

头孢他啶/阿维巴坦耐药肺炎克雷伯菌的体外抗菌药物治疗方案研究

阙万才¹, 程昱¹, 赵志常¹, 曾晓芳¹, 张冰清², 刘茂柏¹, 丘宏强^{1,2*} (1.福建医科大学附属协和医院药学部, 福州 350001; 2.福建医科大学药学院, 福州 350108)

摘要: 目的 探索对头孢他啶/阿维巴坦耐药的肺炎克雷伯菌体外抗菌药物治疗方案, 为临床治疗方案选择提供理论依据。方法 采用 PCR 对 2 株肺炎克雷伯菌可能耐药基因进行鉴定, 并对扩增产物进行测序。采用体外时间杀菌试验评估不同抗菌药物单药或联合用药对耐药菌株生长的影响。结果 膜孔蛋白严重缺失和产金属酶分别介导了两菌株对头孢他啶/阿维巴坦耐药; 多黏菌素 B、亚胺培南、美罗培南和磷霉素单药或两药合并不能显示足够抗菌效果, 而多黏菌素 B-美罗培南-磷霉素或多黏菌素 B-头孢他啶-阿维巴坦三药联合方案可分别对这 2 株耐药株产生强大持续的杀菌作用。结论 多黏菌素 B 为基础三药联合可能是对抗具有不同机制介导的头孢他啶/阿维巴坦耐药肺炎克雷伯菌的有效方案。

关键词: 头孢他啶; 阿维巴坦; 耐药; 肺炎克雷伯菌; 体外

中图分类号: R969.4 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)12-1502-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.017

引用本文: 阙万才, 程昱, 赵志常, 等. 头孢他啶/阿维巴坦耐药肺炎克雷伯菌的体外抗菌药物治疗方案研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1502-1508.

Study on the *in Vitro* Antibacterials Therapy of Ceftazidime/Avibactam-resistant *Klebsiella Pneumoniae*

QUE Wancai¹, CHENG Yu¹, ZHAO Zhichang¹, ZENG Xiaofang¹, ZHANG Bingqing², LIU Maobai¹, QIU Hongqiang^{1,2*} (1.Department of Pharmacy, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China; 2.College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the antibacterial therapy of ceftazidime/avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains *in vitro* and to provide a basic theory for the clinical treatment against such resistant strains. **METHODS** The possible resistance genes of two *Klebsiella pneumoniae* strains were characterized by PCR, and then the amplicons were sequenced. The effect of monotherapy and combination of the different antibiotics against the resistant strains were evaluated by *in vitro* time-kill experiments. **RESULTS** Deficiency of outer membrane porins and production of metallo-beta-lactamase mediated the two strains to ceftazidime/avibactam-resistant, respectively. The time-kill experiment results showed that monotherapy and two-drug combinations of polymyxin B, imipenem, meropenem and fosfomycin could not obtain a satisfactory bactericidal effect. However, the triple therapy of polymyxin B-meropenem-fosfomycin or polymyxin B-ceftazidime-avibactam could produce strong and sustained bactericidal effect on the two drug-resistant strains respectively. **CONCLUSION** Different triple therapy based on polymyxin B may be an effective strategy against ceftazidime/avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains underlying a different resistant mechanism.

KEYWORDS: ceftazidime; avibactam; resistance; *Klebsiella pneumoniae*; *in vitro*

产碳青霉烯酶 (*Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase, KPC)肺炎克雷伯菌在世界范围广泛传播, 具有较高的发病率, 且临床死亡率较高, 已成为全球关注的卫生问题^[1]。根据中国细菌耐药监测网 CHINET 监测结果, 肺炎克雷伯菌对常见的碳青霉烯类药物(美罗培南)的耐药率从 2005 年的 2.9%左右飙升至 2018 年的 28.6%, 耐药率上升幅度高达 8 倍^[2]。头孢他啶/阿维巴坦这一新型酶

复合制剂虽于 2019 年获得国家药品监督管理局批准上市, 但值得注意的是, 国外不断有针对此药耐药菌报道的出现^[3-7]。在全球新的抗菌药物研发放缓的背景下, 有必要利用现有药物进行用药方案研究, 以应对头孢他啶/阿维巴坦临床可能出现的耐药。由于此药国内上市不久, 尚未见相关此类耐药菌的临床治疗方案报道。本研究选取临床分离的 2 株对头孢他啶/阿维巴坦耐药的耐药

基金项目: 福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(2018-ZQN-35); 福建省科技厅社发处引导性项目(2016Y0045); 福建省科技创新联合资金项目(2019Y9051)

