

临床克雷伯菌属碳青霉烯酶三种检测方法的实验比较研究

白倩¹, 赵雅^{1,2}, 王林²

(1. 陕西中医药大学, 陕西咸阳 712046; 2. 西安市第一医院检验科, 西安 710002)

摘要:目的 对聚合式酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、改良碳青霉烯酶灭活试验 (modified carbapenem inactivation method, mCIM) + EDTA 碳青霉烯酶灭活试验 (EDTA-carbapenem inactivation method, eCIM) 和 GeneXpert 三种方法检测碳青霉烯酶的性能进行了比较, 为临床选择合适的检测方法提供依据。方法 收集 2019 年 1 月~2021 年 5 月临床分离的 43 株碳青霉烯类抗生素耐药及 37 株碳青霉烯类抗生素敏感克雷伯菌属菌株, 用 PCR 法和 GeneXpert 试验检测碳青霉烯酶基因, mCIM+ eCIM 试验检测碳青霉烯酶。以 PCR 法为金标准, 对三种试验方法检测结果进行比较。结果 43 株耐碳青霉烯克雷伯菌属经 PCR 扩增检测有 40 株携带碳青霉烯耐药基因, bla_{KPC} 30 株, bla_{NDM} 8 株, bla_{IMP} 2 株; 37 株碳青霉烯类敏感克雷伯菌属经 PCR 扩增均未检出碳青霉烯酶基因。与 PCR 法结果相比, mCIM+eCIM 试验检测丝氨酸酶及金属酶表型结果敏感度和特异度均为 100%, Kappa 值为 1; GeneXpert 技术敏感度和特异度分别为 94.9%, 97.6%, Kappa 值为 0.925。结论 mCIM+ eCIM 试验和 GeneXpert 与 PCR 结果一致程度强, 但鉴于临床诊断的时效性, GeneXpert 技术操作简单, 耗时短, 结果准确可信且易于判读, 对于有条件的医院, 可以用于临床微生物实验室常规开展。

关键词: 碳青霉烯酶; 聚合式酶链反应; 改良碳青霉烯酶灭活试验; EDTA 碳青霉烯酶灭活试验; GeneXpert
中图分类号: R378.996; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 01-149-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.030

Comparative Study on Three Detection Methods of Clinical Carbapenemase Producing *Klebsiella*

BAI Qian¹, ZHAO Ya^{1,2}, WANG Lin² (1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 710046, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xi'an First Hospital, Xi'an 710002, China)

Abstract: Objective To provide a basis for clinical selection of appropriate detection methods of carbapenemases, compared the difference of three clinical methods, including polymerase chain reaction (PCR), modified carbapenem inactivation method (mCIM) + EDTA synergistic carbapenem inactivation method (eCIM) and GeneXpert, and evaluated their performance. **Methods** Collected 43 carbapenem antibiotic-resistant *Klebsiella* strains and 13 carbapenem antibiotic-sensitive *Klebsiella* strains were collected from January 2019 to May 2021. PCR and GeneXpert test were used to detect carbapenemase gene, and mCIM+eCIM test was used to detect carbapenemase. The PCR method was used as the gold standard to compare the detection results of the three test methods. **Results** 40 out of 43 carbapenem-resistant *Klebsiella* carried carbapenem resistance genes detected by PCR, including 30 bla_{KPC}, 8 bla_{NDM}, and 2 bla_{IMP}. None of the 37 carbapenem-sensitive *Klebsiella* strains detected the carbapenemase gene by PCR. The sensitivity and specificity of the serinase and metalloenzyme phenotypes detected by mCIM+eCIM test were 100%, and the Kappa value was 1. The sensitivity and specificity of GeneXpert technology were 94.9% and 97.6%, respectively, and the Kappa value was 0.925. **Conclusion** Both the mCIM+ eCIM test and GeneXpert have a strong agreement with PCR results. Considering effectiveness, GeneXpert is simple to operate, easy to interpret, time-consuming, accurate, and reliable. It is suitable for routine development in clinical microbiology laboratories.

