

# CIM, mCIM 和 MHT 筛选肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的方法评价

曹蕾<sup>1</sup>, 李小明<sup>1</sup>, 罗庆礼<sup>2</sup>, 王亚平<sup>1</sup>

(1. 安庆市第一人民医院检验科, 安徽安庆 246003; 2. 安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230000)

**摘要:**目的 评估碳青霉烯类抑制法(carbapenem inactivation method, CIM)、改良碳青霉烯类失活法(modified carbapenem inactivation method, mCIM)和改良 Hodge 试验(modified hodge test, MHT)对肠杆菌科细菌碳青霉烯酶表型筛选能力。方法 以 PCR 检测碳青霉烯酶基因作为金标准,对 120 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant enterobacteriaceae, CRE)和 50 株碳青霉烯类敏感的肠杆菌科细菌,分别进行 CIM, mCIM 和 MHT 表型筛选试验,评估三种方法的表型筛选能力。结果 120 株 CRE 中,93 株携带碳青霉烯酶耐药基因,表型筛选试验显示, CIM, mCIM 和 MHT 的敏感度分别是 95.6%、96.8% 和 95.8%, 特异度分别为 72.7%、92.3% 和 50%。三种方法筛选碳青霉烯酶,差异有统计学意义( $\chi^2 = 12.796, P < 0.05$ )。与 PCR 结果相比较, CIM, MHT 和 mCIM 的一致率分别为 90%、95% 和 77.4%, Kappa 值分别为 0.898、0.949 和 0.771。mCIM 和 CIM 试验与 PCR 高度一致。50 株碳青霉烯类敏感的肠杆菌科细菌 PCR 检测和三种方法均为阴性。结论 三种表型筛选方法均有较高的敏感度,但 mCIM 较 CIM, MHT 具有更高的特异度和一致率,是筛选 CRE 的有效方法。

**关键词:** 肠杆菌; 碳青霉烯酶; 碳青霉烯类抑制试验; 改良碳青霉烯类失活试验; 改良 Hodge 试验

**中图分类号:** R378.2; R446.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2020)01-067-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2020.01.018

## Evaluation of CIM, mCIM and MHT Screening Methods for Carbapenem-producing Enterobacteriaceae

CAO Lei<sup>1</sup>, LI Xiao-yue<sup>1</sup>, LUO Qing-li<sup>2</sup>, WANG Ya-ping<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Laboratory, the First People's Hospital of Anqing, Anhui Anqing 246003, China;

2. Department of Pathogenic Biology, Anhui Medical University, Hefei 230000, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the screening ability of carbapenem inactivation method(CIM), modified carbapenem inactivation method(mCIM) and modified Hodge test(MHT) for carbapenem enzyme phenotype of Enterobacteriaceae bacteria.

**Methods** PCR method was used to detect the genes of carbapenemase in Enterobacteriaceae bacteria, and the results were utilized as the standard of the phenotype screening capacity of CIM, mCIM and MHT test for 120 isolates of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and 50 sensitive strains. **Results** Among 120 CRE strains, 93 strains carried carbapenemase resistance genes. Phenotypic screening tests showed that the sensitivity of CIM, mCIM and MHT were 95.6%, 96.8% and 95.8%, respectively. The specificity of the three phenotypic screening methods was 72.7%, 92.3% and 50%, respectively. There were significant differences among the three methods ( $\chi^2 = 12.796, P < 0.05$ ). Compared with PCR, the consistency rates of the three methods were 90%, 95% and 77.5%, and the Kappa values of the three methods were 0.898, 0.949 and 0.771, respectively. 50 strains of carbapenem-sensitive Enterobacteriaceae bacteria were detected by PCR and all three methods were negative. **Conclusion** All three phenotypic screening methods had high sensitivity, but mCIM had higher specificity and consistency than CIM and MHT. mCIM is an effective method for screening CRE.