作者简介: 阙万才, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0591)86218591 E-mail: wancai1979@126.com *通信作者: 丘宏强, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0591)8621859 E-mail: hongqiangqiu@fjmu.edu.cn

肺炎克雷伯菌,通过评估体外不同抗菌药物单独和联合给药方案的抗菌效果,以期寻找可能有效的治疗方案,为临床此类耐药菌的治疗提供理论依据。

1 仪器与试剂

Veriti Dx PCR 扩增仪(Applied Biosystems); PowerPac Basic 电泳仪(美国伯乐); CP114 分析天平(奥豪斯); 0.20 μm 无菌滤膜(德国康宁,批号: 31317068); GelDoc XR+凝胶成像仪(美国伯乐); DK600S 水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); 50 mL KG2621 灭菌离心管(上海捷瑞生物工程有限公司)。

Mueller-Hinton 肉汤粉(批号: HB6231)、Mueller-Hinton 琼脂粉(批号: HB6232)均购自青岛高科园海博生物技术有限公司; 电泳用琼脂糖(BIOWEST,批号: 111860); 去离子水(批号: E607017)、dNTPs(批号: FB26KA3884)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Q5 Hi-Fidelity Taq DNA 聚合酶(NEB,批号: 10065838); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司,批号: GR0612G21X); 氯化钠、氯化钙、氯化镁均购自西陇科学股份有限公司。

多黏菌素 B(Sigma-Aldrich,批号: WXBC3634V); 亚胺培南(AK Scientific,批号: LC27244PU9); 磷霉素(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,批号: 4181113); D(+)-6-磷酸葡萄糖钠(英国 Acros Organics,批号: 343234); 阿维巴坦(美国 Advanced ChemBlocks Inc.,批号: R16093; 纯度: 99%); 所有药品临用前灭菌注射用水配制,并通过 0.22 μm 无菌滤膜过滤。

菌株:本研究使用肺炎克雷伯菌株 XHKP2016 和 XHKP2052,2019 年分离自福建医科大学附属协和医院患者痰培养。XHKP2016 来自 86 岁男性患者,入院诊断为脑出血。住院期间根据药敏使用抗感染药物有头孢噻肟钠、替加环素、特治星、伏立康唑、多黏菌素 B。XHKP2052 来自 89 岁女性患者,因感染性休克入院治疗。住院期间根据药敏使用抗感染药物有注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠、卡泊芬净、多黏菌素 B、美罗培南、伏立康唑、左氧氟沙星。

2 方法

2.1 细菌药敏检测

根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)指南

要求,菌株的药物敏感性试验采用 Mueller-Hinton 肉汤稀释法或者稀释琼脂平板法进行检测。最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)折点参考 CLSI 和欧洲药敏检测委员会(EUCAST)制定的范围。

2.2 基因分析

基因组 DNA 根据说明书采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行提取;采用 PCR 法,根据文献设计 β -内酰胺酶基因引物: A 型酶(GES 和 KPC), B 型酶(NDM, VIM 和 IMP)和 D 型酶(OXA 48 和 40);膜孔蛋白基因 Ompk35、Ompk36 和 Ompk37。引物序列设计见表 1,PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳分析,并且对 PCR 产物进行测序分析;核酸序列比对和蛋白序列推断采用 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行分析。

表 1 耐药基因引物序列

Tab. 1 Primers for resistance genes

基因名	正向引物	反向引物
<i>bla_{KPC}</i>	TCGCTAAACTCGAACAGG	TTACTGCCCGTTGACGCC CAATCC
<i>bla_{NDM}</i>	ATGGAATTGCCCAATATT	TCAGCGCAGCTTGTTCGGC
<i>bla_{GES}</i>	CTATTACTGGCAGGGATCG	CCTCTCAATGGTGTGGGT
<i>bla_{OXA-48}</i>	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	GTAAMRATGCTTGGTTC GC
<i>bla_{IMP}</i>	GAGTGGCTTAATTCTCRATC	AACTAYCCAATAYRTAAC
<i>bla_{VIM}</i>	GTTTGGTTCGCATATCGCAAC	AATGCGCAGCACCAGGA TAG
<i>bla_{OXA-40}</i>	CACCTATGGTAATGCTCTTGC	GTGGAGTAACACCCATT CC
<i>Ompk35</i>	CAGACACCAAACCTCTCATCA ATGG	AGAATTGGTAAACGATA CCCACG
<i>Ompk36</i>	CAGCACAATGAATATAGCCG AC	GCTGTTGTCTGCCAGCA GGTTG
<i>Ompk37</i>	CATTCCGCGAGAATGAGACGG CAAC	CGACGATGTTATCGGTA GAGATAC