Keywords: carbapenemase; polymerase chain reaction(PCR); modified carbapenem inactivation method (mCIM); EDTA-carbapenem inactivation method(eCIM); GeneXpert

克雷伯菌属属于肠杆菌科, 是导致肺炎、菌血症、尿路感染以及创口感染的常见医疗相关感染病原菌, 其多重耐药现象是世界公众卫生健康面临的

紧迫挑战。碳青霉烯类抗生素是治疗多重耐药克雷伯菌属感染的首选用药, 但随着临床上此类抗生素的不合理使用, 碳青霉烯耐药克雷伯菌属所致感染

基金项目: 陕西省科技厅基金资助项目 (编号: 2017SF-119)。

作者简介: 白倩 (1997-), 女, 硕士研究生, 检验技师, 从事临床微生物耐药机制研究, E-mail: 1377783840@qq.com。

通讯作者: 赵雅 (1964-), 女, 主任检验师, 研究生导师, 从事临床微生物耐药机制研究及分子生物学研究技术, E-mail: zhaoya2508@sina.com。

不断增多^[1]。我国碳青霉烯耐药机制最常见为产碳青霉烯酶，主要流行类型为KPC型（肺炎克雷伯氏菌碳青霉烯酶）、NDM型（新德里金属 β -内酰胺酶）、IMP型（亚胺培南水解 β -内酰胺酶）以及VIM型（维罗纳整合子编码 β -内酰胺酶），第一种属于丝氨酸酶，后三种属于金属酶，分别由bla_{KPC}、bla_{NDM}、bla_{IMP}和bla_{VIM}基因编码^[2]。碳青霉烯酶遗传和表型检测的相关研究有助于全球监测碳青霉烯耐药菌的多样性和流行性，且快速准确地检测碳青霉烯酶，能够帮助临床及时地制定有效的治疗方案以及实现对医院内感染的监控^[3]。至今尚无一种方法能够快速、准确、简便、经济、全面地检测碳青霉烯酶，本文选取了实验室常见的三种检测方法，以聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）法为金标准，采用改良碳青霉烯酶灭活试验（modified carbapenem inactivation method, mCIM）+ EDTA 碳青霉烯酶灭活试验（EDTA-carbapenem inactivation method, eCIM）和 GeneXpert 法检测克雷伯菌属碳青霉烯酶或碳青霉烯酶基因，对这三种测试进行方法学比较，为临床和实验室选择适合的方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集2019年1月~2021年5月西安市第一医院及西安交通大学第一附属医院临床分离出的克雷伯菌属细菌，共计80株，碳青霉烯类耐药菌株43株，碳青霉烯类敏感菌株37株，剔除同一病人重复菌株，菌株分离鉴定按《全国临床检验操作规程》要求执行。质控菌株为大肠埃希菌（*Escherichia Coli*）ATCC25922，肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705，肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1706。所有菌株均使用菌株保存管于-80℃保存。

1.2 仪器与试剂 GeneXpert®Carba-R 全自动病原体快速检测系统及试剂盒（美国赛沛公司），基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪（德国布鲁克公司），Vitek 2 Compact 全自动细菌药敏分析仪（法国生物梅里埃公司），PCR 扩增仪（美国 Bio-Rad 公司），电泳仪（北京六一仪器厂）；胰蛋白胨大豆肉汤培养基（tryptic soy broth, TSB, 海博生物有限公司），MH 培养基（康泰生物有限公司），EDTA，细菌 DNA 提取试剂盒及 Taq PCR Mix 预混液（上海生工生物有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定及药敏实验：将冻存于-80℃冰箱菌株恢复至室温，使用接种环接种于血琼脂平板上，过夜孵育。使用质谱仪进行细菌菌种鉴定，Vitek 2 Compact 全自动细菌药敏分析仪进行药敏试验。

1.3.2 PCR 法检测耐药基因：采用细菌 DNA 提

取试剂盒提取受试菌全基因组 DNA，引物参考文献[4]设计，交由生工生物有限公司合成，见表1。PCR 反应体系共 25 μ l：DNA 模板 1 μ l，上、下游引物各 1 μ l，Taq PCR Mix 12.5 μ l，ddH₂O 9.5 μ l。扩增产物通过 1.5ml/dl 琼脂糖凝胶 60V 电泳 60min，最终在凝胶成像系统上观察结果。PCR 扩增阳性产物交由奥科生物有限公司进行双向测序，在 NCBI 数据网上（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>）进行 blast 序列比对。

表1 碳青霉烯酶耐药基因 PCR 引物序列

基因	序列 5' → 3'	长度 (bp)	退火温度 (℃)
blaKPC	F:CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R:CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	55
blaNDM	F:GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R:CGGAATGGCTCATCACCAGTC	621	58
blaIMP	F:GGAATAGACTGGCTTAAYTCTC R:GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232	55
blaVIM	F:GATGGTGTGTTGGTCGCATA R:CGAATGCGCAGCACCAG	390	58
blaOXA-48	F:GCGTGGTTAAGGATGAACAC R:CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	58

