

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20245389

· 论 著 ·

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦耐药机制的研究

陈熙元¹, 王紫玲¹, 宋爽^{1,2}, 许波银³, 孙静芳², 赵树龙², 康海全²

(1. 徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏 徐州 221002; 3. 南通大学附属医院感染管理办公室, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的** 探讨耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的分子流行病学特点,揭示其对头孢他啶/阿维巴坦(CZA)的耐药机制。**方法** 收集 2021 年 1 月—2023 年 9 月徐州医科大学附属医院临床首次分离的 CZA 耐药 CRKP,采用基因扩增法和胶体金法检测 bla_{KPC} 、 bla_{NDM} 、 bla_{OXA} 、 bla_{VIM} 和 bla_{IMP} 五种碳青霉烯酶基因携带情况,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)方法检测产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌(KPC-KP)相对拷贝数以及表达量,采用全基因组测序方法分析 KPC 突变株的突变位点,以分析 CRKP 流行特征及对 CZA 的耐药机制。**结果** 共分离 73 株对 CZA 耐药的 CRKP,其中 37 株(50.68%)为 KPC + NDM 联产菌株,33 株(45.21%)为单产 NDM 的菌株(单产 NDM-5 23 株,单产 NDM-1 10 株),3 株单产 KPC 的菌株。发现菌株 KP-2842 为 ST11 型 KPC-33 突变株;菌株 KP-2127 和 KP-2189 为产 KPC-2 菌株,与肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 相比,其 bla_{KPC} 拷贝量分别上调 1.04~3.86 倍,而表达量分别增加 6.66~12.93 倍;胶体金法与 PCR 结合双向测序方法两者结果一致性良好,同时可以覆盖联产酶及 KPC-33 突变体的检测。**结论** 该院 CRKP 对 CZA 耐药机制主要由金属酶 NDM 介导,其中 NDM、KPC 联产是本地区 CRKP 的主要特点,部分菌株对 CZA 耐药可能由 bla_{KPC-2} 高拷贝和高表达导致,并在江苏地区的 ST11 型 CRKP 中首次发现了 KPC-33 突变体。

[关键词] 肺炎克雷伯菌;碳青霉烯酶;突变;头孢他啶/阿维巴坦;耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌

[中图分类号] R378.99⁺6

Mechanisms of resistance to ceftazidime/avibactam of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

CHEN Xi-yuan¹, WANG Zi-ling¹, SONG Shuang^{1,2}, XU Bo-yin³, SUN Jing-fang², ZHAO Shu-long², KANG Hai-quan² (1. Medical Technology School, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; 2. Department of Laboratory Medicine, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China; 3. Department of Infection Management, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the molecular epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), and reveal its mechanism of resistance to ceftazidime/avibactam (CZA). **Methods** CZA-resistant CRKP strains initially isolated from the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from January 2021 to September 2023 were collected. The carriage of 5 carbapenemase genes (bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{OXA} , bla_{VIM} , bla_{IMP}) were detected with gene amplification method and colloidal gold method. The relative copy number and expression level of *Klebsiella pneumoniae* (KP) carbapenemase-producing KP (KPC-KP) was detected with real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), mutation sites of KPC mutation strains were analyzed with whole-genome sequencing, and epidemic characteristics of CRKP and resistance mechanism to CZA were analyzed. **Results** A total of 73 CZA-resistant CRKP strains were isolated, with 37 (50.68%) being KPC and NDM co-producing

[收稿日期] 2023-12-26

[基金项目] 江苏省卫健委科研项目(Z2021009、Ym2023110);徐州市科技计划项目(KC23269)

[作者简介] 陈熙元(1997-),女(汉族),浙江省杭州市人,住院医师,主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 康海全 E-mail: hqk811029@163.com

