

• 论 著 •

碳青霉烯类敏感性下降革兰阴性杆菌 NDM-1 基因筛查

叶龙英¹, 徐韞健^{2△}, 卢鉴财²

(1. 广州市荔湾区第三人民医院检验科, 广东广州 510380; 2. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:目的 检测碳青霉烯类敏感性下降革兰阴性杆菌的新德里金属 β -内酰胺酶-1(NDM-1)基因,了解广州地区 NDM-1 超级细菌的流行情况。方法 收集 2011~2014 年分离的碳青霉烯类敏感性下降革兰阴性杆菌 105 株,采用聚合酶链反应(PCR)扩增 NDM-1 基因保守序列初步筛查 NDM-1 基因,阳性菌株扩增 NDM-1 基因全序列,然后克隆至 pUCm-T 质粒后进行测序。结果 肠杆菌科细菌对美罗培南、厄他培南、亚胺培南的耐药率分别为 29.09%、50.91%、29.09%;鲍曼不动杆菌对美洛培南、亚胺培南全耐药;铜绿假单胞菌对美罗培南、亚胺培南的耐药率均为 88.46%。有 4 株菌含 NDM-1 基因,包括肺炎克雷伯菌 1 株,大肠埃希菌 2 株,阴沟肠杆菌 1 株;克隆质粒 pUCm-T-NDM-1 经双酶切和测序证实构建成功。测序结果经 BLAST 比对后,发现 4 个克隆质粒的序列 100% 相同,与国内外发现的 NDM-1 序列也是 100% 一致。结论 该地区革兰阴性杆菌存在产 NDM-1 酶株,其所携带的 NDM-1 基因全序列与国际上发现的完全一致。

关键词:新德里金属 β -内酰胺酶-1; 碳青霉烯类; 敏感性; 克隆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1896-03

Screening of NDM-1 gene in gram-negative bacilli with decreased sensitivity to carbapenems

Ye Longying¹, Xu Yunjian^{2△}, Lu Jiancai²

(1. Department of Clinical Laboratory, Third People's Hospital of Liwan District of Guangzhou City, Guangzhou, Guangdong 510380, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To determine new delhi metallo- β -lactamase-1(NDM-1) gene in strains of gram-negative bacilli with decreased sensitivity to carbapenems, and to investigate the epidemic situation of strains carrying NDM-1 gene in Guangzhou area. **Methods** 105 strains of gram-negative bacilli with decreased sensitivity to carbapenems isolated from 2011 to 2014 were collected. The conserved sequences of NDM-1 gene were screened initially by using polymerase chain reaction(PCR) amplification, and positive strains were confirmed by PCR amplification of the whole sequence. Then NDM-1 gene was cloned into plasmid pUCm-T and sequenced. **Results** The resistance rates of Enterobacteriaceae bacteria against meropenem, ertapenem and imipenem were 29.09%, 50.91% and 29.09%, respectively. All strains of Acinetobacter baumannii were resistant to meropenem and imipenem. The resistance rates of Pseudomonas aeruginosa against meropenem and imipenem both were 88.46%. 4 strains were NDM-1 gene positive, including 1 strain of Klebsiella pneumoniae, 2 strains of Escherichia coli, 1 strain of Enterobacter cloacae. Successful establishment of cloning plasmid pUCm-T-NDM-1 was confirmed by using double enzyme digestion and sequencing. The sequencing results were compared with BLAST, it was showed that the sequences were exactly the same in four cloned plasmids, and sequences of NDM-1 were also exactly the same with those in domestic and foreign. **Conclusion** Strains of NDM-1 producing gram-negative bacilli exist in Guangzhou area, and whole sequence of NDM-1 gene carried in these strains are exactly the same with those found in foreign.