2.3 时间杀菌试验

通过 24 h 杀菌试验评价单药、双药和三药合并给药方案杀菌速度和程度。①单药给药方案:多黏菌素 B(0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 64 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 亚胺培南(10, 20, 40, 60, 120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 美罗培南(10, 20, 40, 60, 120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和磷霉素(75, 150, 300, 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。②多黏菌素 B(0.5, 1, 2, 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为基础的两药合并,另一药物为美罗培南(20, 40, 60, 120 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)或者磷霉素(75, 150, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。③三药给药方案:采用 3×2×2 阵列多黏菌素 B(0.5, 2, 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、美罗培南(40, 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和磷霉素(75, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$);另一组三药 3×3×1 阵列多黏菌

素 B(1, 2, 4 mg·L⁻¹), 头孢他啶(16, 32, 64 mg·L⁻¹)/阿维巴坦(4 mg·L⁻¹)三药合并观察杀菌效果。

2.4 细菌计数

所有细菌取样样本通过灭菌生理盐水系列稀释法稀释, 加 50 μL 稀释液, 用接种环接种均匀, 涂抹在 Mueller-Hinton 琼脂培养板。置于 37 °C 培养箱 18~24 h 后, 采用 App 软件 Colony Counter 进行菌落计数, 细菌的定量限为 2 log₁₀ CFU·mL⁻¹。

2.5 药效学分析

抗菌效果采取不同时间点(4, 8, 24 h)的细菌计数 1 和基线水平(0 h)log₁₀CFU·mL⁻¹ 变化值来评价, 公式如下: log change=log₁₀(CFU_t)-log₁₀(CFU₀); 杀菌活性: 和起始菌数相比, log₁₀CFU·mL⁻¹ 降低 ≥3。

3 结果

3.1 细菌药敏试验

两菌株对多种抗菌药物 MIC 检测结果显示, 菌株对多黏菌素敏感, 对其他包括碳青霉烯类药物的大部分抗菌药物为耐药, 所以该肺炎克雷伯菌为多重耐药的肺炎克雷伯菌。结果见表 2。

3.2 基因检测结果

PCR 扩增电泳结果显示, XHKP2052 存在产金属酶基因(NDM), 而 XHKP2016 不存在 NDM 基因。两菌株均不存在 A 型酶(GES 和 KPC), B 型酶(VIM 和 IMP)和 D 型酶(OXA48 和 40), 基因扩增结果为阴性。膜孔蛋白 *Ompk35*, *Ompk36* 和 *Ompk37* 基因 PCR 扩增结果显示, XHKP2052 在 1 200 bp 附近存在 *Ompk35*, *Ompk36* 和 *Ompk37* 基因扩增产物条带, 而 XHKP2016 不存在 *Ompk35*, *Ompk36* 和 *Ompk37* 基因目的扩增带。通过对 XHKP2052 菌株 *Ompk35*, *Ompk36* 和 *Ompk37* 基因扩增产物进行测序, BLAST 分析结果提示 *Ompk35* 为野生型, *Ompk36* 存在几个氨基酸的替换, *Ompk37* 则存在启动子突变。结果见图 1。

3.3 时间杀菌结果

3.3.1 单药治疗 多黏菌素 B 在高浓度(16,

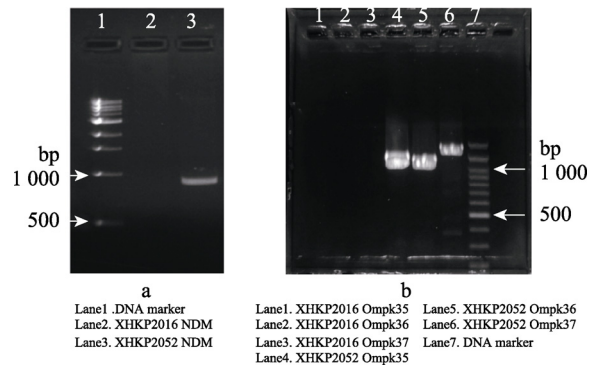


图 1 肺炎克雷伯菌株 XHKP2016 和 XHKP2052 产碳青霉烯金属酶 NDM 基因(a)和膜孔蛋白 *Ompk35*, *Ompk36* 和 *Ompk37* 基因(b)的 PCR 扩增后电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of NDM metallo-beta-lactamase genes(a) and *Ompk35*, *Ompk36* and *Ompk37* genes (b) amplified from XHKP2016 and XHKP2052 *Klebsiella pneumoniae* strains by PCR

