

新型携带 blaNDM-1 基因的超级细菌的研究进展

杨 艳 综述,王厚照[△],张 玲 审校

(安徽医科大学解放军第一七四临床学院检验科,福建厦门 361003)

关键词:NDM-1; 超级细菌; 药物耐受性; 多粘菌素; 替加环素**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.041**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)18-2440-03

2010 年 8 月 11 日,一篇发表在英国权威医学杂志《The Lancet Infectious Diseases》上的论文称发现了多重耐药性的 NDM-1 型“超级细菌”^[1],引起了全球各界的密切关注。NDM-1 型超级细菌并不是一种新型细菌,而是一类携带 blaNDM-1 基因对绝大多数抗菌药物都有强劲耐药性多种细菌的统称。研究发现,携带 blaNDM-1 基因的主要是大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌这两种最常见的革兰阴性菌。严格意义上称为“超级细菌”并不准确,为避免公众误解,称为“多重耐药菌”或者“多重肠杆菌属的耐药菌”将更为准确。携带 blaNDM-1 基因的超级细菌源于南亚,很快传到欧美,随后很多国家都报道称发现 NDM-1 感染病例。本文就携带 blaNDM-1 基因的超级细菌的发现及命名、由来、分子生物学特点和耐药机制,防治对策方面作简要综述。

1 blaNDM-1 基因发现及命名

事实上,NDM-1 早在 2009 年已首次被报道,Yong 等^[2]发现,一位印度裔瑞典患者在印度新德里获得了肺炎克雷伯菌引起的尿路感染。这株细菌(肺炎克雷伯菌 05-506)含有金属 β -内酰胺酶(MBL),但未检出已知的 MBL 基因,证实为新型 MBL,研究者根据其产生地将其命名为“新德里金属蛋白酶-1”(NDM-1),blaNDM-1 为其编码基因。该酶对氨曲南以外的所有 β -内酰胺类抗菌药物耐药,对环丙沙星也不敏感,仅对多粘菌素和替加环素敏感^[1]。后来在这名患者的粪便中又分离出一株产相同金属酶的大肠埃希菌。而事实上,一些地区医院临床分离菌株相关回顾性检测结果证明,早在 2006 年,印度就已经存在携带 blaNDM-1 的细菌^[3]。2010 年 3 月,对孟买的一家医院研究发现,从不同患者体内分离出的 24 株碳青霉烯类耐药菌中,22 株携带 blaNDM-1 基因^[4]。2009 年 10 月,中国香港已有首例携带 blaNDM-1 基因的病例。2010 年 10 月 26 日,中国大陆报道检出三株 blaNDM-1 基因阳性的超级细菌。

blaNDM-1 的出现并非偶然,抗菌药物滥用正是引起 blaNDM-1 的首要原因。细菌在接触抗菌药物之前,就已存在具有耐药性的突变株。Maritnez^[5]认为,自然界中存在着广泛的耐药基因,如真菌、放线菌的抗菌药物合成基因组中本身就含有“耐药基因”。另外,致病菌在与抗菌药物的作用过程中也会进化出“耐药基因”。

2 NDM-1 型超级细菌的由来

实际上,超级细菌不是现在才有的,1928 年亚历山大·弗莱明发现了青霉素,标志着人类进入了抗菌药物时代,同时也开始了与细菌抗争的历史。细菌与抗菌药物之间一直是此消彼长的斗争关系,人类不断研制出新型抗菌药物对付致病菌,从青霉素到头孢菌素再到碳青霉烯类;同时,细菌为了生存不断的发生变异,最终形成更新更强大细菌——“超级细菌”。

迄今为止被称为“超级细菌”,根据耐药的严重程度主要有:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA),耐万古霉素肠球菌(VRE),耐万古霉素葡萄球菌(VRSA),耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(包括 NDM-1),多重耐药铜绿假单胞菌(MDR-PA),泛耐药鲍曼不动杆菌(PDR-Ab),产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)肠杆菌科细菌,多重耐药结核杆菌(XDR-TB) 8 种。随着抗菌药物滥用问题日益严重,“超级细菌”的家族也越来越庞大。新型携带 blaNDM-1 基因的细菌,为“超级细菌”家族的一个新成员。

从微生物进化的角度看,“超级细菌”的出现是微生物与人类斗争的必然结果,是抗菌药物使用过程中不可避免的^[6]。而抗菌药物的滥用,使细菌面临巨大的选择压力,迫使越来越多的耐药菌产生被选择出来。