1.3.3 mCIM+ eCIM 试验检测耐药表型：将冻存的菌株复苏接种于血琼脂平板上，过夜孵育。每个样本取 1 μ l 纯菌落分别加入装有 2ml TSB 肉汤（mCIM 试验）和含 20 μ l 0.5mol/L EDTA 的 2ml TSB 肉汤（eCIM 试验）的试管中，漩涡震荡混匀。每个试管加入 10 μ g 美罗培南药敏纸片，确保肉汤浸没纸片，37℃空气孵育 4h。使用大肠埃希菌 ATCC 25922 与生理盐水配置 0.5 麦氏浓度单位（ 1×10^8 CFU/ml）的菌悬液，将菌悬液均匀涂布于 MH 平板上。将 TSB 肉汤中的美罗培南纸片用无菌棉签挤出多余水分，贴于已涂布有大肠埃希菌 ATCC 25922 的 MH 平板上。倒置平板，37℃空气孵育 18~24h。结果判断：mCIM 试验阳性：美罗培南抑菌圈直径 6~15mm 或直径 16~18mm，但抑菌圈内有散在菌落。mCIM 阴性：抑菌圈直径 ≥ 19 mm。eCIM 试验阳性：与 mCIM 结果相比，抑菌圈直径之差 ≥ 5 mm，则判定为产金属酶类碳青霉烯酶。eCIM 试验阴性：与 mCIM 结果相比，抑菌圈直径之差 ≤ 4 mm，则判定为产丝氨酸类碳青霉烯酶（mCIM 试验阴性则不对 eCIM 试验结果进行解释）。

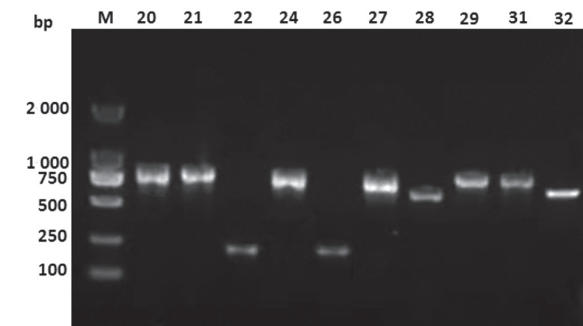
1.3.4 GeneXpert 检测耐药基因：使用一次性接种环挑取受试菌单个菌落，用生理盐水配置成 0.5 麦氏浓度单位菌悬液，取 10 μ l 菌悬液加入样本试剂内，漩涡震荡混匀后取 1.7ml 混合液加入 GeneXpert®Carba-R 检测试剂盒，使用 GeneXpert®Carba-R 检测系统对 bla_{KPC}，bla_{NDM}，

bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48} 耐药基因进行检测。

1.4 统计学分析 采用 WHONET5.6 软件对受试菌分布及耐药情况进行统计分析。采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计数资料比较采用卡方检验。以 PCR 检测耐药基因为金标准,计算 mCIM+eCIM 试验和 GeneXpert 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。Kappa 值 > 0.75 ($P < 0.05$) 说明一致性较好。

2 结果

2.1 PCR 耐碳青霉烯酶基因检出结果 经 PCR 扩增测序后,43 株碳青霉烯耐药克雷伯菌属中,40 株携带耐药基因,3 株未检出耐药基因。在 NCBI 数据库进行 blast 比对,bla_{KPC}-2 有 30 株,bla_{NDM}-5 有 4 株,bla_{NDM}-1 有 4 株,bla_{IMP}-4 有 2 株。主要检出为 bla_{KPC}-2。部分 PCR 碳青霉烯酶基因扩增阳性结果见图 1。37 株碳青霉烯敏感克雷伯菌属均未检出耐药基因。



注: M 为 DNA Marker; 20, 21, 24, 27, 29, 31 为 bla_{KPC}; 28, 32 为 bla_{NDM}; 22, 26 为 bla_{IMP}。

图 1 耐碳青霉烯类克雷伯菌属细菌 bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP} 基因 PCR 扩增产物电泳图

2.2 mCIM 和 eCIM 试验结果 见表 2。40 株碳青霉烯酶基因阳性受试菌中 mCIM 试验阳性 40

株, eCIM 试验阴性(丝氨酸酶阳性)30 株, eCIM 试验阳性(金属酶阳性)10 株。3 株未检出碳青霉烯酶基因的耐碳青霉烯克雷伯菌属 mCIM 试验均为阴性。37 株碳青霉烯酶敏感克雷伯菌属 mCIM 试验均为阴性。

