

• 短篇论著 •

CRKP 对头孢他啶-阿维巴坦的耐药性及碳青霉烯酶表型的分析^{*}

吴海燕¹, 孙 霞², 张 锋³, 姜梅杰⁴, 张志军⁴, 曹身云^{4△}

1. 青岛大学附属泰安市中心医院重症医学科, 山东泰安 271000; 2. 滨州市妇幼保健院检验科, 山东滨州 256600; 3. 青岛大学附属泰安市中心医院超声诊疗中心, 山东泰安 271000; 4. 青岛大学附属泰安市中心医院检验科, 山东泰安 271000

摘 要:目的 明确泰安市中心医院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)对头孢他啶-阿维巴坦(CZA)的耐药性及所产碳青霉烯酶的表型,为临床合理使用抗菌药物提供理论依据。方法 回顾性分析泰安市中心医院 2020 年 6 月至 2021 年 12 月从临床标本中分离培养出的 100 株非重复 CRKP。利用 Autof ms1000 全自动微生物质谱仪进行菌株鉴定。采用纸片扩散法进行 CZA 药敏试验,当抑菌圈直径在 20~22 mm 时,用 CZA 的 E-test 条进行复核。采用 WHONET5.6 软件对 CZA 的耐药率进行统计分析。采用胶体金免疫层析法检测 CRKP 所产碳青霉烯酶的表型。结果 CRKP 对 CZA 的耐药率为 24%(24/100)。100 株 CRKP 中,产 KPC 型碳青霉烯酶的 73 株(73%),产 NDM 型碳青霉烯酶的 10 株(10%),同时产 KPC、NDM 型碳青霉烯酶的 12 株(12%),同时产 IMP、NDM 型碳青霉烯酶的 1 株(1%),未检出碳青霉烯酶的 4 株(4%)。结论 泰安市中心医院 CRKP 以产 KPC 型碳青霉烯酶为主,其次是同时产 KPC、NDM 型碳青霉烯酶及产 NDM 型碳青霉烯酶。CRKP 产 KPC 型碳青霉烯酶时对 CZA 的敏感性较好,产 NDM 型碳青霉烯酶时对 CZA 的敏感性较差。

关键词:耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 碳青霉烯酶; 头孢他啶-阿维巴坦

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.22.022

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2022)22-2798-03

文献标志码:A

肺炎克雷伯菌(KP)是我国临床感染性疾病的第二大致病菌,可引起呼吸系统、泌尿系统和组织感染等^[1]。近年来,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)不断出现,且检出率呈迅速上升趋势,给人类健康造成严重威胁^[2-3]。CRKP 通常呈现泛耐药,仅有多黏菌素和替加环素敏感性较好,但由于药物不良反应等原因^[4],临床医生常无药可用。因此,迫切需要一种新的、有效的抗菌药物来治疗 CRKP 引起的感染。头孢他啶-阿维巴坦(CZA)是一种新型的 β -内酰胺合剂,阿维巴坦能够抑制多种类型的 β -内酰胺酶,保护头孢他啶的杀菌作用^[5],可用于治疗 CRKP 的感染^[6]。由于该药在我国上市时间较短,对其耐药性的研究和报道较少,为此,本研究就 CRKP 对头孢他啶-阿维巴坦的耐药性及碳青霉烯酶表型进行分析,以期临床治疗 CRKP 感染提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 本研究菌株来源为泰安市中心医院 2020 年 6 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日从临床标本中分离培养出的 100 株非重复 CRKP。CRKP 定义为对亚胺培南、美罗培南或厄他培南中任何一种药物耐药的肺炎克雷伯菌^[7]。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC25922。

1.2 仪器与试剂 Autof ms1000 全自动微生物质谱

仪和巧克力平板为郑州安图生物有限公司产品。CZA 纸片为英国 Oxiod 公司产品。CZA 的 E-test 条为温州康泰生物科技有限公司产品,NG-Test CAR-BA5 碳青霉烯酶检测试剂盒为复星诊断科技(上海)有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定 细菌的分离培养严格按照《全国临床检验操作规程》第三版^[8]进行。取巧克力平板纯化培养过夜的单个菌落采用 Autof ms1000 全自动质谱仪进行菌株鉴定。