strains, 33 (45.21%) NDM-producing alone (23 strains producing NDM-5 and 10 strains producing NDM-1), and 3 KPC-producing alone. KP-2842 strain was identified as ST11-type KPC-33 variant, KP-2127 and KP-2189 strains produced KPC-2. Compared with KP ATCC BAA-1705, the copy number of *bla*_{KPC} in these strains up-regulated by 1.04 – 3.86 fold, and the expression increased by 6.66 – 12.93 fold, respectively. Colloidal gold and PCR methods demonstrated good consistency and the ability to detect the enzyme co-producing and KPC-33 variant. **Conclusion** In this hospital, the resistance of CRKP to CZA is primarily mediated by the metalloenzyme NDM, with co-production of NDM and KPC being a characteristic of CRKP. High copy number and expression level of *bla*_{KPC-2} also contribute to CZA resistance. This study identified the KPC-33 variant for the first time in ST11-type CRKP in Jiangsu Province.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase; mutation; ceftazidime/vibactam; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)因其高耐药性、高传播性和高病死率已对临床抗感染治疗构成了严峻挑战^[1]。在应对 CRKP 感染的治疗药物中,多黏菌素、替加环素在疗效和安全性方面存在使用限制,因此头孢他啶/阿维巴坦(ceftazidime/avibactam, CZA)已成为 CRKP 感染治疗的较优选择^[2]。CZA 是我国于 2019 年被批准用于临床治疗的一种新型复合制剂^[3],对多重耐药革兰阴性杆菌引起的复杂性腹腔内感染、复杂性泌尿系统感染,以及医院获得性肺炎有较好的疗效,是目前治疗产 KPC、AmpC 等非金属酶 CRKP 感染的主要药物之一,但其抗菌谱不覆盖产 NDM、IMP 等金属酶的 CRKP^[4-5]。随着 CZA 的广泛应用已出现了较多耐药病例的报道,而且呈上升趋势^[6]。CZA 耐药 CRKP 的出现进一步提升了临床耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌(CRE)感染治疗的难度,目前其耐药机制以及相关流行病学数据较为缺乏。为此,本研究就徐州医科大学附属医院 2021 年 1 月—2023 年 9 月 CZA 耐药 CRKP 的流行病学特征、耐药机制进行分析,以延缓 CZA 耐药,为临床抗感染精准治疗提供实验室依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 试验纳入菌株为徐州医科大学附属医院 2021 年 1 月—2023 年 9 月临床各科室分离的不重复 CZA 耐药 CRKP 菌株(对亚胺培南或美罗培南任一耐药)。试验对照菌株肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 由南通大学附属医院许波银老师赠送。本研究获该院伦理委员会批准(审批号 XY-FY2022-KL008-01)。

1.2 仪器与试剂 MALDI-TOF MS(德国布鲁

克),VITEK 2 Compact 及药敏卡 AST-N335(法国梅里埃),聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 BIO-RAD),CZA 药敏纸片(意大利 Liofilchem),DNA Marker、PCR 引物、Agarose N、GelRed 核酸染料、SGEexcel FastSYBR Master 预混液(上海生工生物公司),碳青霉烯酶胶体金试剂盒(丹娜生物科技),TRIZOL 试剂(上海李记生物公司),磁珠法细菌 DNA 提取试剂盒 D6361-02(广州美基生物科技),逆转录试剂盒(武汉塞维尔公司)。

1.3 方 法

1.3.1 菌株鉴定及药物敏感试验 将血平板上分离的单个纯菌落采用质谱仪复核菌种,VITEK 2 Compact 进行药物敏感试验,药物敏感折点判读参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)^[7]标准,替加环素药敏折点判读参照美国食品药品监督管理局(FDA)^[8]标准,CZA 采用纸片扩散法检测,抑菌圈直径 ≤ 20 mm 为耐药。

1.3.2 临床资料的收集 使用电子病历系统病例查阅栏收集 3 例产 KPC 酶的肺炎克雷伯菌(KPC-KP)感染患者的诊断、治疗和转归资料。

1.3.3 碳青霉烯酶基因的检测 (1)胶体金法:将 73 株 CZA 耐药 CRKP 培养获得纯菌落,在每个 EP 管中加入 300 μ L 裂解液,挑取纯菌落置于裂解液中,漩涡震荡 10 s 使细菌在裂解液中充分混匀后静置 10 min,吸取 200 μ L 于免疫层析试纸的两个加样孔,等待 15 min 观察结果^[9]。(2)PCR 法:煮沸法提取 73 株 CZA 耐药的 CRKP 基因组,采用 PCR 及凝胶电泳,双向测序检测 5 种最常见的碳青霉烯酶基因,引物由生工生物南京分公司合成,引物设计及反应体系设置见参考文献[10]方法,引物参数见表 1。将扩增产物提交上海生工生物公司测序,采用 Snappene 将序列与 GeneBank 中下载的模板基因比对分析。

表 1 碳青霉烯酶基因引物序列及相关参数

Table 1 Primer sequences and related parameters of carbapenemase genes

目的基因	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	产物长度(bp)
<i>bla_{KPC}</i>	F:ATCGCCGTCTAGTTCTGCTG	60	811
	R:TCGCTGTGCTTGTTCATCCTT		
<i>bla_{NDM}</i>	F:GCATTAGCCGCTGCATTGAT	60	704
	R:TGGCTCATCACGATCATGCT		
<i>bla_{VIM}</i>	F:TAGCCGAGGTAGAGGGGAAC	60	383
	R:TGCCTGCTACTCAACGACTG		
<i>bla_{IMP}</i>	F:AAGAAGTTAACGGGTGGGGC	60	385
	R:CTTTCAGGCAGCCAAACCAC		
<i>bla_{OXA-48}</i>	F:ATTATCGGAATGCCAGCGGT	60	706
	R:GCAGCCCTAAACCATCCGAT		

