

• 基础实验研究论著 •

产 KPC 铜绿假单胞菌的耐药性研究^{*}赵树龙¹, 刘仁坤¹, 梁慧², 张薇², 刘佳², 胡红焱^{2△}

(1. 徐州医学院研究生学院, 江苏徐州 221004; 2. 武警总医院检验科, 北京 100039)

摘要:目的 探讨产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)铜绿假单胞菌的耐药性。方法 铜绿假单胞菌菌株来自 2 例痰液标本。采用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定/药敏分析仪进行细菌菌株的鉴定, 应用聚合酶链反应(PCR)及基因测序法鉴定 KPC 酶基因型, 采用肉汤稀释法进行抗菌药的最低抑菌浓度(MIC)测定。结果 2 例菌株均对 β -内酰胺类抗菌药、左氧氟沙星耐药, 对环丙沙星中介, 对庆大霉素、奈替米星、妥布霉素、黏菌素及多黏菌素 B 敏感; 其中 1 株还对替加环素敏感。2 例菌株所产碳青霉烯酶不是金属 β -内酰胺酶, 其亚型为 KPC-2。接合实验未能证明 bla KPC 基因能接合转移到大肠埃希菌 J53 中。结论 产 KPC 铜绿假单胞菌的出现给临床抗感染治疗带来严峻挑战。

关键词:假单胞菌, 铜绿; 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶; 最低抑菌浓度; 鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1235-03

A study on drug resistance of KPC carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*^{*}Zhao Shulong¹, Liu Renkun¹, Liang Hui², Zhang Wei², Liu Jia², Hu Hongyan^{2△}

(1. Graduate School of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of Medical Laboratory, the General Hospital of the Chinese People's Armed Police, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To investigate the drug-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* which producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases(KPC). **Methods** *Pseudomonas aeruginosa* strains were derived from two sputum samples. VITEK 2 COMPACT Automated Microbial Identification/Susceptibility Analyzer was employed to identify the bacterial strains. Polymerase chain reaction (PCR) and gene sequencing were adopted to identify the genotypes of KPC enzyme. Broth dilution method was used to measure the minimal inhibitory concentration(MIC) of antimicrobial agents. **Results** Both *Pseudomonas aeruginosa* strains were resistant to β -lactam antibiotic and levofloxacin, and were intermediary to ciprofloxacin, and sensitive to gentamicin, netilmicin, tobramycin, colistin and multi-polymyxin B. One of them was sensitive to tigecycline. Carbapenemase produced by the two stains was not metal β -lactamase, with the subtype of KPC-2. Mating experiments failed to prove the bla KPC gene could be transferred to *E. coli* J53. **Conclusion** Appearance of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* poses serious challenges to clinical anti-infective therapy.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases; minimal inhibitory concentration; identification

铜绿假单胞菌容易在医院的各种潮湿环境下生存, 是临床感染最常见的革兰阴性杆菌之一, 不仅有多种天然和获得性耐药机制而导致的耐药性强、耐药机制复杂等特点, 而且还具有极强的环境适应能力, 是医院感染菌群中常见的条件致病菌, 可同时导致呼吸系统、泌尿系统和血液循环系统等的感染。作为一种重要的临床机会致病菌, 其血液循环系统的感染多导致严重的医院获得性感染, 且易发生于血液透析、恶性肿瘤、实体脏器移植、慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)和糖尿病等患者体内。近年来, 随着临床广谱抗菌药的过量使用及各种侵袭性操作的展开, 其血液循环系统感染的发生率呈逐年上升趋势, 此类患者往往具有病情危重, 预后差的特点, 给临床抗感染治疗带来极大挑战。碳青霉烯类抗菌药是具有抗菌谱广, 抗菌活性强的一类 β -内酰胺类抗菌药, 因其具有对 β -内酰胺酶作用稳定及毒性低等特点, 已成为临床治疗严重细菌感染的主要抗菌药物之一, 故又被称为治疗革兰阴性菌感染的最后一道防线^[1]。肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, KPC)于 2001 年首次在美国报道后, 因为其具有水解除头霉素类抗菌药以外的所有 β -内酰胺类抗菌药的特点(如青霉素类、头孢菌素类、单环酰胺类和碳青霉烯类等抗菌药), 引起了世界各国卫生组织的极