64 mg·L⁻¹)可以产生快速持续的杀菌作用, 两菌株 1~2 h 内不再生长, 可持续 24 h 不重新生长。而浓度<16 mg·L⁻¹, 4~8 h 两菌株均出现反弹生长, 24 h 失去杀菌效果(log₁₀CFU 变化<3), 在临床可达的治疗浓度范围内(0.5~4 mg·L⁻¹)多黏菌素 B 最迟 6 h 出现细菌反弹生长; 亚胺培南(10, 20, 30, 60, 120 mg·L⁻¹)和美罗培南单药(10, 20, 30, 60, 120 mg·L⁻¹)在所有浓度组 24 h 均不能产生持续的杀菌效果; 磷霉素 300, 500 mg·L⁻¹ 可对 XHKP2052 产生杀菌作用, 但 8 h 后出现反弹生长。磷霉素(75, 150, 300, 500 mg·L⁻¹)所有浓度组在任何时间均没有对 XHKP2016 菌株产生持续杀菌作用, 24 h 内全部反弹生长。结果见图 2。

3.3.2 两药合并 两菌株对头孢他啶/阿维巴坦均耐药, 且提高头孢他啶/阿维巴坦浓度也不能起到很好的杀菌作用, 24 h 细菌均反弹生长, 结果见图 3。以多黏菌素 B 为基础两药合并(磷霉素或美罗培南)对 XHKP2016 菌株在低浓度多黏菌素 B (<4 μg·mL⁻¹) 24 h 不能产生持久的杀菌效果, 细菌在给药各浓度范围均出现反弹生长, 结果见图 4~5。且只有在多黏菌素 B(4 μg·mL⁻¹)联合美罗培南才产生持久杀菌效果, 但细菌出现反弹生长。以多

表 2 两菌株药敏试验结果

Tab. 2 Drug sensitivity test results of two strains

菌株	多黏菌素 B	黏菌素	美罗培南	亚胺培南	磷霉素	头孢他啶	庆大霉素	替加环素	氨曲南	头孢他啶/阿维巴坦
XHKP2016	<0.5(S)	0.5(S)	64(R)	128(R)	64(S)	128(R)	256(R)	2(I)	64(R)	128(R)
XHKP2052	<0.5(S)	0.5(S)	64(R)	64(R)	16(S)	256(R)	64(R)	0.5(S)	128(R)	128(R)

注: S-敏感; I-中介; R-耐药。

Note: S-susceptible; I-mediation; R-resistance.

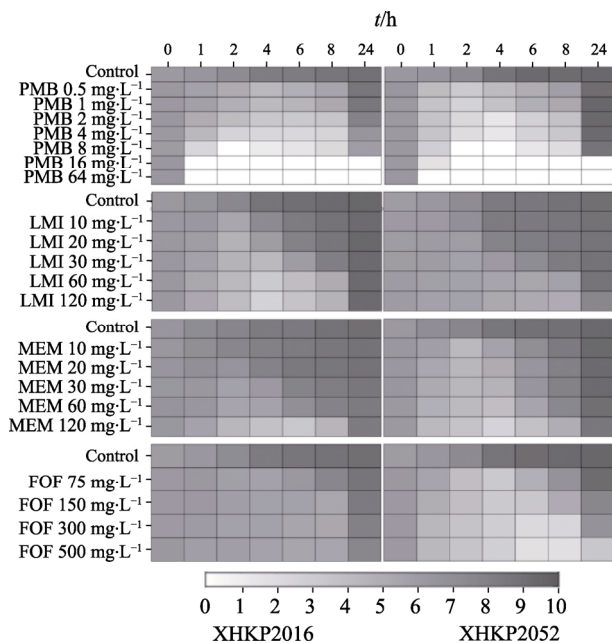


图 2 多黏菌素 B、亚胺培南、美罗培南及磷霉素对两菌株 XHKP2016 和 XHKP2052 的时间杀菌效果
灰度代表 $\log_{10}$ CFU，细菌量越少，颜色越白；反之灰度越深。PMB-多黏菌素 B；IMI-亚胺培南；MEM-美罗培南；FOF-磷霉素。
Fig. 2 Time-kill effect of polymyxin B, meropenem, imipenem and fosfomycin alone against XHKP2016 and XHKP2052 strains
Gray scale represented $\log_{10}$ CFU. The less bacteria, the whiter the color, and vice versa. PMB-polymyxin B; IMI-imipenem; MEM-meropenem; FOF-fosfomycin.