注:F 为上游引物;R 为下游引物。

1.3.4 全基因组测序 使用磁珠法提取 KPC 突变菌株的基因组 DNA, 寄送至上海生工生物公司完成全基因组测序及序列拼接, 在 proksee 网站(<https://proksee.ca/>)进行全基因组序列分析。提取 KPC 突变菌株 7 个管家基因序列, 在相关网站完成多位点序列分型(MLST, <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>)。

1.3.5 *bla_{KPC}* 相对拷贝数的检测 采用煮沸法提取 3 株 KPC-KP 的 DNA, 以肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 为对照菌株, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)法检测 *bla_{KPC}* 拷贝数, 引物序列及参数见表 2。反应体系配置为: 2 × SGEexcel FastSYBR Mixture 10 μL, 前后引物各 0.4 μL, DNA 模板 1 μL, 无菌无酶水 8.2 μL。反应参数设置为: 95°C 5 min; 95°C 5 s, 56°C 10 s, 72°C 10 s, 循环 40 次; 内部参照基因为管家基因 *rpoB*, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算相对拷贝数, 所有菌株 DNA 提取 3 次, qPCR 设置 3 个复孔。

表 2 RT-qPCR 扩增引物及相关参数

Table 2 RT-qPCR amplification primers and related parameters

目的基因	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	产物长度(bp)
<i>bla_{KPC}</i>	F:CGGAACCTGCGGAGTGATGG	56	119
	R:CGCTGTGCTTGTTCATCCTTGTTA		
<i>rpoB</i>	F:TGTAGAGCGTGCGGTGAAAGAG	58	88
	R:GGAAATCGGCTTGCGGTTGATC		

注:F 为上游引物;R 为下游引物。

1.3.6 *bla_{KPC}* 相对表达量的检测 采用 TRIzol 法提取 KPC-KP RNA (1 × 10⁸ 个细菌溶解于 1 mL TRIzol), 逆转录试剂盒法获得其 cDNA 后, 采用 RT-qPCR 法进行相对表达量检测。对照菌株、内部参照基因、RT-qPCR 引物、反应参数同 1.3.5。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算相对表达量, 所有菌株 RNA 提取 3 次, qPCR 设置 3 个复孔。

1.4 统计学处理 RT-qPCR 数据采用 Welch's *t*-test (双尾) 进行统计学分析, 计量资料用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株特征及分布 73 株 CZA 耐药 CRKP 分离患者中, 男性占比 61.64%, 年龄为 63(32, 74)岁; 17 株分离自年龄 <1 岁的患者, 40 株分离自 >60 岁的患者。菌株主要来源于痰(69.86%)、导管(10.96%)及尿(6.85%)标本, 主要分离自各科室重症监护病房(ICU, 67.12%)、神经外科病房(21.92%)及血液内科病房(2.74%)。见表 3。

表 3 耐 CZA 的 CRKP 特征及分布情况

Table 3 Characteristics and distribution of CZA-resistant CRKP

来源	株数(n=73)	构成比(%)
标本		
痰	51	69.86
导管	8	10.96
尿	5	6.85
血	4	5.48
脓液	2	2.74
支气管肺泡灌洗液	2	2.74
腹腔引流液	1	1.37
科室		
新生儿 ICU	17	23.28
神经外科病房	16	21.92
神经内科 ICU	12	16.44
急诊 ICU	6	8.22
综合 ICU	6	8.22
神经外科 ICU	5	6.85
呼吸科 ICU	3	4.11
血液内科病房	2	2.74
神经内科病房	2	2.74
呼吸科病房	1	1.37
普外科病房	1	1.37
泌尿外科病房	1	1.37
胃肠外科	1	1.37

2.2 药敏试验结果 药敏试验结果显示,73 株 CZA 耐药 CRKP 对多数抗菌药具有耐药性,尤其对头孢菌素类及青霉素类抗生素耐药率已达 100%,对氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类、磺胺类及单环 β-内酰胺类药物氨曲南的耐药率稍低,但也超过 60%,仅发现 1 株 CRKP 对多黏菌素耐药,所有 CRKP 对替加环素均敏感,见表 4。17 株对氨曲南敏感的 CRKP 均来源于新生儿 ICU。

