

文章编号: 1674-7054(2013)03-0214-06

海南发现 2 株新德里金属 β -内酰胺酶-1 阳性的阴沟肠杆菌

符生苗, 李天娇, 陈淑萍, 李成学, 蔡俊宏, 王旭明, 黄涛, 符惠群

(海南省人民医院 医学检验中心 海南 海口 570311)

摘要: 为了解临床分离的携带新德里金属 β -内酰胺酶-1 (NDM-1) 基因的阴沟肠杆菌耐药性, 笔者采用法国生物梅里埃公司的 VITEK-2 全自动细菌分析系统对临床分离的 2 株阴沟肠杆菌进行了鉴定, 用 IP/IPI E-test 试纸条法协同试验检测了产金属酶类的碳青霉烯酶, 用浓度梯度 E-test 条法进行药物敏感性试验, 并对 PCR 产物进行电泳后纯化, 测序比对确定基因型。结果表明 2 株阴沟肠杆菌均携带 β -内酰胺酶 *bla*NDM-1 基因, 对美洛培南、亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢替坦、头孢吡肟、头孢曲松、头孢他啶、氨曲南、复方新诺明、阿米卡星等均有耐药性。由于分离出这 2 株携带 NDM-1 基因的阴沟肠杆菌的患者都是海南省居民, 从未有国外旅行史, 说明与国外报道的 NDM-1 肠杆菌科细菌没有流行病学关联, 这对了解该基因在海南地区的流行情况具有重要意义。

关键词: 阴沟肠杆菌; 金属酶; *bla*NDM-1 基因; 聚合酶链反应

中图分类号: R440

文献标志码: A

新德里金属 β -内酰胺酶-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1, NDM-1) 是 2009 年英国学者 Yong 等^[1]首先分离自瑞典 1 例尿道感染的印度裔患者, 来源于表达金属 β -内酰胺酶 (Metallo- β -lactamase, MBL) 的肺炎克雷伯菌, 以后各国学者分别在不同地区、不同菌株中鉴定出相同基因, 并且在巴基斯坦和英国发生小规模播散^[2]。我国香港^[3]、台湾地区^[4] 2011 年也开始对这类携带 *bla*NDM-1 分子耐药菌株感染进行了报道。国家卫生部自 2010-10-25 颁布全国对 NDM-1 的菌株进行筛查和监测以来, 国内外对含 NDM-1 耐药基因菌株鲜有报道。笔者近期在肠杆菌科细菌中发现 2 株阴沟肠杆菌 NDM-1 阳性细菌, 现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 患者 1, 女, 79 岁, 四川人, 无国外旅行史。因“支气管哮喘急性发作”于 2012-02-26 入院, 胸部 CT 示左肺叶基底段及左肺叶舌段少许炎症。经使用莫西沙星效果不佳而改用甲磺霉素治疗, 住院 10 d 病情好转出院。出院诊断: 双侧肺炎, 完全性右束支传导阻滞。2013-01-01 以胸背/双肩部疼痛再次入院, 心电图示窦性心动过速, 完全性右束支传导阻滞。住院期间从痰液中培养, 分离出阴沟肠杆菌。使用头孢哌酮/他唑巴坦治疗 5 d 病情好转出院。出院诊断: 骨质疏松, 慢性支气管炎。

患者 2, 男, 92 岁, 澄迈县人, 无外国人接触史, 也从未出过省。因慢性阻塞性肺病加重/肺部感染于 2012-06-11 入院, 胸部 CT 示慢性支气管炎、肺气肿。住院期间使用头孢哌酮/他唑巴坦联合莫西沙星治疗未见效果, 换用头孢吡肟联合多西环素疗效也不佳, 再改用亚胺培南联合大扶康抗感染治疗, 但病情

收稿日期: 2013-07-17

基金项目: 海南省卫生厅科学基金资助课题(2010-016)

作者简介: 符生苗(1958-) 男, 海南琼海人, 海南省人民医院医学检验中心研究员, 海南大学农学院硕士生导师。E-mail: smfu2000@126.com

