

DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20211013

· 论 著 ·

## 产 NDM-1 阴沟肠杆菌的耐药性与毒力基因分布

余 艳,牛 敏,杜 艳,任玉吉,代鹏飞,何秋月,刘淑敏

(昆明医科大学第一附属医院检验科 云南省检验医学重点实验室 昆明医科大学第一附属医院临床检验诊断省创新团队, 云南 昆明 650032)

**[摘 要]** **目的** 了解产新德里金属  $\beta$ -内酰胺酶-1 (NDM-1) 阴沟肠杆菌 (ECL) 耐药性与毒力基因分布情况。**方法** 收集 2017 年 1 月—2020 年 11 月昆明医科大学第一附属医院分离的 ECL, 试验组为 29 株产 NDM-1 的耐碳青霉烯类 ECL (CRECL), 对照组为 32 株不产 NDM-1 的 CRECL 和 35 株碳青霉烯类敏感 ECL (CSECL)。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF MS)、全自动微生物分析系统进行菌株鉴定和药敏试验, PCR 方法检测 NDM-1 耐药基因、24 对毒力基因, 采用  $\chi^2$  检验比较毒力基因分布差异。**结果** 该院分离的 CRECL 菌株 NDM-1 基因检出率为 47.5%, 产 NDM-1 的 CRECL 对常用抗菌药物表现为多重耐药。96 株 ECL 菌株中, 毒力基因 *acrA*、*tolC*、*wcaA*、*wcaM*、*wza* 的检出率较高, 分别为 80.2%、90.6%、87.5%、75.0%、92.7%, *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip* 基因的检出率也均在 60% 以上, 未检出 *escV*、*nleB*、*pet*、*hlyA* 等毒力基因。产 NDM-1 的 CRECL 组 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip*、*acrA* 基因检出率高于不产 NDM-1 的 CRECL, CRECL 组 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip* 基因检出率高于 CSECL 组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** 产 NDM-1 CRECL 耐药形势严峻而且毒力基因的携带率也增高, 临床用药应兼顾细菌的耐药性和毒力基因分布情况。

**[关 键 词]** 阴沟肠杆菌; NDM-1; 耐药; 毒力基因**[中图分类号]** R378.2**Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes of NDM-1-producing *Enterobacter cloacae***

YU Yan, NIU Min, DU Yan, REN Yu-ji, DAI Peng-fei, HE Qiu-yue, LIU Shu-min (Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Key Laboratory of Laboratory Medicine, Yunnan Innovation Team of Clinical Laboratory and Diagnosis, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To understand antimicrobial resistance and distribution of virulence genes of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)-producing *Enterobacter cloacae* (ECL). **Methods** ECL isolated from the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University from January 2017 to November 2020 were collected, the trial group was 29 strains of NDM-1-producing carbapenem-resistant ECL (CRECL), control group was 32 strains of CRECL without producing NDM-1 and 35 strains of carbapenem-sensitive ECL (CSECL). Strains were identified and performed antimicrobial susceptibility testing with matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) and automated microbial identification system, NDM-1 resistance genes and 24 pairs of virulence genes were detected by polymerase chain reaction, change in distribution of virulence genes was compared with Chi-square test. **Results** Isolation rate of NDM-1 gene of CRECL strain isolated in this hospital was 47.5%,

[收稿日期] 2021-01-06

[基金项目] 国家自然科学基金 (81960382); 云南省医学学科带头人培养项目 (D-2017023); 云南省应用基础研究计划联合专项 [2019FE001(-060)]; 云南省科技厅应用基础研究联合专项 (202001AY070001-037)

[作者简介] 余艳 (1994-), 女 (汉族), 云南省曲靖市人, 硕士研究生, 主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 刘淑敏 E-mail: 466174813@qq.com

