

• 综述 •

肠杆菌科细菌产金属 β -内酰胺酶的研究进展

张志军¹, 姜梅杰², 赵书平², 田兆菊¹

1. 泰山医学院, 泰安 271016; 2. 山东省泰安市中心医院检验科, 泰安 271000

摘要: 金属 β -内酰胺酶(MBL)可广泛水解多种抗生素, 对常规 β -内酰胺酶抑制剂如克拉维酸、舒巴坦等不敏感。产 MBL 肠杆菌科细菌一直是临床公认的多重耐药病原体。尤其是在发现新德里金属 β -内酰胺酶后, 人们更加重视肠杆菌科细菌中检出 MBL 的情况, 因为其所致感染日渐严重。因此, 快速、准确检测出产 MBL 菌株是有效预防、控制感染发生与播散的重要环节。本文就肠杆菌科细菌 MBL 的发现及分类、耐药基因传播、检测方法等进行简要概述。

关键词: 金属 β -内酰胺酶; 肠杆菌科; 耐药性

Research progress on metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae

ZHANG Zhi-Jun¹, JIANG Mei-Jie², ZHAO Shu-Ping², TIAN Zhao-Ju¹

1. *Taishan Medical University, Tai'an 271016, China*; 2. *Department of Clinical Laboratory, Tai'an Central Hospital, Tai'an 271000, China*

Abstract: Metallo- β -lactamase (MBL) can hydrolyze a variety of antibiotics, and is insensitive to conventional β -lactamase inhibitors, such as clavulanic acid and sulbactam. After the reporting of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), Enterobacteriaceae producing MBL have been recognized as clinical multidrug-resistant pathogens, and the infections caused by them in clinic are becoming increasingly serious. Rapid and accurate detection of this group of strains is an important link to prevent and control the occurrence and spread of infection effectively. The research progress on MBL produced by Enterobacteriaceae covering its discovery, classification, spreading and detection methods is reviewed in the present paper.

Key words: Metallo- β -lactamase; Enterobacteriaceae; Drug resistance

金属 β -内酰胺酶(metallo- β -lactamase, MBL)又称金属酶, 是一组活性部位为金属离子且必须依赖金属离子存在而发挥催化活性的酶类。MBL 可水解单环类以外的几乎所有 β -内酰胺类抗生素, 包括青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类; 其活性不能被克拉维酸、舒巴坦和三唑巴坦等常见 β -内酰胺酶抑制剂抑制, 但能被乙二胺四乙酸(ethylenediamine-

netetraacetic acid, EDTA)、菲咯啉及巯基化合物抑制^[1]。携带 MBL 肠杆菌科细菌的发现与传播一直备受关注, 因为 MBL 的产生是其耐 β -内酰胺类抗生素的主要机制。MBL 耐药基因位于细菌染色体、质粒或转座子上, 以基因盒的形式存在于整合子中^[2], 而整合子可在同种和不同种细菌间进行基因水平转移, 导致耐药基因迅速传播。

通信作者:赵书平

Corresponding author. ZHAO Shu-Ping; E-mail: Dczhshp@126.com

1 MBL 的发现与分类

MBL 在 Ambler 结构分类法中属于 B 类, 在 Bush 分群中属于 3 群。迄今为止, 已鉴定的 MBL 有 IMP、VIM、NDM、GIM、SPM、SIM 等基因型。在肠杆菌科细菌中, 位于质粒或整合子中的获得性 MBL 主要是前 3 种, 最近又发现了 GIM 基因型。