Key words: new delhi metallo- β -lactamase-1; carbapenems; sensitivity; clone

新德里金属 β -内酰胺酶-1(NDM-1)是一种新的金属 β -内酰胺酶,容易水解碳青霉烯类、青霉素类和头孢菌素类等抗菌药物,但对多黏菌素和替加环素具有较高体外敏感性。Yong 等^[1]于 2008 年 1 月在一位印度裔瑞典尿路感染患者中发现产 NDM-1 肠杆菌科细菌,该菌株对包括碳青霉烯类的所有 β -内酰胺类抗菌药物耐药。目前,携带 NDM-1 基因的泛耐药菌引起的感染主要有尿道感染、呼吸机相关性肺炎、血流感染、导管相关性感染、伤口感染等。NDM-1 基因可存活在任何细菌中,能通过借助整合子、转座子、质粒等可移动基因元件经接合性转导在不同细菌间进行水平传播,从而会把耐药基因传播给非耐药细菌。一旦病原菌获得此基因,会产生多重耐药的表现,其感染情况难以控制。本研究通过筛查广州市两家医院碳青霉烯类敏感性下降革兰阴性杆菌的 NDM-1 基因,了解本地区

NDM-1 超级细菌的流行情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株及质粒 105 株碳青霉烯类敏感性下降的革兰阴性杆菌分离自 2011~2014 年广州市荔湾区第三人民医院和广州医科大学附属第一医院临床标本,包括肠杆菌科细菌 55 株(其中大肠埃希菌 21 株、阴沟肠杆菌 7 株、肺炎克雷伯菌 27 株)、鲍曼不动杆菌 26 株、铜绿假单胞菌 24 株。标本来源:脓液 1 株,插管导管 1 株,导管头 1 株,分泌物 4 株,腹腔引流液 1 株,腹水 2 株,静脉穿刺管 1 株,尿液 16 株,伤口拭子 2 株,咽拭子 2 株,痰 67 株,胸腔积液 2 株,血液 2 株,引流液 1 株,组织 2 株。大肠埃希菌标准菌株 ATCC25922 为实验室保存;JM109 化学感受态细菌购自北京鼎国昌盛生物技术有限责

任公司;pUCm-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 仪器与试剂 Premix Taq 酶、DNA marker DL2000、限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III、DNA 片段纯化试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;GeneAmp PCR System 9700 购自上海普迪生物技术有限公司;美国 BIO-RAD Gel Doc EZ 全自动成像系统购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 引物设计与合成 根据 Genbank 数据库中 NDM-1 基因序列,设计其保守序列及全序列的引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。保守序列扩增片段大小为 292 bp,其引物序列为,NDM-1-A:5'-CCG CAA CCA TCC CCT CTT-3';NDM-1-B:5'-CAG CAC ACT TCC TAT CTC-3'。全序列扩增片段大小为 813 bp,其引物序列为,NDM-1-F:5'-CCG GAA TTC ATG GAA TTG CCC AAT ATT ATG CA-3'(下划线表示 EcoR I);NDM-1-R:5'-CCC AAG CTT TCA GCG CAG CTT GTC GGC CAT-3'(下划线表示 HindIII)。

1.3 方法

1.3.1 收集碳青霉烯酶筛查试验阳性的革兰阴性杆菌 判断标准:根据美国临床实验室标准化协会(CLSI)的建议^[2],美罗培南或亚胺培南或厄他培南对肠杆菌科细菌的最小抑菌浓度(MIC)大于或等于 2 mg/L 即为碳青霉烯酶筛查试验阳性。参考文献[3-4]建议,亚胺培南、美罗培南对铜绿假单胞菌、不动杆菌 MIC≥8 mg/L,即为碳青霉烯酶筛查试验阳性。

1.3.2 NDM-1 基因的检测 煮沸法裂解提取 DNA,利用保守序列引物对所收集的菌株进行 NDM-1 基因扩增,聚合酶链反应(PCR)总体积为 25 μL,内含 2 μL NDM-1 模板,12.5 μL Premix Taq,1 μL 20 μmol/L NDM-1-A,1 μL 20 μmol/L NDM-1-B,8.5 μL 灭菌三蒸水。反应条件:95 ℃ 预变性 5

min;95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 再延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。对 NDM-1 阳性的菌株再进行全基因组 DNA 基因扩增,扩增体系及反应条件同上。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。阳性 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行核苷酸序列测定,测序结果在 GenBank 上进行比对。