NDM-1-producing CRECL showed multiple resistance to common antimicrobial agents. Among 96 ECL strains, detection rates of virulence genes *acrA*, *tolC*, *wcaA*, *wcaM*, and *wza* were 80.2%, 90.6%, 87.5%, 75.0% and 92.7% respectively, detection rates of *clpB*, *icmf*, and *VasD/Lip* genes were also above 60%, virulence genes such as *escV*, *nleB*, *pet*, and *hlyA* were not found. Detection rates of *clpB*, *icmf*, *VasD/Lip*, and *acrA* genes in NDM-1-producing CRECL group were higher than those in CRECL group without producing NDM-1, detection rates of *clpB*, *icmf*, and *VasD/Lip* genes in CRECL group were higher than those in CSECL group, difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Antimicrobial resistance of NDM-1-producing CRECL is severe, and the carrying rate of virulence genes also increased, antimicrobial resistance and virulence gene distribution of bacteria should be considered in clinical medication.

[Key words] *Enterobacter cloacae*; NDM-1; antimicrobial resistance; virulence gene

新德里金属  $\beta$ -内酰胺酶-1(New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1, NDM-1)可水解几乎所有  $\beta$ -内酰胺类抗生素,产 NDM-1 的细菌引起的感染临床致死率较高<sup>[1]</sup>。阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*, ECL)是一种重要的条件致病菌,可以产生多种抗生素水解酶,目前研究<sup>[1-2]</sup>显示产碳青霉烯酶尤其是 NDM-1 是耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌(carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*, CRECL)的主要耐药机制。

除了产生各种抗生素水解酶以外,ECL 也能表达多种毒力因子,包括菌毛、蛋白质分泌系统、毒力岛、脂多糖、铁载体、毒素、外排泵等,这些毒力因子在细菌黏附、入侵宿主、免疫防御、引起宿主损伤的过程中发挥重要作用<sup>[3-7]</sup>。ECL 含有丰富的质粒和染色体基因组,易于获得包含耐药基因和毒力基因的多种可移动遗传元件,二者的遗传机制主要通过基因水平转移而实现<sup>[5]</sup>,并且相互关联,在细菌的进化过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。通常情况下,细菌在获得耐药性后,由于适应性代价的原因,会导致毒力下降<sup>[9]</sup>。然而,随着菌株突变,耐药菌可通过补偿性进化机制使其毒力和生存能力增强<sup>[10]</sup>,使得临床感染治疗更加困难。国内外研究<sup>[4, 11]</sup>表明,携带 NDM-1 基因会对 ECL 的致病性产生一定影响,但目前相关研究较少。因此,本研究拟分析携带 NDM-1 基因 ECL 的耐药特点、毒力基因携带情况,为进一步研究 NDM-1 基因对 ECL 毒力、致病性的影响提供帮助,甚至为研究新颖有效的抗感染疗法、缓解致病菌感染及耐药现状提供新视角。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2017 年 1 月—2020 年 11 月昆明医科大学第一附属医院分离鉴定的 ECL,试

验组为 29 株产 NDM-1 的 CRECL,对照组为 32 株不产 NDM-1 的 CRECL 及同期分离的 35 株碳青霉烯类敏感 ECL(CSECL),剔除同一患者不同部位分离的重复菌株。根据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)指南,CRECL 的判读标准为:亚胺培南或美罗培南 MIC  $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  或厄他培南 MIC  $\geq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,根据 NDM-1 基因检测结果进一步将 CRECL 分为产 NDM-1 和不产 NDM-1 菌株,CSECL 菌株对碳青霉烯类药物均表现为敏感。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 和 ECL ATCC 700323 均由本实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器 VITEK 2 全自动微生物鉴定及药敏分析仪(法国梅里埃公司)、基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱仪 MALDI-TOF MS(布鲁克科技有限公司)、药敏纸片(英国 Oxoid 公司)、DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、DNA Marker(大连宝生物公司)、 $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ 、Golden View 核酸染料、 $50 \times \text{TAE Buffer}$ (北京博迈德基因技术有限公司)、琼脂糖(西班牙 Bio-west 公司)、引物合成及 DNA 测序(北京擎科生物科技有限公司昆明分公司)、PCR 扩增仪(西安天隆科技有限公司)、电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、凝胶成像仪(美国 GE Healthcare 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定与药敏试验 采用 VITEK 2 Compact 进行菌种鉴定,MALDI-TOF MS 复核菌种鉴定结果,全自动药敏系统联合 K-B 纸片法进行药敏试验,替加环素和多粘菌素的药敏试验采用微量肉汤稀释法。试验操作及结果判识参照 CLSI M100(第 28 版)标准<sup>[12]</sup>。

