

细菌NDM-1质粒耐药表型与其表达的相关性研究

冯伟¹ 欧阳净^{1,2} 程林¹ 袁谦¹ 王瑜¹ 孙凤军^{1,*}

(1 陆军军医大学(第三军医大学)西南医院药剂科, 重庆 400038; 2 重庆市公共卫生医疗救治中心药剂科, 重庆 400036)

摘要: **目的** 探讨NDM-1质粒携带菌株耐药表型与其基因表达的相关性, 为临床抗菌药物选择提供理论参考。**方法** 携带NDM-1的质粒电转化入大肠埃希菌TOP10, 采用琼脂平板倍比稀释法测定碳青霉烯类药物对野生株和电转化子的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC), *TaqMan* RT-PCR检测碳青霉烯类耐药菌株的 bla_{NDM-1} 基因表达及亚-MIC亚胺培南诱导对 bla_{NDM-1} 基因表达的影响。**结果** 12株产NDM-1菌株中共有8株电转化成功, 电转化子对碳青霉烯类药物的耐药性与野生菌株基本一致。细菌对碳青霉烯类的耐药性与 bla_{NDM-1} 基因表达成正比。亚-MIC亚胺培南诱导后菌株对碳青霉烯类药物的MIC值和 bla_{NDM-1} 基因表达均显著高于野生株。**结论** 碳青霉烯类耐药菌株耐药表型与 bla_{NDM-1} 基因表达具有正相关性, *TaqMan* RT-PCR检测可快速准确地为临床治疗提供依据。

关键词: NDM-1; 质粒; 碳青霉烯酶; *TaqMan* RT-PCR; 耐药

中图分类号: R978.1 **文献标志码:** A

Correlation analysis between the resistant phenotype and the bla_{NDM-1} gene expression in NDM-1-producing bacteria

Feng Wei¹, Ouyang Jing^{1,2}, Cheng Lin¹, Yuan Qian¹, Wang Yu¹ and Sun Feng-jun¹

(1 Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing 400038;

2 Department of Pharmacy, Chongqing Public Health Medical Center, Chongqing 400036)

Abstract Objective To investigate the correlation between the resistant phenotype and the bla_{NDM-1} gene expression in NDM-1-producing strains, and provide a theoretical reference for the selection of clinical antibacterial drugs. **Methods** The plasmid carrying NDM-1 was electroporated into *Escherichia coli* TOP10, and the minimal inhibitory concentrations (MIC) of carbapenems on wild-type strains and electrotransformants were determined by the agar plate dilution method. *TaqMan* RT-PCR was used to detect the expression of the bla_{NDM-1} gene in carbapenem-resistant strains and the effect of sub-MIC imipenem on the bla_{NDM-1} gene expression. **Results** Eight out of 12 NDM-1-producing strains were successfully transferred into TOP10 by eletrotransformation. The resistance of electrotransformants to carbapenems was similar with that of wild-type strains. There was a positive correlation between carbapenem resistance and the bla_{NDM-1} gene expression. Moreover, the carbapenem MIC values and the bla_{NDM-1} gene expression of strains induced with sub-MIC imipenem were significantly higher than those of wild-type strains. **Conclusion** The resistant phenotype of carbapenem-resistant strains showed a positive correlation with the bla_{NDM-1} gene expression. The detection of the bla_{NDM-1} gene by *TaqMan* RT-PCR could provide a rapid and accurate treatment measure.

Key words NDM-1; Plasmid; Carbapenemase; *TaqMan* RT-PCR; Resistance

收稿日期: 2019-04-15

基金项目: 陆军军医大学西南医院院级课题(No. SWH2017JCZD-04)

作者简介: 冯伟, 女, 生于1986年, 主管技师, 研究方向为细菌耐药及感染防治研究, E-mail: fengwei.sky@163.com

*通讯作者, E-mail: fengji_sun@163.com

新德里金属- β -内酰胺酶-1(New Delhi metallo- β -lactamase-1, NDM-1)于2008年最早在瑞典的一家医院被发现,2010年报道后被研究者关注^[1],后续研究报道发现其广泛分布于不同菌种和不同地区,并导致高水平耐药^[2]。NDM-1对碳青霉烯类抗菌药物具有很强的水解能力,单独携带 bla_{NDM-1} 耐药基因即可获得较高的碳青霉烯MIC值。

