

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.19.007

肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦的耐药性分析

杨 铭, 苏 博, 台锦阁, 汪定成, 邵海连, 张霄霄, 张 倩, 董 轲[△]
空军军医大学第二附属医院检验科, 陕西西安 710038

摘 要:目的 探讨肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦的耐药性。方法 选取 2018 年 1 月至 2020 年 6 月该院检出的 1 785 株肺炎克雷伯菌为研究对象, 对其进行药敏试验。采用改良碳青霉烯类灭活法(mCIM)和乙二胺四乙酸碳青霉烯类灭活法(eCIM)检测耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的碳青霉烯酶和金属 β -内酰胺酶; 采用碳青霉烯酶抑制增强试验检测 CRKP 的丝氨酸酶和金属 β -内酰胺酶。对 19 株 CRKP 进行碳青霉烯酶耐药基因检测。**结果** 1 785 株肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦的敏感率为 95.49%, 121 株 CRKP 对头孢他啶/阿维巴坦的敏感率为 80.17%。101 株 CRKP mCIM 阳性(83.5%), 其中 22 株 eCIM 阳性(21.8%); 碳青霉烯酶抑制增强试验检测出 78 株产丝氨酸酶, 22 株产金属 β -内酰胺酶, 1 株同时产丝氨酸酶和金属 β -内酰胺酶。19 株进行碳青霉烯酶耐药基因检测的 CRKP 中, 15 株检测出 blaKPC-2, 3 株检测出 blaNDM-1, 1 株同时检测出 blaNDM-1 和 blaKPC-2。**结论** 头孢他啶/阿维巴坦是治疗临床肺炎克雷伯菌感染, 尤其是 CRKP 感染的有效药物, 碳青霉烯酶耐药基因鉴定具有临床指导意义。

关键词:肺炎克雷伯菌; 头孢他啶/阿维巴坦; 碳青霉烯酶; 耐药基因

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)19-2813-04

Analysis of the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to ceftazidime/avibactam

YANG Ming, SU Bo, TAI Jin'ge, WANG Dingcheng, SHAO Hailian,
ZHANG Xiaoxiao, ZHANG Qian, DONG Ke[△]

Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Air Force
Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China

Abstract: Objective To investigate the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to ceftazidime/avibactam. **Methods** Selected 1 785 *Klebsiella pneumoniae* strains detected in this hospital from January 2018 to June 2020 as the research objects, carried out drug sensitivity test. The modified carbapenem inactivation method (mCIM) and the ethylenediaminetetraacetic acid carbapenem inactivation method (eCIM) were used to detect carbapenemase and metal β -lactamase, carbapenemase inhibition enhancement test was used to detect serinase and metal β -lactamase of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP). Carried out carbapenemase resistance gene detection in 19 CRKP strains. **Results** The sensitivity rate of 1 785 *Klebsiella pneumoniae* strains to ceftazidime/avibactam was 95.49%, and the sensitivity rate of 121 CRKP strains to ceftazidime/avibactam was 80.17%. A total of 101 CRKP strains were positive for mCIM (83.5%), of which 22 strains were positive for eCIM (21.8%). The carbapenemase inhibition enhancement test detected 78 strains producing serinase, 22 strains producing metal β -lactamase, and 1 strain producing both serinase and metal β -lactamase. A total of 19 CRKP strains were detected the carbapenemase resistance genes, of which 15 strains detected blaKPC-2, 3 strains detected blaNDM-1, and 1 strain detected both blaNDM-1 and blaKPC-2. **Conclusion** Ceftazidime/avibactam is an effective drug for the treatment of clinical *Klebsiella pneumoniae* infections, especially CRKP infections, and the identification of carbapenemase resistance genes has clinical guiding significance.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; ceftazidime/avibactam; carbapenemase; drug resistance gene

肺炎克雷伯菌是临床常见的引起严重感染的重要病原菌, 近年来, 其检出率和耐药率逐年增高, 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的耐药率由 2013 年的 4.9% 上升至 2019 年的 10.9%, 使临床抗感染治疗愈加困难^[1-2]。新型抗菌药物头孢他啶/阿维巴坦

可有效抑制 β -内酰胺酶, 能用于严重革兰阴性菌感染的治疗^[3], 这为临床治疗和预防肺炎克雷伯菌, 特别是 CRKP 引起的严重感染提供了新的途径。本研究通过分析肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦的耐药性, 以期临床抗感染治疗提供实验依据。现将结果

作者简介: 杨铭, 女, 主管技师, 主要从事临床微生物检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: drdongke@163.com。

本文引用格式: 杨铭, 苏博, 台锦阁, 等. 肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦的耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(19): 2813-2815.

