

产IMP-1型碳青霉烯酶非脱羧勒克菌的分离与鉴定*

齐杰, 刘贵建, 潘健, 马玉芝, 张婷菊, 刘志远

(中国中医科学院广安门医院检验科, 北京 100053)

摘要:目的 分析碳青霉烯耐药非脱羧勒克菌(*L. adacarboxylata*)的耐药基因型。方法 Vitek II Compact 鉴定细菌及药敏试验, PCR 扩增碳青霉烯酶基因。结果 该株非脱羧勒克菌产IMP-1型碳青霉烯酶。结论 非脱羧勒克菌临床分离株较少见, 此为首次自非脱羧勒克菌检出IMP-1型金属酶。

关键词:非脱羧勒克菌; 碳青霉烯类; IMP-1 金属酶

中图分类号: R378.2; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)02-052-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.016

Isolation and Identification of *L. adacarboxylata* Producing IMP-1 Metallo-beta-lactamase

QI Jie, LIU Gui-jian, PAN Jian, MA Yu-zhi, ZHANG Ting-ju, LIU Zhi-yuan

(Department of Clinical Laboratory,

Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China)

Abstract: Objective To investigate the phenotype and genotype in a carbapenem resistant *L. adacarboxylata* strain. **Methods**

Microbial identification and drug susceptibility test was done with VITEK II Compact. Carbapenemases genes were detected by PCR methods. **Results** The strain of carbapenem resistant *L. adacarboxylata* produced IMP-1 carbapenemase. **Conclusion** *L. adacarboxylata* was found only rarely in the clinical isolates. This was the first Isolate of *L. adacarboxylata* producing IMP-1 metallo-beta-lactamase.

Keywords: *L. adacarboxylata*; carbapenem; IMP-1 metallo-beta-lactamase

勒克菌属(*Leclercia*)隶属于细菌域, 变形菌门, γ -变形菌纲, 肠杆菌目, 肠杆菌科。我院分离出一株产IMP-1型碳青霉烯酶非脱羧勒克菌。

1 材料与方法

1.1 对象 患者: 女, 49岁。2011年12月主因“腰椎术后7年余, 切口渗液2个月”收入院。

1.2 入院查体及病史 体温36.5℃, 心率84次/min, 呼吸18次/min, 血压: 150/84 mmHg。腰骶部正中见一长约15 cm纵行切口, 切口尾端可见一小窦道, 局部渗出, 无明显红肿。患者既往12年前于某院行双侧乳腺增生手术; 否认肝炎、结核、否认糖尿病、冠心病、外伤史及输血史; 否认药物及食物过敏史。

1.3 治疗经过 2004年7月26日在我院住院行椎板减压、髓核摘除、内固定术, 于2011年9月发现原手术切口尾端渗出流液, 予局部换药配合口服抗生素(具体不详), 局部渗出无缓解。2011年12月1日以“腰椎术后”收入院, 入院症见: 腰痛, 腰骶部正中见一长15 cm纵行切口, 原手术切口尾端渗出, 无发热, 纳食可, 小便控制力差, 大便可。住院期间行抗生素治疗, 未进行清创、引流等外科治疗。

于2011年12月12日患者腰骶部窦道渗出消失, 局部结痂, 出院。2011年12月21日, 患者因腰骶部窦道渗出再次入院, 保守治疗无效, 2012年1月11日在我院骨科住院行腰椎间盘突出术后感染清创、引流、灌洗术。术后保留闭式引流并联合应用甲磺酸左旋氧氟沙星注射液200 ml/d及注射用头孢西丁钠2 g 6 h 1次, 抗感染至1月24日, 于当日拔进水管, 1月27日拔引流管并行管头分泌物培养, 左右两侧引流管均培养出非脱羧勒克菌。患者腰部原手术切口愈合良好。但手术切口周围皮肤瘙痒, 于2月13日根据细菌学结果回报予患者皮试阴性后用注射用哌拉西林/舒巴坦钠(4:1)5g+0.9%氯化钠注射液100 ml 每12 h 1次抗感染治疗至27日。患者痊愈。

1.4 试剂和仪器 VITEK II Compact GN鉴定卡、VITEK II Compact AST-GN09药敏卡、VITEK II Compact全自动微生物鉴定仪购自法国生物梅里埃公司。

1.5 方法 碳青霉烯酶表型确证试验: 根据CLSI M100-S23推荐改良Hodge试验方法。同源性分析采用16S rDNA测序。耐药基因检测采用PCR

* 基金项目: 中国中医科学院广安门医院国家中医临床研究示范基地科研专项暨所级科研基金课题, 批准号2011S242。

作者简介: 齐杰(1983-), 女, 本科学历, 主管检验师, 从事临床微生物学检验工作, Tel: 010-88001460, E-mail: qijie0303@126.com。

