他唑巴坦抑制;B类属于金属酶,活性部位有锌离子,主要包括IMP、VIM、SPM、NDM、GIM和SIM,活性不受 β -内酰胺酶抑制剂影响,可被EDTA等金属螯合剂所抑制,不能水解氨曲南;D类主要为OXA-48-like酶,能水解青霉素类、邻氯西林、苯唑西林等药物。

编码碳青霉烯酶的基因通常存在于可移动基因元件上,通过质粒及转座子容易在细菌之间水平传播,导致局部流行,甚至是感染暴发^[3];同时,产碳青霉烯酶细菌感染常伴随治疗的失败及高病死率。因此,快速、准确地识别产酶菌株,对于患者的治疗及采取合适的感染控制措施,防止耐药基因的播散具有重要意义。尽管临床实验室可以常规进行碳青霉烯类抗菌药物的敏感性检测,但是敏感性下降并不一定是由于产生了碳青霉烯酶。分子诊断技术是判断细菌是否产生碳青霉烯酶的金标准,但检测方法不仅步骤繁琐,而且需要特殊的仪器设备,在临床工作中难以广泛开展。另外,分子诊断仅能够对已知类型的酶基因检测,对于少见的类型存在漏检风险。近年来,多种碳青霉烯酶表型检测方法被广泛应用,每种方法都各具特色。本文对肠杆菌科细菌碳青霉

[收稿日期] 2017-07-03

[基金项目] 江苏省自然科学基金面上项目(BK20151154);江苏省"科教强卫"医学重点人才项目

[作者简介] 张保荣(1972-),女(汉族),江苏省邳州市人,主任技师,主要从事病原微生物感染研究。

[通信作者] 顾兵 E-mail:gb20031129@163.com

烯酶表型检测方法进行综述,目的是通过表型检测能简便、准确、及时发现产酶株,为患者的治疗及控制耐药菌株的传播提供帮助。

1 表型筛查试验

1.1 药物敏感试验 产生碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌(carbapenemase-producing Enterobacteriaceae CPE)通常表现对一种或多种碳青霉烯类药物敏感性下降。药物敏感性检测方法主要为最低抑菌浓度(MIC)测定及纸片扩散法测量抑菌环直径,当 MIC 值升高或抑菌环直径缩小提示为可疑的 CPE 菌株。有报道指出不同的碳青霉烯类药物对 CPE 的筛选能力存在差异,厄他培南敏感性较高,但特异性略差,亚胺培南情况类似,美罗培南在敏感性和特异性的综合评价中有较满意的结果^[4]。Benenson 等^[5]利用纸片扩散法检测肠杆菌科细菌对亚胺培南的敏感性,判断是否产生 KPC 酶,灵敏度和特异度分别为 100%、96%。有研究应用 VITEK 2 测定亚胺培南与美罗培南的 MIC 进行 CPE 筛选,发现两者联合应用可以显著提高检测能力^[6]。

判断 CPE 的折点目前尚无统一标准,Tamma 等^[7]通过对 198 株 CRE 进行耐药基因及碳青霉烯类药物 MIC 检测,发现 CPE 菌株与非 CPE 菌株的 MIC 值分布存在差异,不同基因型的碳青霉烯酶 MIC 分布无差异。研究^[7]认为,筛查 CPE 的最佳厄他培南浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,美罗培南、亚胺培南、多利培南的浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Pasteran 等^[6]发现,以亚胺培南 $\text{MIC} \geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 联合美罗培南 $\text{MIC} \geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 CPE 判断标准,具有很高的灵敏度及特异度。也有学者在 CPE 低流行区域进行大数据分析,结果显示以目前美国临床实验室标准化协会(CLSI)敏感标准(美罗培南 $\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$),14% 的 CPE 菌株对美罗培南敏感,以欧洲抗菌药物敏感试验委员会(EUCAST)敏感标准(美罗培南 $\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$),此比率上升至 20%,认为以美罗培南筛查 CPE 时,应采用的折点为 $\text{MIC} 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[8]。

药物敏感试验可以方便、快捷地进行 CPE 筛查,同时可以根据药敏结果指导临床用药。但由于其他的耐药机制,如膜孔蛋白缺失合并高产 AmpC 酶同样可导致碳青霉烯类药物 MIC 值升高或抑菌环直径缩小,有些产酶菌株对碳青霉烯类药物水解能力弱,也可出现敏感结果。因此,产酶株与非产酶株药敏结果会出现部分重叠。

