

• 论 著 •

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*

杨银梅, 叶惠芬, 张伟红, 陈惠玲, 周小棉[△]

(广州医学院附属广州市第一人民医院检验科 510180)

摘要:目的 调查对碳青霉烯类抗菌剂敏感性降低的肠杆菌和鲍曼不动杆菌中 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因的存在情况。方法 应用改良 Hodge 试验和 EDTA 协同试验对 2007~2010 年本院收集的对碳青霉烯类抗菌剂敏感性降低的肠杆菌和鲍曼不动杆菌进行碳青霉烯酶筛选。PCR 法扩增 NDM-1 基因, 并对 PCR 扩增阳性产物进行 DNA 测序分析。对 NDM-1 基因阳性菌株用 PCR 方法检测 armA 和 rmtB16S rRNA 甲基化酶基因, VIM、SPM、IMP 和 KPC 碳青霉烯酶基因以及 I 类整合子。Etests 法进行药敏试验。结果 70 株肠杆菌中 10 株 Hodge Test 和 EDTA 协同试验阳性, 55 株鲍曼不动杆菌中 6 株 EDTA 协同试验阳性。其中 1 株臭鼻克雷伯和 3 株鲍曼不动杆菌 PCR 扩增出 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因目的片段, 经测序比对为 NDM-1 型基因。其中 1 株臭鼻克雷伯和 1 株鲍曼不动杆菌检测出 armA 型 16S rRNA 甲基化酶基因, 1 株鲍曼不动杆菌检测出 2 000 bp 左右的 I 类整合子, 未检出除 NDM-1 型外的其他碳青霉烯酶基因。NDM-1 基因阳性菌除对替加环素、多黏菌素 B 敏感外, 对其他检测的抗菌剂均耐药。结论 臭鼻克雷伯和鲍曼不动杆菌中存在 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因, 有的携带 armA 型 16S rRNA 甲基化酶基因和 I 类整合子, 为该地区首次报道。

关键词:碳青霉烯酶; NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因; 抗药性, 细菌; 革兰氏阴性菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1407-03

Detection of New Delhi metallo- β -lactamase 1 gene in *Klebsiella ozaenae* and *Acinetobacter baumannii*

Yang Yinmei, Ye Hui fen, Zhang Weihong, Chen Huiling, Zhou Xiaomian[△]

(Department of Clinical Laboratory, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of NDM-1 gene in multidrug-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. **Methods** Carbapenemases were screened by Modified Hodge Test and EDTA-disk synergy test. The encoding genes of NDM-1 was amplified by PCR and DNA sequencing. Encoding genes of 16S rRNA methylase, VIM, SPM, IMP and KPC gene was amplified by PCR and DNA sequencing. Antibiotic susceptibilities were assessed by Etests. **Results** 10 of 70 isolates Enterobacteriaceae were positive by Hodge Test and EDTA-disk synergy test, 6 of 55 isolates *Acinetobacter baumannii* were positive by EDTA-disk synergy test. Of these 125 Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*, 1 *Klebsiella ozaenae* and 3 *Acinetobacter baumannii* were NDM-1 positive by PCR and DNA sequencing. 1 *Klebsiella ozaenae* and 1 *Acinetobacter baumannii* were armA 16S rRNA methylase gene positive, the strain carrying NDM-1 gene was sensitive to polymyxin B and tigecycline. **Conclusion** *Klebsiella ozaenae* and *Acinetobacter baumannii* carry NDM-1 gene, This is the first report of NDM-1 in Guangzhou.

Key words: carbapenemases; New Delhi metallo- β -lactamase 1 gene; drug resistance, bacterial; gram-negative bacteria

碳青霉烯类抗菌剂是临床治疗革兰阴性杆菌引起的严重感染最强有力的抗菌剂, 具有抗菌谱广、抗菌作用强和对大部分 β 内酰胺酶稳定的特点, 特别是超广谱 β 内酰胺酶 (ESBLs) 和头孢菌素酶 (AmpC)。但随着该类药物的广泛使用, 细菌产生多种碳青霉烯酶而表达耐药^[1]。特别是 2009 年 Yong 等^[2]报道了产生 NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase 1) 型金属 β 内酰胺酶的肠道杆菌, 即“超级细菌”, 引起了全球的广泛关注。作者收集 2007~2010 年本院对碳青霉烯类抗菌剂敏感性降低的肠道杆菌和鲍曼不动杆菌进行相关检测, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2007~2010 年本院临床分离对厄它培南 MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ (Vitek2 检测) 肠道杆菌 70 株和亚胺培南 MIC $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 的鲍曼不动杆菌 55 株, 所有菌株均经法国生物梅里埃公司的 API 鉴定条或 Vitek2 仪器进行鉴定。