1.2.2 NDM-1 耐药基因与毒力基因检测 提取分离菌株 DNA 作为 PCR 扩增模板。采用 PCR 方法对 61 株 CRECL 进行 NDM-1 耐药基因扩增,引物

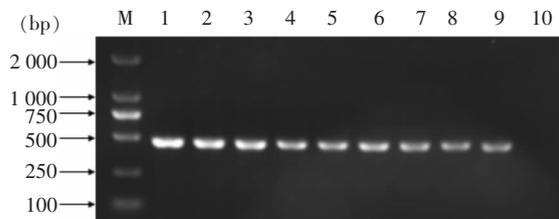
序列及反应条件参照文献[13]进行。对所有 96 株 ECL 菌株进行 24 种毒力基因包括耶尔森毒力岛基因(*irp-2*、*fyuA*)、铁载体基因(*fhuA*、*sodB*、*sltA*)、III 型分泌系统(T3SS)编码基因(*escV*、*nleB*)、V 型分泌系统(T5SS)编码基因(*pic*、*pet*)、VI 型分泌系统(T6SS)编码基因(*clpB*、*icmf*、*VasD/Lip*)、脂多糖基因(*WaaL*、*WaaG*)、I 型菌毛基因(*fimH*)、III 型菌毛基因(*mrkD*)、生物膜胞外多糖基因(*wcaA*、*wcaM*、*wza*)、外排泵基因(*acrA*、*tolC*)、志贺毒素基因(*shET1*)、细胞毒性坏死因子基因(*cnf1*)、溶血素基因(*hlyA*)，引物序列、反应条件、产物大小参照相关文献[3-7, 14]。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳(120 V × 30 min)后，在凝胶成像系统中进行观察。扩增阳性产物送测序并将测序结果与 Genbank 数据库中相应序列比对验证。

1.2.3 统计学方法 应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析，计数资料以例数或百分比表示，采用卡方检验(Chi-square test)比较组间分布差异， $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 NDM-1 耐药基因检出率 2017 年 1 月—2020 年 11 月共收集 61 株 CRECL，经 PCR 扩增测

序比对，有 29 株检出 NDM-1 基因，检出率为 47.5%。图 1 为部分菌株 NDM-1 基因电泳图。



M: DNA Marker(DL 2000); 1~8: NDM-1 基因阳性菌株; 9: 阳性对照; 10: 阴性对照。

图 1 NDM-1 基因电泳图

Figure 1 Electrophoresis map of NDM-1 gene

2.2 抗菌药物敏感性试验检测结果 29 株产 NDM-1 的 CRECL 均表现为多重耐药，对常用抗菌药物如碳青霉烯类、头孢菌素类抗生素的耐药率达 100%；对喹诺酮类药物左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率分别为 51.7%、55.2%；对氨基糖苷类抗生素如庆大霉素的耐药率为 37.8%，而对阿米卡星的耐药率仅为 3.4%；对复方磺胺甲噁唑的耐药率为 51.7%，对氨曲南的耐药率为 44.8%，对四环素的耐药率为 48.6%，29 株菌对替加环素和多粘菌素均表现为敏感。见图 2。