**Keyword:** Enterobacteriaceae; carbapenemase; CIM; mCIM; MHT;

近年来,耐碳青霉烯的肠杆菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)引起了广泛关注,而产碳青霉烯酶是引发耐药的主要机制<sup>[1]</sup>。有报道显

示,产碳青霉烯酶的 CRE(carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CP-CRE)比非 CP-CRE 毒力、致病力更强<sup>[2]</sup>,并能通过耐药质粒引

**基金项目:** 安徽省科技厅项目(项目编号:1704f0804035)。

**作者简介:** 曹蕾(1983-),女,硕士研究生,主管检验师,主要从事微生物耐药、免疫相关检测, E-mail: 283275191qq.com。

**通讯作者:** 李小明,副主任检验师, E-mail: 18496701@qq.com。

起播散。明确 CP-CRE 诊断,有利于感染的控制和播散。因而,一种高效、简便、准确筛选碳青霉烯酶的方法尤为重要。

本实验选取三种操作简便、无需特殊仪器的方法:改良 Hodge 试验(modified Hodge test, MHT),碳青霉烯类失活法(carbapenem inactivation method, CIM)和改良碳青霉烯类失活法(modified carbapenem inactivation method, mCIM),结合本地区肠杆菌细菌耐药情况,以 PCR 作为金标准,评估三种方法的表型筛选能力。

## 1 材料和方法

1.1 研究方向 收集安庆地区 2013 年 01 月~2017 年 12 月临床分离的肠杆菌科细菌,挑选 120 株 CRE,即对亚胺培南的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)  $\geq 4$ ,其中肺炎克雷伯菌 73 株,大肠埃希菌 24 株,阴沟肠杆菌 9 株,产气肠杆菌 5 株,弗氏枸橼酸杆菌 5 株和黏质沙雷菌 4 株。50 株碳青霉烯类敏感的肠杆菌科细菌中大肠埃希菌 30 株,肺炎克雷伯菌 20 株。

1.2 试剂与仪器 全自动微生物分析仪 VITEK 2 Compact 及配套板卡,哥伦比亚血琼脂、水解酪蛋白培养基(法国生物梅里埃公司);药敏纸片(英国 Oxoid 公司);PCR 扩增仪、凝胶成像仪和电泳仪(美国伯乐公司);2 × Es Taq MasterMix(北京康为世纪公司);50 × TAE,琼脂糖和胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptic soy broth, TSB)(上海生工生物公司),引物由大连宝生物公司合成。

### 1.3 方法

1.3.1 碳青霉烯酶表型的检测:分别参照文献[3-5]进行 CIM, mCIM 和 MHT 试验及结果判读。

1.3.2 碳青霉烯酶基因检测:采用加热煮沸法提取菌株 DNA 作为 PCR 模板。参照文献[6]合成碳青霉烯酶基因 blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaIMP, blaGES, blaOXA-48 和 blaOXA-23 引物。PCR 扩增体系 20  $\mu$ l:上、下游引物(10 mmol/L)各 1  $\mu$ l, 2 × Taq Master Mix 10  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ l, 模板 1  $\mu$ l。PCR 扩增参数:95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。扩增产物经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果。PCR 扩增阳性产物由大连宝生物公司进行双向测序,测序结果经 BLAST 比对分析以确定基因型。

1.4 统计学分析 采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析,分别计算 CIM, mCIM 和 MHT 的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,并进行一致性分析,分别计算 CIM, mCIM, MHT 和 PCR 结果的一致率和 kappa 值。kappa 值在 0.41~0.60 之间,表示一致性强度中等,kappa 值在 0.61~0.80 之间,一致性强度

为高度;kappa 值在 0.81~1.00 之间,一致性强度为完全一致。

## 2 结果

2.1 耐药基因检测结果 见表 1。120 株 CRE 中, 93 株携带一种或多种耐药基因, 27 株未检出耐药基因。除 blaGES 基因外,其他基因型均有检出。50 株碳青霉烯类敏感的肠杆菌科细菌未发现基因型。