1.2 筛选培养基 主要有添加了碳青霉烯类药物的麦康凯培养基及商业化的显色培养基,可以直接从临床标本中筛选出耐药菌株。利用 CPE 对碳青霉烯抗生素敏感性下降的特性,以及麦康凯培养基能有效抑制革兰阳性菌的生长,改进后的麦康凯具有很好的选择作用。在麦康凯培养基中加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亚胺培南用于直肠拭子筛选 CPE 菌株有很好的检测效能^[9]。商业化的显色培养基具有筛选和鉴定双重作用,其中的抑制剂限制了杂菌的生长,未受影响的细菌在生长过程中代谢产生的酶,水解培养基中底物,释放色原物质呈现特定颜色,利用颜色的不同对目标菌进行鉴定。Panagea 等^[10]使用 CHROMager KPC 培养基监测直肠拭子标本中 CPE,阳性预测值及阴性预测值分别为 100%、98.8%,但对于产 KPC 和 VIM 酶的菌株通过颜色判断或菌落特征并不能区别。早期的显色培养基具有方便、特异度高、结果易于观察的优点,不过主要用于筛选 CRE,对 CPE 无特异性,并且对一些低水平耐药的 CPE 菌株,敏感性较低,易出现漏检。

ChromID CARBA 是一种新型显色培养基,专为 CPE 设计,添加剂中含有特异性抑制革兰阳性菌和非产碳青霉烯酶细菌的成分。Perry 等^[11]比较 ChromID CARBA 和 Colorex KPC 两种培养基检测产 NDM-1 酶肠杆菌科细菌的能力,认为前者更敏感,可以检测出美罗培南 MIC 低于 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株。另外一种新型的筛选培养基 SUPERCARBA,其中加入一种碳青霉烯类药物、氯唑西林、硫酸锌,可以筛选多种类型碳青霉烯酶,如 OXA-48、NDM、VIM、IMP、KPC 等,检测灵敏度在 95% 以上^[12]。

利用筛选培养基进行临床标本中 CPE 的筛查是一种好方法,最大优势在于能从多种菌群中分离出目标菌,但是孵育过程需 24~48 h,不能满足快速检测要求,并且不能区分碳青霉烯酶类型。

2 表型确认试验

2.1 抑制剂增效试验 不同类型的碳青霉烯酶活性可被相应的抑制剂所抑制,在碳青霉烯类药物中加入酶抑制剂,可以使药物的 MIC 下降或纸片扩散法的抑菌环增大。常用的方法有 E-test 和纸片增效试验,前者判读标准为加酶抑制剂一侧与另一侧比较 MIC 值相差 8 倍以上为阳性,后者可以将抑制剂直接加到药物纸片中,与原药物纸片比较抑菌环

的大小,或者将抑制剂纸片贴在药物纸片附近,观察两者是否出现协同。A 类酶抑制剂有硼酸类化合物、克拉维酸等,有文献评价两种抑制剂对产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌检测能力,硼酸检出所有产酶株,而克拉维酸灵敏度及特异度稍差^[13]。硼酸类除了能抑制 A 类 β -内酰胺酶,也能抑制 AmpC 酶,当菌株高产 AmpC 酶伴随膜蛋白缺失时易造成假阳性,若联合加入氯唑西林,因其仅抑制 AmpC 酶可以进行鉴别。B 类酶抑制剂常用的有 EDTA、吡啶二羧酸,两者对于金属酶的检测均有很好的效果。Tsakris 等^[14]报道以纸片增效试验检测同时具有 KPC 和金属酶的菌株,当美罗培南纸片中仅加入苯硼酸或 EDTA 一种时,结果均为阴性,只有两者同时加入才出现阳性结果。OXA-48 目前无理想的特异性抑制剂,但是可利用其水解替莫西林的特征进行识别。有研究者分别使用苯硼酸、吡啶二羧酸和氯唑西林作为 A、B 类及 AmpC 酶抑制剂,联合替莫西林纸片扩散法检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶,结果显示所有 OXA-48 菌株与苯硼酸和吡啶二羧酸均无协同作用,并且替莫西林抑菌环 <10 mm,以此作为判断标准,灵敏度及特异度均达 100%^[15]。