大关注。国内报道的产 KPC 菌株主要以肠杆菌科细菌为主, 包括克雷伯菌、沙门菌属和肠杆菌属细菌、黏质沙雷菌、弗劳地柠檬酸杆菌、大肠埃希菌和奇异变形杆菌等^[2], 在非发酵菌中则鲜见报道。笔者在日常细菌耐药筛查中发现 2 株产 KPC 的铜绿假单胞菌, 其具有独特的临床和微生物学特征, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 耐亚胺培南的铜绿假单胞菌来自分别来自徐州医学院附属医院呼吸内科患者(病例 1)及重症监护病房患者(病例 2), 病例 1, 男, 70 岁, 入院诊断为 COPD 合并感染; 病例 2, 男, 51 岁, 肺部感染; 均在使用亚胺培南治疗后, 进行痰本微生物学培养, 结果显示感染菌为耐亚胺培南的铜绿假单胞菌。大肠埃希菌 J53 及质控菌株 ATCC2 5922 为徐州医学院研究生学院实验室保存菌株, 前者使用前在含 100 mg/L 叠氮钠的麦康凯平板上活化, 使其具有叠氮钠抗性。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂: Taq DNA 聚合酶、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)相关试剂及 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, 琼脂糖、溴化乙锭为美国 Promega 公司产品, CHELEX-100 树脂为美国 Bio-Rad 公司产品, 抗菌药敏感实验板购自珠海迪尔生物工程有限公司,

* 基金项目: 中华医院感染控制研究基金资助项目(ZYGY001)。

工作。 △ 通讯作者, E-mail: huhongyanwj@163.com。

作者简介: 赵树龙, 男, 在读硕士研究生, 主要从事细菌耐药机制的研究

替加环素由美国辉瑞公司提供。主要仪器:VITEK 2 COMPACT全自动微生物鉴定/药敏分析仪及革兰阴性杆菌鉴定卡为法国 BioMerieux 公司产品,德国 Eppendorf Mastercycler personal PCR 仪,UV-2102C 型紫外/可见分光光度计为美国 UNICO 公司产品及 KODAK Gel Logic 100 凝胶成像系统。

1.3 菌株的分离培养和鉴定 严格按照《全国临床检验操作规程》和 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定/药敏分析仪操作指南进行菌株的分离培养和鉴定。

1.4 抗菌药的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定 常见药物的 MIC 根据美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2012 年版标准,使用肉汤稀释法进行测定。因 CLSI 无替加环素 MIC 的测定方法,因此,该项检测根据美国食品药品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 推荐的肉汤稀释法及参照标准,当抑菌圈小于 2 mg/L 时,为敏感;抑菌圈为 4 mg/L 时,为中介;抑菌圈大于 8 mg/L 时,为耐药。

1.5 细菌的酶活性鉴定

1.5.1 酶粗提液制备 将过夜培养的菌落接种于 3 mL LB 肉汤,过夜培养 16 h,然后以 1:100 比例转种于 50 mL LB 液体培养基;35 °C 震摇培养 18 h 后,4 °C、4 000 r/min 离心 10 min,去上清液;沉淀用 50 mmol/L 2-乙酰胺酸 (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine]ethanesulfonic acid, HEPES) 缓冲液 (pH7.0) 洗涤,再行 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 1 mL 50 mmol/L HEPES 缓冲液混匀;在冰水浴中用超声波破碎仪破碎细菌,超声参数为:200 W,每次超声 25 s,间隔 25 s,共超声 15 min,结束后于 4 °C,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液于-20 °C 保存、备用。

1.5.2 碳青霉烯酶活性的测定(表型法) 在涂抹大肠埃希菌 ATCC 25922 的 Mueller-Hinton 琼脂平板上粘贴亚胺培南纸片 (A 纸片及 B 纸片),在纸片四周贴上滴有细菌破碎后所得酶抽提液的纸片,其中 A 纸片不加乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA),B 纸片加入 EDTA 作为酶抑制剂,同时设立不产酶的细菌提取液作为阴性对照,阳性对照用确认产生 I 型新德里金属 β -内酰胺酶 (New Delhi Metallo- β -lactamase1, NDM-1) 的已知菌液,待测样品因为在 A 纸片中能水解亚胺培南,所以指示菌株 ATCC25922 可在 A 纸片周围生长,说明有碳青霉烯酶的活性。B 纸片因加入 EDTA 作为酶抑制剂,金属 β -内酰胺酶待测样品则因为受到 EDTA 的抑制,所以 B 纸片周围细菌不能生长。如出现上述现象,则说明存在在金属 β -内酰胺酶;否则,为非金属 β -内酰胺酶。

1.6 细菌基因组 DNA 的提取 接种新鲜细菌至含 2 mL 营养肉汤培养基中,置于 37 °C 摆床中震荡培养过夜,再将上述培养的菌液取 1.5 mL 放入离心管中,12 500 r/min 离心 2 min,沉淀用新鲜无菌水洗涤 1 次,然后加入 5% (w/v) CHELEX-100 树脂 100 μ L,剧烈振荡后煮沸 10 min,立即放入冰浴中 5 min,再 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为扩增模板。

