· 调查报告与分析 ·

北京地区医院污水中产 NDM-1 不动杆菌检测和抗生素敏感性分析

王旭[1,2], 王秀红[2], 任清明[2], 戚丽华[1], 梁蓓蓓[1], 易胜杰[1], 王建[1], 李浩[1], 杨超杰[1], 刘鸿博[1], 邱少富[1], 宋宏彬[1]

摘　要: 目的　调查北京地区医院污水中含有 NDM-1 阳性的不动杆菌及耐药性情况。**方法**　从北京多家医院采集污水标本, 通过生化鉴定和 16S rRNA 测序进行病原分离鉴定; 利用 PCR 技术对分离的病原进行 blaNDM-1 基因的鉴定; 利用 Sensititre 药敏鉴定仪对 NDM-1 阳性菌进行抗生素敏感性分析。**结果**　从医院污水中检出 20 株 NDM-1 阳性不动杆菌; 所有菌对头孢类抗菌素、头孢西丁以及替卡西林和氨苄西林耐药率达到 100%, 有 85% 的菌对亚胺培南耐药。**结论**　北京地区污水中产 NDM-1 阳性菌分离率较高, 且主要为不动杆菌, 其表现出多重耐药的特点, 医院污水可能是 NDM-1 阳性菌存在的主要场所之一。

关键词: NDM-1; 不动杆菌; 耐药性

中图分类号: R 123.3　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)08-1083-04　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-08-30

Detection and antibiotic resistance analysis of NDM-1 producing *Acinetobacter* isolated from sewage of hospitals in Beijing

WANG Xu*, WANG Xiu-hong, REN Qing-ming, et al(*Center for Disease Control and Prevention, Joint Logistics Department of Shenyang Military Command, Shenyang, Liaoning Province* 110034, China)

Abstract: Objective　To investigate the prevalence of New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) producing *Acinetobacter* isolated from sewage samples of hospitals in Beijing and to analyze its antibiotic resistance. **Methods**　Sewage samples were collected from several comprehensive hospitals in Beijing and the isolated strains with suspicious resistance to imipenem were screened with biochemical identification and 16S rRNA sequencing. Polymerase chain reaction (PCR) technique was used to detect the blaNDM-1 gene from the isolated bacterial colonies. Antibiotic susceptibility testing of all the blaNDM-1 positive strains was performed by using the Sensititre instrument. **Results**　Twenty blaNDM-1 positive *Acinetobacter* strains were detected, including 10 *A. baumannii*, 4 *A. calcoaceticus*, 4 *A. lwoffi*, and 2 *A. junii*. All strains were resistant to ceftriaxone, cefepime, cefepime, cefepime, cefoperazone, cefazolin, cefoxitin, and ampicillin and 85% of them to imipenem. **Conclusion**　Isolation rate of the blaNDM-1 positive *Acinetobacter* in hospital sewage in Beijing is high and the blaNDM-1 positive bacteria are multidrug resistance. Hospital sewage may be one of main medium facilitating the emergence and spread of the blaNDM-1 positive bacteria.

Key words: NDM-1; *Acinetobacter*; resistance

不动杆菌属(*Acinetobacter*. spp)是非发酵条件致病菌, 当机体抵抗力降低时易引起机体感染, 是引起医院内感染的重要机会致病菌之一。自 1991 年美国首次报道亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌[1]以来, 全球范围内鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药率呈现快速增长, 国内外相继有耐碳青霉烯类抗生素鲍曼不动杆菌暴发的报道[2-4]。New Delhi Metallo-beta-lactamase-1(NDM-1)是一种广谱 β-内酰胺酶(碳青霉烯酶), 能够灭活除了氨曲南以外的所有 β-内酰胺类药物[5]。细菌带有 blaNDM-1 基因后, 主要特点是多重耐药, 感染该类细菌的患者的临床表现与敏感菌感染没有差别, 但治疗上极为困难。因此, 对不动杆菌这种院内感染常见的细菌是否携带 blaNDM-1 基因以及对其耐药机制的研究越来越重要。本研究于 2010 年从北京地区医院污水筛检出 20 株产 NDM-1 的菌株, 对其进行了分离鉴定和药敏试验研究。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　DYY-6D 型电泳仪(北京六一仪器厂), Sensititre AutoReader(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), TC-412 型 PCR 仪(英国 TECHNE 公司), ExTaq 酶、DL2000DNA Marker、6 ×loading buffer(大连宝生物 TAKARA 公司), LB 培养基、营养琼脂(北京陆桥公司), Sensititre 非苛养菌药敏板 PRCM2F(美国 Thermo Fisher Scientific 公司), API 20NE 生化鉴定条(法国梅里埃公司)。