表 4 73 株 CZA 耐药 CRKP 对 17 种抗菌药物的耐药情况
Table 4 Resistance of 73 CZA-resistant CRKP strains to 17 antimicrobial agents

抗菌药物	耐药株数	耐药率(%)
哌拉西林/他唑巴坦	73	100
替卡西林/克拉维酸	73	100
头孢吡肟	73	100
头孢他啶	73	100
头孢哌酮/舒巴坦	73	100
氨曲南	56	76.71
亚胺培南	72	98.63
美罗培南	73	100
阿米卡星	45	61.64
妥布霉素	51	69.86
米诺环素	47	64.38
多西环素	55	75.34
替加环素	0	0
左氧氟沙星	52	71.23
环丙沙星	61	83.56
复方磺胺甲噁唑	52	71.23
多黏菌素	1	1.37

2.3 碳青霉烯酶基因型检测结果 碳青霉烯酶基因型胶体金法检测结果显示,73 株耐 CZA 的 CRKP 中,37 株同时产 KPC 和 NDM,33 株单产 NDM 株,3 株单产 KPC。碳青霉烯酶基因型 PCR 结合双向测序与胶体金方法结果一致率为 100%。见表 5。KPC 与 NDM 联产菌株 PCR 产物电泳及胶体金检测结果见图 1。

2.4 KPC 突变菌株全基因组测序结果 对 73 株 CZA 耐药 CRKP 菌株进行 Sanger 测序后,发现 1 株

*bla*_{KPC-2} 突变株 KP-2842,基因组测序结果显示为 ST11 型,在 *bla*_{KPC-2} 的 532 发生碱基突变(G532T),导致在 KPC-2 酶第 179 位的氨基酸天冬氨酸被酪氨酸取代(D179Y),经比对与 *bla*_{KPC-33} 序列一致。

表 5 CZA 耐药 CRKP 菌株两种检测方法检出碳青霉烯酶基因型分布
Table 5 Distribution of carbapenemase genotypes detected by two methods for CZA-resistant CRKP strains

碳青霉烯酶基因型	胶体金法		PCR 法	
	株数	构成比(%)	株数	构成比(%)
<i>bla</i> _{KPC-2} + <i>bla</i> _{NDM-1}	37	50.68	37	50.68
<i>bla</i> _{NDM}	33	45.21	33	45.21
<i>bla</i> _{NDM-5}	-	-	23	31.51
<i>bla</i> _{NDM-1}	-	-	10	13.70
<i>bla</i> _{KPC}	3	4.11	3	4.11
<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	2	2.74
<i>bla</i> _{KPC-33}	-	-	1	1.37
合计	73	100	73	100

注: - 代表胶体金法不能区分基因亚型,数据不存在。

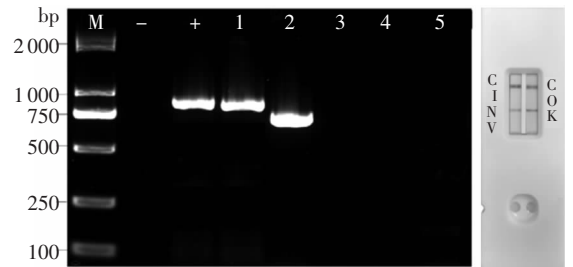
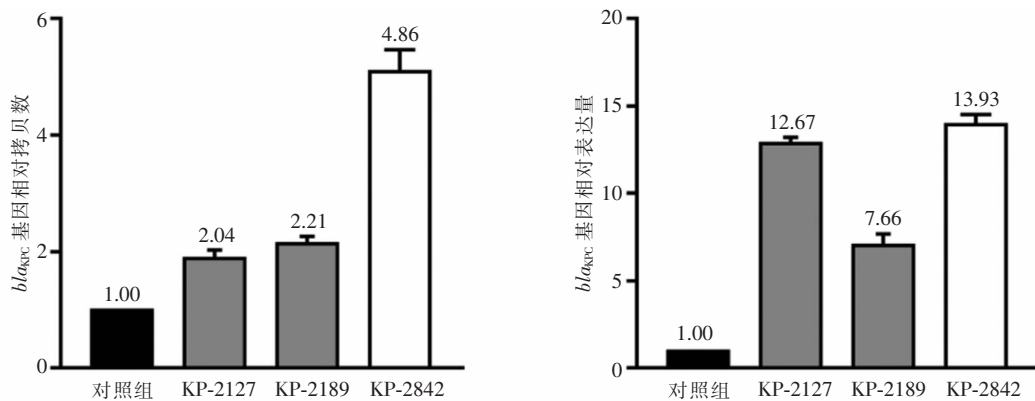