1.3.2 CZA 药敏试验 CZA 药敏试验首先采用纸片扩散法进行,抑菌圈直径 ≥ 21 mm 为敏感,抑菌圈直径 ≤ 20 mm 为耐药。对于抑菌圈直径在 20~22 mm 的细菌,由于纸片扩散法容易出现假敏感或假耐药,因此用 CZA 的 E-test 条进行复核^[9]。药敏试验和结果判读参照 2021 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)抗菌药物敏感性试验执行标准 M100^[9]。

1.3.3 碳青霉烯酶表型检测 采用胶体金免疫层析法检测细菌所产碳青霉烯酶的表型^[10-11],具体试验方法和结果判读参照试剂盒说明书。将检测卡和提取缓冲液平衡至室温,滴入 5 滴(约 150 μ L)提取缓冲液于无菌 EP 管中。使用 1 μ L 无菌接种环取巧克力平板纯培养过夜的细菌,在 EP 管管壁轻轻研磨,形成均

^{*} 基金项目:山东省保健科技协会科学技术课题(SDBJKT20180033);山东病理生理学会专项科研基金(2021BS004)。

[△] 通信作者, E-mail:15288929959@163.com。

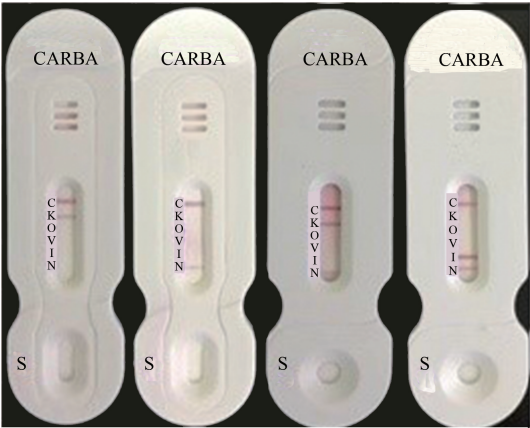
匀的细菌混悬液。使用一次性移液管,吸取 5 滴(约 100 μ L)制备好的细菌混悬液,加入检测卡标记了“S”的标本孔中,室温放置 15 min,读取结果。如果只有 C 线区域出现一条红线,说明标本中不含检测试剂盒所检测的 5 种碳青霉烯酶或碳青霉烯酶含量低于检测试剂盒的检测限,判读为阴性结果。如果在 C 线区域出现一条红线,并且在 K、O、V、I、N 线区域出现一条或者多条红线,判读为阳性结果。如果 C 线区域未出现红线,说明测试结果无效。

1.4 统计学处理 CZA 耐药率统计应用 WHO-NET5.6 软件,计数资料采用频数、率表示。参照 2021 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)抗菌药物敏感性试验执行标准 M100 进行统计分析。

2 结 果

2.1 CZA 药敏试验结果 100 株 CRKP 中对 CZA 耐药 24 株,敏感 76 株,CZA 的耐药率为 24%(24/100)。

2.2 胶体金免疫层析法碳青霉烯酶结果 100 株 CRKP 中,产 KPC 型碳青霉烯酶的 73 株(73%),产 NDM 型碳青霉烯酶的 10 株(10%),同时产 KPC、NDM 型碳青霉烯酶的 12 株(12%),同时产 IMP、NDM 型碳青霉烯酶的 1 株(1%),未检出碳青霉烯酶的 4 株(4%)。见图 1、表 1。



注:从左至右依次为产 KPC、NDM、KPC+NDM、IMP+NDM 型碳青霉烯酶。

图 1 胶体金免疫层析法碳青霉烯酶检测结果

表 1 对 CZA 不同耐药性的 CRKP 碳青霉烯酶检测结果(n)

耐药性	n	KPC	NDM	KPC+NDM	IMP+NDM	未检出碳青霉烯酶
耐药	24	0	10	12	1	1
敏感	76	73	0	0	0	3
合计	100	73	10	12	1	4

