

临床常见革兰阴性杆菌对替加环素的药敏情况分析*

王 琪, 胡燕燕, 张 嵘, 陈功祥 (浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009)

摘要:目的 了解临床常见革兰阴性杆菌对替加环素的耐药情况。方法 收集2012年9月~10月浙江省9个城市15家医院的393株鲍曼不动杆菌复合群以及2012年1月~12月浙江大学医学院附属第二医院的115株大肠埃希菌, 110株肺炎克雷伯菌和99株鲍曼不动杆菌复合群。用Vitek-2 Compact全自动微生物鉴定仪对细菌做鉴定及药物敏感性试验。393株分离自全省的鲍曼不动杆菌复合群用基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱仪(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)进行鉴定。另外挑取393株鲍曼不动杆菌复合群中GN-AST16药敏卡MIC值 $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ 或 $4 \mu\text{g/ml}$ 的所有菌株以及少部分MIC值在 $\leq 0.5 \mu\text{g/ml} \sim 2 \mu\text{g/ml}$ 之间的不动杆菌159株, 这些菌株同时采用Etest法和GN-AST16药敏卡对替加环素的药敏情况进行比较。结果 393株鲍曼不动杆菌复合群经MALDI-TOF MS鉴定为317株鲍曼不动杆菌, 32株肺炎克雷伯菌和44株医院不动杆菌。采用FDA标准, 115株大肠埃希菌对替加环素的耐药率为0.0%; 110株肺炎克雷伯菌对替加环素的耐药率为7.3%; 99株鲍曼不动杆菌复合群对替加环素的耐药率为6.1%。替加环素耐药革兰阴性杆菌中, 85.7%(12/14)对碳青霉烯类耐药; 而碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌中, 仅10.0%(12/120)对替加环素耐药。结论 替加环素对临床常见的多重耐药甚至泛耐药革兰阴性杆菌有较好的抗菌活性。不管采用FDA还是EUCAST判读标准, Etest方法的耐药率比GN-AST16药敏卡方法稍低。

关键词: 替加环素; 革兰阴性杆菌; 美国食品药品监督管理局; 欧洲抗菌药物敏感性试验判断标准

中图分类号: R378.2; R446.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)01-008-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.003

Resistance of Clinical Isolated Gram Negative Bacilli to Tigecycline

WANG Qi, HU Yan-yan, ZHANG Rong, CHEN Gong-xiang (the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou 310009, China)

Abstract: **Objective** To investigate the resistance of clinical isolated gram negative bacilli to tigecycline. **Methods** One hundred and fifteen *Escherichia coli* isolates, 110 *Klebsiella pneumoniae* isolates and 99 *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolates were collected from Affiliated Second Hospital of Zhejiang University College of Medicine from the year 2012. The other 393 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolates were collected from 15 hospitals of nine cities in Zhejiang province during September to October 2012. Species identification and susceptibility test were confirmed by VITEK-2 compact system, while the 393 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains isolated from Zhejiang province were identified by MALDI-TOF MS. Moreover, 159 *A. baumannii* isolates with tigecycline MIC value $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ or $4 \mu\text{g/ml}$ and part of the MIC value $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ and $2 \mu\text{g/ml}$ which were firstly determined by VITEK 2 GN AST-16 Susceptibility card were then determined by Etest. **Results** The 393 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex strains were identified as 317 of *A. baumannii*, 32 of *A. pittii* and 44 of *A. nosocomialis*. When using the FDA breakpoints, the resistance rate of tigecycline against 115 *E. coli* isolates, 110 *K. pneumoniae* isolates and 99 *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolates were 0.0%, 7.3% and 6.1%, respectively. Interestingly, 85.7% of the tigecycline-resistant gram negative bacilli were resistant to carbapenems. However, only 10.0% of the carbapenem-resistant gram negative bacilli were resistant to tigecycline. **Conclusion** Tigecycline had a good activity against clinical isolated multi-drug resistant or even pan-drug resistant gram negative bacilli. No matter which criteria for tigecycline was referred to, the resistance rate of tigecycline was slightly lower by Etest than by GN AST-16 Susceptibility card.