1.3.3 目的基因克隆 (1)NDM-1 片段的回收与纯化:按试剂盒说明操作。(2)载体与目的基因的连接:纯化的 NDM-1 基因片段,与 pUCm-T 载体连接,在离心管中加入 1 μL pUCm-T 载体和 4 μL 纯化的 NDM-1 基因片段,加入 5 μL 的 Solution I,置于干式恒温金属浴中 22 ℃ 反应 4 h。(3)转化感受态细胞:10 μL 连接产物加入 50 μL JM109 感受态细胞中,冰上放置 30 min。42 ℃ 加热 90 s 后,再在冰上放置 2 min。加入 890 μL LB 培养液,37 ℃ 振荡培养 60 min。在含 Amp 的琼脂平板培养基上培养,形成单菌落。挑取单菌落保存并进行 PCR 鉴定,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。(4)重组菌质粒的提取:碱裂解法过柱提取。(5)EcoR I 和 Hind III 双酶切克隆质粒:在离心管中加入克隆质粒 16 μL 和 10 mol/L 缓冲液 2 μL,共 18 μL,加入 EcoR I 和 Hind III 各 1 μL,共 20 μL。置于干式恒温金属浴中 37 ℃ 反应 4 h。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。(6)克隆质粒测序及结果分析:克隆质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果在 GenBank 上进行比对。

2 结 果

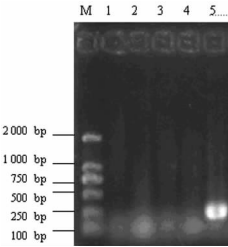
2.1 药物敏感结果 肠杆菌科细菌对美罗培南、厄他培南、亚胺培南的耐药率分别为 29.09%、50.91%、29.09%;鲍曼不动杆菌对美洛培南、亚胺培南全耐药;铜绿假单胞菌对美罗培南、亚胺培南的耐药率均为 88.46%。见表 1。

表 1 105 株革兰阴性杆菌的药敏结果(%)

抗菌药物	肠杆菌科细菌(55 株)			鲍曼不动杆菌(26 株)			铜绿假单胞菌(24 株)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
美罗培南	63.63	7.27	29.09	0	0	100.00	3.85	7.69	88.46
亚胺培南	69.09	1.82	29.09	0	0	100.00	3.85	7.69	88.46
厄他培南	32.73	16.36	50.91	—	—	—	—	—	—

S:敏感;I:中介;R:耐药;—:未做药敏试验。

2.2 NDM-1 保守序列筛查 有 4 株菌显示目的基因条带,包括肺炎克雷伯菌 1 株,大肠埃希菌 2 株,阴沟肠杆菌 1 株,其长度为 292 bp,而鲍曼不动杆菌及铜绿假单胞菌均为阴性。PCR 产物电泳见图 1。

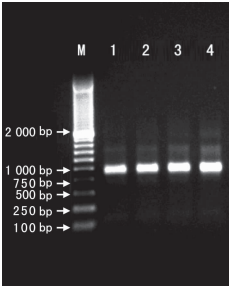


M:DNA 标记物 DL2000;1~5:NDM-1 基因的 PCR 产物。

图 1 NDM-1 基因保守序列 PCR 扩增产物电泳图

2.3 NDM-1 全序列扩增 4 株菌的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,显示有目的基因条带,可见 813 bp 的特异条带。

PCR 产物电泳见图 2。

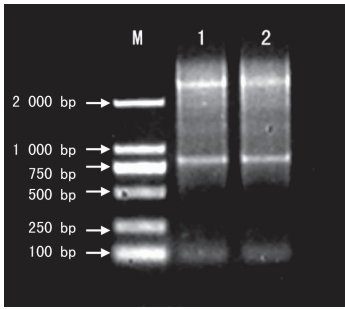


M:DNA 标记物 DL2000;1~4:NDM-1 基因的 PCR 产物。

图 2 NDM-1 基因全序列 PCR 扩增产物电泳图

2.4 克隆质粒双酶切 克隆质粒 pUCm-T-NDM-1 的双酶切(EcoR I /Hind III)产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 813 bp 的条带,其酶切产物电泳检测结果见图 3。测序结果显示,克隆载体 PUCm-T 中插入的基因片段大小为 813 bp,表明重

组克隆质粒 pUCm-T-NDM-1 构建成功。



M: DNA 标记物 DL2000; 1~2: 克隆质粒。

图 3 pUCm-T-NDM-1 的双酶切鉴定

2.5 克隆质粒序列比对结果 测序结果经 BLAST 比对后,发现 4 个克隆质粒的序列 100% 相同,与国内外发现的 NDM-1 序列也是 100% 一致。证明目前发现的 NDM-1 基因都是相同的序列,未见序列突变现象。