图 1 1 株 KPC 与 NDM 联产菌株 PCR 产物电泳及胶体金检测图谱
Figure 1 Electrophoresis and colloidal gold plots of 1 KPC and NDM co-producing strain

2.5 KPC-KP *bla*_{KPC} 相对拷贝数及表达量 共检出 3 株 KPC-KP (KP-2127、KP-2189、KP-2842) 菌株,与对照菌株肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 相比,*bla*_{KPC} 相对拷贝量分别上调至 2.04、2.21、4.86 倍,相对表达量分别增加至 12.67、7.66、13.93 倍。见图 2。



注: KP-2842 检测基因为 *bla*_{KPC-33}。

图 2 CZA 耐药 CRKP 的 *bla*_{KPC} 拷贝及表达水平

Figure 2 Copy number and expression level of *bla*_{KPC} in CZA-resistant CRKP

2.6 3 株 KPC-KP 感染患者治疗与转归 KP-2127 感染患者, 32 岁, 男性, 因前交通动脉瘤破裂伴蛛网膜下腔出血入住神经外科 ICU, 住院第 24 天痰培养检出 CZA 耐药 CRKP, 经呼吸内科会诊后改为多黏菌素静脉滴注及雾化吸入治疗, 第 39 天患者病情好转转入社区医院继续康复治疗。KP-2189 感染患者, 77 岁, 女性, 因小脑出血破入脑室入住神经外科病房, 住院期间因肺部感染使用注射用磷酸阿米卡星治疗 14 d, 治疗第 13 天痰培养检出 CZA 耐药 CRKP, 患者家属要求转院治疗。KP-2842 感染患者, 62 岁, 女性, 因多发性颅内动脉瘤破裂伴蛛网膜下腔出血入住神经外科, 住院第 6 天痰培养检出碳青霉烯类敏感肺炎克雷伯 (CSKP), 住院第 24 天痰培养检出 CZA 敏感 CRKP, 期间使用注射用头孢西钠、头孢他啶、左氧氟沙星等多种药物, 住院第 29 天痰培养检出 CZA 耐药 CRKP, 改用替加环素治疗 7 d 后痰培养仍显示该病原菌未被清除, 转入社区医院继续治疗。

3 讨论

本文对临床标本分离的 73 株 CZA 耐药 CRKP 的标本来源、耐药性及耐药机制进行研究, 发现分离自年龄 <1 岁和 >60 岁的患者占比最高, 此与这类患者抵抗力较弱、感染风险高有关, 菌株分离自痰标本占比最高, 达 69.86%, 与相关研究^[11-12] 结果一致, 提示呼吸道标本是 CZA 耐药 CRKP 的主要来源, 加强呼吸道卫生的管理或可一定程度预防 CZA 耐药 CRKP 感染。本研究发现 CZA 耐药 CRK 感染病例多来源于 ICU, 一方面与入住该科的患者免

疫力低下, 常接受侵入性操作及应用多种抗菌药物有关。既往研究^[13] 表明, 入住 ICU 是感染 CRKP 的危险因素之一; 另一方面因 CRKP 可移动元件常能介导耐药基因水平传播, 导致该类耐药菌常可以在医疗机构内, 尤其是 ICU 内传播流行。因此, 医院应将 ICU 作为感染防控的重点科室。

对临床分离的 CRKP 菌株进行准确、快速的酶型检测可减少临床经验性广谱抗菌药物的不合理使用。目前实验室检测碳青霉烯酶的手段多样, 包括 mCIM-eCIM 联合试验、APB-EDTA 试验、Carba NP 试验等表型检测方法, 以及本试验采用的测序和胶体金基因型检测方法。本研究胶体金方法和测序结果呈现出高度一致性, 而且覆盖了联产酶和 KPC 突变体 KPC-33 酶, 同时灵敏度及准确性也良好, 无需特殊的设备, 操作简单快速便于推广, 可指导临床医生根据碳青霉烯酶型选择治疗方案。

据中国细菌耐药监测网 (CHINET)^[14] 监测数据, 肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类药物的耐药率已达 20% 以上。CRKP 主要的耐药机制是产碳青霉烯酶, 但所产酶型具有区域和人群分布差异^[15]。在我国, 丝氨酸酶 KPC 和金属酶 NDM 的产生是其对碳青霉烯类耐药的首要原因, 成人以 KPC 酶为主, 儿童以 NDM 酶为主^[16]。CZA 能有效抑制 A、C 类及部分 D 类 β -内酰胺酶, 但对 B 类金属酶无抑制作用^[17]。本研究 73 株 CZA 耐药 CRKP 中, 有 70 株 (95.89%) 产 NDM, 表明产生金属酶是该院 CRKP 对 CZA 耐药的主要机制, 与 Chen 等^[18] 的研究结果相符。其中有 37 株联产 NDM 和 KPC, 这使得临床治疗难度更大, 可选择的药物更加局限。因 CZA 无法水解金属酶 NDM^[17], 其应用对产该酶的

