

临床耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌对头孢他啶 / 阿维巴坦的药物敏感性分析

徐卫皓^{1,2}, 杨凤真², 伊茂礼², 薛兆平², 王鑫¹, 张玉梅¹

(1. 滨州医学院基础医学院病原生物学教研室, 山东烟台 264000; 2. 烟台毓璜顶医院检验中心, 山东烟台 264000)

摘要: 目的 分析携带不同碳青霉烯酶的耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)对头孢他啶/阿维巴坦(ceftazidime-avibactam, CZA)的药物敏感性,为临床合理精准用药提供依据。方法 采用药敏纸片扩散法(K-B法)对烟台毓璜顶医院2018~2020年临床分离并保存的98株非重复CRE菌株进行CZA的药敏试验,并对CZA抑菌圈在20~22mm的菌株用微量肉汤稀释法(broth microdilution method, BMD)进行验证,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法检测其碳青霉烯酶型,分析产不同碳青霉烯酶的CRE菌株对CZA的药物敏感性。结果 烟台毓璜顶医院CRE菌株以产金属 β -内酰胺酶为主,占72.45%,总体对CZA敏感率为23.47%。CZA对单产丝氨酸酶(bla_{KPC} , bla_{OXA-48})的CRE敏感率为100%,对单产金属酶(bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP})的CRE耐药率为100%,对同时产丝氨酸酶和金属酶的CRE菌株和对不产酶的CRE菌株敏感率分别为25.0%和83.3%。结论 携带不同碳青霉烯酶的CRE菌株对CZA的药物敏感性不同,CZA体外药敏试验有必要在临床开展,同时需增加酶型检测方法指导临床精准用药。

关键词: 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 头孢他啶/阿维巴坦; 药物敏感性试验; 碳青霉烯酶型检测

中图分类号: R378.2; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2022)01-164-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.01.033

Drug Sensitivity Analysis of Clinical Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* Bacteria to Ceftazidime/Avibatan

XU Wei-hao^{1,2}, YANG Feng-zhen², YI Mao-li², XUE Zhao-ping², WANG Xin¹, ZHANG Yu-mei¹

(1. Department of Pathogen Biology, School of Basic Medicine, Binzhou Medical University, Shandong Yantai 264000, China; 2. Laboratory Center of Yantai Yuhuangding Hospital, Shandong Yantai 264000, China)

Abstract: Objective To analyze the drug sensitivity of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) with different carbapenems to Ceftazidime-avibactam (CZA), and provide the basis for clinical rational and accurate drug use. **Methods** A total of 98 non-repeat CRE strains isolated and preserved in Yantai Yuhuangding Hospital from 2018 to 2020 were tested for CZA drug susceptibility by K-B method, and a broth microdilution method (BMD) was used for strains with CZA inhibition zone of 20~22mm, the polymerase chain reaction (PCR) method was used to detect the carbapenase type, and the sensitivity of CRE strains producing different carbapenases to CZA was analyzed. **Results** In Yantai Yuhuangding Hospital, the CRE strain was mainly metal-producing β -lactamase, accounting for 72.4%, and the sensitivity rate to CZA was 23.5%. CZA was 100% sensitive to serinase (bla_{KPC} , bla_{OXA-48}), 100% resistant to metalase (bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP}), and the sensitivity rates of CRE strains producing serinase and metalloenzyme and CRE strain not producing enzyme were 25.0% and 83.3%, respectively. **Conclusion** CRE strains carrying different carbapenases had different drug sensitivity to CZA, so it is necessary to carry out CZA drug sensitivity test in vitro in clinic, and at the same time, enzyme type detection method should be added to guide clinical precision drug use.

Keywords: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; ceftazidime/avibactam; drug sensitive paper diffusion method; carbapenase type test

随着各类抗生素的广泛应用,细菌耐药率呈现快速增长趋势,其中耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)由于高度耐药、致死率高、传播速度快而备受关注,

被世界卫生组织列为全球耐药的紧急威胁^[1-2]。CRE种类繁多并且在不断增加,且易携带和产生新的对其他抗生素的耐药基因,为临床诊治提出巨大挑战,迫切需要新的药物来解决耐药菌这一难题。