报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取 2018 年 1 月至 2020 年 6 月本院检出的肺炎克雷伯菌 1 785 株为研究对象。

1.2 仪器与试剂 头孢他啶(30 μg)/阿维巴坦(20 μg)药敏纸片(英国 Oxoid 公司),VITEK MS 全自动快速微生物质谱检测系统(法国生物梅里埃公司),WalkAway 96 Plus 全自动细菌鉴定及药敏分析仪(美国贝克曼库尔特公司),Thermal cycler 型 PCR 仪(美国 ABI 公司),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),DYY-8C 型稳压稳流定时电泳仪(北京六一生物科技有限公司),Mini BIS PRO 凝胶成像系统分析仪(以色列 DNR 公司)。TapDNA 聚合酶(日本 TaKaRa 公司),琼脂糖(美国 Invitrogen 公司),胰蛋白胨、酵母浸出物(英国 Oxoid 公司),DL2000 DNA Marker、溴化乙锭(北京鼎国生物技术有限公司)。PCR 扩增引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,其余试剂为实验室自行配制。

1.3 方法

1.3.1 药敏试验 采用 WalkAway 96 Plus 全自动细菌鉴定及药敏分析仪检测 1 785 株肺炎克雷伯菌对 21 种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)。对 CRKP 补充头孢他啶/阿维巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、米诺环素及多黏菌素 B 的药敏试验,结果根据美国临床和实验室标准协会(CLSI) 2020 版相关标准进行判断。

1.3.2 改良碳青霉烯类灭活法(mCIM)和乙二胺四乙酸碳青霉烯类灭活法(eCIM) 对 CRKP 进行检测,取 A、B 两支含 2 mL 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)的试管,B 管加入 20 μL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液混匀,再向 A、B 管中分别加入 1 μL 已在血平板上孵育 18~24 h 的待检细菌,震荡混匀 10~15 s。A、B 管中分别放入 1 张含 10 μg 美罗培南的无菌纸片,确认纸片浸没于菌悬液中,35 ℃ 4 h 孵育;孵育结束后,用接种环分别将 A、B 管中的美罗培南纸片取出,贴于同一块已涂布有 0.5 麦氏浊度大肠埃希菌 ATCC 25922 的 MH 琼脂平板上。根据 CLSI 2020 相关标准进行结果判断。

1.3.3 碳青霉烯酶抑制增强试验 将 0.5 麦氏浊度的 CRKP 菌悬液均匀涂布于 MH 琼脂平板上,贴 4 张亚胺培南纸片,1 张纸片不滴加任何液体,1 张纸片滴加 10 μL 氨基乙基二苯硼酸酯(APB)溶液,1 张纸片滴加 10 μL EDTA 溶液(初始浓度 0.1 mol/L),1 张纸片同时滴加 APB 溶液和 EDTA 溶液各 10 μL。过夜孵育,量取抑菌圈直径。结果判读如下:如滴加 APB 溶液使抑菌圈直径扩大 5 mm 以上,判断为产 A 类碳青霉烯酶;如滴加 EDTA 溶液使抑菌圈直径扩大 5 mm 以上,判断为产 B 类碳青霉烯酶;如同时滴加 APB 和 EDTA 溶液使抑菌圈直径扩大 5 mm 以上,则判断为同时产 A 类和 B 类碳青霉烯酶。

1.3.4 碳青霉烯酶耐药基因检测 对 2020 年 1—6 月收集的 19 株 CRKP 进行碳青霉烯酶耐药基因检测,参考文献[4-5]设计引物。PCR 反应体系为 20 μL,包括 2×Taq PCR Master Mix 10 μL,引物 1 μL,DNA 模板 1 μL,双蒸水 8 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;最后再 72 ℃ 延伸 4 min。扩增产物送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序,序列经 BLAST 数据库进行比对分析。

1.4 统计学处理 采用 Excel 2010 进行数据分析。

2 结果

2.1 菌株分布 1 785 株肺炎克雷伯菌分离自痰液的占 63.47%,分离自血液的占 10.25%,分离自尿液的占 9.36%,其他来源占 16.92%;检出率位于前 9 位的科室依次为脑外科(25.77%)、神经内科(12.83%)、呼吸科(10.14%)、胸外科(6.61%)、重症监护室(6.55%)、血液科(4.87%)、骨科(4.08%)、普外科(2.91%)、中医科(2.24%)。121 株 CRKP 主要分离自重症监护室。