3 讨 论

2020 年中国细菌耐药监测网结果显示,KP 对亚胺培南和美罗培南的耐药率从 2005 年的 3.0%和

2.9%上升至 2020 年的 23.2%和 24.2%^[12]。尤其是长期住院和住重症监护室的患者,CRKP 的检出已不再罕见。CRKP 对常用抗菌药物耐药率高,常呈现泛耐药,只有多黏菌素类和替加环素敏感性较好。但由于多黏菌素与较高的肾毒性风险相关,而且静脉使用可能对肺炎无效^[9]。替加环素常规剂量使用时治疗效果不理想,高剂量使用时,副作用也随之增大,而且不适用于泌尿系感染^[9],导致临床常面临无药可用的境地^[13]。因此,急需一种新型有效的抗菌药物来治疗 CRKP 导致的感染。CRKP 对碳青霉烯类药物耐药的机制有:产碳青霉烯酶、外膜蛋白缺失、主动外排系统活跃等。其中最主要的机制是产碳青霉烯酶,CRKP 中常见的碳青霉烯酶有 KPC、NDM、IMP、OXA、VIM 等^[14]。

CZA 是美国食品和药品监督局第一个批准的用于治疗碳青霉烯耐药肠杆菌目细菌所致感染的新型 β -内酰胺合剂。CZA 是三代头孢菌素头孢他啶和新型酶的抑制剂阿维巴坦相结合,其中阿维巴坦比传统的 β -内酰胺酶抑制剂具有更高的分子活性,可以抑制多种类型分解头孢他啶的 β -内酰胺酶,而保护头孢他啶的杀菌作用。阿维巴坦可以抑制的 β -内酰胺酶包括 A 类酶(如 KPC-2 等)、C 类酶和某些 D 类酶(主要是 OX-48 等),但对 B 类金属酶无抑制作用,如 NDM、IMP、VIM 等^[5,15]。阿维巴坦的作用机制与传统的 β -内酰胺酶抑制剂有所不同,主要区别在于传统的 β -内酰胺酶抑制剂在与 β -内酰胺酶结合时,结构被破坏而失活;而阿维巴坦在与 β -内酰胺酶共价结合的过程中不会被水解,经环合形成内酰胺环后,阿维巴坦的活性又可以恢复^[5]。而且阿维巴坦不会诱导 β -内酰胺酶产生^[16],这也是优于传统 β -内酰胺酶的重要特点。CZA 可用于治疗碳青霉烯耐药肠杆菌目细菌所引起的医院获得性和呼吸机相关性细菌性肺炎、泌尿系感染、腹腔感染等疾病^[5],是治疗产 KPC 和 OXA-48 型碳青霉烯酶肠杆菌目细菌的最佳选择^[16]。

本研究中 CRKP 对 CZA 的耐药率为 24%(24/100),高于周琴等^[17]报道的成都地区 16.67%的耐药率,与许晓波^[18]的研究结果(24.8%)基本一致。本研究中对 CZA 耐药的 CRKP 有 24 株,其中产 NDM 型碳青霉烯酶的有 10 株,同时产 KPC、NDM 型碳青霉烯酶的有 12 株,同时产 IMP、NDM 型碳青霉烯酶的有 1 株,未检出碳青霉烯酶的 1 株;对 CZA 敏感的 CRKP 有 76 株,其中产 KPC 型碳青霉烯酶的 73 株,未检出碳青霉烯酶的 3 株。本研究中产 KPC 型碳青霉烯酶的 CRKP 对 CZA 的敏感率为 100%(73/73),而所有产 NDM 型碳青霉烯酶的 CRKP 对 CZA 的耐药率为 100%(23/23)。因此,对于 CRKP 导致的感染,应首先明确细菌所产碳青霉烯酶的类型。当 CRKP 产 KPC 型碳青霉烯酶时,其对 CZA 的敏感性较好,可以选择用 CZA 来抗感染治疗;而当 CRKP 产

NDM 型碳青霉烯酶时,通常对 CZA 耐药,应避免使用 CZA 进行治疗。此外,对于产金属酶的 CRKP 选择 CZA 和氨曲南进行联合用药也有治疗成功的报道^[19-20]。