Keywords: tigecycline; gram negative bacilli; FDA; EUCAST

近年来, 细菌耐药性已成为全球医疗领域中最受关注的问题之一。根据中国细菌耐药监测网(CHINET)细菌耐药性监测, 临床分离菌株中革兰

阴性杆菌的分离率明显高于革兰阳性球菌^[1]。临床上最常见的肠杆菌科细菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌, 非发酵菌为铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81371871)。

作者简介: 王 琪(1987—), 女, 本科, 检验师, 从事细菌耐药机制研究, E-mail: wangqi866@sina.com。

通讯作者: 陈功祥, E-mail: chengong218@yeah.net。

等。碳青霉烯类抗生素是目前用于治疗由多重耐药革兰阴性杆菌引起的严重感染的首选药物^[2]。然而,碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌以及肠杆菌科细菌逐年增多,近年来发现的碳青霉烯酶 NDM 的暴发流行,使得临床上几乎面临对碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌以及泛耐药鲍曼不动杆菌无药可治的地步。对于日益增多的危及生命的多重耐药菌的暴发与流行,临床上迫切需要新的抗生素。替加环素是首个甘氨酸环素类药物,对多重耐药鲍曼不动杆菌、产 NDM 或 KPC 等碳青霉烯酶肠杆菌科细菌有较好的抗菌作用。本研究对浙江省 9 个城市 15 家医院的 393 株鲍曼不动杆菌复合群的替加环素的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)进行检测,同时回顾性分析了该院分离的临床常见革兰阴性杆菌对替加环素的药敏情况。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 115 株大肠埃希菌,110 株肺炎克雷伯菌和 99 株鲍曼不动杆菌复合群分离自 2012 年 1 月~12 月浙江大学医学院附属第二医院的各类送检标本,剔除重复菌株。另外 393 株鲍曼不动杆菌复合群分离自 2012 年 9 月~10 月浙江省九个城市的 15 家医院。

1.2 仪器与试剂 Vitek2 GN 鉴定卡,Vitek2 AST-GN16 药敏卡,Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定仪及替加环素 Etest 条购自法国生物梅里埃公司;MALDI-TOF MS 鉴定仪购自德国 Bruker 公司;Mueller-Hinton 琼脂购自英国 Oxoid 公司。

1.3 细菌鉴定和药物敏感性实验 我院分离的 115 株大肠埃希菌,110 株肺炎克雷伯菌和 99 株鲍曼不动杆菌复合群采用 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定仪的 GN 鉴定卡进行鉴定;浙江省分离的 393 株鲍曼不动杆菌复合群采用德国 Bruker 公司 MALDI-TOF MS 鉴定仪进行鉴定。采用 Vitek2 GN-AST16 药敏卡对菌株 MIC 进行测定;同时挑取 393 株鲍曼不动杆菌复合群中 GN-AST16 药敏卡 MIC 值为 $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ 或 $4 \mu\text{g/ml}$ 的所有菌株以及少部分 MIC 值在 $\leq 0.5 \mu\text{g/ml} \sim 2 \mu\text{g/ml}$ 之间的不动杆菌 159 株,对这 159 株细菌同时采用 Etest 方法测定替加环素的 MIC 值。替加环素的判读标准分别参照美国食品和药品管理局(food and drug administration, FDA)和欧洲抗菌药物敏感性试验判断标准(european committee on antimicrobial susceptibility testing, EUCAST)^[3], 其它抗生素的判读标准参照美国临床实验室标准委员会^[4]标准。其中 FDA 对替加环素的敏感、中介和耐药的判断折点分别为 $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, $4 \mu\text{g/ml}$ 和 $\geq 8 \mu\text{g/ml}$;而 EUCAST 对替加环素的敏感、中