2.2 药敏试验结果 1 785 株肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦的敏感率为 95.49%,药敏试验结果见表 1。121 株 CRKP 对头孢他啶/阿维巴坦的敏感率为 80.17%,药敏试验结果见表 2。

表 1 1 785 株肺炎克雷伯菌药敏试验结果(%)

抗菌药物	敏感	耐药	中介
头孢他啶/阿维巴坦	95.49	4.51	0.00
头孢西丁	65.55	29.25	5.20
头孢吡肟	53.21	46.56	0.23
头孢他啶	59.50	39.38	1.22
头孢呋辛	46.79	51.95	1.26
头孢曲松	48.95	50.87	0.18
头孢噻肟	45.63	53.66	0.71
氮曲南	49.84	48.82	1.34
哌拉西林/他唑巴坦	69.12	27.09	3.79
氨苄青霉素/舒巴坦	42.57	49.94	7.49
亚胺培南	77.52	22.37	0.11
美罗培南	77.34	22.54	0.12
厄他培南	75.80	24.07	0.13
环丙沙星	56.93	38.46	4.62
左氧氟沙星	63.72	33.05	3.23
庆大霉素	63.78	34.88	1.34
妥布霉素	58.93	31.17	9.90
阿米卡星	81.75	17.56	0.69
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑	54.04	45.90	0.06
氮曲南	66.98	31.67	1.35
替加环素	98.54	1.19	0.27

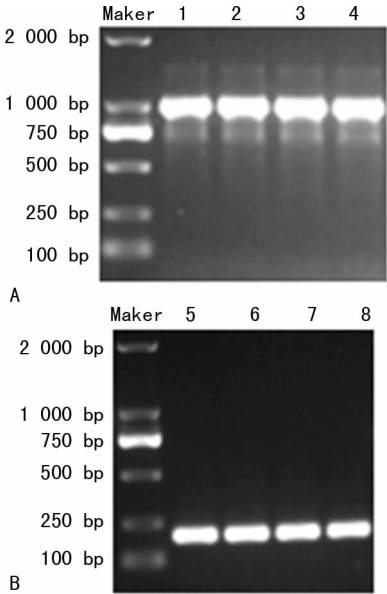
2.3 mCIM 及 eCIM 检测结果 对 121 株 CRKP 进行 mCIM 及 eCIM 检测,其中 101 株 mCIM 阳性,占

83.5%(101/121),产碳青霉烯酶;101 株 mCIM 阳性菌株中,22 株 eCIM 阳性,占 21.8%(22/101),产金属 β -内酰胺酶。

表 2 121 株 CRKP 对补充抗菌药物的药敏试验结果(%)			
抗菌药物	敏感	耐药	中介
头孢他啶/阿维巴坦	80.17	19.83	0.00
米诺环素	52.23	15.64	32.12
多黏菌素 B	0.00	0.00	100.00
头孢哌酮/舒巴坦	3.63	93.07	3.30

2.4 碳青霉烯酶抑制增强试验结果 对 121 株 CRKP 进行碳青霉烯酶抑制增强试验,78 株产丝氨酸酶,占 64.5%;22 株产金属 β -内酰胺酶,占 18.2%;1 株同时产丝氨酸酶和金属 β -内酰胺酶(该菌株在 mCIM 和 eCIM 联合检测时被误判为仅产丝氨酸酶),占 0.83%。

2.5 碳青霉烯酶耐药基因检测结果 对 19 株 CRKP 进行 blaKPC-2、blaIMP、blaVIM、blaGIM、blaSPM、blaNDM-1、blaOXA-48 共 7 种常见碳青霉烯酶耐药基因的扩增,其中 15 株检测出 blaKPC-2,3 株检测出 blaNDM-1,1 株同时检测出 blaNDM-1 和 blaKPC-2。见图 1。



注:A 为部分菌株耐药基因 blaKPC-2 的检测结果,其中 1 为阳性对照,2~4 为临床菌株;B 为耐药基因 blaNDM-1 的检测结果,其中 5 为阳性对照,6~8 为临床菌株。

图 1 碳青霉烯酶耐药基因 PCR 产物电泳图

3 讨 论

近年来,由于广谱抗菌药物的广泛使用,肺炎克雷伯菌耐药情况日趋严峻。肺炎克雷伯菌感染,尤其是 CRKP 感染的控制和治疗成为临床重点关注的问题。肺炎克雷伯菌的耐药机制主要包括产超广谱 β -内酰胺酶、碳青霉烯酶、头孢菌素酶(AmpC),膜孔蛋白缺失或突变,外排泵过度表达等。肺炎克雷伯菌对