抑菌剂增效试验操作简单,结果易于观察,可区分碳青霉烯酶类型。但是,当以 EDTA 作为金属酶抑制剂时,有些菌株本身对 EDTA 敏感可出现假阳性,并且检测过程需 16~20 h 的孵育,无法快速获得结果。

2.2 改良 Hodge 试验(modified Hodge test, MHT)

Hodge 试验最早用于淋病奈瑟菌产生青霉素酶的检测,后来 Lee 等^[16]进行改进用于铜绿假单胞菌和不动杆菌的金属酶筛查。2009 年 CLSI 建议对碳青霉烯类药物敏感性下降的肠杆菌科细菌采用 MHT 进行碳青霉烯酶的表型确证。MHT 原理基于产生碳青霉烯酶的细菌使碳青霉烯药物失活,大肠埃希菌(ATCC 25922)作为对药物敏感的指示菌,在试验菌株接种线与抑菌环相交处出现增强生长。MHT 步骤简单,不需要特殊的试剂和仪器,适合于各级实验室常规开展,并且对于 A 类和 D 类碳青霉烯酶显示较好的检测能力,但是对于金属酶,如 NDM、VIM、IMP 的检测存在缺陷。一些菌株由于 ESBLs 或者存在高水平 AmpC,会导致假阳性结果^[17]。

针对 MHT 的不足,研究人员进行了多种改进。有文献报道^[18]以间接碳青霉烯酶试验检测 KPC 酶,试验步骤类似于 MHT,药敏纸片为亚胺培南,

试验菌株不是沿药敏纸片边缘划线,而是涂在 EDTA 纸片上,贴在亚胺培南纸片边缘,孵育过夜后观察结果,指示菌在 EDTA 边缘出现凹陷生长为阳性。EDTA 在其中作用是裂解菌体细胞,释放 KPC 酶,提高了检测能力。对于金属酶检测的缺陷,有研究尝试在培养基中加入硫酸锌,检测 NDM 的灵敏度从 50%增高至 85.7%,但特异度无改善^[19]。最近研究^[20]发现,NDM 是结合在外膜上的脂蛋白;Pasteran 等^[21]通过在 MH 培养基中加入非离子表面活性剂 Triton X-100,使 MHT 检测 NDM 的灵敏度 $>90\%$ 。Takayama 等^[22]报道在 MH 培养基中加入氯唑西林进行 MHT, AmpC 导致的假阳性被有效控制。也有研究以麦康凯培养基代替 MH,敏感性明显提高,可能是麦康凯中的抑制物如胆盐增加了胞内酶的释放^[23]。

2.3 Carba NP 试验

2012 年 Nordmann 等^[24]报道了一种新型的快速检测细菌水解亚胺培南能力的试验,称为 Carba NP,试验原理基于生化显色。碳青霉烯酶能水解亚胺培南的 β -内酰胺环,使溶液 pH 下降,其中的酚红指示剂颜色发生红色到黄色的改变。整个实验过程仅需要 2 h,缩短了检测时间,能早期识别 CPE 菌株。2015 年 CLSI 推荐 Carba NP 作为肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属产生碳青霉烯酶的表型确证试验^[24]。据报道本试验有高特异性,对于 KPC 酶及金属酶的检测有高灵敏度,但是对于 OXA-48-like 的敏感性报道不一,11%~100%^[24-26]。Segawa 等^[27]以此试验检测 IMP-6 及 IMP-1 型酶,发现阳性出现时间与酶基因的表达水平显著相关,提示 Carba NP 有潜力用于评价碳青霉烯酶基因的表达程度。

尽管 Carba NP 简单快速,但是影响因素较多,如配制试验溶液 pH、待测菌分离选用的培养基、接种量、孵育时间、结果判定的主观因素、黏液型的表型以及酶活性表达水平等均会对结果造成影响^[26,28]。另外,试验需要一些特殊的试剂,如商品化蛋白提取液(B-PER II)、亚胺培南标准品粉剂等,不仅试验成本较高,而且亚胺培南粉剂加入后试剂要尽快使用,有效期仅 3 d,限制了该试验的推广应用。现在一些商品化的试剂盒应运而生,如 Rapidec Carba NP、Rosco Neo-Rapid Carb Kit 等,据报道上述商品化产品具有同样的检测性能,操作更简便^[29-30]。Pires 等^[31]介绍了一种替代试验(Blue-Carba),不需要蛋白提取液,直接从培养基取菌使用,以静脉滴注使用的亚胺培南/西司他丁代替亚胺