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(202011001140)。

作者简介: 徐卫皓(1987-),女,本科,主管检验师,研究方向:病原微生物学。

通讯作者: 张玉梅(1981-),女,博士,副教授,研究方向:病原微生物学, E-mail:meiyuzh@163.com。

头孢他啶/阿维巴坦 (ceftazidime-avibactam, CZA) 于2015年通过美国FDA批准上市, 主要用于治疗成人复杂性泌尿系统感染和复杂性腹腔感染, 医院获得性细菌性肺炎 (包括呼吸机相关的细菌性肺炎), 以及治疗方案有限的由需氧革兰阴性菌引起的其他感染的治疗^[3-4]。CZA为这些严重且难以治疗的感染提供了一个有价值的新选择。国家药品监督管理局2019年批准CZA在我国上市, 目前在国内的使用和研究尚少, 尽管它对革兰阴性杆菌的有效性已被证明, 但一些国家已经报告了对CZA的耐药性, 这需要引起广泛的关注, 本研究通过分析携带不同碳青霉烯酶的CRE菌株对CZA的敏感性, 为临床CRE感染患者的治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集烟台毓璜顶医院2018年1月~2020年12月临床分离并保存的CRE菌株 (亚胺培南和/或美罗培南 MIC ≥ 4 μg/L), 剔除同一患者同一部位分离的重复菌株, 共计98株。质控阴性菌株大肠埃希菌 ATCC25922 购自卫生部临床检验中心, 质控阳性菌株为经DNA测序明确产 bla_{KPC}, bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{NDM} 和 bla_{OXA-48} 碳青霉烯酶基因的菌株 (阳性菌株由青岛大学附属医院检验科惠赠)。

1.2 仪器与试剂 法国生物梅里埃公司生产的 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪, BRUKER 飞行时间质谱仪, 海精宏实验室设备有限公司生产的 GNP29270 型恒温培养箱, 君意电泳公司生产的 JY04S-3E 全自动凝胶图像分析系统和来自美国 ABI 公司的 VerTi 梯度 PCR 仪, 北京市六一仪器厂生产的 DYY-6C 型电泳仪, 北京百晶公司生产的 BG-subMIDI (v) 可见光电泳-透射仪。英国 OXOID 公司生产的血琼脂平皿, 法国生物梅里埃公司的 VITEK-MSCHCA 基质液, 亚胺培南和美罗培南药敏纸片为赛默飞公司生产, CZA 药敏纸片和 BMD 药敏板由辉瑞公司赠予。Premix Taq™ 酶, DNA Marker 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购于艾科瑞生物公司, 5种碳青霉烯耐药基因的引物由擎科生物公司青岛合成部合成。

1.3 方法

1.3.1 培养和鉴定: 复苏保存的 CRE 菌株, 在 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪上进行菌株鉴定和药敏试验, 所有菌株均通过药敏纸片扩散法进行验证, 确定为 CRE。并使用 BRUKER 飞行时间质谱仪进行鉴定复核, 要求 BRUKER 的评分大于 2.0。最后再将鉴定到菌种水平的 CRE 菌株接种在血琼脂平皿上, 置 35℃ 二氧化碳恒温培养箱孵育 16~20h。

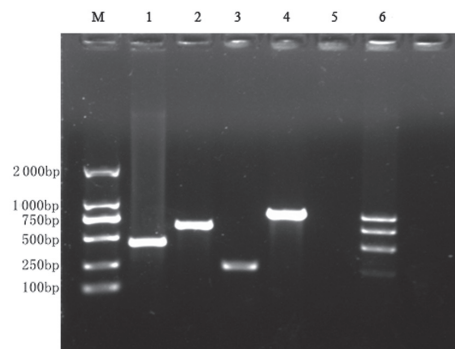
1.3.2 头孢他啶/阿维巴坦药敏试验: 药敏试验标

准和结果判读根据 2020 版 CLSI M100 执行。药敏纸片扩散法检测 98 株 CRE 菌株对 CZA 的药物敏感性, 对 CZA 抑菌圈直径在 20~22mm 区域的菌株用微量肉汤稀释法验证, 头孢他啶/阿维巴坦药物浓度测定范围 0.03/4mg/L~64/4mg/L。药敏试验标准和结果判读根据 2020 版 CLSIM100 执行^[5]。