碳青霉烯类耐药最常见的原因是产碳青霉烯酶^[6]。Ambler 分类法将碳青霉烯酶分为 A、B、D 3 类,A 类酶包括 KPC、GES、IMI、SME 和 SFC,其活性部位含有丝氨酸结构,属于丝氨酸酶,部分可被克拉维酸抑制;B 类酶包括 NDM、VIM、SPM、GIM、SIM 和 IMP,其活性部位含有锌离子,属于金属酶,能被 EDTA 抑制;D 类酶主要包括 OXA-48。阿维巴坦可抑制 A 类和某些 D 类碳青霉烯酶。

本研究中,CRKP 对头孢他啶/阿维巴坦的耐药率为 19.83%,对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率为 93.07%,该结果与国内同类研究类似^[7];而 CRKP 对米诺环素的耐药率为 15.64%,低于同类研究^[7]。本研究对 121 株 CRKP 进行了 mCIM 和 eCIM 检测,产碳青霉烯酶菌株检出率为 83.5%,其中产金属 β -内酰胺酶菌株占 21.8%,该结果比其他研究产碳青霉烯酶菌株的检出率(44.83%)高^[8],可能与地区差异和菌株流行差异有关。1 株同时产丝氨酸酶和金属 β -内酰胺酶的 CRKP 在 mCIM 和 eCIM 联合检测时被误判为仅产丝氨酸酶,而在碳青霉烯酶抑制增强试验中,该菌株被准确检测出了上述两种酶。碳青霉烯酶抑制增强试验能够准确检测酶型,但除了 A 类酶和 B 类酶以外,其不能有效区分是否产碳青霉烯酶,还是仅为碳青霉烯酶和/或 AmpC 酶合并膜孔蛋白的下调或缺失。提示 mCIM、eCIM 和碳青霉烯酶抑制增强试验联合使用可能更准确地检测出 D 类酶^[9]。本研究检测出 2 种碳青霉烯酶基因 blaKPC-2 和 blaNDM-1,未检测出 blaIMP、blaVIM、blaOXA-48 等基因型和变异,可能与检测的样本量较少有关^[10]。

肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦敏感,CRKP 导致的严重感染也可使用头孢他啶/阿维巴坦治疗。药敏试验和碳青霉烯酶耐药基因鉴定对合理使用抗菌药物具有重要意义。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会合理用药专家委员会,全国细菌耐药监测网. 2019 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国合理用药探索,2021,18(3):1-11.

[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会合理用药专家委员会,全国细菌耐药监测网. 2018 年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国执业药师,2020,17(1):1-10.

[3] 黄天敏,杨映霞,姜赛平,等. 头孢他啶阿维巴坦的临床应用进展[J]. 中国新药与临床杂志,2019,38(3):129-134.

[4] 王芳,魏任雄,张肖肖,等. 产碳青霉烯酶阴沟肠杆菌耐药特性及耐药基因分析[J]. 中国消毒学杂志,2018,35(1):17-19.

[5] 胡咏梅,邹明祥,李军,等. 同一患者不同部位分离耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药机制研究及同源性分析[J]. 临床检验杂志,2017,35(7):511-513.

[6] BASSETTI M, PEGHIN M, MESINI A, et al. Optimal management of complicated infections(下转第 2819 页)

能发生了变化,或是多种因素相互作用的结果,其确切机制仍有待继续研究。BMI 是 NT-proBNP 水平的独立影响因素,肥胖者心肌细胞神经肽的合成和释放功能受损,释放利钠肽减少,从而影响 NT-proBNP 水平^[11]。利钠肽清除受体在脂肪组织中含量丰富,说明脂肪细胞可能参与了 NT-proBNP 在血液循环中的清除过程。有研究表明,糖基化失调可能对 NT-proBNP 水平也有一定影响^[12]。三酰甘油对 NT-proBNP 的影响可归因于非血流动力学因素。NT-proBNP 主要通过肾脏排泄,受肾功能影响较大^[13]。本研究中尿素氮是健康儿童 NT-proBNP 水平的独立影响因素,验证了 SHENKMAN 等^[14]的报道。SAI 等^[10]的研究发现,年龄、血脂、肾功能等均与 NT-proBNP 水平有显著相关性,上述因素对 NT-proBNP 的生物学影响仍有待进一步确定,但可以确定的是根据影响因素来探讨人群 NT-proBNP 参考范围具有重要的意义。