还继续加重 经多次痰培养分离出多重耐药菌株(阴沟肠杆菌合并鲍曼不动杆菌) 药敏试验发现对亚胺培南和美洛培南耐药。住院 37 d 后病情危重自动出院。电话随访出院后不久死亡。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 大肠杆菌 ATCC 25922 菌株购自卫生部临床检验中心。VITEK-2 全自动细菌鉴定仪和配套 CNS 试剂及 API 20E 生化鉴定条购自法国生物梅里埃公司。亚胺培南、美洛培南、替加环素药敏和 IP/IPI E-test 试纸条均为瑞典 AB Biodis 公司产品。使用 E-Cycle™ 96 PCR 扩增仪和 JS-380 自动凝胶成像系统; PCR 扩增试剂是 2 × Power Taq PCR Master Mix(BioTeke , PR1700) 试剂盒; Marker 使用 D2000 DNA Marker(TIANGEN , MD114) 。

1.2.2 菌株鉴定及药敏试验 使用法国梅里埃 API 20E 对细菌进行生化鉴定 ,具体方法按照说明书操作。亚胺培南和美罗培南体外药敏实验均采用浓度梯度 E-test 条法测 MIC 值 ,测得的 MIC 值按 2010 年临床实验室标准化研究所 (CLSI) 的临界值^[5]判定敏感性。替加环素体外药敏实验使用浓度梯度法 E-test 条法 ,结果判定按照美国 FDA 的肠杆菌科标准进行;其他药敏 MIC 值使用梅里埃 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪和配套 CNS 试剂进行药敏实验。

1.2.3 产金属酶碳青霉烯酶表型确认 从痰中分离出的阴沟肠杆菌对亚胺培南和美罗培南体外药敏实验耐药 ,笔者采用 IP/IPI E-test 试纸条法协同试验 ,即将过夜培养待测菌落 ,用无菌生理盐水调至 0.5 麦氏浊度的悬液 ,将菌液均匀涂布于 MH 琼脂平板上 ,静置 10 min 待干燥;将 IP/IPI E-test 试纸条置于琼脂平板表面 35 °C 孵育 16 ~ 18 h 判读结果。

1.2.4 细菌基因组 DNA 的提取 将培养 16 ~ 18 h 的新鲜培养物悬浊于 100 ~ 200 μ L 无菌去离子水中 ,沸水浴 10 min 以上 ,12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 吸取上清液作为扩增模板。

1.2.5 PCR 扩增及检测 根据 GenBank 登录的金属 β -内酰胺酶基因保守区域进行引物设计 ,①初筛 NDM-1 基因引物序列为^[6]: 5'-17U-191 CAGCACACTTCCTATCTC-3' 292 bp ,扩增片段位于 CDS 反向 2751 ~ 2993 位置; 5'-17L-465 CCGCAACCATCCCCTCTT-3'; ②全长 NDM-1 基因引物序列: NDM-上游 5'-TCGCATAAAACGCCTCTG-3' 1 001 bp ,扩增片段位于 CDS 正向 2564 ~ 3444 位置; NDM-下游 5'-GAAACTGTGCGCACCTCAT-3'。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 15 s , 55 °C 退火 30 s , 72 °C 30 s ,共 25 个循环 ,最后 72 °C 再延伸 5 min。PCR 扩增完成后 ,产物经 120 V 40 min $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳 ,用凝胶成像系统观察结果并拍照。将 PCR 扩增后的产物送由上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定及药敏试验 亚胺培南和美罗培南 E-test 条法测得药敏抑菌圈 MIC > 32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (见图 1)。替加环素 E-test 条法测得药敏抑菌圈 MIC > 0.38 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (见图 2)。



图 1 亚胺培南和美罗培南 E-test 法药敏结果
($MIC > 32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 1 The drug sensitivity result of Imipenem and Meropenem by E-test ($MIC > 32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)



图 2 替加环素 E-test 法结果($MIC > 0.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 2 The drug sensitivity result of Tigecycline by E-test
($MIC > 0.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2 产金属酶的碳青霉烯酶结果 该 2 菌株亚胺培南和美罗培南的 IP/IPI E-test 试纸条法协同试验结果为(IP/IPI > 8) 阳性 确定为产金属酶的碳青霉烯酶阳性菌(见图 3)。

2.3 初筛 NDM-1 基因结果 经过优化 PCR 反应条件 其扩增产物经琼脂糖凝胶电泳发现在 287 bp 处出现阳性条带(见图 4) ,目标带纯化后的 DNA 测序结果使用 DNASTAR 分析软件与 GenBank 上公布的 FN396876.1 序列进行同源性比对 获得结果为 100%(位于反向 2 751 ~2 993)(见图 5) ,证实得到的是携带 blaNDM-1 基因的菌株。