1.3.3 PCR 法检测碳青霉烯酶基因型: 采用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA 作为 PCR 模板, 扩增 5 种常见的碳青霉烯酶基因, 包括 A 类丝氨酸酶 (bla_{KPC})、B 类金属酶 (bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP})、D 类丝氨酸酶 (bla_{OXA-48})。目的基因、引物序列、产物长度及退火温度等见表 1。基因 bla_{NDM} 和 bla_{KPC} 的 PCR 反应条件: 94℃ 5min, (94℃ 30s, 60℃ 40s, 72℃ 60s) 30 cycle, 60℃ 10min; 基因 bla_{VIM}, bla_{IMP} 和 bla_{OXA-48} 的 PCR 反应条件: 94℃ 5min, (94℃ 30s, 55℃ 40s, 72℃ 1min) 30 cycle, 55℃ 10min。产物经 15g/L 琼脂凝胶电泳后, 用凝胶成像系统分析。部分耐药基因阳性菌株凝胶电泳图见图 1。将有阳性条带菌株的扩增产物送基因测序, 并应用 BLAST 比对并确认基因型。

表 1 PCR 扩增引物的名称及产物

目的基因	引物序列 (5' → 3')	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)
bla _{KPC}	F:CGTCTAGTCTGCTGTCTTG R:CTTGTCATCCTTGTTAGCGG	797	60
bla _{IMP}	F:GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R:GGTTTAAAYAAAACAACCACC	211	55
bla _{VIM}	F:ACTGGTGACTATCCGACAG R:ATGAAAGTGGCTGGAGAC	261	55
bla _{NDM}	F:GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R:CGGAATGGCTCATCAGGATC	601	60
bla _{OXA-48}	F:GCGTGTTAAGGATGAACAC R:CATCAAGTCAACCCAACCG	418	55



注: M 为 DL2000 DNA Marker, 条带 1 为 bla_{OXA-48} 基因 (418bp), 条带 2 为 bla_{NDM} 基因 (601bp), 条带 3 为 bla_{IMP} 基因 (211bp), 条带 4 为 bla_{KPC} 基因 (797bp), 条带 5 为空白对照, 条带 6 为检测出的 4 种碳青霉烯酶基因混合物。

图 1 部分耐药基因阳性菌株凝胶电泳图

1.4 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件对数据进行

统计学分析, 计数资料用 $n(\%)$ 表示。

2 结果

2.1 头孢他啶 / 阿维巴坦药物敏感性结果 见表 2。

2.2 实验 CRE 菌株对头孢他啶 / 阿维巴坦敏感 23 株

表 2 携带不同耐药基因型的 CRE 对 CZA 的药物敏感性

耐药基因	CZA 敏感株数 / 菌株数								CZA 敏感率 (%)
	kpn	kox	eae	eco	ecl	cfr	sma	pmi	
bla _{KPC}	13/13	-	-	1/1	-	-	-	-	100.0
bla _{OXA-48}	1/1	-	2/2	-	-	-	-	-	100.0
bla _{NDM}	0/11	-	0/1	0/44	0/4	0/7	0/1	0/2	0.0
bla _{IMP}	-	-	-	-	0/1	-	-	-	0.0
bla _{VTM}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bla _{KPC} +bla _{NDM}	1/3	0/1	-	-	-	-	-	-	25.0
未检出基因型	2/2	-	1/1	2/3	-	-	-	-	83.3

注: kpn 肺炎克雷伯菌, kox 产酸克雷伯菌, eae 产气肠杆菌, eco 大肠埃希菌, ecl 阴沟肠杆菌, cfr 弗劳地柠檬酸杆菌, sma 黏质沙雷菌, pmi 奇异变形杆菌, “-”表示未检出。

2.2 PCR 法检测碳青霉烯酶基因型结果 共检测 98 株 CRE 菌株, 检出 92 株携带碳青霉烯酶耐药基因, 其中 70 株含 bla_{NDM} (71.43%), 14 株含 bla_{KPC} (14.29%), 4 株同时含 bla_{KPC} 和 bla_{NDM} (4.08%), 3 株含 bla_{OXA-48} (3.06%), 1 株含 bla_{IMP} (1.02%), 未检出基因型 6 株 (6.12%)。我院临床分离的 CRE 菌株以产 B 类金属 β -内酰胺酶为主 (72.45%, 71/98), 其次为产丝氨酸碳青霉烯酶型 (17.35%, 17/98), 双酶型 (4.08%, 4/98), 未检出碳青霉烯酶型 (6.12%, 6/98)。