3 讨 论

2010 年 8 月著名医学杂志《柳叶刀感染病学》(《Lancet Infection Diseases》)第一次报导新的耐药基因,即 NDM-1 基因,携带有该耐药基因的菌株能够分解碳青霉烯类抗菌药物^[5]。几年间,世界范围内纷纷报导 NDM-1 超级细菌的检出^[6-8]。NDM-1 基因主要存在于质粒 DNA 结构中,该质粒可以在细菌中自由复制和在不同细菌间进行水平传播,从而会把耐药基因传播给非耐药细菌。NDM-1 已经被证实存在于可移动的质粒上^[9],并随着转座子或插入序列的移动而传播。国内也见报道,NDM-1 基因上下游常包含转座子或插入序列等元件,为其水平转移奠定基础^[10]。目前,携带 NDM-1 的菌株除了对替加环素和多黏菌素敏感以外,对其他抗菌药物均具有耐药性,也出现部分菌株甚至对这两种抗菌药物耐药的情况。“超级细菌”对碳青霉烯类抗菌药物也具有耐药性,而碳青霉烯类抗菌药物通常被认为是治疗耐药性感染病的最后方法。

有研究发现,鲍曼不动杆菌对亚胺培南、美罗培南的耐药率已超过 50%^[11],而本实验中鲍曼不动杆菌对美洛培南、亚胺培南全耐药,肠杆菌科细菌对厄他培南耐药率高达 50%,对美罗培南、亚胺培南也有不同程度的耐药;铜绿假单胞菌对美洛培南、亚胺培南耐药也超过 60%。虽然产 NDM-1 酶细菌能够水解 β -内酰胺环结构,可使任何含 β -内酰胺环结构的药物失效,从而导致对碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降,但这并不能全部解释本实验菌株对碳青霉烯类耐药率较高的情况,提示还存在其他主动外排系统或其他耐药机制如产生灭活酶、作用靶点变异和外膜蛋白的改变等,均可介导细菌对抗菌药物的耐药。

NDM-1 保守序列筛查中肠杆菌科细菌中有 4 株菌显示目的基因条带,说明含 NDM-1 的肠杆菌科细菌在本院存在,而鲍曼不动杆菌及铜绿假单胞菌并未出现阳性结果,湖南地区也出现这种情况^[12],可能本次研究筛查的样本量小,而目前为止在中国 NDM-1 鲍曼不动杆菌及铜绿假单胞菌阳性株仅有个别报道^[13-14]。NDM-1 全序列经 BLAST 同源性对比,结果显示本实验所得到的 4 个阳性克隆质粒的序列 100% 相同,而且

与世界各地所发现的阳性菌株完整阅读框 NDM-1 的同源性达 100%,表明编码 NDM-1 完整阅读框基因保守性良好,遗传稳定,与目前发现的 NDM-1 基因是相同的序列,未出现序列突变现象。

参考文献

[1] 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 *lebsiella pneumoniae* equence type 14 from India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010.

[3] Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, et al. Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients [J]. Indian J Med Res, 2008, 127 (4): 398-402.

[4] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. MetaUo-beta-lactamas-es; the quiet before the storm[J]. Clin Miembiol Rev, 2005, 18 (2): 306-325.

[5] 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 epidem iological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9): 597-602.

[6] 时东彦, 曹丽君, 杨靖, 等. 河北省发现携带 NDM-1 型金属 β -内酰胺酶基因的阴沟肠杆菌分离株[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28 (3): 32-34.

[7] Chen Y, Cui YJ, Pu F, et al. Draft genome sequence of an *Acinetobacter* genomic species 3 strain harboring a bla(NDM-1) gene[J]. J Bacteriol, 2012, 194 (1): 204-205.

[8] Wu HS, Chen TL, Chen IC, et al. First identification of a patient colonized with *Klebsiella pneumoniae* carrying blaNDM-1 in Taiwan[J]. J Chin Med Assoc, 2010, 7(11): 596-598.

[9] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1791-1798.

[10] 程灿灿, 芮勇宇. 6 株超级细菌 NDM-1 基因环境研究[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(11): 1820-1823.

[11] 李永丽, 应春妹. 鲍曼不动杆菌主动外排系统和 NDM-1 基因分布特征及与耐药表型的关系[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(7): 866-870.

[12] 李先平, 周秋菊, 王敏. 50 株耐亚胺培南的鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌 NDM-1 基因的筛查[J]. 实用预防医, 2012, 19(8): 1146-1149.

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

(收稿日期: 2015-05-08)