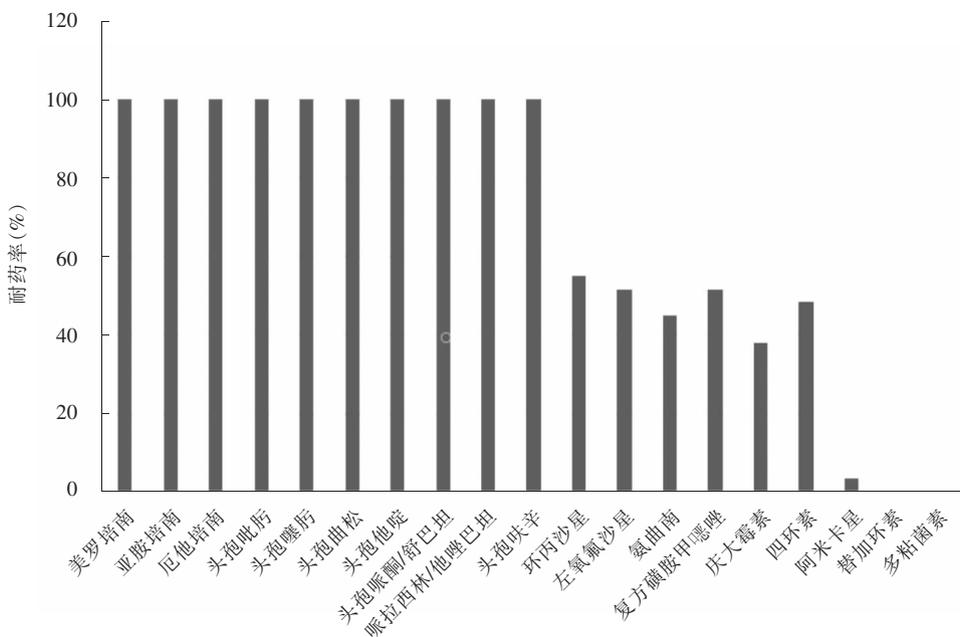


图 2 29 株产 NDM-1 的 CRECL 对常用抗菌药物耐药率

Figure 2 Antimicrobial resistance rates of 29 strains of NDM-1-producing CRECL

2.3 毒力基因 96 株 ECL 菌株中,外排泵和生物膜胞外多糖编码基因 *acrA*、*tolC*、*wcaA*、*wcaM*、*wza* 的检出率较高,分别为 80.2%、90.6%、87.5%、75.0%、92.7%, T6SS 编码基因 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip* 的检出率也均在 60%以上,未检出 *escV*、*nleB*、*pet*、*hlyA* 等毒力基因。

2.3.1 产 NDM-1 的 CRECL 和不产 NDM-1 的 CRECL 毒力基因分布差异 产 NDM-1 酶 CRECL

组检出率最高的是 *acrA* 基因(96.6%),不产 NDM-1 酶 CRECL 菌株检出率最高的是 *wza* 基因(90.6%),产 NDM-1 的 CRECL 菌株 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip*、*acrA* 检出率高于不产 NDM-1 的 CRECL,而不产 NDM-1 的 CRECL 组 *wcaM* 基因检出率高于产 NDM-1 的 CRECL 组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 产 NDM-1 和不产 NDM-1 的 CRECL 毒力基因检出情况[株(%)]

Table 1 Detection results of virulence genes of NDM-1-producing CRECL and CRECL without producing NDM-1 (No. of isolates [%])