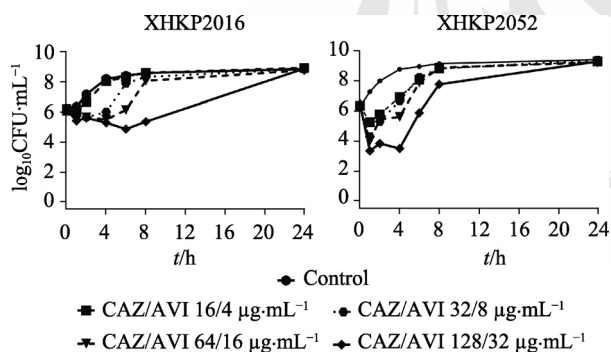


图 3 头孢他啶/阿维巴坦对两菌株 XHKP2016 和 XHKP2052 的时间杀菌效果
CAZ-头孢他啶；AVI-阿维巴坦。
Fig. 3 Time-kill effect of ceftazidime/avibactam against XHKP 2016 and XHKP2052 strains
CAZ-ceftazidime; AVI-avibactam.

黏菌素 B 为基础两药合并(美罗培南或磷霉素)对 XHKP2052 则也只有在高浓度多黏菌素 B ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)才出现持久杀菌效果，但出现反弹生长。在其他多黏菌素 B 浓度下，各组大部分无法获得 24 h 持久杀菌效果，且均出现了不同程度反弹生长，见图 4~5。

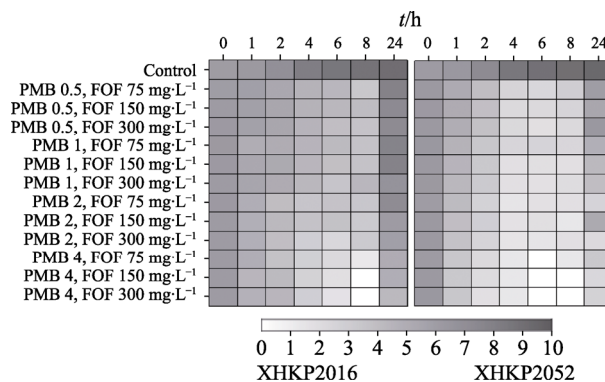


图 4 多黏菌素 B 联合磷霉素对两菌株 XHKP2016 和 XHKP2052 的时间杀菌效果
灰度代表 $\log_{10}$ CFU，细菌量越少，颜色越白，反之灰度越深。PMB-多黏菌素 B；FOF-磷霉素。
Fig. 4 Time-kill effect of polymyxin B and fosfomycin against XHKP2016 and XHKP2052 strains
Gray scale represents $\log_{10}$ CFU. The less bacteria, the whiter the color, and vice versa. PMB-polymyxin B; FOF-fosfomycin.

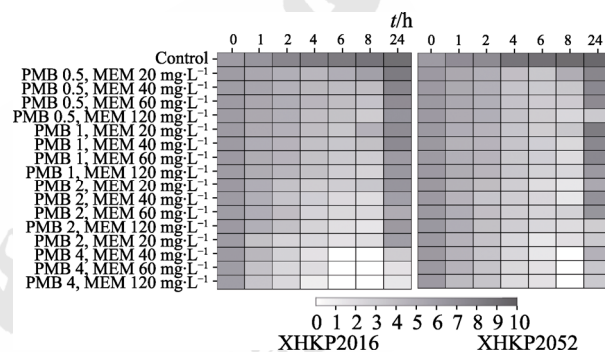


图 5 多黏菌素 B 联合美罗培南对两菌株 XHKP2016 和 XHKP2052 的时间杀菌效果
灰度代表 $\log_{10}$ CFU，细菌量越少，颜色越白，反之灰度越深。PMB-多黏菌素 B；MEM-美罗培南。
Fig. 5 Time-kill effect of polymyxin B and meropenem against XHKP2016 and XHKP2052 strains
Gray scale represented $\log_{10}$ CFU. The less bacteria, the whiter the color, and vice versa. PMB-polymyxin B; MEM-meropenem.