1.2　菌株收集与分离鉴定　2010 年从北京地区多

作者单位: 1. 军事医学科学院疾病预防控制所, 北京 100071; 2. 沈阳军区联勤部疾病预防控制中心
作者简介: 王旭(1985 -), 女, 辽宁沈阳人, 硕士在读, 研究方向: 病原生物学。
通讯作者: 宋宏彬, E-mail: hongbinsong@263.net; 邱少富, E-mail: qiushf0613@hotmail.com
数字出版日期: 2015 - 6 - 30 9:38
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150630.0938.002.html

家综合性医院采集医院污水,按如下方法进行处理:收集 500 mL 研究水样,取其中 100 mL 常温下 1 000 g 离心 10 min,小心倾析上清液,重悬于1 mL 的 Luria-Bertani(LB)后取 400 μL 接种于含亚胺培南(10 mg/mL)的琼脂培养板上。选取所有对亚胺培南耐药的菌落用 API 20NE 非肠道革兰氏阴性杆菌鉴定系统做进一步鉴定,扩增 16S rRNA 并分析 16S rRNA 的基因序列。PCR 产物送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序,测序结果通过 EditSeq 软件进行比对。参照文献[6]合成引物(表 1)。

表 1　鉴定 blaNDM-1 基因引物

引物名称	引物序列	产物大小
EC-NDM-F	5′-GTCTGGCAGCACACTTCCTA-3′	515 bp
EC-NDM-R	5′-TAGTGCTCAGTGTCGGCATC-3′	
rRNA515-F	5′-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3′	877 bp
rRNA1391-R	5′-GACGGGCGGTGWGTRCA-3′	

1.3　blaNDM-1 基因 PCR 扩增及产物电泳鉴定　对分离出的株菌进行粗制模板的制备,步操如下:无菌条件下取 100 μL 菌液放入 1.5 mL 离心管,12 000 r/min离心 1 min,收集菌体,100 μL 无菌水重悬,煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 1 min,吸取上清至干净的 EP 管中即为粗制的 PCR 反应模板。对粗制模板进行 blaNDM-1 基因 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min,以 95 ℃变性 30 s,55 ℃退火复性 30 s,72 ℃延伸 30 s 进行 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物取 5 μL 与 1 μL 6 × loading buffer 充分混合以后,点入 1% 琼脂糖凝胶上样孔中,在电泳仪上以 150 V 条件电泳 30 min,电泳结束后在凝胶成像仪上观察结果,鉴定是否有条带以及条带的特异性。PCR 产物送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序,测序结果通过 EditSeq 软件进行比对。