通讯作者: 刘志远, Tel: 010-88001460, E-mail: yzl297@hotmail.com。

扩增。

2 结果

2.1 鉴定结果 1月27日送检分泌物接种于血平板及麦康凯平板上,35℃培养18~24 h,左右两侧引流管在血平板上均培养出圆形、凸起、灰白色的菌落,在麦康凯琼脂平板上形成粉红色菌落(见图1)。革兰氏染色为阴性杆菌(见图2),氧化酶试验阴性,触酶阳性,经 Vitek II Compact 鉴定为非脱羧勒克菌。由中美泰和生物技术(北京)有限公

司通过 16S rDNA 测序进一步鉴定,测序结果见图3,结果与在 GenBank 中勒克菌属(*Leclercia*)的 16S rDNA 序列有 100%的同源性,可确定菌属为勒克菌属(*Leclercia*);与已知菌种的匹配中,与非脱羧勒克菌的 16S rDNA 序列均有 100%的同源性,与非脱羧勒克菌在 RDP-II 数据库中(S-ab score:1.000)的序列相似性最高,可确定菌种为非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)。

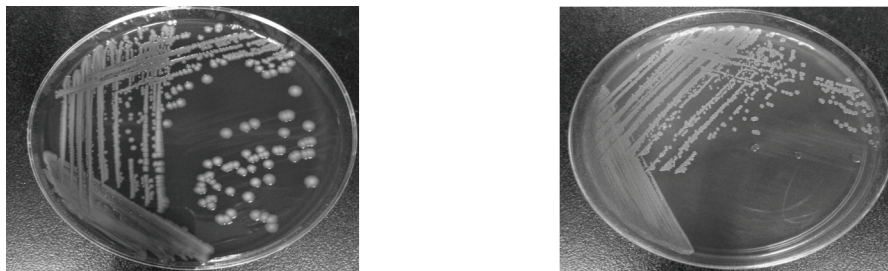


图1 非脱羧勒克菌在哥伦比亚血平板及麦康凯平板上培养18~24 h的菌落形态



图2 非脱羧勒克菌(图2a)、大肠埃希菌(图2b)革兰染色($\times 1000$)形态

```

-----
CCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG
GGAAACGTATTCAACGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACT
CCAATCCGGAACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATT
GTAGACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTACATCCCACTTCTCCAGTTTATCA
CTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCGGCCCTAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC
TTAACCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACC
AAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGT
CGACTTAAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGT
GGACTACCAAGGTATCTAATCTGTTTCTCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCAGGGGG
CCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGATTTACCGCTACCACTGGAATTCACCCCCCTCTAC
AAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCGACTTGACAG
ACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGATTAAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGC
ACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGCGGTTATTAAACCACAAACCTTCTCCCC
GCTGAAAGTACTTTACAAACCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTG
TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCTC
TCAGACCAAGCTAGGGATCGTCGCTAGGTGAGCCATTACCCACCTACTAGCTAATCCATCTGGGCAATCT
GATGGCAAGAGGGCCGGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGTACCGTTTCCAGTA
GTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTACCCGTCGCGCACTCGTCACCCGAGAGCAAGCTC

```

图3 16S rDNA 测序结果

2.2 药物敏感性试验 氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、头孢替坦、头孢曲松、头孢唑啉、头孢呋辛、头孢呋辛酯、妥布霉素、复方新诺明、厄他培南、亚胺培南、头孢他啶均为耐药,头孢吡肟药敏结果为中介,左旋氧氟沙星、阿米卡星、氨基糖苷、庆大

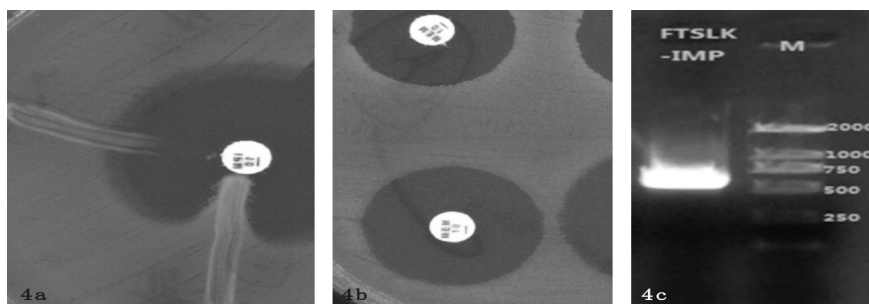
霉素、哌拉西林/他唑巴坦均为敏感。药敏判定结果参照 2011 年 CLSI 文件。

2.3 碳青霉烯酶表型确证试验 根据 CLSI M100-S23 推荐改良 Hodge 试验进行碳青霉烯酶表型检测为阳性(图4a)。根据《产NDM-1泛耐药

肠杆菌科细菌感染诊疗指南(试行版)》采用亚胺培南/EDTA复合纸片,进行K-B法药敏试验,亚胺培南/EDTA复合纸片(抑菌环直径24 mm)比亚胺培南单药纸片(抑菌环直径19 mm)的抑菌圈直径增大5 mm确认为产金属酶(图4b)。