介和耐药的判断折点分别为 $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, $2 \mu\text{g/ml}$ 和 $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 。大肠埃希菌 ATCC25922,肺炎克雷伯菌 ATCC13883 和鲍曼不动杆菌 ATCC19606 作为质控菌株。

2 结果

2.1 鉴定结果 浙江省分离的 393 株鲍曼不动杆菌复合群经 MALDI-TOF MS 鉴定为鲍曼不动杆菌 317 株,占 80.7%;皮氏不动杆菌 32 株,占 8.1%;医院不动杆菌 44 株,占 11.2%。

2.2 药物敏感性试验

2.2.1 常见革兰阴性杆菌对替加环素的药敏结果:采用 FDA 标准,115 株大肠埃希菌对替加环素的耐药率为 0.0%;110 株肺炎克雷伯菌对替加环素的耐药率为 7.3%;99 株鲍曼不动杆菌复合群对替加环素的耐药率为 6.1%。同时对我院碳青霉烯耐药革兰阴性杆菌的替加环素药敏情况及替加环素耐药革兰阴性杆菌的碳青霉烯类药敏情况进行比较发现:替加环素耐药革兰阴性杆菌中,85.7%(12/14)对碳青霉烯类耐药;而碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌中,仅 10.0%(12/120)对替加环素耐药。

2.2.2 浙江省 393 株鲍曼不动杆菌复合群药敏结果:见表 1。替加环素对鲍曼不动杆菌复合群显示了很好的抗菌活性,其耐药率为 3.6%(采用 FDA 标准),是所有抗生素中耐药率最低的抗菌药物;阿米卡星的耐药率也较低,为 5.9%。亚胺培南的耐药率则高达 54.3%。不同型别间的耐药率略有差异,替加环素或阿米卡星的耐药株均为鲍曼不动杆菌,皮氏不动杆菌和医院不动杆菌对这两种抗生素无耐药株。同时,317 株鲍曼不动杆菌对亚胺培南的耐药率高达 65.6%,而皮氏不动杆菌对亚胺培南的耐药率为 16.1%,医院不动杆菌对亚胺培南则 100%敏感。

表 1 393 株鲍曼不动杆菌复合群对替加环素药敏情况比较

菌种	n	FDA 标准(%)		EUCAST 标准(%)		MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
		耐药率	中介率	耐药率	中介率		
皮氏不动杆菌	32	0.0	0.0	0.0	0.0	≤ 0.5	≤ 0.5
医院不动杆菌	44	0.0	0.0	0.0	2.3	≤ 0.5	1
鲍曼不动杆菌	317	4.4	20.5	24.9	32.8	2	4

2.3 替加环素采用 Etest 法和 GN-AST16 药敏卡方法对 159 株鲍曼不动杆菌药敏情况比较 见表 2。116 株 Etest 法及 GN-AST16 药敏卡方法的替加环素 MIC 结果符合率为 73.0%(116/159)。在 43 株 MIC 结果不符合菌株中:Etest 法比 GN-AST16 药敏卡方法高一个梯度共 10 株,占总不符

合菌株数的 23.3%；高两个梯度共 1 株，占总不符合菌株数的 2.3%；GN-AST16 药敏卡方法比 E-test 法高一个梯度共 32 株，占总不符合菌株数的 74.4%；高两个梯度共 0 株。在采用 EUCAST 及 FDA 标准时，159 株鲍曼不动杆菌在用 Etest 法时，对替加环素的耐药率分别为 75.5%和 11.9%；而采用 GN-AST16 药敏卡方法时，对替加环素的耐药率分别为 89.3%和 13.8%。

表 2 159 株鲍曼不动杆菌采用 Etest 法和 GN-AST-16 药敏卡法对替加环素药敏情况比较						
菌株数	FDA 标准(%)		EUCAST 标准(%)		MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)
	耐药率	中介率	耐药率	中介率		
Etest 法	11.9	63.5	75.5	17.6	4	8
GN-AST-16 药敏卡法	13.8	75.5	89.3	1.9	4	≥8