bla_{NDM-1} 最早发现于肺炎克雷伯菌中,多存在于质粒中,具有较高的传播能力,由于携带 bla_{NDM-1} 的耐药质粒多表现为多重耐药,感染者病死率高,对医疗安全构成了巨大挑战。目前NDM-1在肠杆菌科中分布最为广泛,而碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌已被世界卫生组织列为“超级细菌”,临床治疗非常困难,因此研究其质粒传播、基因表达与耐药的情况对临床药物选择具有重要的意义和科学价值。据此,本研究以前期临床分离的产NDM-1肠杆菌科细菌为研究对象,将其耐药质粒电转化入标准菌株,并检测其耐药表型,分析其与 bla_{NDM-1} 表达的相关性。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

大肠埃希菌14E362、13E719、13E208、13E696和BTR,肺炎克雷伯菌13E22、13E126和13E130,弗氏柠檬酸杆菌13E164,霍氏肠杆菌13E366,非脱羧勒克菌P10164,解鸟氨酸拉乌尔菌YNKP001,均保存于陆军军医大学西南医院药剂科,前期课题组通过Carba NP产酶实验以及碳青霉烯酶耐药基因PCR扩增和测序,验证其所有菌株均只携带 bla_{NDM-1} 基因。电转化受体菌TOP10由军事医学科学院周冬生教授提供。

1.2 主要试剂与设备

亚胺培南(imipenem, IMP)、美罗培南、厄他培南和比阿培南购于大连美仑生物技术有限公司; Premix Ex Taq(Probe qPCR)和质粒中提试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司;细菌RNA提取纯化试剂盒购于北京天根生化科技有限公司; cDNA合成试剂盒购于东洋纺(上海)生物科技有限公司; bla_{NDM-1} 引物(正向序列5'-GAATCATTCGCTATTGGCA-3',反向序列:5'-TACGCCTTATACGCATCCGA-3')、荧光探针序列为5' FAM-TCGGCACCTAGACTTACGCATTCCAC-TAMRA-3'由上海生工生物工程股份有限公司合成。NanoDrop 2000超微量分光光度计购于美国Thermo Scientific公司,基因电击转化仪和荧光定量PCR仪购于

美国Bio-Rad公司,多点接种仪购于日本Sakuma公司。

1.3 试验方法

1.3.1 耐药质粒电转化实验

将携带 bla_{NDM-1} 菌株的单菌落接种于10mL LB培养基中,37℃、180r/min振荡培养过夜。取1mL菌液加入100mL LB培养基中,37℃、180r/min振荡培养过夜。采用Takara公司的质粒中提试剂盒对12株产NDM-1菌株进行质粒DNA提取纯化。然后将质粒DNA电转化入大肠埃希菌感受态细胞TOP10中,电转化子通过在含IMP的LB平板上进行抗性筛选,挑取阳性克隆进行 bla_{NDM-1} 耐药基因的扩增和Carba NP产酶实验鉴定,并通过16S rRNA基因测序进行比对分析。

1.3.2 细菌最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定

采用琼脂平板倍比稀释法检测碳青霉烯类抗菌药物对野生菌株、电转化子、受体菌的MIC值。将细菌划线接种于哥伦比亚血琼脂平板,37℃下培养过夜。将培养后的细菌分别配制为0.5 Mc Farland单位(约 10^8 CFU/mL)菌液,再通过多点接种仪分别接种1~2 μ L菌液至含梯度浓度抗菌药物的M-H琼脂平板,37℃下放置18h后进行结果判读。以大肠埃希菌ATCC25922为对照进行质控。

1.3.3 TaqMan RT-PCR检测细菌 bla_{NDM-1} 基因表达

采用天根公司的细菌RNA基因组提取试剂盒对细菌的总RNA进行提取纯化,然后用分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳对RNA浓度和纯度进行定量和定性分析。cDNA合成采用First Strand cDNA Synthesis Kit对RNA进行逆转录,逆转录反应条件为:42℃ 10min,30℃ 20min,99℃ 5min,4℃ 5min。反应完毕,cDNA产物中加入60 μ L RNase Free H₂O,混匀,-20℃保存备用。TaqMan RT-PCR反应体系(25 μ L):2 \times Premix Ex Taq(Probe qPCR) 12.5 μ L,10 μ mol/L正向和反向引物各0.5 μ L,TaqMan Probe 1 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O补足至25 μ L。荧光定量PCR反应条件为:95℃ 30s;95℃ 5s,60℃ 30s,共40个循环,每个循环结束时进行荧光检测,反应结束后确认扩增曲线并制作标准曲线,以16S rRNA为内参基因分析菌株的 bla_{NDM-1} 基因表达量。