图 3 IP/IPI E-test 试纸条法协同试验结果(IP/IPI > 8)
Fig. 3 The result of IP/IPI E-test by strip: IP/IPI > 8

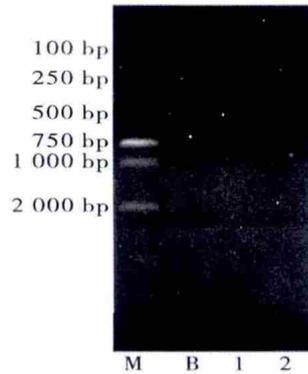


图 4 初筛 NDM-1 基因(DNA 片段为 287 bp) 的 PCR 产物电泳图

M: Marker(D2000) ; 1 ~2 为 NDM-1 阳性阴沟肠杆菌 (NDM-1 基因耐药筛选) ; B 为空白对照

Fig. 4 Electrophoresis of screened NDM-1 gene (287 bp) after PCR

M: Marker (D2000) ; 1 ~2: Positive control of screened NDM-1 gene; B: Blank

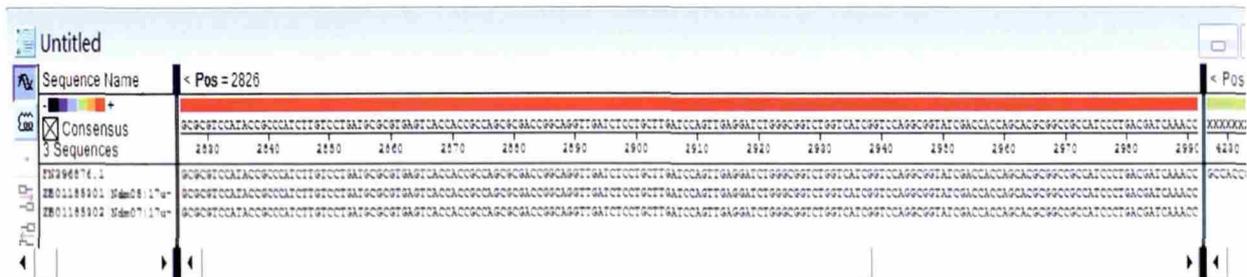


图 5 阳性阴沟肠杆菌初筛 NDM-1 测序结果与 FN396876.1 的比对图

Fig. 5 Sequencing comparison of NDM-1 gene screened from FN396876.1 and *E. cloacae*

2.3 全长 NDM-1 基因结果 该 2 株 NDM-1 基因初筛阳性菌株进行全长 NDM-1 基因扩增 ,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳发现在 1 001 bp 处均出现阳性条带(见图 6)。目标带的 DNA 测序结果分别在 BLAST 与 FN396876.1 进行比对分析 同源性为 100%。

2.4 菌株鉴定及药敏试验结果 2 株 NDM-1 耐药基因全长 DNA 片段阳性阴沟肠杆菌对 14 种抗生素的药敏试验结果显示 该 2 菌株除多粘菌素 B 和替加环素敏感外 对亚胺培南、美洛培南等 12 种抗生素均表现耐药(见表 1)。

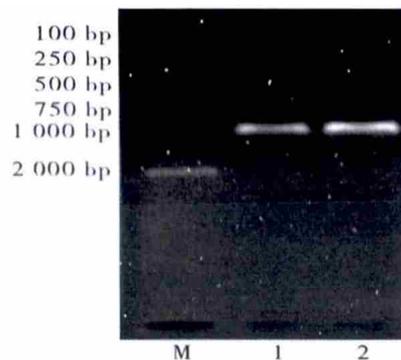


图 6 全长 NDM-1 基因(DNA 片段为 1 001 bp) 的 PCR 产物电泳图
M: Marker(D2000) ; 1 ~2: 为 NDM-1 阳性阴沟肠杆菌

Fig. 7 Electrophoresis of complete NDM-1 gene (1 001 bp) after PCR
M: Marker (D2000) ; 1 ~2: Positive control of complete NDM-1 gene