3 讨论

产生碳青霉烯酶是肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物耐药最主要的机制^[6]。研究显示, 不同国家、不同省份、不同医院、不同人群以及不同菌属所携带的碳青霉烯酶种类均有差异^[7]。在我国, 产生 KPC 或 NDM 型碳青霉烯酶是 CRE 最主要的耐药机制, 从地域分布来看, 与南方相比, 我国北方综合性医院临床分离的 CRE 菌株产 NDM 型较 KPC 型多^[8]。新药头孢他啶 / 阿维巴坦可有效抑制丝氨酸碳青霉烯酶, 而对产金属酶的菌株无活性^[3]。我院临床分离的 CRE 菌株以产 B 类金属 β -内酰胺酶为主, 因此 CZA 对我院 CRE 菌株整体敏感性不高。研究显示, 头孢他啶 / 阿维巴坦在使用过程中, 可能会出现诱导耐药, 为避免抗生素滥用而出现新的耐药菌, 使用前准确、快速地对 CRE 产生的碳青霉烯酶进行检测并分型, 筛选出对 CZA 敏感 / 耐药的表型, 对于临床重症 CRE 抗感染治疗的精准用药和医院感染预防控制具有重要的价值。

体外药敏试验显示, 对于单产丝氨酸碳青霉烯

(23.47%), 其中携带 bla_{KPC} 基因型 14 株, 携带 bla_{OXA-48} 基因型 3 株, 同时携带 bla_{KPC} 和 bla_{NDM} 基因 1 株, 未检出基因型 5 株。

酶的 CRE 菌株敏感性高达 100%, 对单产 B 类金属 β -内酰胺酶的 CRE 耐药率为 100%。基于之前研究积累和本实验研究总结, 对于单产金属酶的 CRE 菌株, 可认为 CZA 对其耐药; 对于单产丝氨酸碳青霉烯酶的 CRE 菌株, 需用药敏方法对其进行验证, 对于不具备 CZA 药敏的实验室可报告 CZA 可能对其有活性。这为临床 CRE 菌株在使用头孢他啶 / 阿维巴坦的治疗上指明了基本方向。

之前研究认为头孢他啶 / 阿维巴坦对于携带金属酶的 CRE 菌株无体外活性, 这是由阿维巴坦的抑菌谱决定的。而本研究中有一株肺炎克雷伯菌的药敏结果值得讨论, 经金标准 PCR 法多次验证该菌同时携带 bla_{KPC} 和 bla_{NDM} 耐药基因, 而对 CZA 敏感。此结果, 与张敬霞等^[9]学者发现的 1 株双基因型的 CRE 对 CZA 敏感相似。分析可能有两方面原因: ①体外药物敏感性与携带耐药基因的量有关, 此菌携带 NDM 酶 (B 类金属 β -内酰胺酶) 含量较少, PCR 电泳也发现此菌 NDM 条带较浅。②本菌虽同时携带 bla_{KPC} 和 bla_{NDM} 耐药基因, 但不表达 bla_{NDM} 耐药基因。故证实对于同时产金属酶和丝氨酸酶的 CRE 菌株, 并非全耐药, 需要进行头孢他啶 / 阿维巴坦药敏试验进行验证。

头孢他啶 / 阿维巴坦对不产酶的 CRE 菌株具有良好的活性, 但并非全敏感。本研究中有 6 株 CRE 菌株未检出基因型, 可能是由产碳青霉烯酶以外的耐药机制介导的, 其中 5 株不产酶的 CRE 菌株对 CZA 敏感, 敏感率 83.3%, 1 株不产酶的大肠埃希菌对 CZA 耐药。此耐药菌头孢他啶 / 阿维巴坦 K-B 法检测抑菌圈直径为 21mm, 纸片法判为敏感, 经

验证 MIC 值为 $>64/4\text{mg/L}$, 证实此菌对 CZA 耐药。本耐药菌株证实: ①头孢他啶 / 阿维巴坦药敏纸片扩散法存在假敏感。此判断与另一学者对于肠杆菌目细菌纸片扩散法会出现假敏感的结论一致^[10]。② K-B 法检测 CZA, 敏感和耐药的判定标准仅差 1mm, 可能存在系统误差。③此菌耐药机制可能由 Ampc 酶突变引起, 此猜测有待进一步验证。基于之前学者和本研究总结, 对于大多数不产酶的 CRE 菌株, CZA 对其有良好的活性, 但仍需要增加确证性药敏试验对其进行验证。