1.4　药敏试验　使用 Sensititre Trek Diagnostic Systems 96 孔板自动检测抗菌药物系统,可以精确剂量为相应的面板稀释液,相当于传统微量肉汤稀释方法。采用 CLSI(美国临床和实验室标准协会)推荐改良的微量肉汤稀释 2 ~ 8 点,在每一反应孔内参与荧光底物,若细菌生长,表面特异酶系统水解荧光底物,激发荧光,反之无荧光,检测出的荧光的量正比于细菌生长。将制备好的细菌悬液加入 96 孔药敏板中,每板可做 2 个菌,做好标记,然后放入 37 ℃培养箱中,孵育 18 ~ 24 h 后读板。实验中所使用的 Sensititre 非苛养菌药敏板(96 孔板),每块药敏板都包被有适量稀释度的抗生素试剂:头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、头孢曲松(ceftriaxone, CRO)、亚胺硫霉素(imipenem, IPM)、呋喃妥因(nitrofurantioin, NIT)、阿洛西林(azalomycin, AZL)、四环素(tetracycline, TE)、头孢吡肟(cefepime, FEP)、头孢哌酮(cefoperazone, CSL)、头孢唑啉(cefazolin, CZO)、头孢西丁(cefoxitin, FOX)、妥布霉素(tobramycin, TOB)、左氧氟沙星(levofloxacin, LVX)、庆大霉素(gentamycin, GEN)、替卡西林(ticarcilin, TLC)、替卡西林/克拉维酸(ticarcilin/clavulanic acid, TCC)、氨曲南(aztreonam, ATM)、氨苄西林(ampicillin, AMP)、氯霉素(chloromycetin, CHL)、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑(trimethoprim/sulfamethoxazole, TMP/SXT)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、阿米卡星(amikacin, AMK)、阳性对照、阴性对照。18 h 后取出,放入 Auto Reader 打开 SWIN 软件进行读板,记录好每个板子的编号及样品编号,保存判读结果。

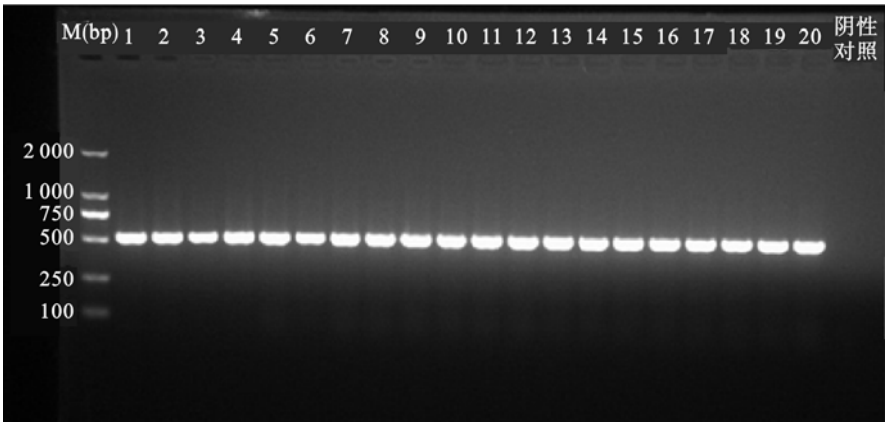
2　结　果

2.1　blaNDM-1 基因鉴定(图 1)　从医院未处理的污水中分离出的不动杆菌,用 blaNDM-1 基因特异性引物扩增后,电泳显示有 20 株为 NDM-1 阳性。序列分析 BLAST 结果显示 NDM-1 完整阅读框基因与 *Klebsiella* pneumonia pPMK1-NDM(GenBank: CP008933)基因序列同源性达到 100%,未发现突变位点。

2.2　菌株的分离鉴定　经 API 20NE 生化鉴定和 16S rRNA 基因序列分析显示,20 株 NDM-1 阳性的不动杆菌中有 10 株菌为鲍曼不动杆菌,4 株为鲁菲不动杆菌,4 株为醋酸钙不动杆菌,2 株为琼氏不动杆菌。

2.3　抗生素敏感性分析(表 2)　20 株不动杆菌菌株的药敏模式有相似之处。所有菌株对头孢类药物,包括头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢唑啉、头孢西丁以及替卡西林和氨苄西林均表现为耐药,耐药率达到了 100%;其次为亚胺硫霉素(亚胺培南),除编号为 BJ-1, BJ-4 和 BJ-27 为中度敏感,其他菌株均对其耐药,耐药率为 85%;所有菌株对四环素和阿米卡星均表现为敏感;除 BJ-13, BJ-20 及 BJ-26 外,其余菌株对氨基糖苷类均表现为敏感;对诺氟沙星的耐药率达到了 70%;有 55% 的菌株对甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑表现出了耐药性,而 BJ-1, BJ-4, BJ-10, BJ-13, BJ-19 和 BJ-22 表现为敏感。但是对氨基糖苷类(庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星)、喹诺酮类(左氧氟沙星、诺氟沙星)及单环酰胺类(氨曲南)表现出的药敏表型有明显的差异,推测可能与菌株所携带的耐药基因不同有关。