3.3.3 多黏菌素 B 为基础的三药联合 多黏菌素 B 联合美罗培南和磷霉素对 XHKP2052 产生很好的杀菌效果，即使在最低浓度的多黏菌素 B ($0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、美罗培南和磷霉素联合方案下，24 h 也能产生强大的杀菌效果($\log_{10}\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 降低 ≥ 3)。而此三药联合对 XHKP2016 效果不佳，仅在高浓度多黏菌素 B 联合下，才产生持续杀菌效果，且各浓度方案均出现反弹生长。多黏菌素 B 联合头孢他啶和阿维巴坦对菌株 XHKP2016 在多黏菌素 B 浓度 $\geq 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和亚胺培南/阿维巴坦联合下就可以产生持续 24 h 杀菌作用，多黏菌素 B 浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时可不出现反弹生长。结果见图 6~7。

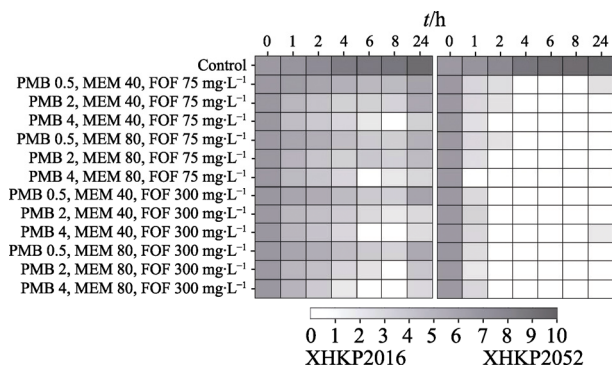


图 6 多黏菌素 B 联合美罗培南和磷霉素对两菌株 XHKP2016 和 XHKP2052 的时间杀菌效果

灰度代表 log CFU, 细菌量越少, 颜色越白, 反之灰度越深。PMB—多黏菌素 B; MEM—美罗培南; FOF—磷霉素。

Fig. 6 Time-kill effect of polymyxin B, meropenem and fosfomycin against XHKP2016 and XHKP2052 strains

Gray scale represented log CFU. The less bacteria, the whiter the color, and vice versa. PMB—polymyxin B; MEM—meropenem; FOF—fosfomycin.

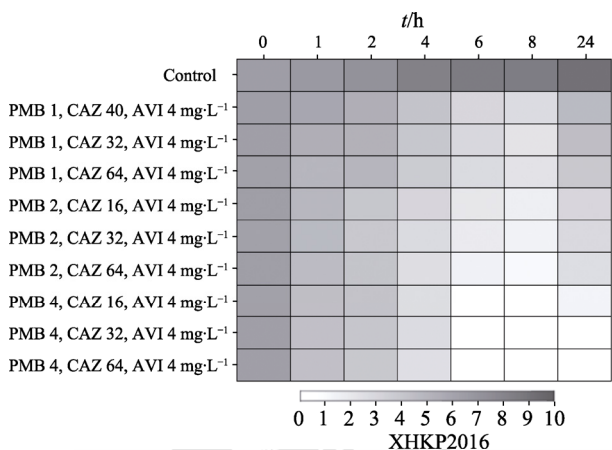


图 7 多黏菌素 B 联合头孢他啶和阿维巴坦对菌株 XHKP2016 的时间杀菌试验结果

灰度代表 log CFU, 细菌量越少, 颜色越白, 反之灰度越深。PMB—多黏菌素 B; CAZ—头孢他啶; AVI—阿维巴坦。

Fig. 7 Time-kill effect of polymyxin B, ceftazidime and avibactam against XHKP2016 strain

Gray scale represents log CFU. The less bacteria, the whiter the color, and vice versa. PMB—polymyxin B; CAZ—ceftazidime; AVI—avibactam.

4 讨论

中国革兰氏阴性菌耐药形势严峻, 社区环境和医院环境中由耐药革兰氏阴性菌引起的感染在持续增多, 特别是包括碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)在内的耐药菌引起的感染发生率不断升高^[2]。在中国耐碳青霉烯药物的肺炎克雷伯菌主要因产生 KPC 导致碳青霉烯药物水解而失效。针对 KPC 耐药的革兰氏阴性杆菌近几年研发出许多新型的非 β -内酰胺类 β -内酰胺酶抑制剂, 如阿维巴坦、瑞拉巴坦等。与经典 β -内酰胺酶抑制剂有本质的区别,