1.1 IMP 型

目前, IMP 家族有 42 类变种^[3]。在肠杆菌科细菌中, IMP 通常位于可移动的质粒, 易造成更多细菌耐药。

1994 年, Osano 等^[4]对 1 株黏质沙雷菌的 MBL 基因进行序列分析, 正式命名为 IMP-1, 其编码基因位于染色体上。随后在多种肠杆菌科细菌中发现了 IMP, 包括 2000 年从福氏志贺菌中发现的 IMP-3^[5]、2004 年从我国广州地区枸橼酸杆菌中发现的 IMP-4 等^[6]。Shigemoto 等^[3]于 2013 年在 1 株肺炎克雷伯菌中发现 IMP-34, 其编码基因位于可传播质粒的整合子内。基因测序证实其是 IMP-1 的变种, 第 87 位谷氨酸被甘氨酸取代, 但对亚胺培南的水解活性比 IMP-1 弱。

1.2 VIM 型

与 IMP 相比, VIM 在肠杆菌科细菌中较少见^[1], 两者同源性低于 30%, 但执行相似功能, 即可水解氨曲南以外的所有 β-内酰胺类抗生素。目前, VIM 家族至少有 37 类变种^[2]。

肠杆菌科细菌中 VIM-1 首次由 Lartigue 等^[7]于 2003 年从大肠埃希菌中分离获得, 其编码基因位于可自我移动的质粒上, 属 I 类整合子。随后在法国^[8]等地区相继从肠杆菌科细菌中发现 VIM-1。我国学者 Wei 等^[9]于 2012 年从 1 例住院患者痰液标本中分离出的弗氏枸橼酸杆菌内发现了 VIM-4, 这是中国地区枸橼酸杆菌产 VIM 的首次报道。

2013 年 3 月, Papagiannitsis 等^[10]在 1 株罕见的肠杆菌科细菌——非脱羧勒克菌中发现了 VIM-1, 其产酶基因亦位于 I 类整合子上, 而在此之前尚未有非脱羧勒克菌产 MBL 的报道, 这表明耐药基因正广泛传播。目前, 研究者已在多种肠杆菌科细菌中发现了 VIM, 如黏质沙雷菌、弗氏枸橼酸杆菌、产酸克雷伯菌、阴沟肠杆菌等^[1,8]。

1.3 NDM 型

携带 blaNDM-1 耐药菌的全称是产 I 型新德

里金属 β-内酰胺酶肠杆菌科细菌, 主要为肺炎克雷伯菌^[11](居首位)与大肠埃希菌。

NDM-1 是 Yong 等^[12]于 2008 年从 1 例尿路感染患者体内分离的肺炎克雷伯菌中首次发现的。随后, 在多个国家检测到携带此基因的“超级细菌”^[11]。截止 2012 年底, 全世界已有 40 多个国家对其进行了报道。研究表明^[12], blaNDM-1 大多定位于质粒上, 其活性区附近有独特的残基, 编码基因中有独特的插入子, 而其他 MBL 没有这些特征。而且, 此种产酶基因正向其他革兰阴性杆菌(如鲍曼不动杆菌^[13])传播。

我国报道的首例 NDM-1 携带菌出现在香港地区, 感染者为印度裔男子, 从其尿液样本中检出携带 blaNDM-1 的大肠埃希菌^[14]。一直以来, 各地不断报道出现 NDM-1 的变种, 如埃及等地区发现的 NDM-2^[15]、印度报道的 NDM-4^[16]等。最近 Tada 等^[17]报道了一种新的变种 NDM-8, 与 NDM-1 相比, 其氨基酸序列中 2 处发生改变, 但两者有几乎完全相同的动力学特征, 对氨苄西林、青霉素、美罗培南等的水解活性轻微减弱。

1.4 GIM 型

肠杆菌科细菌中发现的第 1 株携带 blaGIM-1 的细菌是黏质沙雷菌, 是德国学者 Rieber 等^[18]从 1 例住院患者的体液样本分离获得的。基因测序发现其产酶基因位于质粒介导的 I 类整合子内。同时, Hamprecht 等^[19]在阴沟肠杆菌中也发现了 blaGIM-1, 而此前研究者仅在铜绿假单胞菌中检测到 GIM-1, 表明该类 MBL 正在向肠杆菌科细菌播散。目前尚有在其他肠杆菌科细菌中检出 GIM 的报道。