1.2 试剂与仪器 PCR 反应所用试剂购自大连宝生物有限公司, 引物由广州英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增仪和电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品。API 鉴定条和 Vitek2 细菌自动鉴定药敏系统为生物梅里埃公司产品。

1.3 碳青霉烯酶表型筛选 (1) Hodge 试验: 按照 CLSI 的改良法进行^[3]。(2) EDTA 协同试验: 0.5 麦氏单位的待检菌涂布 MH 平板, 贴两张亚胺培南纸片, 相距 1.0~1.5 cm, 其中一张纸片上面滴加 0.5 mol/L EDTA 10 μL , 35 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 亚胺培南加 EDTA 与亚胺培南纸片抑菌圈之差大于或等于 5 mm 者为金属酶阳性。

1.4 细菌 DNA 的提取 24 h 培养后纯菌于 2 mL M-H 肉汤中过夜培养后, 离心收集细菌沉淀。用生理盐水洗涤细菌后, 加非离子去污剂 NP-40 和蛋白酶 K 混匀, 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 2~3 h。取出消化好的细菌 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min 后, 离心取上清液为模板。

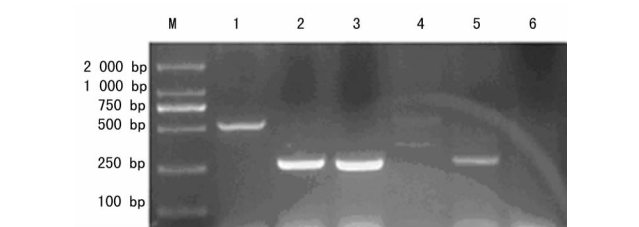
* 基金项目: “十一五”艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项资助项目 (2008ZX10004-004-1); 国家自然科学基金资助项目 (30870753); 广东省自然科学基金资助项目 (9151008901000190); 广东省医学科研基金资助项目 (A2009518); 广州市医药卫生科技基金重点资助项目 (2009-ZD1-10); 广州市科技支撑计划资助项目 (2010J-E241-2)。 [△] 通讯作者, E-mail: zhouximi@yahoo.com。

表 1 PCR 引物序列*		
引物	引物序列(5'-3')	产物长度和退火温度
NDM-1(1)	F1:CCGCAACCAATCCCTCTT (2751~)	292 bp, 55 ℃
	R1:CAGCACACTTCCTATCTC (3024~)	
NDM-1(2)	F2:GGCGGAATGGCTCATCACGA (2463~)	286 bp, 60 ℃
	R2:CGCAACACAGCCTGACTTTC (2731~)	
NDM-1(3)	F2:GGCGGAATGGCTCATCACGA (2731~)	588 bp, 57 ℃
	R1:CAGCACACTTCCTATCTC (3024~)	
VIM-2	F:ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG R:CTACTCAACGACTGAGCG	801 bp, 57 ℃
SPM	F:GCGTTTGTGTTGTGTGCTC R:TTGGGGATGTGAGACTAC	802 bp, 57 ℃
IMP-1	F:CTACCGCAGCAGAGTCTTTTG R:ACAACCAGTTTGCCTTACC	589 bp, 55 ℃
KPC	F:ATGTCACGTATCGCCGTC R:TTACTGCCCGTTGACGCC	871 bp, 55 ℃
I 类整合子 [#]	F:GACGTCAAGTCATCATCG R:GACGTCAAGTCATCATGG	55 ℃
armA	F:AGGTTGTTTCCATTCTCTGAG R:TCTCTCCATTCCTTCTCC	591 bp, 55 ℃
rmtB	F:ATGAACATCAACGATGCCCT R:CCTTCTGATTGGCTTATCCA	769 bp, 55 ℃

* :引物序列后括号内的数字表示在参考基因 FN396876 中的位置(NDM-1)。[#] : I 类整合子产物片段大小不定。

1.5 NDM-1 型基因检测 国家 CDC 提供并参考 GenBank 中

表 2 病例资料				
项目	16 号	41 号	65 号	70 号
病区	呼吸	呼吸	ICU	泌尿内科
菌株分离时间(年/月/日)	09/12/2	10/3/1	10/7/20	08/8/2
入院时间(年/月/日)	09/11/23	10/2/9	10/7/13	08/7/14
诊断	肺炎、糖尿病	呼吸衰竭、糖尿病	脑出血	肾功能不全
菌株来源	中段尿	痰	痰	中段尿
抗菌剂治疗	头孢他啶	哌拉西林/他唑巴坦	左氧氟沙星	头孢哌酮/他唑巴坦
出院时间(年/月/日)	09/12/9 康复出院	10/3/3 放弃治疗出院	10/8/18 出院	08/8/6 好转出院