1.7 KPC 的 PCR 检测 根据 GenBank 登录的保守区域设计简并引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列, KPC-F: 5'-CCC ACT GTG CAG CTC ATT CA-3'; KPC-R: 5'-CGT TGA CGC CCA ATC CC-3'。在 21 μ L 的 PCR 反应体系中,加入 2 μ L 细菌基因组 DNA 和 2 μ L 引物。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 2 min 后,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 60 s,共 35 个循环,并保存于 4 °C。结果用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析。对所需要的 PCR 产物条带经过切胶回收后,送北京天一辉远生物科技有限公司测序,并将其与 GenBank 上的序列进行比对。

其与 GenBank 上的序列进行比对。

1.8 接合实验 用徐州医学院研究生学院实验室的大肠埃希菌 J53 为受体菌,用待测细菌作为供体菌,二者以 1:10 的比例混匀后涂布血平板,在培养箱中培养 18 h 后用生理盐水洗脱平板上的细菌,将洗脱后的细菌稀释后均匀涂布于麦康凯平板 (含 100 mg/L 叠氮钠,0.5 mg/L 亚胺培南),培养 24 h 后观察结果。

2 结 果

2.1 菌株鉴定 病例 1 和病例 2 痰标本经过实验室常规菌落形态和生化反应鉴定为铜绿假单胞菌,后经 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定/药敏分析仪确认。

2.2 微生物敏感性试验 病例 1、2 痰标本菌株的 MIC 见表 1。病例 1、2 菌株均对 β -内酰胺类抗菌药、左氧氟沙星耐药,对环丙沙星中介,对庆大霉素、奈替米星、妥布霉素、黏菌素及多黏菌素 B 敏感;病例 2 菌株还对替加环素敏感。

表 1 产 KPC 铜绿假单胞菌细菌耐药特点

抗菌药	MIC(μ g/mL)		抗菌药	MIC(μ g/mL)	
	病例 1	病例 2		病例 1	病例 2
美罗培南	>8	>8	阿米卡星	≤16	≤16
亚胺培南	>8	>8	环丙沙星	2	2
氨曲南	>16	>16	左氧氟沙星	8	8
哌拉西林	128	128	奈替米星	≤8	≤8
头孢他啶	>32	>32	黏菌素	≤2	≤2
庆大霉素	≤4	≤4	多黏菌素 B	≤2	≤2
妥布霉素	≤4	≤4	替卡西林/棒酸	>64/2	>64/2
头孢吡肟	>32	>32	哌拉西林	128	64
头孢哌酮/舒巴坦	>64/32	>64/32	—	—	—

—:此项目无数据。

2.3 碳青霉烯酶活性测定 将 2 株细菌菌体破碎后取上清液进行了碳青霉烯酶活性的测定,通过加入金属 β -内酰胺酶的抑制剂 EDTA,确定其产生碳青霉烯酶不是金属 β -内酰胺酶。

2.4 测序结果 扩增的目标序列与文献报道的 KPC-2 基因同源性为 100%,表明这 2 株铜绿假单胞菌 KPC 的亚型为 KPC-2。

2.5 接合实验 以大肠埃希菌 J53 为受体菌进行接合实验,在含 100 mg/L 叠氮钠,2 mg/L 亚胺培南麦康凯平板上无接合子生长,未能证明 bla KPC 基因能接合转移到大肠埃希菌 J53 中。

3 讨 论

国内、外相关文献报道提示,KPC 是近几年来最引人注目的碳青霉烯酶类型,其不仅可以水解包括碳青霉烯类在内的所有 β -内酰胺类抗菌药,且克拉维酸不能完全抑制其活性^[3]。此外,由于 KPC 基因位于细菌体内的可移动质粒上,其可经质粒、整合子、插入序列的基因元件进行多种途径的传播,因此,具有暴发流行的潜在威胁。产 KPC 菌株的出现使临床抗感染治疗面临一大难题^[4]。在对医院内的铜绿假单胞菌进行抗感染治疗时,因为碳青霉烯类抗菌药的过量使用,进而导致该菌对多种碳青霉烯类抗菌药耐药的出现^[5]。目前所知道的铜绿假单胞菌耐碳青霉烯类药物的机制主要涉及产碳青霉烯酶、孔道蛋白的改变及外排泵等。1991 年日本首次报道了关于产金属酶型铜绿假单胞菌耐碳青霉烯抗菌药的出现^[6],现在已经发现的金属酶主要类型有 VIM^[7]、SIM^[8]、GIM^[9]、DIM^[10]、