表 1 PCR, CIM, mCIM 和 MHT 试验阳性结果分布(株)

类别	菌株数	CIM	mCIM	MHT
blaKPC	41	38	41	33
blaNDM	18	15	18	12
blaOXA-23	1	1	1	1
blaKPC/NDM	18	17	17	13
blaKPC/VIM	7	7	7	5
blaVIM/NDM	1	1	1	0
blaNDM/IMP	2	2	2	2
blaOXA-48/NDM	2	0	1	0
blaKPC/VIM/OXA-23	2	2	2	2
blaKPC/NDM/IMP	1	1	1	1
合计	93	84	91	69

2.2 CIM, mCIM 和 MHT 试验结果 120 株 CRE 中, CIM 试验阳性 87 株,阴性 33 株;mCIM 试验阳性 94 株,阴性 26 株;MHT 试验阳性 72 株,阴性 48 株。三种方法筛选碳青霉烯酶,差异有统计学意义( $\chi^2 = 12.796, P < 0.05$ )。50 株碳青霉烯类敏感的肠杆菌科细菌三种方法均阴性。

2.3 三种方法性能评价 见表 2。以 PCR 结果作为金标准,对三种方法检测 CRE 的性能进行评价, mCIM 试验的敏感度、特异度和阳性预测值均高于另外两种方法。与 PCR 结果相比较, CIM, MHT 和 mCIM 的一致率分别为 90%, 95% 和 77.4%, Kappa 值分别为 0.898, 0.949 和 0.771。mCIM 和 CIM 试验与 PCR 高度一致。

表 2 CIM, mCIM 和 MHT 试验检测 CP-CRE 性能评价

评价指标	CIM	mCIM	MHT
敏感度(%)	95.6	96.8	95.8
特异度(%)	72.7	92.3	50
阳性预测值(%)	90.3	97.8	74.2
阴性预测值(%)	88.9	88.9	88.9
一致率(%)	90	95	77.4
Kappa 值	0.898	0.949	0.771

## 3 讨论

临床微生物实验室快速准确地检测 CP-CRE 的能力,是有效控制和预防病原菌播散的重要因素,也是实验室管理的一个至关重要的组成部分<sup>[7]</sup>,肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶是导致耐药的主要机制,该

酶常处于可移动的质粒上,细菌通过转移耐药质粒将耐药性传递给其他菌株引起播散。因而,对碳青霉烯酶的快速检测将有利于临床及早采取隔离措施,避免耐药菌的进一步播散。实验室快速鉴定 CP-CRE 是控制其扩散的重要一环,约有 55% 的实验室使用 PCR 的方法来进行鉴定,但耐药基因检测也存在一些缺陷,对实验室条件、人员、技术要求较高,同时也会受检测的基因数量、引物突变等因素的影响而出现假阴性<sup>[8]</sup>,本研究中就有三株细菌, CIM, mCIM 和 MHT 试验均阳性,但未检测到试验中扩增的这 6 种基因型,原因可能是因为 CRE 耐药基因多样,而研究中选择扩增的基因有限。也可能是操作失误或是引物突变而出现的假阴性,具体原因仍需实验论证。虽然目前 PCR 检测耐药基因仍旧是金标准,是流行病学监测和感染防治的基础,但是,基因检测有其不能避免的缺点,因而,仍需要一种快速经济的表型检测方法。表型检测提供了一种成本效益高的筛选过程可快速区分 CP-CRE 和非 CP-CRE,避免不必要的分子检测,且不受已知基因突变或分子靶点数量的限制<sup>[9]</sup>,也无需特殊仪器,人员要求不高,有利于基层实验室中开展。