2 细菌耐药基因的传播与多重耐药

2.1 耐药基因的传播

研究表明^[20], 肠杆菌科细菌产获得性 MBL 耐药基因常位于其他耐药基因决定簇中的整合子内, 且可能与其他移动基因元件组合在一起。通常由质粒或转座子介导传播, 无论哪种整合子或质粒, 它们均可在同种或不同种细菌间进行基因水平转移。此过程可借助转化、转导或接合的方式来完成, 其中接合方式是最常见的传播方式。Chen 等^[21]研究携带 blaNDM-1 基因的质粒发现, 编码基因在菌株间传播时, 转座接合方式比单纯质粒播散在致病菌流行

方面起更重要的作用。研究质粒内的基因组也发现,不同的质粒中存在着不同的插入序列,而插入序列的不同增加了耐药基因传播的效率。

非脱羧勒克菌临床罕见^[10],其产 MBL 的报道表明,MBL 基因的传播早已打破了普通细菌之间的局限,但其播散潜力及路径尚不清楚。因此,研究其传播机制对疾病治疗及疫情控制有重要作用。

有效限制耐药基因的水平传播,首先要阻止细菌播散。Perez 等^[22]对院内携带耐碳青霉烯革兰阴性杆菌的患者进行调查发现,超过 50% 的患者是从监护室转出的,表明这些病区是耐药菌传播的重要储存库。因此,在这些监护机构中,临床医师更应合理使用抗生素彻底杀灭细菌,缩短入住时间,防止耐药菌、耐药基因的传播。同时,要重视手卫生与环境卫生,注意污染物品的消毒,建立良好的管理及无菌操作观念,防止交叉感染的发生。

2.2 多重耐药

多重耐药性是指对 3 种或更多种类的药物(如 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类等)产生耐药的现象。

一般情况下,MBL 基因通过质粒等可移动元件介导传播,这些移动元件中不仅包括编码相关 MBL 的基因,还包括耐非 β -内酰胺类抗生素的相关基因,如磺胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类等^[1,23],这种复合产酶导致严重的多重耐药。由此可见,细菌的耐药并不是某种酶单纯作用的结果,而是多种因素的综合作用。此外,编码这些酶的基因可在短期内大范围传播,给临床抗生素的使用及疫情防控带来巨大困难。

除细菌复合产酶导致耐药外,其他机制也可能引发相关肠杆菌科细菌的多重耐药,如外膜蛋白(ompF、ompC 等)缺失;药物作用靶位改变,主要为青霉素结合蛋白(penicillin binding protein, PBP)的改变,降低了细菌与抗生素的亲和力;以及主动外排系统的活跃等^[24]。

3 检测方法

快速检测出产 MBL 的菌株,是有效防止耐药基因传播与医院感染暴发的第一步^[25]。国内外已有较多关于 MBL 检测方法的报道,但目前国际上仍没有推荐方法。现阶段对 MBL 的检测主要有表型检测和基因检测两类。

3.1 表型检测

对 MBL 的检测主要采用美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的表型检测法^[26]。目前有以下几种:应用 2-巯基乙醇或 EDTA 双纸片协同试验、应用毗啶二羧酸或 EDTA 的复合纸片法、E-test 及改良 Hodge 试验。

Galani 等^[27]筛选出 194 株具有不同亚胺培南最低抑菌浓度的肠杆菌科细菌(95 株产 MBL、99 株不产 MBL),分别用上述 4 种方法对其产 MBL 情况进行检测。结果发现,EDTA 双纸片协同试验具有很高的灵敏度(100%)与特异度(91.9%);且亚胺培南比头孢他啶更适合作为反应底物。经测试,EDTA 纸片与亚胺培南纸片的最佳距离是 10 mm。