中国公共卫生 CPH



注：M：Marker；1：BJ-1；2：BJ-4；3：BJ-7；4：BJ-8；5：BJ-9；6：BJ-10；7：BJ-11；8：BJ-12；9：BJ-13；10：BJ-14；11：BJ-15；12：BJ-16；13：BJ-17；14：BJ-18；15：BJ-19；16：BJ-20；17：BJ-22；18：BJ-25；19：BJ-26；20：BJ-27。BJ（北京）。

图 1　blaNDM-1 基因引物 PCR 产物电泳结果

表 2　NDM-1 阳性不动杆菌的耐药分析（%，$n=20$）

抗生素	抗生素敏感性		
	R	I	S
头孢他啶	100	0	0
头孢曲松	100	0	0
亚胺硫霉素	85	15	0
呋喃妥因	45	55	0
哌拉西林	40	35	25
四环素	0	0	100
头孢吡肟	100	0	0
头孢哌酮	100	0	0
头孢唑啉	100	0	0
头孢西丁	100	0	0
妥布霉素	20	5	75
左氧氟沙星	0	5	95
庆大霉素	40	10	50
替卡西林	100	0	0
替卡西林/克拉维酸	55	0	45
氨曲南	40	55	5
氨苄西林	100	0	0
氯霉素	40	25	35
甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑	55	0	45
诺氟沙星	70	5	25
阿米卡星	0	0	100

注：R：耐药；S：敏感；I：中度敏感。

3　讨　论

本菌可引起伤口及皮肤感染、呼吸道和泌尿生殖道感染、败血症、脑膜炎、心内膜炎等，重症者可导致死亡。不动杆菌属可分为 7 种，即醋酸钙不动杆菌（*A. calcoaceticus*）、鲁菲不动杆菌（*A. lwoffi*）、鲍曼不动杆菌（*A. baumannii*）、溶血不动杆菌（*A. haemolytius*）、琼氏不动杆菌（*A. junii*）、约翰逊不动杆菌（*A. johnsonii*）和抗辐射不动杆菌。其中鲍曼不动杆菌对湿热、紫外线、化学消毒剂有较强抵抗力，广泛分布于医院环境中，各种医疗器具和医务人员手的检出率均很高。近年来随着临床上广谱抗生素的大量应用，出现了对大部分抗生素耐药的多重耐药及超耐药鲍曼不动杆菌，并时常造成医院感染的暴发流行，给临床治疗带来极大困难，被誉为 21 世纪革兰阴性菌中的“耐甲氧西林金黄色葡萄球菌”（MRSA）[1]。不动杆菌属的侵袭力及致病力比不上肠杆菌科细菌，但是该菌属细菌对抗菌药物的耐药性威胁较其他菌属则高出许多[7]。有数据显示在印度、英国、瑞典等国家，检出的产 NDM 酶肠杆菌科细菌占所检测细菌的 1.2% ~13%，主要菌种为大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌，其他细菌还有阴沟肠杆菌、变形杆菌、弗劳地枸橼酸菌、产酸克雷伯菌、摩根摩根菌、普罗威登菌及铜绿假单胞菌等[8-10]；而在中国从大量的数据中可以看出 blaNDM-1 基因阳性菌以不动杆菌属为主。Yang 等[11]从 ICU 分离的 3 114 株不动杆菌属中筛查出 24 株携带有 blaNDM-1 基因的 A. pittii；俞云松等[12-13]学者从 2009 年 1 月—2010 年 9 月间收集的来自全国 18 个省市，57 家医院的革兰阴性杆菌 12 024 株（其中大肠埃希菌 3439 株、肺炎克雷伯菌 2 840 株、不动杆菌属 2 835 株以及铜绿假单胞菌 2 910 株）筛查到 13 株 blaNDM-1 阳性不动杆菌。在本研究中，在对医院的污水进行细菌分离鉴定之后，可以确定在 20 株 NDM-1 阳性菌中有 10 株为鲍曼不动杆菌，由此可见耐药的鲍曼不动杆菌检出率较高。在医院的污水中有多种菌属共存，与耐药不动杆菌混合，有获得耐药基因的可能性。在医院里的患者接触这些携带 blaNDM-1 基因的菌种的机会多，直接或者间接由不动杆菌引起的耐药菌院内感染发生的可能性随之