M:DNA 标准带;1,4:16 和 41 号菌株引物 NDM-(3)的产物;2,5: 16 号和 41 号菌株 NDM-1(1)引物的扩增产物;6:阴性对照。

图 1 PCR 产物电泳图一

基因(序列号为 FN396876)设计 2 对引物,见表 1。引物 NDM-1(1)和 NDM-1(2),用 NDM-1(2)的正向序列 F2 和 NDM-1(1)R1 组成第 3 对引物 NDM-1(3)。PCR 反应产物琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像系统成像保存。扩增出目的片段的 PCR 扩增产物送广州英骏生物技术有限公司进行双向测序,测得序列采用 GenBank 中的 Blast 程序进行同源分析。

1.6 NDM-1 基因阳性菌株的相关检测 PCR 检测 16S rRNA 甲基化酶基因和其他碳青霉烯酶基因及 I 类整合子,相关引物见表 1。Etests 法进行药敏试验。

1.7 查阅病例资料 查阅分离出 NDM-1 基因阳性菌株的患者病历。

2 结 果

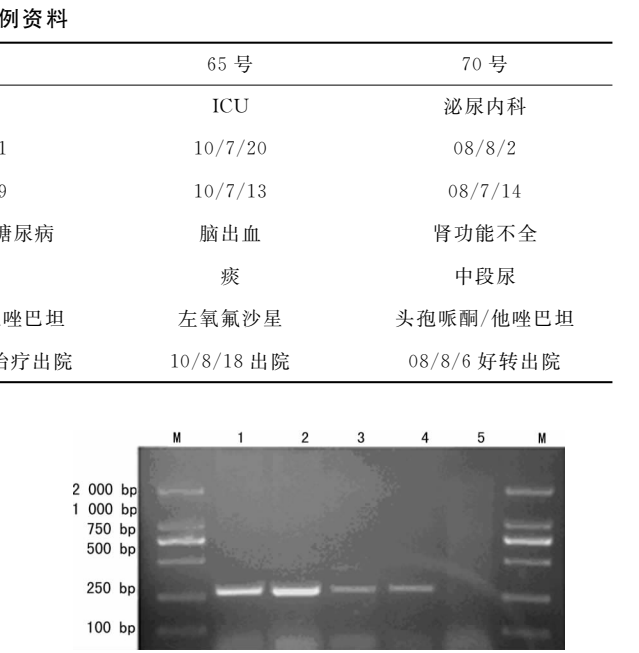
2.1 表型检测结果 70 株肠杆菌中 10 株 Hodge Test 和 EDTA 协同试验阳性;55 株鲍曼不动杆菌中 6 株 EDTA 协同试验阳性。

2.2 NDM-1 基因 PCR 检测结果 125 株细菌中,1 株臭鼻克雷伯(16 号标本)和 3 株鲍曼不动杆菌(41、65、70 号标本)均扩增出目的片段。见图 1~2。

2.3 NDM-1 基因测序及比对结果 在 NCBI BLAST 比对,16 号菌株第 1、2、3 对引物和 41 号第 1、2 对引物以及 65、70 号的第 3 对引物测得序列均为 NDM-1 基因,与 GenBank 核酸数据库上公布的(FN396876 和 HQ259057)序列同源性为 100%,其中 16、65 号菌株的 NDM-1 基因序列已提交 GenBank。

2.4 其他 PCR 检测结果 16、41 号菌株检出 armA16S rRNA 甲基化酶基因,经测序比对与 GenBank 核酸数据库公布的 armA 基因(HM570047)序列同源性为 100%。65 号菌株检出 2 000 bp 左右的 I 类整合子,未检测出除 NDM-1 型外的其他碳青霉烯酶基因。

2.5 病例资料 病例资料分析见表 2。



M:DNA 标准带;1,2:16 号菌株引物 NDM-1(1)和 NDM-1(2)的扩增产物;3,4:41 号菌株引物 NDM-1(1) 和 NDM-1(2)的扩增产物;5:阴性对照。

图 2 PCR 产物电泳图二

2.6 药敏结果 见表 3。

表 3 药敏结果(MIC 值, $\mu\text{g/mL}$)				
抗菌剂	16 号	41 号	65 号	70 号
头孢他啶	>256	>256	>256	>256
阿米卡星	>256	>256	128	32
环丙沙星	>32	>32	>32	>32
哌拉西林/他唑巴坦	>256	>256	>256	32
头孢哌酮/舒巴坦	>256	64	32	12
亚胺培南	12	>32	>32	>32
头孢吡肟	>256	192	>256	>256
多黏菌素 B	1.5	0.5	0.5	0.5
氨曲南	>256	24	16	8
替加环素	3	1.5	2	0.75