1.3.4 连续传代体外诱导细菌耐药

前期研究中,本研究已对非脱羧勒克菌P10164、解鸟氨酸拉乌尔菌YNKP001和大肠埃希菌BTR的NDM耐药质粒进行全基因组测序及精细结构分析,

其基因背景明确^[3-4]，因此，将这3株菌作为研究对象分别划线接种于血琼脂平板上，37℃恒温孵箱中培养过夜。挑取单菌落接种于LB肉汤(含1/4MIC IMP)中，37℃、200r/min振荡培养12h，然后取100μL菌液加入新鲜的LB肉汤(含1/4MIC IMP)中，37℃、200r/min振荡培养12h，按此方法每隔12h传代1次，直至培养到第10代，取末次培养的菌液测定其诱导后的MIC值。

1.3.5 亚-MIC IMP诱导对 bla_{NDM-1} 基因表达的影响

将3株IMP诱导耐药成功的菌株接种于血琼脂平板上进行过夜培养。挑取细菌单菌落接种于10mL LB肉汤中震荡培养过夜。取100μL过夜培养物加入9.9mL LB肉汤中37℃、180r/min震荡培养过夜后进行RNA提取。然后采用*TaqMan* RT-PCR方法检测亚-MIC IMP诱导菌株耐药后对 bla_{NDM-1} 基因表达的影响。

1.3.6 统计学分析

采用SPSS 17.0进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。碳青霉烯耐药菌株 bla_{NDM-1} 基因表达量与IMP耐药性之间的相关性采用Spearman相关系数分析，亚-MIC IMP诱导菌株和野生株的 bla_{NDM-1} 基因表达差异采用独立样本*t*检验， $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒电转化实验结果

通过电转化实验获得了BTR、13E719、13E208、P10164、13E126、13E130、13E164、YNKP001菌株的电转化子BTR-NDM-TOP10、13E719-NDM-TOP10、13E208-NDM-TOP10、P10164-NDM-TOP10、13E126-NDM-TOP10、13E130-NDM-TOP10、13E164-NDM-TOP10、YNKP001-NDM-TOP10。而其他4株菌多次尝试均无法获得其电转化子。产酶实验结果显示这些电转化子均产B酶(图1)，16S rRNA基因测序结果显示转化子均为大肠埃希菌，即 bla_{NDM-1} 耐药基因成功转入受体菌TOP10，转化成功。

2.2 MIC测定结果

碳青霉烯类抗菌药物对野生株、电转化子和受体菌的MIC结果如表1所示。电转化子对碳青霉烯类抗菌药物的耐药性表现出与野生株基本相同。它们对比阿培南的敏感性高于其他3种药物。

2.3 *TaqMan* RT-PCR检测细菌 bla_{NDM-1} 基因表达差异

TaqMan RT-PCR结果如图2所示，12株碳青霉烯类耐药菌株的 bla_{NDM-1} 基因表达不同，对碳青霉烯类耐药性高的菌株其 bla_{NDM-1} 基因表达量高。

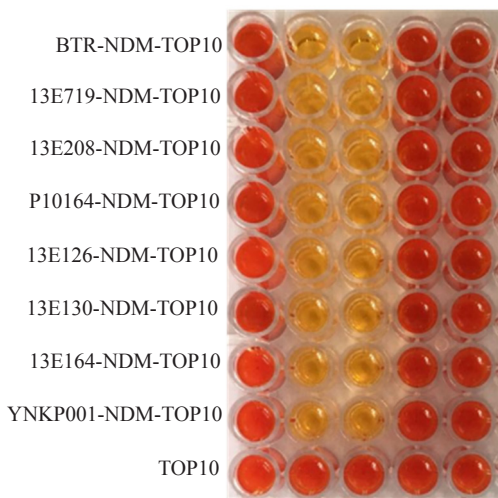


图1 Carba NP法鉴定质粒电转化子产酶类型实验结果

Fig. 1 Identification results of the carbapenemase types of electrotransformants by Carba NP method

表1 药敏实验结果(μg/mL)

Tab. 1 The results of antimicrobial susceptibility testing (μg/mL)