培南标准品,选择溴麝香草酚蓝作为指示剂替代酚红。据描述 Blue-Carba 具有很高的检测能力,而且减少了试剂花费,简化了试验操作,同时因为溴麝香草酚蓝变色范围在 pH 6.0~7.6,覆盖了大多数 β -内酰胺酶(pH 6.8),水解后引起的颜色变化更明显。也有文献^[32]报道以 Triton X-100 代替蛋白提取液,亚胺培南/西司他丁代替亚胺培南标准品,同样取得了满意的结果。有研究^[33]对此方法进行改进,将配制好的亚胺培南酚红混合溶液及单一酚红溶液(作为对照)分别滴加在滤纸条上,然后取培养基上的菌落直接涂在滤纸上,5 min 内根据颜色变化判读结果,也取得了理想效果,方便、快速、直观的方法更易被临床实验室所接受。

2.4 碳青霉烯灭活试验(carbapenem inactivation method, CIM) CIM 2015 年由荷兰 van der Zwaluw 研究团队首次提出,可以在 8 h 内检测革兰阴性杆菌的碳青霉烯酶,对 KPC、NDM、OXA-48、VIM、IMP 和 OXA-23 型 β -内酰胺酶的检测方法与 PCR 具有高度一致性^[34]。操作如下:(1)取一满环血平板或 MH 上菌株加入实验室用水中,做成均匀菌悬液,夹一片 10 μg 美罗培南药敏纸片浸入菌悬液,35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;(2)大肠埃希菌(ATCC 25922)以生理盐水制成 0.5 麦氏单位菌悬液,按照常规纸片扩散法操作涂布于 MH 平板表面;(3)取出美罗培南纸片贴在已涂布大肠埃希菌的 MH 平板上,35 $^{\circ}\text{C}$ 至少孵育 6 h 或过夜判读结果。如果待检菌株产生碳青霉烯酶,作用于药敏纸片中的美罗培南使其失去活性,指示菌的生长就不受影响,反之指示菌生长被抑制,在美罗培南周围出现明显抑菌圈。对 203 株碳青霉烯耐药的革兰阴性杆菌进行 CIM 和 Carba NP 实验,结果与多重 PCR 比较,CIM 灵敏度和特异度分别为 95.7%、95.5%,而 CarbaNP 分别为 75.0%、99.1%^[35]。2017 年 CLSI 推荐了改良 CIM 试验(mCIM)用于肠杆菌科细菌产生碳青霉烯酶的表型确认试验^[36],mCIM 与 CIM 的区别在于菌悬液使用胰蛋白酶大豆肉汤代替实验室用水制备,加入美罗培南纸片后孵育时间从 2 h 延长至 4 h。Pierce 等^[37]对 mCIM 进行评价,认为该试验不仅操作简单,而且结果易于判断、重现性好。

CIM 试验试剂花费少,容易操作,结果判断明确,检测 OXA-48-like 灵敏度高^[35,37],但试验需孵育 2 次,第一次 2~4 h,第二次至少 6 h 或过夜,操作时间长,不能达到快速检测的目的,另外当酶活性较低时会出现假阴性结果^[38]。