表1 NDM-1阳性阴沟肠杆菌的药敏结果

Tab.1 The drugs sensitivities of *E. cloacae*

抗生素 Antibiotics	药敏/(mg·L ⁻¹) Drug sensitivity		敏感性 Sensitivity
	病例1 Case 1	病例2 Case 2	
多粘菌素 B Polymyxin B	≤2	≤2	S
替加环素(E-test 条) Tigecycline	0.75	1.0	S
阿米卡星 Amikacin	≥64	≥64	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	≥4	≥4	R
庆大霉素 Gentamicin	≥16	≥16	R
复方新诺明 Trimethoprim	≥320	≥320	R
氨曲南 Aztreona	≥64	≥64	R
头孢他啶 Ceftazidime	≥64	≥64	R
头孢曲松 Ceftriaxone	≥64	≥64	R
头孢吡肟 Cefepime	≥64	≥64	R
头孢替坦 Cefotetan	≥64	≥64	R
哌拉西林/他唑巴坦 Piperacillin/Tazobactam	≥128	≥128	R
亚胺培南(E-test 条) Imipenem	>32	>32	R
美洛培南(E-test 条) Meropenem	>32	>32	R

3 讨论

金属 β -内酰胺酶属 Bush 分类 3 群,包括 Ambler 分子分类中的 A、B、D 类酶。Ambler 分类为 B 类,该群酶最大特点是可以水解碳青霉烯类等抗生素,其活性不被克拉维酸等 β -内酰胺酶抑制剂所抑制,但可被 EDTA 抑制,酶活性中心需金属锌离子的参与^[7]。碳青霉烯酶又包括非金属碳青霉烯酶和金属酶碳青霉烯酶(简称金属酶),前者主要有 NMC-A、Sme-1 酶分子,后者主要包括 L1、IMP-1 和 VIM-1 金属酶蛋白。而 NDM-1^[1]是最近几年国际上发现的一种新型 β -内酰胺酶分子,为 B 类碳青霉烯金属酶蛋白,该酶分子与以往发现的金属酶一样,具有以包括碳青霉烯在内的绝大多数 β -内酰胺类抗生素的水解活性。与上述 L1、IMP-1 和 VIM-1 金属酶碳青霉烯酶蛋白分子不同,NDM-1 基因位于 140 kb^[8]的可通过接合的方式在各菌之间进行水平传播的耐药性质粒上。现已明确该质粒可整合多种耐药基因^[9],因此,携带含 NDM-1 基因质粒的菌株,将会导致临床上新型多重耐药菌在各种不同种属的细菌间的出现和扩散,将会给感染性疾病的治疗带来新的难题。

自首次发现新德里金属 β -内酰胺酶-1 以来,于 2010-10-26 我国“中国疾病预防控制中心”和“军事医学科学院”同时宣布,在中国大陆发现了 3 株携带 *bla*NDM-1 的碳青霉烯酶菌株,其中 2 株来自宁夏腹泻新生儿粪便尿肠球菌^[10],1 株来自福建肺癌患者痰标本鲍曼不动杆菌^[11];2011 年 Chen Y 等^[12]在以前留存的菌株中发现 4 株 NDM-1 阳性的鲍曼不动杆菌;2011 年 8 月广州的杨银梅等^[13]报道了 3 株不动杆菌和 1 株臭鼻克雷伯菌;2012 年 Zhou 等^[14]也报道了 1 株 NDM-1 阳性的琼氏不动杆菌;2012 年 3 月云南报道了从 1 位 4 岁患儿血液中分离出 1 株携带 *bla*NDM-1 的产酸克雷伯菌^[15];2012 年 8 月