抗菌药物的滥用主要存在于两个方面:一是在医疗领域人类疾病治疗过程;另一个畜牧业、养殖业等如动物饲料添加抗菌药物。统计数据表明,两者各占一半。WHO 调查显示,中国大陆住院患者抗菌药物使用率高达 80%,其中联合使用两种以上抗菌药物的占 58%,远高于 WHO 推荐的 30%,而欧美发达国家仅为 22%~25%。中国真正需要使用抗菌药物的患者还不到 20%,80%以上属于滥用抗菌药物。我国是抗菌药物滥用最严重的国家之一,每年约有 8 万人因滥用抗菌药物而死亡。由于不合理使用抗菌药物在 7 岁以下儿童中造成耳聋的患者多达 30 万,占总体聋哑儿童的 30%~40%,而发达国家只占 0.9%。而农牧业中滥用抗菌药物的情况更为严重。

3 NDM-1 的分子生物学特点及耐药机制

Ambler^[7]将 β -内酰胺酶分为 4 类:A、B、C 和 D。A、C、D 类酶活性中心有一个丝氨酸残基,又称丝氨酸 β -内酰胺酶;B 类酶活性中心为金属离子(主要为 Zn^{2+}),因此称为金属 β -内酰胺酶(MBL)。MBL 根据序列不同,又可分为 3 个亚类:B1、B2 和 B3^[8]。已报道的 β -内酰胺酶超过 300 种,MBL 也有许多种类,如 IMP、VIM、GIM、SIM 和 KMH 等,NDM-1 是一种新发现的 MBL,属于 B1 亚类。

NDM-1 与其他 MBL 之间的氨基酸序列同源性很低,即使与最相似的 VIM-1/VIM-2 相比,也只有 32.4%的同源性^[9]。在酶活性位点附近具有独特的氨基酸残基(第 222 位酪氨酸残基)以及插入序列使其不同于其他种类的 MBL,并能与碳青霉烯类抗菌药物更紧密地接合。而且在 NDM-1 中,在两个组氨酸残基中间的是一个丙氨酸残基^[2]。

blaNDM-1 包含 807 bp 的开放读码框,其中 C+G 的含量为 57%,低于周围相邻的 DNA 片段中 C+G 的含量(62%~65%),表明其是外源转移获得的新的 DNA 片段^[2],blaNDM-1 基因编码产物为 1 个包含 269 个氨基酸的蛋白质分子,呈紧密

的球状,呈左右不对称结构,天然蛋白以单体形式存在^[10],分子量为 27.5×10^3 ,等电点为 6.9。

blaNDM-1 以基因盒的形式位于质粒或染色体的整合子中^[11]。研究表明 blaNDM-1 基因以 DNA 的形式大多存在于可转移的质粒上。blaNDM-1 在肺炎克雷伯菌 05-560 中位于一个 180 kb 的质粒上,在大肠埃希菌中位于一个 140 kb 的质粒上。转移接合试验表明,携带 blaNDM-1 的质粒可以从肺炎克雷伯菌 05-560 和大肠埃希菌 NF-NDM-1 以频率 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 转移至受体菌大肠埃希菌 J53。由于在最初发现该基因的患者身上也分离到了携带 blaNDM-1 的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌,提示 blaNDM-1 基因可在不同的菌属间转移和传播,由此可造成不同菌种耐药性的播散。一旦强致病菌获得 blaNDM-1 基因并产生耐药性,必将给公共卫生带来巨大威胁,这不得不引起医学界和科学界的重视。2011 年 4 月《柳叶刀传染病》杂志报道 blaNDM-1 基因已传播导致霍乱和痢疾的细菌中,并在 1 400 万人口的首都的其他细菌中传播^[12]。少数 blaNDM-1 基因位于染色体上^[1-2]。

NDM-1 酶可分解 β -内酰胺环结构,可使所有含 β -内酰胺环结构的药物失效。青霉素与头孢菌素,以及头霉素类和碳青霉烯类等其他非典型 β -内酰胺类这些目前临床最常用的抗菌药物都含有 β -内酰胺环结构,因此带有该酶的细菌可对几乎所有抗菌药物耐药。

目前所知携带 blaNDM-1 基因的超级细菌的耐药机制:NDM-1 对抗菌药物的活性部位降解灭活形成超强耐药;基因发生某些位点的突变导致编码的蛋白质性质发生了改变影响与药物分子相互作用等形成高度耐药;另外,该遗传因子还编码一种能增加抗药性的外排泵^[2]。NDM-1 的耐药机制有待于进一步研究和证实。

4 治疗对策

NDM-1 型超级细菌对已上市的近 200 种抗菌药物几乎都具有耐药性。目前,只有多粘菌素 (Polymyxins) 和替加环素 (Tigacycline) 对其敏感,但对多粘菌素耐药的多重耐药菌株已有报道^[13]。