3 讨论 替加环素是米诺环素的衍生物，是第一个应用于临床的新型甘氨酸环素类抗生素。2005 年，替加环素被批准用于复杂性皮肤和皮肤软组织感染及复杂性腹腔内感染的治疗^[5]；2009 年，替加环素被批准用于社区获得性细菌性肺炎的治疗^[6]。替加环素克服了四环素类的两种主要耐药机制：核糖体保护机制和四环素特异性泵介导的外排机制。对革兰阳性菌及革兰阴性菌(包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌等)都有较好的抗菌效果。

随着肠杆菌科细菌中质粒介导的碳青霉烯酶在国内的广泛流行，替加环素作为取而代之的新型抗生素，其体外抗菌效果显得尤为重要。本研究中，肠杆菌科细菌对替加环素的敏感率高达 96.4%(217/225)，这与 Kelesidis 等^[7]报道的数据接近。其中肺炎克雷伯菌对替加环素的耐药率明显高于大肠埃希菌的耐药率，这可能是由于肺炎克雷伯菌中存在 AcrAB 外排系统^[8]。AcrAB 外排泵基因的高表达，直接导致替加环素在未进入胞内时就被细菌排出体外。

鲍曼不动杆菌复合群包括鲍曼不动杆菌、皮氏不动杆菌，医院不动杆菌和醋酸钙不动杆菌。不同类型的不动杆菌所呈现的耐药模式有所差异^[9,10]。本次研究的细菌主要以鲍曼不动杆菌为主，其耐药率较皮氏不动杆菌及医院不动杆菌高，鲍曼不动杆菌一直是近年来受到关注较多的细菌。随着抗生素的广泛使用，多重耐药甚至泛耐药菌株的不断出现，由于该菌生存力强，成为了院内感染控制的难点。替加环素对鲍曼不动杆菌复合群有显著的体外抗菌活性，我院鲍曼不动杆菌对替加环素的耐药率高于浙江省的数据，可能是由于我院重症病人较

多，而整个浙江省的数据则囊括了部分偏远地区，而这些地方重症病人相对较少。这一数据也提示必须控制好院内感染，以防止多重耐药甚至泛耐药菌的广泛传播流行。同时，在采用不同判定标准对 317 株鲍曼不动杆菌对替加环素的耐药率进行统计时，替加环素的耐药率存在较大差异。FDA 判定为中介的菌株，在采用 EUCAST 标准时，均被列入耐药株统计。而这些中介耐药株恰恰在总菌株数中占到了较高的比例(20.5%，65/317)，而替加环素作为新药刚被国外用于临床治疗用药时，对鲍曼不动杆菌的耐药率或中介耐药率都极低^[11]，这些中介耐药株的不断增多应引起临床重视，替加环素的广泛使用，可能导致细菌对其产生获得性耐药^[12]，从而对替加环素的敏感性降低。

替加环素不仅对临床常见的革兰阴性杆菌有显著的体外活性，对碳青霉烯类耐药的革兰阴性杆菌同样敏感率较高；而反之，碳青霉烯类抗生素对替加环素耐药的革兰阴性杆菌敏感率极低；显示了替加环素作为新型甘氨酸环素类抗生素对革兰阴性杆菌有较好的抗菌活性，对于多重耐药的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌，替加环素的抗菌活性优于碳青霉烯类抗生素。

另外，Torrico 等^[13]报道，采用不同的琼脂以及不同的 MIC 测定方法，会对替加环素的 MIC 值产生 1~2 个梯度的差别，用 Etest 法测定替加环素的 MIC 值，比肉汤稀释法和琼脂稀释法低一个梯度。本研究中，不管采用 FDA 还是 EUCAST 判读标准，Etest 方法的耐药率比 GN-AST16 药敏卡方法稍低，与文献^[13]报道一致。Etest 方法是否优于 GN-AST16 药敏卡方法，还有待更多的临床实验分析。

参考文献：

[1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中华感染与化疗杂志, 2014, 12(5):365-374.
Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET 2013 surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chin J Infect Chemother, 2014, 12(5):365-374.