毒力因子及编码基因	产 NDM-1 CRECL (n=29)	不产 NDM-1 CRECL (n=32)	$\chi^2$	P	毒力因子及编码基因	产 NDM-1 CRECL (n=29)	不产 NDM-1 CRECL (n=32)	$\chi^2$	P
耶尔森毒力岛					I 型菌毛				
<i>irp-2</i>	3(10.3)	5(15.6)	0.372	0.412	<i>fimH</i>	2(6.9)	2(6.3)	0.010	0.655
<i>fyuA</i>	3(10.3)	5(15.6)	0.372	0.412	III 型菌毛				
铁载体					<i>mrkD</i>	2(6.9)	4(12.5)	0.539	0.384
<i>fhuA</i>	0(0.0)	2(6.3)	1.874	0.271	胞外多糖				
<i>sodB</i>	0(0.0)	2(6.3)	1.874	0.271	<i>wcaA</i>	27(93.1)	27(84.4)	1.141	0.255
<i>sltA</i>	1(3.4)	4(12.5)	1.656	0.209	<i>wcaM</i>	17(58.6)	26(81.3)	3.745	0.049
T3SS					<i>wza</i>	27(93.1)	29(90.6)	0.124	0.548
<i>escV</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-	外排泵				
<i>nleB</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-	<i>acrA</i>	28(96.6)	23(71.9)	6.759	0.010
T5SS					<i>tolC</i>	27(93.1)	28(87.5)	0.539	0.384
<i>pic</i>	0(0.0)	1(3.1)	0.921	0.525	志贺菌肠毒素				
<i>pet</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-	<i>shET1</i>	1(3.4)	0(0.0)	1.122	0.475
T6SS					细胞毒性坏死因子				
<i>clpB</i>	25(86.2)	18(56.3)	6.563	0.010	<i>cnf1</i>	1(3.4)	0(0.0)	1.122	0.475
<i>icmf</i>	26(89.7)	19(59.4)	7.209	0.007	溶血素				
<i>VasD/Lip</i>	26(89.7)	19(59.4)	7.209	0.007	<i>hlyA</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-
脂多糖									
<i>WaaL</i>	1(3.4)	0(0.0)	1.122	0.475					
<i>WaaG</i>	16(55.2)	14(43.8)	0.794	0.263					

2.3.2 CRECL 和 CSECL 毒力基因分布差异 CRECL 和 CSECL 菌株中检出率最高的都是 *wza* 基因,分别为 91.8%和 94.3%。CRECL 组 *clpB*、

*icmf*、*VasD/Lip* 基因检出率高于 CSECL,差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),其余毒力基因的检出率不具有统计学差异(均  $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 CRECL 和 CSECL 两组菌株的毒力基因检出情况[株(%)]

Table 2 Detection results of virulence genes of CRECL and CSECL (No. of isolates [%])

毒力因子及编码基因	CRECL (n = 61)	CSECL (n = 35)	$\chi^2$	P	毒力因子及编码基因	CRECL (n = 61)	CSECL (n = 35)	$\chi^2$	P
耶尔森毒力岛					I 型菌毛				
<i>irp-2</i>	8(13.1)	2(5.7)	1.305	0.217	<i>fimH</i>	4(6.6)	2(5.7)	0.027	0.619
<i>fyuA</i>	8(13.1)	2(5.7)	1.305	0.217	III 型菌毛				
铁载体					<i>mrkD</i>	6(9.8)	8(22.9)	3.027	0.077
<i>fhuA</i>	2(3.3)	1(2.9)	0.013	0.700	胞外多糖				
<i>sodB</i>	2(3.3)	1(2.9)	0.013	0.700	<i>wcaA</i>	54(88.5)	30(85.7)	0.161	0.459
<i>sltA</i>	5(8.2)	6(17.1)	1.754	0.160	<i>wcaM</i>	43(70.5)	29(82.9)	1.814	0.135
T3SS					<i>wza</i>	56(91.8)	33(94.3)	0.203	0.497
<i>escV</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-	外排泵				
<i>nleB</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-	<i>acrA</i>	51(83.6)	26(74.3)	1.217	0.200
T5SS					<i>tolC</i>	55(90.2)	32(91.4)	0.042	0.573
<i>pic</i>	1(1.6)	2(5.7)	1.220	0.300	志贺肠毒素				
<i>pet</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-	<i>shET1</i>	1(1.6)	1(2.9)	0.162	0.599
T6SS					细胞毒性坏死因子				
<i>clpB</i>	43(70.5)	17(48.6)	4.559	0.028	<i>cnf1</i>	1(1.6)	1(2.9)	0.162	0.599
<i>icmf</i>	45(73.8)	17(48.6)	6.174	0.012	溶血素				
<i>VasD/Lip</i>	45(73.8)	17(48.6)	6.174	0.012	<i>hlyA</i>	0(0.0)	0(0.0)	-	-
脂多糖									
<i>WaaL</i>	1(1.6)	1(2.9)	0.162	0.599					
<i>WaaG</i>	30(49.2)	18(51.4)	0.045	0.500					