4.1 多粘菌素 由于细菌耐药产生快速且突然,而新药物的研制周期长且疗效尚待确证,此时,为老药寻找新的适应证尤为重要,如多粘菌素。

多粘菌素 (PMX) 是从多粘杆菌培养液中分离出的一种多肽类抗菌药物。不同菌株产生化学结构不全相同的多粘菌素 A、B、C、D、E。临床应用的主要是多粘菌素 B (PB) 和多粘菌素 E (又称黏菌素 colistin) 的硫酸盐和甲磺酸盐。B 和 E 的抗菌谱相似,但抗菌活性不同,一般 B 的作用优于 E。PMX 于 20 世纪 50 年代被开发出来,20 世纪 60 年代用于治疗革兰阴性菌感染。20 世纪 80 年代后由于其抗菌谱窄,肾毒性较明显而被弃用。

PMX 是环状阳离子多肽抗菌药物,抗菌机制^[14]是作用于细菌的细胞膜,破坏细胞膜完整性使其通透性增加,导致细胞内的重要物质外漏而起杀菌作用。PMX 是一种杀菌药,对生长繁殖期和静止期细菌都具杀菌作用。该药是浓度依赖性抗菌药物,有一定的抗菌药物后效应,其抗菌活性与浓度时间曲线下面积和最低抑菌浓度的比例 (AUC/MIC) 相关。PMX 是唯一具有抗菌和抗内毒素活性的抗菌药物^[15]。PMX 的不良反应主要为剂量依赖性的肾毒性和神经毒性。

4.2 替加环素 替加环素 (Tigecycline) 是米诺环素的衍生物,是第一个用于临床的新一代的甘氨酸环素类抗菌药物。替

加环素与米诺环素在分子结构上极相似,主要区别在于 9 位上增加了一个甘氨酸氨基,此种取代目前为止为替加环素所独有。替加环素具有广谱抗菌活性,对革兰阳性菌、革兰阴性菌、厌氧菌都具有较高的抗菌活性,甚至对多重耐药性的革兰阳性菌如 MRSA、VRE 等也具有抗菌活性。替加环素能够克服导致细菌对四环素类药物耐药的两种遗传机制:核糖体保护与外排泵机制^[16-17]。

美国 FDA 于 1995 年 6 月批准替加环素上市,2005 批准用于复杂的腹腔内、皮肤及软组织感染。替加环素商品名为 Tygacil™,国内商品名为“泰阁”,2012 年正式在我国上市。该药物在国内还处于临床研究阶段,目前已有 11 家企业申请进行该药的临床研究及申报生产^[18]。

替加环素抗菌机制类似与其他四环素类抗菌药物通过与细菌 30S 核糖体亚基结合,阻止氨基酰 tRNA 进入核糖体 A 位,阻止转录从而抑制细菌蛋白质的合成以及细菌的生长^[19-20]。替加环素与核糖体结合的紧密程度是四环素和米诺环素的 5 倍^[17]。Olson 等^[21]研究证明,替加环素抑制细菌蛋白合成的能力是米诺环素 3 倍,四环素的 20 倍。

虽然替加环素结构类似米诺环素,但是分子结构改变后不仅抗菌活性大大提高,而且相比与其他四环素类药物,细菌对之不易产生耐药性^[22-23]。有关药物不良反应的有限资料显示,该药使用安全,耐受性良好。临床常见的不良反应是恶心、呕吐、腹泻和头痛,其他不良反应包括血液蛋白不足和呼吸困难^[24]。

替加环素与多粘菌素的联合治疗在临床上也有应用。一项研究显示,多粘菌素 E 和替加环素对一种相似的碳青霉烯酶有协同作用^[25]。

4.3 新药研发 最近,科学家从青蛙皮肤、蟑螂等材料中发现了一些可能杀灭超级细菌的新型物质^[26],仅获得初步结果。

5 结 语

新型携带 blaNDM-1 基因的超级细菌致病性和临床表现与敏感细菌没有区别,但治疗上极为困难。根据目前所知 NDM-1 型超级细菌不同于“非典”和“甲流”,非传染病,不会因为高传染性和致病性在社会上引起广泛传播,主要通过相互接触而传播,主要感染抵抗力低的人群引起医院内感染,对免疫力正常的人群危害不大。目前有两类抗菌药物对其敏感对超级细菌的耐药机制进行深入研究并积极研制新药是目前行之有效的策略。之前国际上报道的携带 blaNDM-1 基因的均为革兰阴性菌,而我国发现两株携带 blaNDM-1 基因的革兰阳性菌,这说明该基因在细菌中传播比研究者认识的范围更广,机制更复杂。blaNDM-1 基因是否在革兰阴性菌与革兰阳性菌间进行传递和播散,有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, 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.
- [2] Yong D, Toleman MA, Giske CG, 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.
- [3] Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, et al. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in In-

dian hospitals; report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006 – 2007 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(3): 1274-1278.