菌株有一定的筛选作用。来自欧洲的一项研究^[19]表明,在 CZA 投入使用后的筛选压力下,该医疗机构 ICU 内 CRKP 菌株碳青霉烯酶的优势酶型从丝氨酸酶 KPC 转变为金属酶 VIM。因此,在抗菌药物应用之前准确、快速检测碳青霉烯酶基因型,对于临床 CRKP 感染的精准治疗和延缓耐药的产生是非常必要的。

不同碳青霉烯酶对抗菌药物的活性存在差异,当其产多种碳青霉烯酶时常呈现多药耐药、高水平耐药^[20],因此使用单一药物治疗效果往往不佳,意味着这部分菌株的临床治疗更加困难,对其治疗需要联合用药或研发新的抗菌药物复合制剂。2013 年巴西首次报道了 1 株 KPC-NDM 联产的霍氏肠杆菌,后又在印度等地区的肺炎克雷伯菌中检出^[21-22],新型冠状病毒感染流行期间巴西曾报道同时携带这两种基因的 CRKP 引起的医院感染暴发^[23],本研究发现的 KPC 与 NDM 联产菌株除 1 株外均为 2021 年新型冠状病毒感染流行期间检出,提示可能存在这种菌株的局部流行。Gao 等^[20]研究表明,KPC-2 与 NDM-1 联产菌株有较强的适应性和传播性,进化分析显示,可能是 *bla*_{KPC-2} 阳性 CRKP 获得了一个携带 *bla*_{NDM-1} 的质粒进化而来,并可稳定遗传,提示这种联产菌株是今后实验室和临床需要重点关注的耐药菌。

药敏试验结果显示,73 株 CZA 耐药 CRKP 对头孢菌素类和青霉素类药物均耐药,对喹诺酮类左氧氟沙星、磺胺类复方磺胺甲噁唑、氨基糖苷类妥布霉素及四环素类米诺环素的耐药率稍低,但也均超过 60%,说明 CZA 耐药 CRKP 引起的感染治疗可选择的抗菌药物非常受限。值得庆幸的是,CZA 耐药菌株对多黏菌素和替加环素的耐药率仍处于较低水平,分别为 1.37%、0,与以往研究^[12,24]结果一致,提示这两种抗菌药物目前暂时仍可作为 CZA 耐药菌株感染治疗的有效选择之一。本研究发现仅产 NDM-5 的 CRKP 均显示出对氨曲南有较好的敏感性,17 株对氨曲南敏感的 CRKP 均来源于新生儿 ICU。对于氨曲南敏感 CZA 耐药的 CRKP 感染可选择氨曲南治疗,对于由 NDM 介导的 CZA 耐药 CRKP 感染,也可根据指南和临床研究使用氨曲南联合 CZA 治疗。CZA 联合氨曲南对产 NDM 的 CRKP 可达到协同抑菌作用^[25-27],复旦大学附属华山医院胡付品教授团队也曾报道 CZA 联合氨曲南和阿米卡星成功清除 NDM-5 阳性 CRKP 菌株引起血流感染的病例^[28],揭示儿童感染 CZA 耐药

CRKP 时该方案或可作为黏菌素外的另一有效选择。本研究 KP-2127 感染患者使用药敏试验结果为敏感的多黏菌素治疗后好转出院,而 KP-2842 感染患者在替加环素 50 mg q12h 治疗第 6 天痰培养仍检出 CZA 耐药 CRKP,专家共识表明替加环素在肺组织浓度较低,使用单药标准剂量疗效不佳,对于治疗 CRE 引起的重症医院获得性肺炎推荐使用大剂量替加环素方案联合用药,对于病情重的患者可延长疗程^[29],因此对该患者的治疗需增加用药剂量、优化用药方案。

目前已知的 CRKP 对 CZA 的耐药机制还有基于 KPC-2、KPC-3 部分氨基酸的突变成新的 KPC 亚型,如 KPC-31、KPC-33 等,除此之外还有野生型 *bla*_{KPC} 拷贝及表达增加合并膜通透性改变或者外排泵表达增加等^[30]。本研究发现 1 株 KPC-KP 为 KPC-33 突变体,该种突变体曾在我国北京^[31]、上海^[32-33]和河南^[34]等地区被检出,这是在江苏地区首次发现 ST11 型 CRKP 菌株携带 *bla*_{KPC-33},此外,还有 2 株对 CZA 耐药的 KPC-KP 经测序并未发现 KPC-2 的编码基因突变,RT-qPCR 结果显示其 *bla*_{KPC-2} 相对拷贝数及表达量较肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 有不同程度上调,这可能是其出现 CZA 耐药的主要原因,是否合并产 β -内酰胺酶(ESBLs)基因表达、膜孔通透性改变及外排上调等机制有待进一步研究。