### 3 讨论

ECL 是一种重要的革兰阴性杆菌,可引起多种感染。据报道<sup>[15]</sup>,由其引起的医疗保健相关感染在所有肠杆菌目细菌中排名第三。随着碳青霉烯类药物的广泛应用,全球各地相继出现 CRECL 播散流行,全国细菌耐药监测网结果显示,2015—2019 年 ECL 对碳青霉烯类抗生素的耐药率为 3.4%~7.0%<sup>[16]</sup>,多项研究显示 NDM-1 酶是 CRECL 中最常见的碳青霉烯酶,检出率为 53%~72%,并且多地都出现过产 NDM-1 的 ECL 暴发流行<sup>[1-2,15,17]</sup>。本研究收集了 61 株 CRECL,NDM-1 基因检出率为 47.5%(29/61),比同类报道的检出率稍低,说明 NDM-1 基因检出率存在地区差异,也比前期课题组的检出率(80%)低<sup>[13]</sup>,提示本地区产 NDM-1 的 ECL 流行病学特征可能发生了重要变迁,为临床防控提供了重要的流行病学依据。药敏结果显示 29 株产 NDM-1 的 CRECL 均为多重耐药,与类似报道

一致<sup>[18]</sup>。阿米卡星是氨基糖苷类抗生素,其耐药率较低,主要是由于肾毒性、耳毒性等副作用,使用一直受到限制。大部分菌株对氨基糖苷类、喹诺酮类抗生素表现出较高的敏感性,因此可根据药敏结果选择性使用一种或两种药物进行抗感染治疗。理论上 NDM-1 不能水解氨曲南,但本研究中氨曲南的耐药率达 44.8%,主要是因为携带 NDM-1 基因的质粒常同时携带多种耐药基因编码多种抗生素水解酶,也包括能水解氨曲南的 ESBLs 和/或 AmpC 酶,从而导致氨曲南耐药甚至泛耐药。多粘菌素和替加环素是目前治疗此类细菌感染的主流选择,大部分菌株对其敏感率较高,研究显示使用替加环素、多粘菌素联合其他药物可显著提高患者的临床治疗效果<sup>[19]</sup>,但由于多粘菌素副作用大、替加环素价格昂贵等多种原因限制了这两种药物的应用和普及,随着对这两种药物耐药菌株的出现,进一步加剧了临床抗感染治疗的难度,甚至可能出现无药可用的境地。再加上目前尚缺乏针对 NDM-1 的常规标准化表型检测方法以及能有效治疗多重耐药产 NDM-1

酶细菌的抗生素<sup>[20]</sup>,且多数携带 NDM-1 基因的菌株可通过质粒进行广泛克隆播散<sup>[21]</sup>,如果携带大量毒力基因的移动遗传元件转移到耐药质粒中,就会产生高耐药合并高毒力菌株,给临床感染控制和公共健康带来极大威胁。

毒力是细菌的重要致病因素,在感染中发挥重要作用。国内外研究显示 NDM-1 基因不仅赋予肠杆菌目细菌高度耐药性,而且还能使肺炎克雷伯菌毒力增强<sup>[22]</sup>、ECL 的繁殖能力与致病性增强<sup>[12]</sup>,课题组前期研究显示携带 NDM-1 基因会使 ECL 体外生长能力增强<sup>[23]</sup>。目前有研究<sup>[24]</sup>表明携带 NDM-1 基因的大肠埃希菌毒力基因携带率较低,但携带 NDM-1 基因与 ECL 毒力基因检出率的相关性未见报道,因此本研究分析了产 NDM-1 和不产 NDM-1 的 CRECL 之间以及 CRECL 和 CSECL 之间毒力基因的分布差异。