湖南报道了从 1 位 8 个月大的患儿痰液标本中分离出 1 株携带 *bla*_{NDM-1} 肺炎克雷伯菌^[16]。由于碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌的不断出现,极大地限制了临床用药的选择,甚至将面临无敏感药物可用的局面,给感染患者的治疗带来了很大困难。笔者分离出这 2 株携带 *NDM-1* 基因的阴沟肠杆菌的患者都是海南省居民,从未有国外旅行史,说明与国外报道的 *NDM-1* 肠杆菌科细菌没有流行病学关联,这对了解该基因在海南地区的流行情况具有重要意义。至于该阴沟肠杆菌中发现的 *NDM-1* 是由其他杆菌转移过来的,还是具有独特的基因结构,尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] YONG D, TOLEMAN M A, GISKE C G, et al. Characterization of a new metallo-beta-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.
- [2] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *Lancet Infect. Dis.*, 2010, 10: 597-602.
- [3] HO P L, LO W U, YEUNG M K, et al. Complete sequencing of *pNDM-HK* encoding *NDM-1* carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in HongKong [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e17989.
- [4] WU H S, CHEN T L, CHEN I C, et al. First identified cation of a patient colonized with *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{NDM-1} in Taiwan [J]. 2010, 73(11): 596-598.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-S20-U. CLSI [S]. Wayne, PA, USA, 2010.
- [6] 郑波, 吕媛, 李耘. 携带 *bla*_{NDM-1} 基因泛耐药肠杆菌科细菌的检测方案 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2010, 26(11): 845-848.
- [7] BUSH K, JACOBY G. Updated functional classification of beta-lactamases [J]. *Antimicrobial Agents Chemother.*, 2010, 54: 969-997.
- [8] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *Lancet Infect. Dis.*, 2010, 10(9): 597-602.
- [9] 李吉云, 曲芬. 多重耐药微生物及防治对策 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2011.
- [10] 郝琼, 刘翔, 郭邦成, 等. 宁夏腹泻病人携带 *NDM-1* 基因菌株的初步研究 [J]. *宁夏医学杂志*, 2012, 34(4): 289-291.
- [11] 陈硕, 邱少富, 夏力亮, 等. 鲍曼不动杆菌 *bla*_{NDM-1} 基因序列分析及表达 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(5): 471-473.
- [12] CHEN Y, ZHOU Z, JIANG Y, et al. Emergence of *NDM-1*-producing *Acinetobacter baumannii* in China [J]. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2011, 66: 1255-1259.
- [13] 杨银梅, 叶惠芬, 张伟红, 等. 臭鼻克雷伯和鲍曼不动杆菌中检出 *NDM-1* 型金属 β 内酰胺酶基因 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(13): 1407-1409.
- [14] ZHOU Z, GUAN R, YANG Y, et al. Identification of new delhi metallo- β -lactamase gene (*NDM-1*) from a clinical isolate of *Acinetobacter junii* in China [J]. *Can. J. Microbiol.*, 2012, 58: 112-115.
- [15] 尹建雯, 徐闻, 古文鹏, 等. 云南省发现一株携带 *NDM-1* 基因的产酸克雷伯菌 [J]. *疾病监测*, 2012, 27(3): 211-217.
- [16] 邹明祥, 邹靖敏, 李军, 等. 产 *NDM-1* 肺炎克雷伯菌中国分离株的初步研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(8): 616-621.

Identification of Two Strains of *Enterobacter cloacae* Carrying New Delhi Metallo- β -lactamase 1 Gene in Hainan

FU Shengmiao , LI Tianjiao , CHEN Shuping , LI Chengxue , CAI Junhong ,
WANG Xuming , HUANG Tao , FU Huiqun
(Medical Laboratory Center , The People's Hospital of Hainan Province , Haikou 570311 , China)

Abstract: Two strains of *E. cloacae* carrying New Delhi metallo- β -lactamase 1 (*NDM-1*) gene were isolated clinically and identified by using BioMerieux API identification system to study their drug susceptibility , and the *NDM-1* gene from these two strains was identified by PCR. Metal producing enzyme carbapenemase was tested from these two strains by IP/IPI E-test and the drug susceptibility of the strains tested by concentration gradient E-test. The *NDM-1* gene was detected in both of the two strains of *E. cloacae* , and the strains were found resistant to plenty of antibiotics , such as Meropenem , Imipenem , Pyocyanin , Cefotetan , Cefepime , Ceftriaxone , Ceftazidime , Aztreonam , Sulfamethoxazole and Amikacin. The *NDM-1* gene plays an important role in drug susceptibility. The patients infected with *E. cloacae* carrying the *NDM-1* are local people of Hainan Province , China , and they have not traveled abroad , suggesting no epidemiological link between this bacterium and that reported overseas. The *E. cloacae*s identified in Hainan is endemic.

Key words: *Enterobacter cloacae*; metal producing enzyme; *blaNDM-1* gene; polymerase chain reaction

中国科技核心期刊、中国农业核心期刊、
全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊 , 为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊) 、中国核心期刊(遴选) 数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊 , 又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据 2011 年度中国期刊引证研究报告统计 , 《植物遗传资源学报》影响因子 1.396 , 在自然科学与工程类学科排序第 9 名。

报道内容为大田、园艺作物、观赏、药用植物、林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊 , 大 16 开本 , 196 页。定价 20 元 , 全年 120 元。各地邮局发行。

邮发代号: 82-643。国内刊号 CN11-4996/S , 国际统一刊号 ISSN1672-1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续 , 如需邮挂每期另加 3 元。

地 址: 北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮 编: 100081 电话: 010-82105794 010-82105796(兼传真)

网 址: www.zwyczy.cn

E-mail: zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com