2.3 GeneXpert 检测结果 见表 2。40 株碳青霉烯酶耐药基因阳性受试菌中 GeneXpert 共计检出 38 株携带碳青霉烯酶基因,分别为 27 株携带 bla_{KPC}, 8 株携带 bla_{NDM}, 2 株携带 bla_{IMP}, 1 株携带 bla_{KPC}+bla_{NDM}。3 株未检出碳青霉烯酶基因的耐碳青霉烯克雷伯菌属 GeneXpert 检测结果均为阴性。37 株碳青霉烯酶敏感克雷伯菌属 GeneXpert 检测均为阴性。

2.4 三种方法检测碳青霉烯酶差异及方法学比较 以 PCR 法为金标准, mCIM+eCIM 试验检测丝氨酸酶及金属酶表型结果灵敏度、特异度以及阴、阳性预测值均为 100%, 一致率 100%, Kappa 值为 1。GeneXpert 检测灵敏度为 94.9%, 特异度为 97.6%, 阳性预测值为 97.4%, 阴性预测值为 95.2%, 一致率 96.3% Kappa 值为 0.925。三种方法检测碳青霉烯酶差异及各自优缺点见表 3。

表 2 三种检测方法结果比较

PCR 法	株数	mCIM+eCIM 试验		GeneXpert	
		酶类型	株数	基因型	株数
bla _{KPC}	30	丝氨酸酶	30	bla _{KPC}	27
bla _{NDM}	8	金属酶	10	bla _{NDM}	8
bla _{IMP}	2			bla _{IMP}	2
				bla _{KPC} +bla _{NDM}	1
阴性	40	阴性	40	阴性	42

表 3 三种检测方法特点比较

类别	PCR 法	mCIM+eCIM 试验	GeneXpert
原理	聚合式酶链反应	碳青霉烯类灭活法	实时荧光定量 PCR
检测结果覆盖	全部基因型	全部碳青霉烯酶	bla _{KPC} , bla _{NDM} , bla _{IMP} , bla _{VIM} , bla _{OXA-48}
样本处理	DNA	0.5 麦氏单位菌悬液	0.5 麦氏单位菌悬液
时间	3.5h	22 ~ 28h	1h
结果判读	人工读取特定条带	人工量取抑菌环直径	仪器自动读取结果
优点	金标准	操作简单、成本低,结果准确	操作简单、耗时短、准确率高
缺点	耗时长、效率低、产物易污染	耗时长,无法区别具体的耐药基因	成本较高

2.5 碳青霉烯耐药克雷伯菌属细菌药敏结果分析 43 株耐碳青霉烯克雷伯菌属细菌中检出携带碳青霉烯酶基因的有 40 株,其余三株为非产碳青霉烯酶机制导致的碳青霉烯耐药。43 株耐药菌对亚胺培南、美罗培南的耐药率分别为 97.7% (42/43) 和 100% (43/43), 呈现高度耐药现象, 未有对多黏菌素耐

药菌株检出。三种不同基因型药敏实验结果见表 4, 对 bla_{KPC} 及 bla_{NDM} 两种基因型进行耐药率比较分析, 结果显示 bla_{KPC} 对阿米卡星的耐药率高于 bla_{NDM} ($P < 0.05$), bla_{NDM} 对米诺环素耐药率明显高于 bla_{KPC} ($P < 0.05$)。

表4 43株碳青霉烯耐药克雷伯菌属常用
抗生素耐药率(%)

抗生素	bla _{KPC} (n=30)	bla _{NDM} (n=8)	bla _{IMP} (n=2)	非产酶耐药菌株 (n=3)
妥布霉素	90	75	0	33.3
头孢吡肟	96.7	100	100	100
美罗培南	100	100	100	100
亚胺培南	100	100	100	66.7
阿米卡星	96.7	50	0	33.3
环丙沙星	96.7	100	100	100
左旋氧氟沙星	93.3	100	0	100
复方新诺明	40	62.5	0	100
头孢他啶	96.7	100	100	100
氨基糖苷	96.7	87.5	100	100
头孢哌酮/舒巴坦	96.7	100	100	100
米诺环素	50	100	100	100
哌拉西林/他唑巴坦	100	100	100	100
多黏菌素	0	0	0	0
替加环素	26.7	37.5	0	33.3