阿维巴坦主要抑制 A、C 类 β 内酰胺酶, 而对 B 类金属酶和 D 类(除 OXA-48)无效。

新抗菌药物的出现伴随新耐药菌的出现, 头孢他啶/阿维巴坦上市短短几年, 已出现越来越多对该药耐药的菌株报道^[3-7]。除对金属酶天然耐药外, 头孢他啶/阿维巴坦开始出现对 KPC 碳青霉烯酶耐药。根据浙江邵逸夫医院研究团队^[8]统计的头孢他啶/阿维巴坦耐药情况, 肺炎克雷伯菌耐药率为 3.7%, 53.1%耐药菌株为产金属酶引起, 40.6%为产 KPC 酶, 6.3%合并以上两酶。产 KPC 酶耐药机制主要为 KPC3/KPC2 基因出现突变, 导致了 KPC2 酶氨基酸 L169P 或 KPC3 酶 Ω 环氨基酸 D179Y 改变^[3,7]。也有 KPC3 为野生型但对头孢他啶/阿维巴坦耐药, 在肺炎克雷伯菌膜孔蛋白 Ompk35 功能缺失, Ompk36 蛋白失活情况下, KPC3 和 SHV-12 酶的表达增加可导致耐药^[9]。

本研究所选取的 2 株碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌 XHKP2016 和 XHKP2052 均对头孢他啶/阿维巴坦高度耐药, 但耐药机制迥然不同。在肺炎克雷伯菌中, 认为 2 个非特异性膜孔为 β -内酰胺类和喹诺酮类抗菌药物提供进入细菌细胞的透膜通道^[10]。Ompk35 属于 OmpF 膜孔蛋白家族, 有着较大通道; 而 Ompk36 属于 OmpF 膜孔蛋白家族, 膜孔通道较小^[10]。XHKP2016 为非产碳青霉烯酶的碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌, 主要耐药机制为细胞外膜膜孔蛋白的严重缺失(Ompk35、Ompk36 和 Ompk37), 导致头孢他啶和阿维巴坦进入细菌严重受限, 细菌体内无法达到足够的药物浓度。有报道碳青霉烯耐药的产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌对碳青霉烯主要耐药机制为产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)和(或)头孢菌素酶(Ampc)合并膜孔蛋白 Ompk35 和 Ompk36 缺陷^[11]。XHKP2052 则为产金属酶, 对头孢他啶/阿维巴坦天然耐药。

应对 CRE 的一个重要手段是不同抗菌机制的药物联合给药, 其疗效在体内外研究中得到了证实, 联合用药也已经显示在药物协同和减轻耐药性方面作用^[12-15]。然而目前, 研究者在药物联合使用过程中, 对具有不同耐药机制病菌的临床效果和不同患者群体的药动学均缺乏足够认识^[16]。本研究采用多黏菌素 B 为基础的联合用药体外评价其对头孢他啶/阿维巴坦耐药的肺炎克雷伯菌抗菌效果。结果显示对于产金属酶 NDM 菌株 XHKP 2052, 多黏菌素 B 合并美罗培南及磷霉素在最低

浓度的药物治疗组合也可产生强大持续的杀菌效果。与此相比,此联合用药组合却对膜孔蛋白缺陷菌株 XHKP2016 效果不佳,仅在多黏菌素 B 浓度为 $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 才有持续杀菌效果,但各浓度组均出现反弹生长。而多黏菌素 B ($\geq 2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 联合头孢他啶/阿维巴坦则可以产生持久杀菌效果,多黏菌素 B 为 $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,可出现持续杀菌而不出现生长反弹。推测其作用机制是多黏菌素 B 可通过破坏细菌外膜脂多糖使外膜膨胀破坏,促进了头孢他啶/阿维巴坦进入细胞而发挥强大的协同作用。

多黏菌素被认为是治疗临床 CRE 感染的最后一道防线。根据 2019 年多黏菌素优化使用国际专家共识指南,推荐在使用多黏菌素时应该进行联合给药^[17]。临床上黏菌素联合头孢他啶/阿维巴坦已有报道^[18-19]。而美罗培南、磷霉素、头孢他啶和阿维巴坦在临床使用安全性较好,目前未有证据表明多黏菌素 B 联合美罗培南和磷霉素或多黏菌素 B 联合头孢他啶/阿维巴坦会增加临床不良反应。虽然国际专家共识指南也指出在肾功能有损害患者治疗中,多黏菌素 B 可无需调整剂量^[18],但是临床上仍然关注其潜在肾毒性不良反应。本研究体外试验表明低浓度多黏菌素 B 联合美罗培南和磷霉素仍可产生强大杀菌效果,因此联合给药时某些情况下可降低多黏菌素 B 的剂量,从而可减少多黏菌素 B 引起的不良反应。考虑到美罗培南、磷霉素、头孢他啶和阿维巴坦主要均从肾脏排泄,因此对肾功能异常患者应对这些药进行剂量调整。

中国碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌主要是产 KPC 酶,其次是产 NDM 酶^[8,20]。虽然头孢他啶/阿维巴坦对碳青霉烯耐药的肺炎克雷伯菌(主要产 KPC 酶)有较高的敏感性,但对少见的头孢他啶/阿维巴坦耐药的产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌,应该引起足够的重视。本研究体外证明多黏菌素为基础的美罗培南及磷霉素或头孢他啶/阿维巴坦联合给药可以分别有效对抗产金属酶或膜孔蛋白严重缺陷导致的头孢他啶/阿维巴坦耐药肺炎克雷伯菌,但其临床实际效果有待进一步研究评估。

REFERENCES

[1] XU L F, SUN X X, MA X L. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with

carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2017, 16(1): 18. Doi: 10.1186/s12941-017-0191-3.