增加。医院的污水为各个菌属之间获得耐药基因提供了一个有利场所,若不进行严格管控,容易造成多重耐药不动杆菌在院内的暴发流行,给治疗带来极大的困难。

多重耐药不动杆菌,尤其是碳青霉稀类耐药不动杆菌已经呈现全球流行的趋势:2001—2004 年,SENTRY 抗菌药物监测数据表明当时欧洲、拉丁美洲和亚太地区分离的不动杆菌对亚胺培南的总体敏感率有 81.1%[14],而这一比例在 2006 年已经下降到 65.8%,到了 2009 年仅仅有 40.2% 比率的不动杆菌还对亚胺培南保持敏感性[15]。本研究中分离出的 20 株 NDM-1 阳性菌均对亚胺培南产生了不同程度的耐药,耐药率已经达到了 85%,可以推测不动杆菌对亚胺培南的耐药性正在不断的提高。并且这些菌对头孢类药物和替卡西林也都表现出了较强的耐药性,在本研究中对其产生的耐药率也达到了 100%,而这些药物是现在临床上比较常用的抗菌药物,一旦发生院内感染,将给治疗带来极大的困难。因此,对医院污水的妥善处理应该引起重视,否则将很可能为耐药菌株在医院内暴发流行创造条件。

参考文献

[1] Go ES, Urban C, Burns J, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam[J]. Lancet, 1994, 344(8933): 1329 – 1332.

[2] Jeon BC, Jeonq SH, Bae IK, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23beta-lactamase in Korea[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2241 – 2245.

[3] Naas T, Levy M, Hirschauer C, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetbacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary carehospital of Papeete, French Polynesia [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4825 – 4829.

[4] 裘莉佩,潘登,徐炜烽,等. 鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型及分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(4): 381 – 384.

[5] 孙明伟,郑焙文,高福,等. 人类与病原菌的军备竞赛:NDM-1 耐药基因与超级细菌[J]. 生物工程学报, 2010, 26(11): 1461 – 1472.

[6] Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT, et al. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex [J]. Med Microbiol, 1996, 44(6): 482 – 489.

[7] Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10 – year experience in the United States(1999 – 2008)[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2009, 65(4): 414 – 426.

[8] Johnson AP, Woodford N, Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase(NDM)-mediated carbapenem resistance[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(4): 499 – 513.

[9] Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, et al. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(8): 3929 – 3931.

[10] Wang X, Xu X, Li Z, et al. An Outbreak of a nosocomial NDM-1-producing *KlebsieUa pneumoniae* ST147 at a teaching hospital in Mainland China[J]. Microbial Drug Resistance, 2014, 20(2): 144 – 149.

[11] Yang J, Chen Y, Jia X, et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter* pittii in an intensive care unit in China[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2012, 18(12): E506 – E513.

[12] Fu Y, Du X, Ji J, et al. Epidemiological characteristics and genetic structure of blaNDM-1 in non-baumannii *Acinetobacter* spp. in China[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(9): 2114 – 2122.

[13] Chen Y, Zhou Z, Jiang Y, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(6): 1255 – 1259.

[14] Gales AC, Jones RN, Sader HS, et al. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme(2001 – 2004)[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2006, 12(4): 315 – 321.

[15] Gales AC, Jones RN, Sader HS, et al. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY *Antimicrobial* Surveillance Program(2006 – 09)[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(9): 2070 – 2074.

收稿日期: 2015-04-08　　(吴少慧编校)