本研究发现,mCIM 试验敏感度、特异度和一致率高于 CIM 试验,与其他国内外相关报道一致<sup>[10-11]</sup>。CIM 试验是由 VAN DER WALUW 等<sup>[3]</sup>在 2015 年提出的一种操作简便、成本低廉、敏感度高的检测方法,2017 年 CLSI 改良该方法-mCIM 正式纳入标准,用于流行病学调查和感控研究。mCIM 试验用 TSB 替代生理盐水,并将孵育时间延长至 4 h,更有利于细菌的生长,产酶量更充足、水解更充分,同时,可以增强对水解活性较弱、表达水平较低的或需要二价阳离子才能激活的金属酶(B 组耐药基因)的检测,使得敏感度更高<sup>[12-13]</sup>。TAMMA 等报道<sup>[14]</sup>,CIM 试验在 blaKPC, blaNDM 和 blaOXA-48 基因型上敏感度不及 mCIM,本研究中发现 mCIM 对 blaKPC, blaNDM 敏感度可达 100%。且 mCIM 试验不受菌龄、药敏纸片以及细菌是否产黏液影响,使其敏感度和特异度更好。但 mCIM 试验在结果判读中存在一个不确定的范围,即与待测细菌菌液共孵育的美罗培南纸片,若其抑菌圈直径为 16~18mm,则需要再次验证,易导致实验结果的误判。目前,mCIM 试验仅被 CLSI 推荐用于 CRE 的检测,但是耐碳青霉烯的其他细菌(如:铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌)日益增多,其在这些细菌表型检测中的意义如何,仍需更多试验证实。

与 mCIM 试验相比,MHT 步骤更为简单,耗时短,并且对于 A 组(如:blaKPC)和 D 组(如:blaOXA-23)碳青霉烯酶显示较好的检测能力,但是对于 B 组金属酶(如 blaNDM, blaVIM, blaIPM)的检测存在缺

陷,造成该实验总体的敏感度低于其他两种方法,也低于相关报道<sup>[15]</sup>。另外,研究中发现有两株未检测到基因型,且另两种方法均阴性的菌株,MHT 试验阳性,有文献报道细菌产 ESBLs 或者存在高水平的 AmpC 酶,会导致结果出现假阳性<sup>[16-17]</sup>。

相比较而言,mCIM 试验检测 CP-CRE 的性能均高于 CIM 和 MHT,可作为合适的碳青霉烯酶表型筛选试验。

#### 参考文献:

- [1] 张艳双,刘静,万楠,等.耐碳青霉烯类肠杆菌科(CRE)耐药分子机制及控制流行的应对策略[J].现代检验医学杂志,2019,34(2):1-4.  
ZHANG Yanshuang, LIU Jing, WAN Nan, et al. Molecular mechanism of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) resistance and coping strategies for controlling epidemics[J]. J Mod Lab Med, 2019, 34(2): 1-4.
- [2] TAMMA P D, GOODMAN K E, HARRIS A D, 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.
- [3] VAN DER ZWALUW K, DE HAAN A, PLUISTER G N, 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.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-seventh informational supplement. [S]. Wayne: PA, CLSI M100-S27, 2015.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement [S]. Mayne: PA, CLSI M100-S22, 2012.
- [6] MLYNARCIK P, RODEROVA M, KOLAR M. Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae [J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 9(1): e29314.
- [7] PIERCE V M, SIMNER P J, LONSWAY D R, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol. 2017, 55(8): 2321 - 2333.
- [8] 朱明辉,马红映,王卫华,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药性及碳青霉烯类失活法检测分析[J].中华医院感染学杂志. 2019, 29(3): 330-334.  
ZHU Minghui, MA Hongying, WANG Weihua, et al. Drug resistance and carbapenem inactivation method test analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chin J Nosocomiol, 2019, 29(3): 330-334.
- [9] BERESFORD RW, MALEY M. Reduced incubation