- [2] LI Y, LV Y, ZHENG B, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms: Results from China antimicrobial resistance surveillance trial program, 2017-2018[J]. Chin Clin Pharm J(中国临床药理杂志), 2019, 35(19): 2508-2528.
- [3] GÖTTIG S, FRANK D, MUNGO E, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in vivo[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(11): 3211-3216.
- [4] SHILDS R K, CHEN L, CHENG S, et al. Emergence of Ceftazidime-avibactam resistance due to plasmid-borne blaKPC-3 mutations during treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(3): pii: e02097-16. Doi: 10.1128/AAC.02097-16.
- [5] SHIELDS R K, NGUYEN M H, PRESS E G, et al. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance and restoration of carbapenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K pneumoniae: A case report and review of literature[J]. Open Forum Infect Dis, 2017, 4(3): ofx101. Doi: 10.1093/ofid/ofx101.
- [6] GAIBANI P, CAMPOLI C, LEWIS R E, et al. In vivo evolution of resistant subpopulations of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* during ceftazidime/avibactam treatment [J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(6): 1525-1529.
- [7] HEMARAJATA P, HUMPHRIES R M. Ceftazidime/avibactam resistance associated with L169P mutation in the Omega loop of KPC-2[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(5): 1241-1243.
- [8] ZHANG P, SHI Q, HU H, et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(1): 124.e1-124.e4.
- [9] NELSON K, HEMARAJATA P, SUN D, et al. Resistance to ceftazidime-avibactam is due to transposition of KPC in a porin-deficient strain of *Klebsiella pneumoniae* with increased efflux activity[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(10). Doi: 10.1128/aac.00989-17.
- [10] MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier[J]. Clin Microbiol Infect, 2008(14): 82-89.
- [11] HAMZAOUI Z, OCAMPO-SOSA A, FERNANDEZ MARTINEZ M, et al. Role of association of OmpK35 and OmpK36 alteration and blaESBL and/or blaAmpC genes in conferring carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52(6): 898-905.
- [12] SALZBERGER B, FÄTKENHEUER G. Combination therapy for bloodstream infections with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(10): 1020. Doi: 10.1016/s1473-3099(17)30521-2.
- [13] MEDEIROS G S, RIGATTO M H, FALCI D R, et al.

- Combination therapy with polymyxin B for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection[J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 53(2): 152-157.
- [14] SHARMA R, PATEL S, ABBOD C, et al. Polymyxin B in combination with meropenem against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Pharmacodynamics and morphological changes[J]. Int J Antimicrob Agents, 2017, 49(2): 224-232.
- [15] CHUA N G, ZHOU Y P, TAN T T, et al. Polymyxin B with dual carbapenem combination therapy against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Infect, 2015, 70(3): 309-311.
- [16] SHIELDS R K, POTOSKI B A, HAIDAR G, et al. Clinical outcomes, drug toxicity, and emergence of ceftazidime-avibactam resistance among patients treated for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections[J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(12): 1615-1618.
- [17] TSUJI B T, POGUE J M, ZAVASCKI A P, et al. International consensus 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]. Pharmacother: J Hum Pharmacol Drug Ther, 2019, 39(1): 10-39.
- [18] GONZALES ZAMORA J, CORZO-PEDROZA M, ROMERO ALVAREZ M, et al. Carbapenemase-producing *Raoultella planticola*: A rare cause of pneumonia and bacteremia[J]. Diseases, 2018, 6(4): 94. Doi: 10.3390/diseases6040094.
- [19] SHAH P J, TRAN T, EMELOGU F, et al. Aztreonam, ceftazidime/avibactam, and colistin combination for the management of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: A case report[J]. J Pharm Pract, 2019: 897190019882262.
- [20] PENG M F, YU S F, LI S X, et al. Detection of resistance genes and homology analysis on carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumonia*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(14): 1826-1829.
- 收稿日期: 2020-05-25
(本文责编: 李艳芳)