综上所述,2~<6 岁健康儿童 NT-proBNP 水平的参考范围为 25~272 pg/mL。年龄、BMI、三酰甘油、尿素氮是 2~<6 岁健康儿童 NT-proBNP 水平的独立影响因素。建立各地区健康儿童 NT-proBNP 的参考范围对儿童相关疾病的诊疗具有重要意义。

参考文献

- [1] 王华,梁延春.中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J].中华心血管病杂志,2018,46(10):760-789.
- [2] KAVSAK P A, LAM C S P, SAENGER A K, et al. Educational recommendations on selected analytical and clinical aspects of natriuretic peptides with a focus on heart failure: a report from the IFCC committee on clinical applications of cardiac bio-markers[J]. Clin Chem, 2019, 65(10):1221-1227.
- [3] ROBIER C, NEUBAUER M, BINTER G, et al. Extensive elevation of BNP but not NT-proBNP in a patient with advanced urothelial carcinoma in absence of cardiac failure and volume overload[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(5):e99-e101.
- [4] BLASUTIG I M, JUNG B, KULASINGAM V, et al. Analytical evaluation of the VITROS 5600 integrated system in a pediatric setting and determination of pediatric reference intervals[J]. Clin Biochem, 2010, 43(13/14):1039-1044.
- [5] KULASINGAM V, JUNG B P, BLASUTIG I M, et al. Pediatric reference intervals for 28 chemistries and immunoassays on the Roche cobas 6000 analyzer: a CALIPER pilot study[J]. Clin Biochem, 2010, 43(13/14):1045-1050.
- [6] NIR A, LINDINGER A, RAUH M, et al. NT-pro-B-type natriuretic peptide in infants and children: reference values based on combined data from four studies[J]. Pediatr Cardiol, 2009, 30(1):3-8.
- [7] 黎赛,周舟,胡彬,等.0~18 岁健康人群的血清 N 末端脑钠肽前体参考值范围研究[J].医学临床研究,2015,32(4):665-667.
- [8] PERVANIDOU P, AKALESTOS A, SAKKA S, et al. Gender dimorphic associations between N-terminal pro-brain natriuretic peptide, body mass index and blood pressure in children and adolescents[J]. Horm Res Paediatr, 2010, 73(5):341-348.
- [9] 王运红,周琼,张宇辉,等.健康社区人群 N 末端 B 型利钠肽原的分布特征及其影响因素[J].中华心血管病杂志,2015,43(6):511-515.
- [10] SAI L M, ZHENG X M, LIPING L B. Establishment of normal reference values of NT-proBNP and its application in diagnosing acute heart failure in children with severe hand food and mouth disease: erratum[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(12):e19688.
- [11] ARORA P, REINGOLD J, BAGGISH A, et al. Weight loss, saline loading, and the natriuretic peptide system[J]. J Am Heart Assoc, 2015, 4(1):e001265.
- [12] LEWIS L K, RAUDSEPP S D, PRICKETT T C R, et al. ProBNP that is not glycosylated at threonine 71 is decreased with obesity in patients with heart failure[J]. Clin Chem, 2019, 65(9):1115-1124.
- [13] JAFRI L, KASHIF W, TAI J, et al. B-type natriuretic peptide versus amino terminal pro-B type natriuretic peptide: selecting the optimal heart failure marker in patients with impaired kidney function[J]. BMC Nephrol, 2013, 14:117.
- [14] SHENKMAN H J, ZAREBA W, BISOGNANO J D. Comparison of prognostic significance of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide versus blood urea nitrogen for predicting events in patients hospitalized for heart failure[J]. Am J Cardiol, 2007, 99(8):1143-1145.

(收稿日期:2021-01-11 修回日期:2021-04-11)

(上接第 2815 页)

- in the pediatric patient: the role and utility of ceftazidime/avibactam[J]. Infect Drug Resist, 2020, 13:1763-1773.
- [7] 周琴,杨向贵,王丹,等.头孢他啶/阿维巴坦对耐碳青霉烯类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.
 - [8] 王琴,邹自英,谭积善,等.头孢他啶-阿维巴坦在耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌中的药物敏感性分析[J].检验医学与临床,2019,16(6):802-804.

- [9] ZHANEL G G, LAWSON C D, ADAM H, et al. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination[J]. Drugs, 2013, 73(2):159-177.
- [10] HUMPHRIES M R, YANG S X, HEMARAJATA P, et al. First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing klebsiella pneumoniae isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 59(10):6605-6607.

(收稿日期:2021-01-23 修回日期:2021-05-11)