本研究表明随着 CZA 的广泛使用,其耐药菌株在药物的选择压力下逐渐增加,产金属酶 NDM 是该院 CRKP 对 CZA 耐药的主要机制,其中 KPC-2、NDM-1 联产为最显著的特点,同时该院部分 CRKP 因 *bla*_{KPC-2} 突变或拷贝数上调导致其对 CZA 耐药,虽然本研究仅是一家单中心研究,无法代替整个地区的真实流行情况,但是这些数据仍应引起实验室和临床的足够重视,实验室应该积极提供碳青霉烯酶型检测,以便临床医生根据酶型结果进行精准治疗,双方密切配合以控制该耐药菌在医疗机构内传播与流行。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Tsioutis C, Eichel VM, Mutters NT. Transmission of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: the role of infection control[J]. J Antimicrob Chemother, 2021, 76(Suppl 1): i4-i11.
- [2] Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, et al. International con-

- sensus guidelines for the optimal use of the polymyxins; endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-Infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP)[J]. *Pharmacotherapy*, 2019, 39(1): 10–39.
- [3] van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam; second-generation β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(2): 234–241.
- [4] Shields RK, Nguyen MH, Chen L, et al. Ceftazidime-avibactam is superior to other treatment regimens against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(8): e00883–17.
- [5] Petraitiene R, Petraitis V, Kavaliauskas P, et al. Pharmacokinetics and efficacy of ceftazidime-avibactam in the treatment of experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in persistently neutropenic rabbits[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(4): e02157–19.
- [6] Wang YH, Wang J, Wang R, et al. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 22: 18–27.
- [7] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100 30th Edition[S]. Malvern, PA, USA: CLSI, 2020.
- [8] 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.
- Society of Clinical Microbiology and Infection of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare, Clinical Microbiology Group of the Laboratory Medicine Society of the Chinese Medical Association, Clinical Microbiology Group of the Microbiology and Immunology Society of the Chinese Medical Association. Expert consensus on polymyxins, tigecycline and ceftazidime/avibactam susceptibility testing [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2020, 43(10): 964–972.
- [9] 丹娜(天津)生物科技股份有限公司, 丹娜(湖南)生物科技有限责任公司, 丹娜(天津)医学检验有限公司. 碳青霉烯酶免疫层析检测试纸及其制备方法、试剂盒和应用: CN202211185654.7 [P]. 2023–04–14.
- Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd, Dynamiker Biotechnology (Hunan) Co., Ltd, Dynamiker (Tianjin) Medical Laboratory Co., Ltd. Carbapenemase immunochromatographic test paper and its preparation method, kit and application: CN202211185654.7 [P]. 2023–04–14.
- [10] Poirer L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 119–123.
- [11] 胡小品, 袁国航, 吴瑶瑶, 等. 中国西南地区 3 所综合性医院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌流行病学特征及耐药性[J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(2): 121–127.
- Hu XP, Yuan GH, Wu YY, et al. Molecular epidemiological characteristics and antimicrobial resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in three general hospital in southwest China[J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2022, 21(2): 121–127.
- [12] 黄丽萍, 肖力英, 陈东杰, 等. 福州地区耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌对头孢他啶-阿维巴坦的药敏情况及耐药分析[J]. *福建医药杂志*, 2021, 43(5): 5–9.
- Huang LP, Xiao LY, Chen DJ, et al. Analysis of drug sensitivity and resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to ceftazidime-avibactam in Fuzhou[J]. *Fujian Medical Journal*, 2021, 43(5): 5–9.
- [13] Liu P, Li X, Luo M, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection; a Meta-analysis[J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(2): 190–198.
- [14] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2021 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022, 22(5): 521–530.
- Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. CHINET surveillance of antimicrobial resistance among the bacterial isolates in 2021[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2022, 22(5): 521–530.
- [15] Han RR, Shi QY, 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.
- [16] Jiang MX, Li H, Liu X, et al. Genomic analysis revealed the international and domestic transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Chinese pediatric patients[J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(2): e0321322.
- [17] Sanz Herrero F. Ceftazidime-avibactam[J]. *Rev Esp Quimioter*, 2022, 35(Suppl 1): 40–42.
- [18] Chen D, Xiao L, Hong D, et al. Epidemiology of resistance of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* to ceftazidime-avibactam in a Chinese hospital[J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 132(1): 237–243.
- [19] Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Lambropoulou A, et al. Reversal of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemiology from *bla*_{KPC}- to *bla*_{VIM}-harbouring isolates in a Greek ICU after introduction of ceftazidime/avibactam[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(7): 2051–2054.
- [20] Gao H, Liu YD, Wang RB, et al. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102599.
- [21] Ahmed MAEGES, Yang YX, Yang YQ, et al. Emergence of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-