这些方法的优点在于简单、实用,可用于不同实验室,便于大规模检测;但仅限于表型的筛查与确认,不能对疾病进行确诊。

3.2 基因检测

对 MBL 类型的诊断还需依赖基因检测技术,其成本高、操作繁琐,不适合常规应用。但基因检测技术具有较高的灵敏度与特异度,在临床或实验室发挥着不可替代的作用。

3.2.1 实时荧光定量聚合酶链反应 实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是检测的金标准,尤其可检测低水平表达或沉默型基因。Cunningham 等^[28]用实时荧光定量 PCR 检测耐碳青霉烯类抗生素肠杆菌科细菌中 MBL 基因的情况,结果显示,该方法能快速(90 min 内)检测出所有含 MBL 基因的菌株,敏感度与特异度均为 100%,比传统的 PCR(3 h)快得多。Krüttgen 等^[29]以化学合成的 blaNDM-1 基因作为阳性对照,用实时荧光定量 PCR 检测肠杆菌科细菌内的 NDM-1 基因,整个检测过程不足 1 h。研究指出,在病原体分离的初始阶段,以快速合成的基因作为阳性对照来检测相关致病基因非常有用,能有效提高基因的检测效率。与常规 PCR 相比,更适用于微量样品的快速检测,这为稀缺样品的病原检测提供了可行参考。

3.2.2 环介导恒温扩增技术 环介导恒温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification)是目前检测 blaNDM-1 基因的另一种更方便、灵敏和特异的方法^[30]。此实验在恒温条件下进行,不需温度

循环。反应引物能特异识别目标序列区更多的靶序列,因此灵敏度和特异度大大提高。灵敏度是 PCR 的 100 倍,最低检测限为 1~10 拷贝/反应,在整个实验过程中可通过肉眼直接目测实验结果。但该方法扩增的高效性常导致假阳性,需进一步改善。

3.3 免疫层析法

Notake 等^[31]应用免疫层析法检测 181 株耐碳青霉烯类抗生素肠杆菌科细菌产 IMP 的情况,然后用特异 PCR 和直接测序加以证实。结果发现,此方法能检测所有类型的 IMP,准确率 100%,特异度 100%。由此推断,在 IMP 筛选中,免疫层析法可替代 PCR。

4 结语

肠杆菌科细菌是临幊上较常见的菌种,部分产 MBL 肠杆菌科细菌导致的耐药性在临幊上已成为一大难题,尤其是新型超级耐药基因 NDM-1 的全球蔓延及碳青霉烯酶类等抗生素的广泛应用,使产 MBL 肠杆菌科细菌的耐药情况变得日渐复杂和严重,给临幊治疗带来较大压力。因此,针对这些致病菌,快速检测其产 MBL 情况,探究各菌株间编码 MBL 基因的传递方式、传播影响因素并设法阻断,加强细菌耐药性监测将是今后研究的重要方向。

参考文献

- [1] Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams [J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(5): 381-393.
- [2] Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases [J]. Front Microbiol, 2013, 4: 48. doi: 10.3389/fmicb.2013.00048. eCollection 2013.
- [3] Shigemoto N, Kayama S, Kuwahara R, Hisatsune J, Kato F, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, Sueda T, Ohge H, Sugai M. A novel metallo-β-lactamase, IMP-34, in Klebsiella isolates with decreased resistance to imipenem [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76(1): 119-121.
- [4] Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38 (1): 71-78.
- [5] Iyobe S, Kusadokoro H, Ozaki J, Matsumura N, Minami S, Haruta S, Sawai T, O'Hara K. Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(8): 2023-2027.
- [6] Hawkey PM, Xiong J, Ye H, Li H, M'Zali FH. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 194(1): 53-57.
- [7] Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in an Enterobacteriaceae isolate in France [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(12): 4929-4930.
- [8] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 306-325.
- [9] Wei Y, Wang J. First detection of VIM-4 metallo-β-lactamase-producing *Citrobacter freundii* in China [J]. Ann Lab Med, 2013, 33 (1): 84-85.
- [10] Papagiannitsis CC, Studentová V, Hrabák J, Kubelík J, Jindrák V, Zemlicková H. Isolation from a non-clinical sample of a *Leclercia adecarboxylata* producing a VIM-1 metallo-β-lactamase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(6): 2896-2897.
- [11] Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) mediated carbapenem resistance [J]. J Med Microbiol, 2013, 62(Pt 4): 499-513.
- [12] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-β-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.
- [13] Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with bla(NDM-1) and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India [J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(10): 2253-2254.
- [14] Chu YW, Tung VW, Cheung TK, Chu MY, Cheng N, Lai C, Tsang DN, Lo JY. Carbapenemases in enterobacteria Hong Kong, China, 2009 [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17 (1): 130-132.
- [15] Espinal P, Fugazza G, López Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, Goossens H, Carmeli Y, Vila J. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(11): 5396-5398.
- [16] Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. NDM-4 metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(4): 2184-2186.
- [17] Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK, Sah MK, Hiroshi, Ohara, Kirikae T, Pokhrel B M. NDM-8 metallo-

- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(5): 2394-2396.
- [18] Rieber H, Frontzek A, Pfeifer Y. Emergence of metallo- β -lactamase GIM-1 in a clinical isolate of *Serratia marcescens* [J]. *Antimicrobial Agents Chemother*, 2012, 56 (9): 4945-4947.
- [19] Hamprecht A, Poirel L, Göttig S, Seifert H, Kaase M, Nordmann P. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(3): 558-561.
- [20] Farzana R, Shamsuzzaman S, Mamun KZ. Isolation and molecular characterization of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 producing superbug in Bangladesh [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2013, 7(3): 161-168.
- [21] Chen YT, Lin AC, Siu LK, Koh TH. Sequence of closely related plasmids encoding bla (NDM-1) in two unrelated *Klebsiella pneumoniae* isolates in Singapore [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48737.
- [22] Perez F, Endimiani A, Ray AJ, Decker BK, Wallace CJ, Hujer KM, Ecker DJ, Adams MD, Toltzis P, Dul MJ, Windau A, Bajaksouzian S, Jacobs MR, Salata RA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(8): 1807-1818.
- [23] Coelho A, Piedra-Carrasco N, Bartolomé R, Quintero-Zarate JN, Larrosa N, Cornejo-Sánchez T, Prats G, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, González-López JJ. Role of IncH1 plasmids harbouring blaVIM-1, blaCTX-M-9, aac(6')-Ib and qnrA genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39(6): 514-517.
- [24] Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodríguez MC, Velasco M, Saavedra JM, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Martínez-Martínez L, Campos J. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32 (6): 534-537.
- [25] Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention [J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(1): 60-67.
- [26] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S22. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplements [S/OL]. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>.
- [27] Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giannarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo-beta-lactamase production in Enterobacteriaceae [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61 (3): 548-553.
- [28] Cunningham SA, Noorie T, Meunier D, Woodford N, Patel R. Rapid and simultaneous detection of genes encoding *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (blaKPC) and New Delhi metallo- β -lactamase (blaNDM) in Gram-negative bacilli [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(4): 1269-1271.
- [29] Krüttgen A, Razavi S, Imöhl M, Ritter K. Real-time PCR assay and a synthetic positive control for the rapid and sensitive detection of the emerging resistance gene New Delhi metallo- β -lactamase-1 (blaNDM-1) [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2011, 200(2): 137-141.
- [30] Liu W, Zou D, Li Y, Wang X, He X, Wei X, Shao C, Li X, Shang W, Yu K, Liu D, Li Y, Guo J, Yin Z, Yuan J. Sensitive and rapid detection of the new Delhi metallo-beta-lactamase gene by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(5): 1580-1585.
- [31] Notake S, Matsuda M, Tamai K, Yanagisawa H, Hiramatsu K, Kikuchi K. Detection of IMP metallo- β -lactamase in carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae and glucose non-fermenting Gram-negative rods by immunochromatography assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1762-1768.

(收稿日期:2013-06-28)