2.5 其他表型确认试验 以抗体介导为基础的免疫层析方法开始应用于检测碳青霉烯酶,表现了良好的性能,尤其对于 OXA-48-like 的检测有一定的优势。携带 OXA-48-like 酶的菌株常表现为对碳青霉烯类药物的低 MIC 值,并且不同于 KPC 和金属酶,OXA-48-like 缺乏用于表型检测所需的特异性抑制剂,在常规检验中易造成漏检。一种商品化的产品 OXA-48 K-SeT 检测 OXA-48-like 的灵敏度和特异度均达 100%^[39]。试验原理基于抗体捕获 OXA-48 酶的两个特异性抗原表位,将其中之一的特异性抗体以条带状固定在硝酸纤维膜上,胶体金标记另一抗体吸附在结合垫上。当待检样品加到试纸条一端的样本垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记抗体后发生特异性结合,再移动至固化抗体区域时又发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色条带。捕获抗体可以结合目前已知的多种 OXA-48-like 变体,如 OXA-48、OXA-162、OXA-181、OXA-204、OXA-232 和 OXA-244 等,15 min 内获得结果。最近报道了一种新型多通道免疫层析试剂 OKN K-SeT,可以同时检测 OXA-48、KPC、NDM,对于含有目标酶的菌株均能正确检出,非 CPE 或产生其他类型碳青霉烯酶菌株无交叉反应,表现高效的检测性能^[40]。免疫层析分析操作简单,结果快速、准确,敏感性高,不需要其他附加的试剂和仪器,易于在临床实验室开展,并且检测限在 10⁶ CFU/mL,有希望直接从尿或其他生物样本中进行检测,但是因为属于商品化试剂,试剂花费较多,并且只能对目标酶型进行检测,存在局限性。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)是一种软电离技术,将样品分散在基质中,在激光照射下分子电离,电离的样品在电场作用下飞过真空的飞行管,通过离子的质量电荷之比与离子的飞行时间成正比分析离子,测得样品分子的分子量达到鉴定目的。MALDI-TOF/MS 通常用于疾病的诊断和药物代谢研究,近年来在微生物的鉴定方面应用较多,对于耐药机制检测方面也有很大潜能。Hrabák 等^[41]描述了以质谱方法检测肠杆菌科细菌及铜绿假单胞菌产酶引起的碳青霉烯类药物耐药,美罗培南溶液与细菌培养物混合后 35 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h,混合液离心,上清液用于质谱分析,以美罗培南及其钠盐特征峰的出现与否判断结果,方法的灵敏度和特异度分别为 96.67%、97.87%。该方法简便快速、高通量、低成本、可信度高,除了用于细菌

纯培养物检测,还可以直接从血培养中测定,节省了时间,对 KPC、VIM、NDM、IMP、OXA-48-like 均有很高的检出能力^[42]。但是质谱仪价格昂贵,普通微生物实验室难以配置,并且不能区分碳青霉烯酶类型,对于流行病学调查的作用有限。

3 总结与展望

细菌耐药已经成为全球化的问题,特别是 CPE 引起的感染,由于其高传播性及高病死率,应引起临床及感控人员的高度重视。准确、及时发现 CPE 菌株,对于患者的治疗及感控措施的实施至关重要。不同的检测方法对不同类型碳青霉烯酶存在检测能力上的差异,截至目前,仍缺乏一种完美检测手段,实验室应根据自己的条件及地区流行情况进行选择。

显色培养基可以从临床标本中直观地分离出产酶菌株,在去定植检测中有很好的应用前景。免疫层析法对 KPC、NDM、OXA-48 等常见类型可以在 15 min 得出结果,当怀疑由相关机制引起的感染暴发时,该法是不错的选择。MALDI-TOF/MS 作为新型的检测手段开始用于细菌耐药方面的研究,目前对于 CPE 的检测主要依据碳青霉烯药物的水解,对具体的酶类型无法分辨,如果能对酶类型进行检测,将会有更大的应用空间。

[参考文献]