harboring a *bla*_{NDM-1}-carrying virulent plasmid and a *bla*_{KPC-2}-carrying plasmid in an Egyptian hospital[J]. *mSphere*, 2021, 6(3): e00088–21.

- [22] Vázquez-Ponce F, Dantas K, Becerra J, et al. Detecting KPC-2 and NDM-1 coexpression in *Klebsiella pneumoniae* complex from human and animal hosts in South America[J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(5): e0115922.
- [23] Boralli CMDS, Paganini JA, Meneses RS, et al. Characterization of *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} plasmids of a *K. pneumoniae* ST11 outbreak clone[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12(5): 926.
- [24] Zhou JJ, Yang JW, Hu FP, et al. Clinical and molecular epidemiologic characteristics of ceftazidime/avibactam-resistant carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in China[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 2571–2578.
- [25] Bocanegra-Ibarias P, Camacho-Ortiz A, Garza-González E, et al. Aztreonam plus ceftazidime-avibactam as treatment of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in a neutropenic patient: last resort therapy?[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 23: 417–419.
- [26] Lu GP, Tang H, Xia ZX, et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of ceftazidime/avibactam alone or in combination with aztreonam against carbapenem-resistant *Enterobacteriales*[J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 7107–7116.
- [27] Zou DY, Huang Y, Zhao XN, et al. A novel New Delhi metallo-β-lactamase variant, NDM-14, isolated in a Chinese Hospital possesses increased enzymatic activity against carbapenems [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(4): 2450–2453.
- [28] 丁丽, 郑永贵, 吴湜, 等. 抗菌药物联合治疗产 NDM-5 型金属酶肺炎克雷伯菌血流感染 1 例[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2022, 22(3): 336–338.
Ding L, Zheng YG, Wu S, et al. Combined antimicrobial treatment of NDM-5 producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: one case report[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2022, 22(3): 336–338.
- [29] 临床常用四环素类药物合理应用多学科专家共识编写组, 中华预防医学会医院感染控制分会, 中国药理学临床药理分会. 临床常用四环素类药物合理应用多学科专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2023, 103(30): 2281–2296.

Editing Group for Multidisciplinary Expert Consensus on the Rational Use of Tetracyclines Commonly Used in Clinical Practice, Hospital Infection Control Branch of Chinese Preventive Medicine Association, Clinical Pharmacology Branch of Chinese Pharmacological Society. Multidisciplinary expert consensus on the rational use of tetracyclines commonly used in clinical practice[J]. *National Medical Journal of China*, 2023, 103(30): 2281–2296.

- [30] Xiong LY, Wang XT, Wang Y, et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam [J]. *WIREs Mech Dis*, 2022, 14(6): e1571.
- [31] Wang CL, Zhao JK, Liu ZB, et al. *In vivo* selection of imipenem resistance among ceftazidime-avibactam-resistant, imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolate with KPC-33 carbapenemase[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 727946.
- [32] Ding L, Shen SQ, Han RR, et al. Ceftazidime-avibactam in combination with imipenem as salvage therapy for ST11 KPC-33-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2022, 11(5): 604.
- [33] Shi QY, Han RR, Guo Y, et al. Multiple novel ceftazidime-avibactam-resistant variants of *bla*_{KPC-2}-positive *Klebsiella pneumoniae* in two patients [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(3): e0171421.
- [34] Li DB, Li KY, Dong HL, et al. Ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 due to a mutation in plasmid-borne *bla*_{KPC-2} to *bla*_{KPC-33}, in Henan, China [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 1725–1731.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式:陈熙元,王紫玲,宋爽,等.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对头孢他啶/阿维巴坦耐药机制的研究[J].*中国感染控制杂志*,2024,23(11):1365–1372. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20245389.

Cite this article as: CHEN Xi-yuan, WANG Zi-ling, SONG Shuang, et al. Mechanisms of resistance to ceftazidime/avibactam of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chin J Infect Control*, 2024, 23(11): 1365–1372. DOI: 10.12138/j.issn.1671–9638.20245389.