菌株	亚胺培南	美罗培南	厄他培南	比阿培南
BTR	2	8	16	0.5
BTR-NDM-TOP10	1	4	4	0.25
13E719	32	128	256	8
13E719-NDM-TOP10	8	64	64	4
13E208	32	64	256	8
13E208-NDM-TOP10	16	16	64	4
P10164	4	8	16	0.25
P10164-NDM-TOP10	4	4	8	<0.25
13E126	4	32	64	8
13E126-NDM-TOP10	2	8	32	4
13E130	4	8	16	8
13E130-NDM-TOP10	2	8	4	2
13E164	16	64	128	16
13E164-NDM-TOP10	4	32	64	4
YNKP001	8	16	16	4
YNKP001-NDM-TOP10	2	8	4	2
TOP10	0.25	<0.25	0.5	<0.25

经Spearman等级相关分析结果显示，相关系数 $r=0.982$ ， $P=0$ ，即 bla_{NDM-1} 基因表达与IMP耐药性两者之间存在正相关关系。

2.4 亚-MIC IMP体外诱导细菌耐药

通过琼脂平板倍比稀释法检测BTR、P10164、YNKP001菌株经亚-MIC IMP连续诱导后的MIC结果显示，IMP增加了细菌对抗菌药物的耐药性，诱导后碳

青霉烯类药物对细菌的MIC值比野生株高2~4倍(表2)。

2.5 亚-MIC IMP对 bla_{NDM-1} 基因表达的影响

通过探针荧光定量PCR检测亚-MIC IMP诱导后细菌 bla_{NDM-1} 基因表达与野生株的差异性。结果显示, IMP诱导后菌株的 bla_{NDM-1} 基因表达量显著高于野生株($P<0.01$, 图3)。

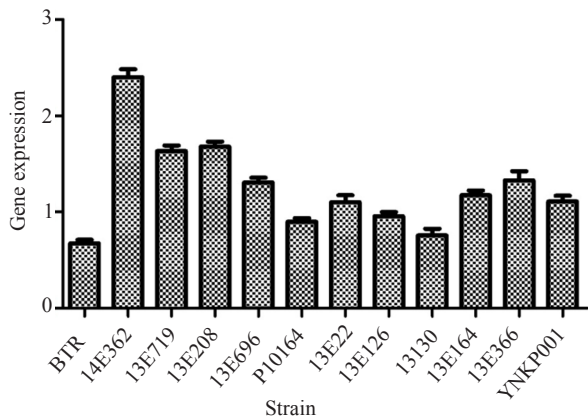


图2 碳青霉烯类耐药菌株 bla_{NDM-1} 基因表达结果
Fig. 2 The results of bla_{NDM-1} gene expression in carbapenem-resistant strains

表2 亚-MIC IMP诱导前后碳青霉烯类药物对细菌的MIC结果($\mu\text{g/mL}$)

Tab. 2 The MIC results of carbapenems on bacterial strains treated with sub-MIC IMP ($\mu\text{g/mL}$)

抗生素	BTR		P10164		YNKP001	
	M_0	M_1	M_0	M_1	M_0	M_1
亚胺培南	2	4	4	8	8	32
美罗培南	8	32	8	16	16	32
厄他培南	16	32	16	64	16	64
比阿培南	0.5	1	0.25	1	4	8

注: “ M_0 ”代表“ MIC_0 ”,表示亚-MIC,即IMP诱导前菌株MIC值; “ M_1 ”代表“ MIC_1 ”,表示亚-MIC IMP诱导后菌株MIC值

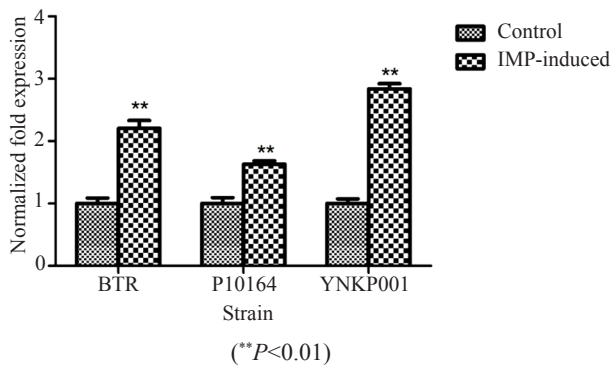


图3 亚-MIC IMP诱导对细菌 bla_{NDM-1} 基因表达的影响
Fig. 3 Effect of sub-MIC IMP on the expression of bla_{NDM-1} gene