[2] Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)[J]. Clin Microbiol Infect, 2000, 6(9):460-463.

[3] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters[S]. Version 2. 0. EUCAST, 2012. http://www.EUCAST.org/clinical_breakpoints/.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22th informational supplement[S]. Wayne, PA, CLSI

- document M100-S22, 2012.
- [5] Kasbekar N. Tigecycline: a new glycylcycline antimicrobial agent[J]. Am J Health Syst Pharm, 2006, 63(13): 1235-1243.
 - [6] Wyeth Pharmaceuticals, Inc. Department of Health & Human Services[J]. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2009/021821s013.
 - [7] Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, et al. Tigecycline for the treatment of multidrug resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 62(5): 895-904.
 - [8] Veleba M, Schneiders T. Tigecycline resistance can occur independently of the ramA gene in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(8): 4466-4467.
 - [9] Ko WC, Lee NY, Su SC, et al. Oligonucleotide array-based identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex in isolates from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 2052-2059.
 - [10] Lin YC, Sheng WH, Chang SC, et al. Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter spp.* with distinct antimicrobial susceptibilities[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 612-617.
 - [11] Arian O, Uysal S. In vitro activity of tigecycline against multiple resistant *Acinetobacter baumannii* and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates [J]. Mikrobiyol Bul, 2008, 42(2): 209-215.
 - [12] Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, et al. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(9): 3298-3304.
 - [13] Torrico M, González N, Giménez MJ, et al. Influence of media and testing methodology on susceptibility to tigecycline of *Enterobacteriaceae* with reported high tigecycline MIC [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2243-2246.

收稿日期: 2015-07-16

修回日期: 2015-10-20

(上接 7 页)

参考文献:

- [1] Barton RC. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome[J]. Scientifica (Cairo), 2013(2013): 459405.
- [2] Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? [J]. Curr Med Res Opin, 2013, 29(4): 3-11.
- [3] Shi LN, Li FQ, Huang M, et al. Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GliT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergillosis[J]. BMC Microbiol, 2012(12): 11.
- [4] 张国勇, 刘倩, 李芳秋, 等. 烟曲霉果胶裂解酶 A 重组蛋白的原核表达及抗原性分析[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(2): 108-110.
Zhang GY, Liu Q, Li FQ, et al. Prokaryotic expression and antigenic analysis of recombinant pectate lyase A of *Aspergillus fumigatus* [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2015, 33(2): 108-110.
- [5] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(12): 1813-1821.
- [6] Shi LN, Li FQ, Lu JF, et al. Antibody specific to thioredoxin reductase as a new biomarker for serodiagnosis of invasive aspergillosis in non-neutropenic patients[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(9/10): 938-943.
- [7] 韩丹丹, 李芳秋, 史利宁, 等. 血清抗烟曲霉二肽基肽酶 V 肽段 IgG 类抗体 ELISA 法的建立及初步应用[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(4): 241-244.
Han DD, Li FQ, Shi LN, et al. Establishment and preliminary application of an ELISA method for detecting serum IgG antibody against *Aspergillus fumigatus* dipeptidyl peptidase V fragment [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2014, 32(4): 241-244.
- [8] Sarfati J, Monod M, Recco P, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis[J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2006, 55(4): 279-291.
- [9] Sambatakou H, Guiver M, Denning D. Pulmonary aspergillosis in a patient with chronic granulomatous disease: confirmation by polymerase chain reaction and serological tests, and successful treatment with voriconazole [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003, 22(11): 681-685.
- [10] Upadhyay SK, Gautam P, Pandit H, et al. Identification of fibrinogen-binding proteins of *Aspergillus fumigatus* using proteomic approach[J]. Mycopathologia, 2012, 173(2/3): 73-82.
- [11] Singh B, Oellerich M, Kumar R, et al. Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus* [J]. J Proteome Res, 2010, 9(11): 5517-5529.

收稿日期: 2014-08-06

修回日期: 2015-08-11