- [1] Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens[J]. Korean J Intern Med, 2012, 27(2): 128 - 142.
- [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] Goodman KE, Simner PJ, Tamma PD, et al. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)[J]. Expert Rev Infect Ther, 2016, 14(1): 95 - 108.
- [4] Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(5): 432 - 438.
- [5] Benenson S, Temper V, Cohen MJ, et al. Imipenem disc for detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1617 - 1620.
- [6] Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, et al. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of Enterobacteriaceae? [J]. J Clinical Microbiol, 2011, 49(2): 697 - 701.
- [7] Tamma PD, Huang Y, Opene BN, et al. Determining the optimal carbapenem MIC that distinguishes carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(10): 6425 - 6429.
- [8] Fattouh R, Tijet N, McGeer A, et al. What is the appropriate meropenem MIC for screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in low-prevalence settings? [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 60(3): 1556 - 1559.
- [9] Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, et al. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from surveillance rectal swabs[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(6): 2239 - 2242.
- [10] Panagea T, Galani I, Souli M, et al. Evaluation of CHROMagar™ KPC for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rectal surveillance cultures[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(2): 124 - 128.
- [11] Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, et al. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(10): 2288 - 2294.
- [12] Girlich D, Poirer L, Nordmann P. Comparison of the SUPER-CARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(2): 214 - 217.
- [13] Nicola FG, Nievas J, Smayevsky J. Evaluation of phenotypic methods for the detection of KPC carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Rev Argent Microbiol, 2012, 44(4): 290 - 302.
- [14] Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(8): 1664 - 1671.
- [15] van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(4): 345 - 349.
- [16] Lee K, Chong Y, Shin HB, et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species[J]. Clin Microbiol Infect, 2001, 7(2): 88 - 91.
- [17] Bayramoğlu G, Uluçam G, Gençoğlu Özgür Ç, et al. Comparison of the modified Hodge test and the Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates[J]. Mikrobiyol Bul, 2016, 50(1): 1 - 10.
- [18] Mathers AJ, Carroll J, Sifri CD, et al. Modified Hodge test versus indirect carbapenemase test; prospective evaluation of a phenotypic assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* car-

- bapenemase (KPC) in Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(4): 1291 - 1293.
- [19] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 477 - 479.
- [20] González LJ, Bahr G, Nakashige TG. Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase[J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(7): 516 - 522.
- [21] 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]. J Clin Microbiol, 2016, 54(3): 640 - 649.
- [22] Takayama Y, Adachi Y, Nihonyanagi S, et al. Modified Hodge test using Mueller-Hinton agar supplemented with cloxacillin improve screening for carbapenemase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(7): 774 - 777.
- [23] Aseem R, Shenoy S, Mala SS, et al. Approach to carbapenemase detection in *Klebsiella pneumoniae* in routine diagnostic laboratories[J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(12): DC24 - DC27.
- [24] Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(9): 1503 - 1507.
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. M100 - S25[S]. CLSI, 2015.
- [26] Tijet N, Boyd D, Patel SN, et al. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(9): 4578 - 4580.
- [27] Segawa T, Matsui M, Suzuki M, et al. Utilizing the Carba NP test as an indicator of expression level of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae[J]. J Microbiol Methods, 2017, 133: 35 - 39.
- [28] Dortet L, Bréchar L, Poirel L, et al. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test[J]. J Med Microbiol, 2014, 63(Pt 5): 772 - 776.
- [29] Hombach M, von Gunten B, Castelberg C, et al. Evaluation of the Rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(12): 3828 - 3833.
- [30] Abdel Ghani S, Thomson GK, Snyder JW, et al. Comparison of the Carba NP, modified Carba NP, and updated Rosco Neo-RapidCarb Kit Tests for carbapenemase detection[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(11): 3539 - 3542.
- [31] Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(12): 4281 - 4283.
- [32] 胡仁静, 严子禾, 韩志君, 等. Carba NP 试验及 Carba NP-direct 试验检测产碳青霉烯酶肠杆菌的临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(8): 1079 - 1086.
- [33] Srisrattakarn A, Lulitanond A, Wilailuckana C, et al. Modification and evaluation of the Carba NP test by use of paper strip for simple and rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2016, 32(7): 117.
- [34] 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[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0123690.
- [35] Madkour LA, Soliman MS, Hassan DM, et al. Detection of carbapenemase-producers: Evaluating the performance of the carbapenem inactivation method and Carba NP test versus multiplex PCR [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 9: 10 - 14.
- [36] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement. M100 - S27[S]. CLSI, 2017.
- [37] Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2321 - 2333.
- [38] Pragasam AK, Veeraraghavan B, Bakthavatchalam YD, et al. Strengths and limitations of various screening methods for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae including new method recommended by clinical and laboratory standards institute, 2017: A tertiary care experience[J]. Indian J Med Microbiol, 2017, 35(1): 116 - 119.
- [39] Rubio E, Zboromyrska Y, Pitart C, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of OXA-48 carbapenemase[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017, 87(3): 266 - 267.
- [40] 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.
- [41] Hrabák J, Walková R, Studentová V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9): 3222 - 3227.
- [42] Oviaño M, Sparbier K, Barba MJ, et al. Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)[J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 48(6): 655 - 660.