3 讨论

在本研究中所选用菌株由于携带的质粒大小不同, 结构功能也有差异, 仅8株菌转化成功, 说明质粒在传播的过程中存在优势传播骨架结构。此外, 课题组前期研究发现 bla_{NDM-1} 基因可通过移动序列直接插入到耐药质粒中^[4], 说明可移动序列在 bla_{NDM-1} 的传递过程中也具有重要的作用。8株电转化成功的产NDM-1原始菌株其IMP药物的MIC值从2~32 $\mu\text{g/mL}$, 具有较大的差异, 说明 bla_{NDM-1} 表达可能对菌株耐药表型具有较大的影响。而当NDM-1耐药质粒转化到TOP10后其耐药性具有明显的降低, 说明质粒存在的宿主菌可能存在其他耐药质粒、外排泵和靶蛋白改变等耐药机制^[5-6]。

鉴于NDM-1对临床治疗的重要影响, 针对 bla_{NDM-1} 基因表达检测方法的研究也较多, 目前主要分为表型检测型和基因检测型^[7,8], 表型检测型直接检测MIC值或者通过显色等试验确定, 具有准确性高的特点, 但需时较长, 而基因检测具有稳定性差但操作简单快捷^[9-10]。本研究选用探针法(*TaqMan* RT-PCR)分析菌株的 bla_{NDM-1} 基因表达特性, 该方法比染料法(*SYBR Green* RT-PCR)具有更高的灵敏度^[7]。本研究发现 bla_{NDM-1} 基因表达量可以较好地反应细菌的耐药表型, 经统计学分析显示耐药性和 bla_{NDM-1} 基因表达具有正相关性。同时对3株基因背景明确的产NDM-1菌株诱导后发现, 亚-MIC IMP可以显著增加细菌的MIC和 bla_{NDM-1} 基因表达, 提示对于NDM阳性菌株, 应慎重使用碳青霉烯类抗菌药物, 仔细斟酌碳青霉烯使用剂量和联合使用抗菌药物方案。

本研究中发现*TaqMan* RT-PCR检测 bla_{NDM-1} 基因表达结果与细菌耐药表型具有较好的相关性, 且具有检测准确快捷的特点, 如与检测细菌种类及数量的*SYBR Green* RT-PCR方法相结合, 可为临床快速提供治疗依据, 提高合理用药水平。

参考文献

[1] 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.

[2] Hu X, Xu X, Wang X, *et al.* Diversity of new delhi metallo-beta-lactamase-producing bacteria in China[J]. *Int J Infect Dis*, 2017, 55: 92-95.

[3] Zhao Y, Wang L, Zhang Z, *et al.* Structural genomics of

- pNDM-BTR harboring In191 and Tn6360, and other *bla*_{NDM} carrying IncN1 plasmids[J]. *Future Microbiol*, 2017, 12(14): 1271-1281.
- [4] Sun F, Yin Z, Feng J, *et al*. Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adecarboxylata* from China[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 458. doi: 10.3389/fmicb.2015.00458.
- [5] Potter R F, D'Souza A W, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae[J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 29: 30-46. doi: 10.1016/j.drug.2016.09.002.
- [6] Lee Y, Choi H, Yum J H, *et al*. Molecular mechanisms of carbapenem resistance in *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Korea and clinical outcome[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2012, 42(3): 281-286.
- [7] 张建明, 黄吉城, 吴健, 等. 荧光定量PCR 检测细菌NDM-I基因方法的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(1): 133-135.
- [8] 侯辰蕊, 戎建荣, 栗子洋, 等. 产NDM-1耐碳青霉烯酶肠杆菌科细菌筛查研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(23): 4157-4159.
- [9] Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P, *et al*. Comparison of in-house and commercial real time-PCR based carbapenemase gene detection methods in Enterobacteriaceae and non-fermenting gram-negative bacterial isolates[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2017, 16(1): 48. doi: 10.1186/s12941-017-0223-z.
- [10] Kazi M, Khot R, Shetty A, *et al*. Rapid detection of the commonly encountered carbapenemases (New Delhi metallo-beta-lactamase, OXA-48/181) directly from various clinical samples using multiplex real-time polymerase chain reaction assay[J]. *Ind J Med Microbiol*, 2018, 36(3): 369-375.