结果显示产 NDM-1 的 CRECL 菌株 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip*、*acrA* 检出率显著高于不产 NDM-1 的 CRECL ( $P < 0.05$ )。 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip* 是 T6SS 编码基因,与细菌的毒力密切相关。敲除 T6SS 相关编码基因的鲍曼不动杆菌,其生长速度减慢,对细胞黏附能力降低,对小鼠的致死能力降低<sup>[25]</sup>。本研究中 T6SS 在 ECL 中普遍存在,与 Mustafa 等<sup>[3]</sup>报道一致,并且在产 NDM-1 ECL 中的携带率更高。 *acrA* 基因是 AcrAB-TolC 外排系统的编码基因,可以增加细菌的适应性和毒力<sup>[6]</sup>,产 NDM-1 的 CRECL 菌株中的携带率更高。因此,产 NDM-1 的 ECL 不仅耐药性强,而且某些毒力基因的携带率更高,可能会导致其毒力增强,但毒力基因的携带率与其在体内致病性强弱的关系需要进一步试验验证。另外,Guérin 等<sup>[26]</sup>研究表明 ECL 复合体中 AcrAB-TolC 外排泵缺失会导致菌株毒力减弱,而生物被膜的产量却增加。生物膜的结构组成、功能行使均与胞外多糖密切相关<sup>[27]</sup>, *wcaM* 基因是 ECL 生物膜胞外多糖合成基因。本次试验结果表明产 NDM-1 的 CRECL 组 *acrA* 基因检出率显著增高而 *wcaM* 基因检出率则显著降低,但对于产 NDM-1 的 CRECL 菌株外排泵与生物膜的关系还需要更多试验验证。

目前对耐碳青霉烯类肠杆菌的毒力研究主要集中在肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌,大量研究报道耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌株给临床治疗带来了极大困扰,其重要分子特征是同时携带碳青霉烯耐药质粒及毒力质粒<sup>[28]</sup>,也有研究显示耐碳青霉烯

类鲍曼不动杆菌的毒力显著增强<sup>[29]</sup>, Gomez-Simmonds 等<sup>[30]</sup>研究表明 CRECL 增强了耐药基因的传播能力,但并没有提高毒力。本研究结果显示 T6SS 编码基因 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip* 在 CRECL 中的检出率显著高于 CSECL 菌株,差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),表明 T6SS 作为毒力因子,在 ECL 中普遍存在并且与耐药性存在一定关联,CRECL 往往合并 T6SS 的高检出率。

综上所述,携带 NDM-1 基因 ECL 伴随 *clpB*、*icmf*、*VasD/Lip*、*acrA* 毒力基因的高检出率,从而可能导致其毒力发生改变,但本研究收集的菌株样本量有限,仅从基因水平进行分析,若要探讨 NDM-1 基因对 ECL 毒力的影响,除了扩大样本量以外,可能还需要结合临床感染特征,进行细胞、动物试验进一步论证。由于耐药菌的不断突变及全球传播,侧重于对抗病原菌毒力因子的抗毒力治疗已经成为一种新的治疗策略<sup>[31]</sup>,本文也可为研究新颖抗感染疗法提供一些新视角。总之,为防止高耐药合并高毒力菌株的出现,除了积极开发抗菌药物以外,医疗机构还要对产 NDM-1 的 ECL 进行流行病学监测、早期发现多重耐药高危菌株,及时采取感染控制措施,防止其暴发流行。

#### [参 考 文 献]

- [1] Cai YM, Chen C, Zhao M, et al. High prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* from three tertiary hospitals in China[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1610.
- [2] Wang Q, Wang XJ, Wang J, et al. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: data from a longitudinal large-scale CRE study in China (2012 - 2016)[J]. *Clin Infect Dis*, 2018, 67(suppl\_2): S196 - S205.
- [3] Mustafa A, Ibrahim M, Rasheed MA, et al. Genome-wide analysis of four *Enterobacter cloacae* complex type strains: insights into virulence and niche adaptation[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8150.
- [4] Brust FR, Boff L, da Silva Trentin D, et al. Macrocolony of NDM-1 producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* generates subpopulations with different features regarding the response of antimicrobial agents and biofilm formation[J]. *Pathogens*, 2019, 8(2): 49.
- [5] Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(4): e00002 - 19.
- [6] Pérez A, Poza M, Fernández A, et al. Involvement of the Ac-

- rAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(4): 2084–2090.
- [7] Azevedo PAA, Furlan JPR, Oliveira-Silva M, et al. Detection of virulence and  $\beta$ -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil [J]. Braz J Microbiol, 2018, 49(Suppl 1): 224–228.
- [8] Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(2): 185–230.
- [9] 杨焰, 游雪甫, 李聪然. 耐药细菌的适应性代价及补偿性进化 [J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(7): 784–792.
- [10] 皮锐, 柳清云, 高谦. 耐药结核分枝杆菌的适应性代价与补偿性进化 [J]. 微生物与感染, 2017, 12(6): 362–368.
- [11] 赵金秋. 产 NDM-1 阴沟肠杆菌 *E. Cloacae*413 的耐药性及致病性研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2015.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100-28 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2018.
- [13] 刘淑敏. 碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌检测及其临床感染特征和危险因素分析 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [14] Amaretti A, Righini L, Candelieri F, et al. Antibiotic resistance, virulence factors, phenotyping, and genotyping of non-*Escherichia coli* *Enterobacteriales* from the gut microbiota of healthy subjects [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1847.
- [15] Jin CM, Zhang JG, Wang Q, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in 11 Chinese cities [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1597.
- [16] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告 [J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1): 15–31.
- [17] Liu CL, Qin SS, Xu H, et al. Correction: New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1), the dominant carbapenemase detected in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* from Henan province, China [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0140726.
- [18] 林琳, 王晓楠, 肖晓光, 等. 产 NDM-1 金属  $\beta$ -内酰胺酶阴沟肠杆菌耐药传递机制及药物敏感性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(22): 3361–3365, 3372.
- [19] Wang XJ, Wang Q, Cao B, et al. Retrospective observational study from a Chinese network of the impact of combination therapy versus monotherapy on mortality from carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteremia [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(1): e01511–18.
- [20] Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM): a threat to public health [J]. BMC Microbiol, 2017, 17(1): 101.
- [21] Wu WJ, Feng Y, Tang GM, et al. NDM metallo- $\beta$ -lactamases and their bacterial producers in health care settings [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00115–18.
- [22] Fuursted K, Schøler L, Hansen F, et al. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) [J]. Microbes Infect, 2012, 14(2): 155–158.
- [23] 尧静. 耐碳青霉烯类阴沟肠杆菌 *bla*NDM-1 基因环境及敲除株构建与分析 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
- [24] 冯丽娜, 李从荣, 姜树朋, 等. 产 NDME<sub>x</sub>PEC 毒力与其耐药性和分子分型的关系研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8): 910–915.
- [25] 王建峰. 不动杆菌属菌种鉴定及 *vgrG*VI 型分泌系统毒力效应研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [26] Guérin F, Lallement C, Isnard C, et al. Landscape of resistance-nodulation-cell division (RND)-type efflux pumps in *Enterobacter cloacae* complex [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(4): 2373–2382.
- [27] Baker P, Hill PJ, Snarr BD, et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. Sci Adv, 2016, 2(5): e1501632.
- [28] 刘周. 高毒力肺炎克雷伯菌分子特征、碳青霉烯耐药机制及进化相关适应性代价研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019.
- [29] 刘鑫喆, 滑明溪, 王慧珠, 等. 基于全基因组序列的耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的耐药与毒力研究 [J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020, 14(5): 367–373.
- [30] Gomez-Simmonds A, Annavajhala MK, Wang Z, et al. Genomic and geographic context for the evolution of high-risk carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex clones ST171 and ST78 [J]. mBio, 2018, 9(3): e00542–18.
- [31] Fleitas Martínez O, Cardoso MH, Ribeiro SM, et al. Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 74.

(本文编辑:陈玉华)

**本文引用格式:** 余艳, 牛敏, 杜艳, 等. 产 NDM-1 阴沟肠杆菌的耐药性与毒力基因分布 [J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(10): 869–875. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20211013.

**Cite this article as:** YU Yan, NIU Min, DU Yan, et al. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes of NDM-1-producing *Enterobacter cloacae* [J]. Chin J Infect Control, 2021, 20(10): 869–875. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20211013.