IMP^[11]、NDM^[12]、SPM^[13]等,而相对于临床金属酶型碳青霉烯酶,KPC 等非金属酶的报道至今仍较少。近年来,国外关于耐碳青霉烯类抗菌药的铜绿假单胞菌分离株的报道日益增多^[14],并且在巴西等国家相继出现了产 KPC 铜绿假单胞菌^[15],本研究发现 2 株产 KPC 铜绿假单胞菌,表明这种耐药机制正在由肠杆菌科细菌向非发酵菌进行扩散,提示人们在临床微生物实验室工作中应引起足够的重视,同时临床工作者在合理使用抗菌药的同时,医院也应采取相应的有效措施来控制其发生与发展。另外,关于 KPC 由肠杆菌科细菌向非发酵菌扩散的分子机制,也已纳入本课题组的研究计划。

参考文献

- [1] Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams[J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(5): 381-393.
- [2] Li B, Sun JY, Liu QZ, et al. First report of Klebsiella oxytoca strain coproducing KPC-2 and IMP-8 carbapenemases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6): 2937-2941.
- [3] Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, et al. Carbapenemases in klebsiella pneumoniae and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4): 682-707.
- [4] Goldfarb D, Harvey SB, Jessamine K, et al. Detection of plasmid-mediated KPC-producing Klebsiella pneumoniae in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(6): 1920-1922.
- [5] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(4): 582-610.
- [6] Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al. Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1991, 35(1): 147-151.
- [7] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(7): 1584-1590.
- [8] Lee K, Yum JH, Yong D, et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(11): 4485-4491.
- [9] Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y. Emergence of metallo- β -lactamase GIM-1 in a clinical isolate of *Serratia marcescens*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4945-4947.
- [10] Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N, et al. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2420-2424.
- [11] Hupková M, Blahová J, Babalova M, et al. Transferable resistance to imipenem in hospital isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Chemother, 1993, 5(1): 14-16.
- [12] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [13] Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50(5): 673-679.
- [14] 李艳华, 刘文恩, 简子娟, 等. 铜绿假单胞菌耐药性分析及金属酶基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(1): 43-47.
- [15] Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4990.

(收稿日期:2014-01-24)

(上接第 1234 页)

- 核表达及鉴定[J]. 医学分子生物学杂志, 2012, 9(3): 204-207.
- [4] Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate[J]. Clin Chem, 2002, 48(5): 699-707.
- [5] Gerbes AL, Güberg V, Bilzer M, et al. Evaluation of serum cystatin C concentration as a marker of renal function in patients with cirrhosis of the liver[J]. Gut, 2002, 50(1): 106-110.
- [6] Christensson A, Ekberg J, Grubb A, et al. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation[J]. Nephron Physiol, 2003, 94(2): 19-27.
- [7] Zhang XB, Lin QC, Deng CS, et al. Elevated serum cystatin C in severe OSA younger men without complications[J]. Sleep Breath, 2013, 17(1): 235-241.
- [8] Chen TH, Chang CH, Lin CY, et al. Acute kidney injury biomarkers for patients in a coronary care unit: a prospective cohort study[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32328.
- [9] Jeon YL, Kim MH, Lee WI, et al. Cystatin C as an early marker of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes[J]. Clin Lab, 2013, 59(11/12): 1221-1229.
- [10] Wan ZH, Wang JJ, You SL, et al. Cystatin C is a biomarker for

- predicting acute kidney injury in patients with acute-on-chronic liver failure[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(48): 9432-9438.
- [11] Wyckoff T, Augoustides JG. Advances in acute kidney injury associated with cardiac surgery: the unfolding revolution in early detection[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2012, 26(2): 340-345.
- [12] Ristiniemi N, Lund J, Tertti R, et al. Cystatin C as a predictor of all-cause mortality and myocardial infarction in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome[J]. Clin Biochem, 2012, 45(7/8): 535-540.
- [13] Li H, Kuipers A, Kammerer CM, et al. The association between renal function biomarkers and subclinical cardiovascular measures in African Caribbean families[J]. Ethn Dis, 2013, 23(4): 492-498.
- [14] Manocha A, Gupta F, Jain R, et al. The potential of Cystatin C and small dense LDL as biomarkers of coronary artery disease risk in a young Indian population[J]. Mol Cell Biochem, 2013 Dec 20. [Epub ahead of print].
- [15] Hayashi M, Iwamoto S, Sato S, et al. Efficient production of recombinant cystatin C using a peptide-tag, 4AaCter, that facilitates formation of insoluble protein inclusion bodies in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif, 2013, 88(2): 230-234.

(收稿日期:2014-01-13)