对于肠杆菌目细菌, 药敏纸片扩散法结果会出现假敏感。这时就需要对 CRE 菌株进行产酶类型的检测, 结合产酶类型指导临床精准用药。研究中有一株阴沟肠杆菌, PCR 显示携带 bla_{NDM} 耐药基因, 但 K-B 法检测抑菌圈为 24mm, 用肉汤稀释法进行验证, MIC 值为 $>64/4\text{mg/L}$, 对头孢他啶 / 阿维巴坦耐药。此菌 K-B 法检测抑菌圈并不在指南要求验证的检测范围 20~22mm, 却出现了假敏感, 进一步提示临床需要增加碳青霉烯酶型或基因型检测方法作为临床判断用药的参考依据, 保证药敏结果的准确性。有学者做了 CZA 微量肉汤稀释法和纸片法相关性方面的研究, K-B 法抑菌圈 $\geq 23\text{mm}$ 的, 假敏感率为 4.36%^[11]。虽然这部分菌株所占比例很少, 但在临床药敏报告中应特别注意, 应结合产酶类型将药敏结果修改为耐药。

综上所述, 携带不同碳青霉烯酶的 CRE 菌株对头孢他啶 / 阿维巴坦的药物敏感性不同。对不具备头孢他啶 / 阿维巴坦药敏的实验室, 可根据 CRE 菌株是否产生碳青霉烯酶及产酶类型指导临床用药。对于能够开展头孢他啶 / 阿维巴坦药敏的实验室, 也应结合产酶类型综合判断, 以免药敏结果出现假敏感或假耐药。头孢他啶 / 阿维巴坦在国内仍处于初上市阶段, 临床应用较少, 关于其耐药的研究报道较少, 因此需要进一步积累菌株进行科研分析。建议临床微生物实验室有针对性的开展头孢他啶 / 阿维巴坦的体外药物敏感试验, 同时增加酶型检测方法检测碳青霉烯酶型并结合病人相关病情综合考虑, 为临床抗感染治疗的精准用药和医院感染预防控制提供有利依据。

参考文献:

- [1] BANERJEE R, HUMPHRIES R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. Virulence, 2017, 8(4): 427-439.
- [2] 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]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2):1-4.
- [3] SHIRLEY M. Ceftazidime-avibactam: A review in the treatment of serious Gram-Negative bacterial infections[J]. Drugs, 2018, 78(6): 675-692.
- [4] 赵锦锦. 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.
- ZHAO Jinjin. Instruction of ceftazidime and avibactam [J]. World Notes on Antibiotics, 2019, 40(2):115-127.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing:30th edition CLSI supplement M100[S]. Wayne: PA, CLSI M100, 2020.
- [6] SUAY-GARCÍA B, PÉREZ-GRACIAMI P. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE)infections[J]. Antibiotics (Basel, Switzerland), 2019, 8(3): 122.
- [7] 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.
- [8] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(1):1-10.
- HU Fupin, GUO Yan, ZHU Demei, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China: 2018 report[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 20(1):1-10.
- [9] 张敬霞, 贾天野, 张树永, 等. 头孢他啶 / 阿维巴坦对耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的体外抗菌活性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(9):1109-1116.
- ZHANG Jingxia, JIA Tianye, ZHANG Shuyong, et al. Study on in vitro antimicrobial activities of ceftazidime/avibactam to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2018, 43(9):1109-1116.
- [10] WANG Qi, ZHANG Feifei, WANG Zhanwei, et al. Evaluation of the E-test and disk diffusion method for detection of the activity of ceftazidime-avibactam against *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa* in China [J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 187.
- [11] SADER H S, RHOMBERG P R, CHANDRASEKARAN S, et al. Correlation between broth microdilution and disk diffusion results when testing ceftazidime-avibactam against a challenge collection of *Enterobacteriales* isolates: results from a multilaboratory study[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020, 58(4): e01719-e01757.

收稿日期: 2021-07-07

修回日期: 2021-08-24