3 讨 论

2009 年 Yong 等^[2]报道,从一个曾在印度就医的糖尿病患者尿液标本中分离 1 株产 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶的肺炎克雷伯菌,因为该菌株对目前应用于临床的几乎所有抗菌剂耐药,而被称为“超级细菌”,引起了全社会的广泛关注。2010 年印度和英国的微生物学家对印度和英国 2003 和 2009 年分离的菌株中携带 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因的情况进行了检测^[4],发现印度南部的 Chennai 地区,2009 年 3 521 株中有 141 株显示为对碳青霉烯类抗菌剂耐药,其中 44 株 NDM-1 基因检测阳性。同一时期,在印度北部的 Haryana 地区,198 株细菌中 47 株耐药,26 株为 NDM-1 基因检测阳性。英国 2008 年首次检测出 NDM-1 基因,2009 年,产碳青霉烯酶的肠杆菌中 44% 为 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶。中国 2010 年 10 月各种媒体报道检测出 3 株携带 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因的菌株,本研究发现 4 株携带 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因的菌株,为广州地区首次报道。

70 号菌株感染者的病历资料表明,携带 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因的菌株早在 2008 年 7~8 月就存在,也就是说,所谓“超级细菌”在中国 2008 年就已经存在。因此,超级细菌起源于印度的说明有待进一步考证。

近年来,不动杆菌对碳青霉烯类抗菌剂耐药的出现和增加,给临床感染的治疗和控制带来了困难,耐药机制也成了研究的热点^[5]。本研究对 55 株对碳青霉烯类高度耐药的泛耐药鲍曼不动杆菌进行检测,发现 3 株携带 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因,说明 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶是泛耐药鲍曼不动杆菌中主要的金属 β 内酰胺酶之一。

据文献报道,产碳青霉烯酶是革兰阴性杆菌对碳青霉烯类抗菌剂的主要耐药机制之一^[6],所以本实验检测了其他类型的碳青霉烯酶基因,通过 PCR 检测这些 NDM-1 型基因阳性菌株

不携带其他类型的碳青霉烯酶基因。16S rRNA 甲基化酶能保护细菌的 16S rRNA,对几乎所有氨基糖苷类抗菌剂高水平耐药^[7]。这些 NDM-1 型基因阳性的菌株中,16 和 41 号同时携带 armA 型 16S rRNA 甲基化酶基因,其耐药表型是相对应的对氨基糖苷类抗菌剂高水平耐药,通过对 I 类整合子的检测^[8],发现 65 号菌株携带 2 000 bp 左右的 I 类整合子,送英骏生物技术有限公司进行双向测序,测序不成功,相关研究还在进行中。

4 株 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因阳性菌株分离时间为 2008 年 8 月至 2010 年 7 月,耐药表型有所不同,如 16 号和 41 号不同于另外 2 株菌对阿米卡星高水平耐药,16 号菌株对亚胺培南的 MIC 为 12 $\mu\text{g/mL}$,不同于其他 3 株菌的高水平耐药。4 株菌分离自 3 个不同的病区,为散发病例。通过查阅病历资料,分离出 16 号臭鼻克雷伯菌株的患者,和 Yong 等^[2]首次报道患者有类似的病史,同样为糖尿病患者;分离出鲍曼不动杆菌菌株的患者,疾病危重,为易感人群。因此,加强对产 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶细菌的监测,加强抗菌剂的合理使用和加强医院感染预防与控制,是必须切实做好的预防措施。

参考文献

[1] 阙守刚,邵海枫,王卫萍,等. 大肠埃希菌质粒型碳青霉烯酶 KPC-2 检测和分析[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(11):1120-1123.

[2] Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-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(27):5046-5054.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M100-S20[S]. Wayne PA: CLSI, 2010.

[4] Karthikeyan KK, Mark AT, Timothy RW, 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(3):597-602.

[5] 周铁丽,李响新,王忠永,等. 鲍曼不动杆菌 OXA-51 样碳青霉烯酶基因分型与耐药性研究[J]. 中华检验医学杂志,2008,31(8):812-816.

[6] 沈继录,朱德妹,吴卫红,等. 革兰阴性杆菌碳青霉烯酶产生与细菌耐药性关系的研究[J]. 中华检验医学杂志,2008,31(4):408-414.

[7] 杨银梅,陈晓文,张伟红,等. 革兰阴性杆菌中 16S rRNA 甲基化酶和 aac(6')-Ib-cr 基因的检测[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(3):356-358.

[8] 许宏涛,陈东科,张秀珍. 多重耐药绿脓假单胞菌中 I 类整合子的研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(7):721-723.

(收稿日期:2011-04-13)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ 、 σ 、 π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S 、 P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。