- time of the modified carbapenem inactivation test and performance of carbapenem inactivation in a set of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a high proportion of blaIMP isolates [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(7). pii: e01852-18.
- [10] 张凡,李耘,甘露. 改良碳青霉烯灭活试验在检测肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶中的应用评价[J]. 中国临床药理学杂志. 2018,34(24):2857-2860  
ZHANG Fan, LI Yun, GAN Lu. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 34(24): 2857-2860.
- [11] TAMMA P D, SIMNER P J. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates [J]. J Clin Microbiol. 2018, 56(11): e01140-18.
- [12] CROWE A, BRENTON L, KINGSTON M, et al. Comparison of the carbapenem inactivation method (CIM) and modified carbapenem inactivation method (mCIM) for the detection of carbapenemase-producing organisms [J]. Pathology, 2018, 50(7): 764-766.
- [13] 马红玲,肖圣达,杜帅先,等. 碳青霉烯酶3种检测方法间的比较[J]. 临床血液学杂志. 2018,31(2): 105-107.  
MA Hongling, XIAO Shengda, DU Shuaixian, et al. Comparison of three test methods detecting carbapenemases [J]. J Clin Hematol China, 2018, 31(2): 105-107.
- [14] TAMMA P D, OPENE B N, GLUCK A, et al. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol. 2017, 55(4): 1046-1055.
- [15] VASOO S, CUNNINGHAM S A, KOHNER P C, et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 3097-3101.
- [16] SNN kunling, XU Xiuyu, YAN Jinrong, et al. Evaluation of six phenotypic methods for the detection of carbapenemases in gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms [J]. Ann Lab Med, 2017, 37(4): 305-312.
- [17] GIRLICH D, POIREL L, NORDMANN R. Value of the modified hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 477-479.

收稿日期:2019-08-27

修稿日期:2019-10-08

(上接66页)

抗体<sup>[7]</sup>。研究发现RA患者疾病的严重程度与RF和ACPA的水平呈正相关,我们的研究发现RF和ACPA水平升高的RA患者抗核抗体的阳性率也升高。这进一步表明抗核抗体在类风湿的发病中可能发挥着重要的作用。但是我们观察了RA患者ANA阳性病例对应的ANA谱,没有发现阳性抗体,说明ANA在RA发病中作用的具体机制尚不清楚,需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] SUR L M, FLOCA E, SUR D G, et al. Antinuclear antibodies: Marker of diagnosis and evolution in autoimmune diseases [J]. Laboratory Medicine, 2018, 49(3): e62-e73.
- [2] HOFMANN K, CLAUDE A K, MANZ R A. Targeting B cells and plasma cells in autoimmune diseases [J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 835-851.
- [3] CHEN S J, LIN G J, CHEN J W, et al. Immunopathogenic mechanisms and novel immune-modulated therapies in rheumatoid arthritis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6): pii E1332.
- [4] GRYGIEL-GÓRNIK B, ROGACKA N, ROGACKI M, et al. Antinuclear antibodies in autoimmune and allergic diseases [J]. Reumatologia, 2017, 55(6): 298-304.
- [5] TARVIN S E, O'NEIL K M. Systemic lupus erythematosus, sjogren syndrome, and mixed connective tissue disease in children and adolescents [J]. Pediatric Clinics of North America, 2018, 65(4): 711.
- [6] 陈宇翔,赵枰. 临床就诊患者抗核抗体和抗核抗体谱检测结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(6): 140-142, 146.  
CHEN Yuxiang, ZHAO Ping. Analysis of antinuclear antibody and antinuclear antibody spectrum test for the clinical medical patients [J]. J Mod Lab Med, 2015, 30(6): 140-142, 146.
- [7] MAHMUD S A, BINSTADT B A. Autoantibodies in the pathogenesis, diagnosis, and prognosis of juvenile idiopathic arthritis [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 9: 3168.
- [8] 罗改莹,王瑞,周辉,等. 类风湿性关节炎患者血清RF-IgM, RF-IgG检测的临床诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(6): 43-45, 49.  
LUO Gaiying, WANG Rui, ZHOU Hui, et al. Clinical diagnostic value of serum RF-IgM and RF-IgG in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Mod Lab Med, 2018, 33(6): 43-45, 49.

收稿日期:2019-09-16

修回日期:2019-10-15