3 讨论

1985年以来,碳青霉烯类抗生素一直是治疗多重耐药革兰阴性杆菌感染的首选治疗药物。但随着耐碳青霉烯肠杆菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)出现及全球传播,其多重耐药趋势以及血流感染期间高死亡率特征,已经成为一个日益严重的公共卫生问题^[5-6]。在碳青霉烯耐药机制中,产碳青霉烯酶最为重要,编码碳青霉烯酶的基因通过可移动遗传元件实现耐药基因在菌株或菌种之间的水平传播,含碳青霉烯酶基因的质粒可以通过 *recA* 基因在细菌细胞内形成质粒多聚体,导致碳青霉烯耐药性的增加^[7-8]。研究表明产碳青霉烯酶耐药菌比非产酶耐药菌毒性和传播力更强,且需要实施更多的感染控制干预措施^[9-10]。因此,探究更快更准确地检测碳青霉烯酶方法对指导临床用药以及控制耐药菌株的产生与传播至关重要。本研究发现 mCIM+ eCIM 试验与 GeneXpert 检测碳青霉烯酶与 PCR 法结果高度一致。

传统 PCR 方法作为检测碳青霉烯耐药基因的金标准,需要设计特定引物。若待测基因与靶基因不符、待测基因拷贝数太低以及引物突变会导致假阴性结果,本研究有三株临床药敏实验结果显示碳青霉烯耐药,但未检测到碳青霉烯酶基因,可能是其他耐药机制引起的耐药或者本研究选择扩增的基因有限所导致。PCR 法对实验条件、设备及操作人员的要求较高,临床实验室难以常规开展,因此需

要一种能够快速准确的检出碳青霉烯酶的方法^[11]。

美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的 mCIM 和 eCIM 试验通过碳青霉烯酶水解美罗培南以及 EDTA 能够抑制金属 β -内酰胺酶活性的特点,即使待测菌株低水平表达碳青霉烯酶, mCIM 试验也能准确地检测出^[12]。但目前 mCIM 试验仅被推荐用于肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的检测,在 HOWARD 等^[13]人的研究中, mCIM 被用于检测不同革兰阴性杆菌是否产生碳青霉烯酶,结果显示 mCIM 对产碳青霉烯酶铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌敏感度分别为 74.1% 和 10.0%,对肠杆菌细菌的敏感度为 96.2%。本研究与 2018 年 CLSI 评价 mCIM+ eCIM 试验检测肠杆菌科细菌产丝氨酸酶和金属酶的敏感度、特异度结果相似。但有学者表明丝氨酸酶与金属酶共表达会导致 eCIM 试验筛选金属酶的灵敏度降低,并且 EDTA 对丝氨酸酶的抑制作用会导致结果仅表现金属酶阳性,因此当临床分离到高 MIC 值的肠杆菌科细菌时应注意是否为丝氨酸酶与金属酶共表达菌株^[14]。mCIM 和 eCIM 试验检测碳青霉烯酶以及区分表型具有较高的敏感度和特异度,经济学价值高、操作简单且结果易于判断^[15]。但其检测周期长不能达到快速检测的目的,适用于基层实验室开展,不建议临床微生物实验室将其作为常规检查项目开展。

GeneXpert® Carba-R 试剂盒是由美国赛沛公司研发半巢式实时荧光定量 PCR 技术,是一种自动化的体外检测试验,可以直接采用直肠拭子和临床分离株进行碳青霉烯耐药基因检测,试剂盒内含有对引物,涵盖了在中国流行的主要碳青霉烯类耐药基因(包括 bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP}, bla_{VIM} 以及 bla_{OXA-48}),最新版本的检测试剂盒对 bla_{OXA-48} 的变异体 bla_{OXA-181} 和 bla_{OXA-232} 亦有着很好的检出率^[16-17]。本研究中采用临床分离株进行检测,主要涉及 bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP} 三种基因型的检测,与参考方法相比一致程度高。最近有人将 GeneXpert 技术直接用于深部痰标本中筛选肠杆菌科细菌基因,结果显示其对 bla_{KPC} 和 bla_{NDM} 两种基因型的灵敏度较高,有望成为直接在已知存在 bla_{KPC} 和 bla_{NDM} 型耐药菌感染风险的痰标本中检测和鉴定肠杆菌科细菌的潜在工具^[19]。但这种检测方法的局限性是不能检测到新出现的或罕见的碳青霉烯酶基因,对于疑似产生碳青霉烯酶的菌株和阴性试验结果,应在参考实验室进一步评估是否存在碳青霉烯酶基因^[20]。与其他两种方法相比, GeneXpert 这种分子方法具有更快地识别所涉及的耐药基因、能够允许迅速开始适当治疗的优势^[21]。