[4] Deshpande P, Rodrigues C, Shetty A, et al. New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae; treatment options with carbapenems compromised [J]. *J Assoc Physicians India*, 2010, 58(1): 147-149.

[5] Martinez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments [J]. *Science*, 2008, 321(5887): 365-367.

[6] Laupland KB, Church DL, Vidakovich J, et al. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*; importance of international travel [J]. *J Infect*, 2008, 57(6): 441-448.

[7] Ambler RP. The structure of beta-lactamases [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1980, 289(1036): 321-331.

[8] Garau G, Garcia-Sáez I, Bebrone C, et al. Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(7): 2347-2349.

[9] Poir  l L, Lagrutta E, Taylor P, et al. Emergence of metallo-  -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(11): 4914-4916.

[10] Zhang H, Hao Q. Crystal structure of NDM-1 reveals a common   -lactam hydrolysis mechanism [J]. *FASEB J*, 2011, 25(8): 2574-2582.

[11] Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(10): 2253-2254.

[12] Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health; an environmental point prevalence study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(5): 355-362.

[13] Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, et al. Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: A matched case-control study [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(6): 2271-2274.

[14] Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria [J]. *Ann Pharmacother*, 1999, 33(9): 960-967.

[15] 陈冠容. 多粘菌素临床应用进展及应对超级细菌 [J]. *医药导报*, 2011, 30(2): 135-140.

[16] Guay DR. Oritavancin and tigecycline; investigational antimicrobials for multidrug-resistant bacteria [J]. *Pharmacotherapy*, 2004, 24(1): 58-68.

[17] Bauer G, Berens C, Projan SJ, et al. Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drug-directed Fe²⁺ cleavage of 16S rRNA [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 53(4): 592-599.

[18] 李祺如, 钟倩. 超级细菌及其感染治疗药物 [J]. *世界临床药物*, 2010, 31(11): 704.

[19] Wenzel R, Bate G, Kirkpatrick P. Tigecycline [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(10): 809-810.

[20] Zhanel GG, Homenuik K, Nichol K, et al. The glycyclines; a comparative review with the tetracyclines [J]. *Drugs*, 2004, 64(1): 63-88.

[21] Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, et al. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(6): 2156-2166.

[22] Kasbekar N. Tigecycline; a new glycycline antimicrobial agent [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2006, 63(13): 1235-1243.

[23] Rubinstein E, Vaughan D. Tigecycline; a novel glycycline [J]. *Drugs*, 2005, 65(10): 1317-1336.

[24] Oliva ME, Rekha A, Yellin A. A multicenter trial of the efficacy and safety of tigecycline versus imipenem/cilastatin in patients with complicated intra-abdominal infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2005, 5(1): 88.

[25] Cobo J, Morosini MI, Pintado V, et al. Use of tigecycline for the treatment of prolonged bacteremia due to a multiresistant VIM-1 and SHV-12 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 60(3): 319-322.

[26] Alleyne R. New antibiotics developed from frog skin [N]. *The Daily Telegraph*, 2010-08-26.

(收稿日期: 2013-05-08)

(上接第 2418 页)

CLSI, 2002: 1-47.

[6] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 133.

[7] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.

[8] Kim JE, Kim BR, Woo KS, et al. Evaluation of the leukocyte differential on a new automated flow cytometry hematology analyzer [J]. *Int J Lab Hematol*, 2012, 34(5): 547-550.

[9] Amundsen EK, Urdal P, Hagve TA, et al. Absolute neutrophil counts from automated hematology instruments are accurate and precise even at very low levels [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(6): 862-869.

[10] Kim A, Park J, Kim M, et al. Correction of Pseudoreticulocytosis in Leukocytosis Samples Using the Sysmex XE-2100 Analyzer Depends on the Type and Number of White Blood Cells [J]. *Ann Lab Med*, 2012, 32(6): 392-398.

[11] Amundsen EK, Henriksson CE, Holthe MR, et al. Is the blood basophil count sufficiently precise, accurate, and specific?: three automated hematology instruments and flow cytometry compared [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(1): 86-92.

[12] Farias MG, Garcia MP, Cagliari CR, et al. Evaluation of the immature myeloid information (IMI) by Sysmex XE 2100(R) hematology analyzer in the identification of blasts of myeloid lineage [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50(10): 1861-1864.

(收稿日期: 2013-06-08)