本研究中 CRKP 以产 KPC 型碳青霉烯酶为主(占 73%),与相关文献报道一致^[21]。4 株 CRKP 未检出碳青霉烯酶,可能的原因有:该碳青霉烯检测试剂盒只能检测 KPC、NDM、IMP、VIM、OXA 等五种常见的碳青霉烯酶表型,若细菌含有 SME、IMI 等不常见的碳青霉烯酶表型则无法检出;也可能是细菌存在除产生碳青霉烯酶以外的耐药机制,如膜孔蛋白缺失或突变使膜的通透性下降或主动外排系统活跃等。

综上所述,本院 CRKP 以产 KPC 型碳青霉烯酶为主,其次是同时产 KPC、NDM 型碳青霉烯酶及产 NDM 型碳青霉烯酶。CRKP 产 KPC 型碳青霉烯酶时对 CZA 的敏感性较好,产 NDM 型碳青霉烯酶时对 CZA 的敏感性较差。因此对于 CRKP 导致的感染,首先要明确细菌所产碳青霉烯酶的表型,才能更好地指导临床合理使用抗菌药物。

参考文献

[1] KONTOPOULOU K, IOSIFIDIS E, ANTONIADOU E, et al. The clinical significance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* rectal colonization in critically ill patients: from colonization to bloodstream infection[J]. J Med Microbiol, 2019, 68(3):326-335.

[2] 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌流行病学变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(2):175-179.

[3] CASSINI A, HÖGBERG L D, PLACHOURAS D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European economic area in 2015: a population-level modeling analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(1):56-66.

[4] 马元吉, 刘真真, 唐光敏. 耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌感染治疗的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(11):1450-1453.

[5] 赵锦锦, 张菁. 头孢他啶-阿维巴坦药品说明书[J]. 国外医药(抗生素分册), 2019, 40(2):115-127.

[6] SHIRLEY M. Ceftazidime-avibactam: a review in the treatment of serious gram-negative bacterial infections [J]. Drugs, 2018, 78(6):675-692.

[7] 喻华, 徐雪松, 李敏, 等. 肠杆菌目细菌碳青霉烯酶的实验室检测和临床报告规范专家共识(第二版)[J]. 中国感染与化疗杂志, 2022, 22(4):463-474.

[8] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2015:629-645.

[9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: CLSI

supplement M100[S]. 31th ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2021.

[10] LILIANA G, BARBARA F, TIZIANA D, et al. Simplified testing method for direct detection of carbapenemase-producing organisms from positive blood cultures using the NG-Test CARBA5 assay[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(7):1-5.

[11] BOUTAL H, VOGEL A, BERNABEU S, et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM, KPC, IMP and VIM type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(4):909-915.

[12] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4):377-387.

[13] 曹身云, 刘晶, 李震, 等. 2015-2019 年耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(5):563-567.

[14] HAN R R, SHI Q Y, WU S, 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.

[15] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会, 中华医学会检验医学分会临床微生物学组, 中华医学会微生物学与免疫学分会临床微生物学组. 多黏菌素类与替加环素及头孢他啶/阿维巴坦药敏方法和报告专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(10):964-972.

[16] 李国强. 头孢他啶-阿维巴坦在耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染治疗中的作用[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4):480-484.

[17] 周琴, 杨向贵, 王丹, 等. 头孢他啶/阿维巴坦对耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的体外抗菌活性分析[J]. 华西医学, 2020, 35(8):918-923.

[18] 许晓波. 头孢他啶-阿维巴坦对抗碳青霉烯类肠杆菌属细菌的体外敏感性分析[J]. 中国乡村医药, 2020, 27(20):51-52.

[19] BENCHETRIT L, MATHY V, ARMAND-LEFEVRE L, et al. Successful treatment of septic shock due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* using ceftazidime/avibactam combined with aztreonam in solid organ transplant recipients: report of two cases[J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 55(1):105842.

[20] FALCONE M, DAIKOS G L, TISEO G, et al. Efficacy of ceftazidime-avibactam plus aztreonam in patients with bloodstream infections caused by met allo-β-lactamase-producing Enterobacterales[J]. Clin Infect Dis, 2021, 72(11):1871-1878.

[21] 龙华婧, 邱芳华, 刘道利, 等. 中国 2017—2019 年耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌耐药基因及流行克隆特征[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(11):1008-1015.