综上所述,快速准确地检测出产碳青霉烯酶细菌对于优化抗生素管理、控制感染、改善预后、减缓耐药菌的发展至关重要。临床实验室可以将GeneXpert技术作为快速检测碳青霉烯耐药基因的首要选择,为危急患者争取宝贵的时间。

参考文献:

- [1] 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): 233-243.
HU Fupin, GUO Yan, ZHU Demei, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across tertiary hospitals in 2019 [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 20(3): 233-243.
- [2] ZHANG Yawei, WANG Qi, YIN Yuyao, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections: report from the China CRE network[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2018, 62(2): e01882-17.
- [3] 孙艳. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药机制及实验室检测研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(16):2011-2016.
SUN Yan. Research progress on the mechanism of carbapenems *Enterobacteriaceae* drug resistance and its laboratory testing [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020, 41(16): 2011-2016.
- [4] 刘宇豪,陈晨,次仁曲珍,等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌耐药基因分析[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2):55-57.
LIU Yuhao, CHEN Chen, CIREN Quzhen, et al. Drug sensitivity and resistance gene of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(2): 55-57.
- [5] HAM D C, MAHON G, BHAURLA S K, et al. Gram-negative bacteria harboring multiple carbapenemase genes, United States, 2012-2019[J]. Emerging Infectious Diseases, 2021, 27(9): 2475-2479.
- [6] HAUCK C, COBER E, RICHTER S S, et al. Spectrum of excess mortality due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2016, 22(6): 513-519.
- [7] KOPOTSA K, OSEI S J, MBELLE N M. Plasmid evolution in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a review[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2019, 1457(1): 61-91.
- [8] ABE R, AKEDA Y, SUGAWARA Y, et al. Enhanced carbapenem resistance through multimerization of plasmids carrying carbapenemase genes[J]. mBio, 2021, 12(3): e0018621.
- [9] 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]. Clinical Infectious Diseases, 2017, 64(3): 257-264.
- [10] WILSON G M, SUDA K J, FITZPATRICK M A, et al. Risk factors associated with carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* positive cultures in a cohort of U S veterans[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(8):1370-1378.
- [11] 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, 345.
ZHU Minghui, MA Hongying, WANG Weihua, et al. Drug resistance and carbapenem inactivation method test analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(3):330-334, 345.
- [12] 张青,陈喆,李克诚,等. 改良Hodge与Carba NP和mCIM试验快速检测产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的方法学比较[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(10):1441-1446.
ZHANG Qing, CHEN Zhe, LI Kecheng, et al. A comparative study of modified Hodge test, Carba NP test and mCIM test for rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(10): 1441-1446.
- [13] HOWARD J C, CREIGHTON J, IKRAM R, et al. Comparison of the performance of three variations of the carbapenem inactivation method (CIM, modified CIM [mCIM] and in-house method (iCIM)) for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* and non-fermenters[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 21:78-82.
- [14] 王永红,刘航,邹家齐,等. mCIM与eCIM检测肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的临床评价[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(5): 466-472.
WANG Yonghong, LIU Hang, ZOU Jiaqi, et al. Evaluation on clinical application of mCIM and eCIM in detection of carbapenemase from *Enterobacteriaceae* Bacteremia [J]. Journal of Third Military Medical University, 2020, 42(5): 466-472.
- [15] 杨巧玲,王梦鹤,林玉玲,等. 五种方法检测产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的卫生经济学评价[J]. 中国循证医学杂志, 2020, 20(2): 227-233.
YANG Qiaoling, WANG Menghe, LIN Yuling, et al. Health economics assessment of five methods for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2020, 20(2): 227-233.
- [16] HAN Renru, SHI Qingyu, WU Shi, 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.
- [17] TRACZEWSKI M M, CARRETTO E, CANTON R, et al. Multicenter evaluation of the Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase genes in Gram-Negative isolates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(8): e00272-18.
- [18] JIN Xi, ZHANG Haomin, WU Shi, et al. Multicenter evaluation of Xpert Carba-R assay for detection and identification of the carbapenemase genes in rectal swabs and clinical isolates[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2021, 23(1): 111-119.