2.4 耐药基因检测 PCR扩增NDM-1(NDM-F1: 5'-GGCGGAATGGCTCATCACGA-3', NDM-R1: 5'-CGCAACACAGGCCTGACTTTC-3'); IMP-1(IMP1-F1: 5'-ACCGCAGCAGAGTCTTT-

GCC-3', IMP1-R: 5'-ACAACCAGTTTTGCCT-TACC-3'); IMP2-F: 5'-GTTTTATGTGTAT-GCTTCC-3', IMP2-R: 5'-AGCCTGTTCCCATGTAC-3'); VIM-1(VIM1-F: 5'-AGTGGTGAG-TATCCGACAG-3', VIM1-R: 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3'), IMP-1 PCR结果阳性(图4c),测序结果(实测549bp)与GenBank同源序列比较99%同源(见图5)。



4a. 改良 Hodge 实验结果;4b. 亚胺培南/EDTA 复合纸片检测金属酶结果;4c. IMP-1 PCR 产物电泳结果。

图4 非脱羧勒克菌碳青霉烯酶表型确证试验及基因检测结果

```

AAGCTTGATGAAGGCGTTTATGTTACACTTCGTTTGAAGAAGTTAACGGGTGGGGCGTTGTTCCATAACAT
GGTTTGGTGGTCTTGTAATGCTGAGGCTTATCTAATTGACACTCCATTTACGGCTAAAGATACTGAAAAGT
TAGTCACTTGGTTTGTGGAGCGTGGCTATAAAATAAAGGCAGTATTTCTCTCATTTTCATAGCGACAGCAC
GGGCGGAATAGAGTGGCTTAATTCGATCTATCCCCACGTATGCATCTGAATTAACAAATGAAGTCTTAAA
AAAGACGGTAAGGTTCAAGCCACAAATTCATTTAGCGGAGTTAACTATTGGCTAGTTAAAAATAAATTGAA
GTTTTTATCCAGGCCGGGACACACTCCAGATAACGTAGTGGTTTGGCTGCCTGAAAGGAAAAATATTATTC
GGTGGTTGTTTTATTAACCGTACGGTTTAGGCAATTTGGGTGACGCAAATATAGAAGCTTGGCCAAAGTCC
GCCAAATTATTAAAGTCCAAATATGGTAAGGCAAACTGGTT

```

图5 IMP-1 PCR 产物测序结果

3 讨论 非脱羧勒克菌又称不脱羧勒克菌(*L. adecarboxylata*), 莱勒克菌属(*Leclercia*)目前属内仅有不脱羧勒克菌1个种^[3]。1962年称为非脱羧埃希菌^[4], 在此以前也被认为是“肠道菌群41”, 是肠杆菌科的一种具有动力的革兰阴性杆菌^[5,6]。1986年将非脱羧埃希菌重新命名为非脱羧勒克菌^[6], 是条件致病菌, 临床上很少引起注意, 主要从患者血液与尿液等无菌体液标本中分离出, 少数来自痰与伤口分泌物。可以引起败血症、伤口感染等。非脱羧勒克菌引起的感染, 虽然临床病例不是很常见, 但可以引起血液、伤口、泌尿系统等感染, 还有并发其它细菌的感染, 应当引起足够重视。

IMP型金属酶是细菌种属或地域分布最广且较为常见的 Zn^{2+} 依赖的碳青霉烯酶, 它有26个亚型^[7]。IMP-1是第一个被发现的金属酶, 是在1990年于日本的1株铜绿假单胞菌的质粒中检测到的。而IMP型金属酶首次于肠杆菌科细菌中的

报道是在日本的黏质沙雷菌和其它肠杆菌科的整合子中, 这提示blaIMP-1已发生了水平传播。据文献报道^[7], 日本1993~2003年间在肠杆菌科中已发现IMP-1, IMP-3, IMP-6, 主要的菌种为黏质沙雷菌、福氏志贺菌、弗劳地枸橼酸杆菌、肺炎克雷伯杆菌、大肠埃希菌、普通变形杆菌、阴沟肠杆菌等。

目前, 文献没有非脱羧勒克菌对碳青霉烯类耐药的报道, 自病人分离到携带IMP-1型金属酶的非脱羧勒克菌尚属首次。

对于该患者, 1月24日和27日两次送检了置管分泌物培养, 但由于前一次是在抗生素使用期间留取的标本, 所以导致了培养阴性, 而在停药三天后则在两处引流管处均培养出非脱羧勒克菌, 说明抗生素应用对细菌培养的结果有重要影响, 也提示临床应在抗生素使用前留取感染性标本, 以提高培养阳性率。

(下转57页)

2可能以某一种相互作用的方式作用于内皮细胞的受体,共同调节血管发生^[1,9~10]。

在进展期肿瘤细胞中出现上调的T细胞活化核因子,能够增加Ang-2的表达,而且肿瘤来源的Ang-2可以通过自分泌或旁分泌方式加速肿瘤细胞的运动,促进肿瘤侵袭和转移^[11]。本文结果显示Ang-2水平与胃癌临床病理分型无关,差异无统计学意义($P>0.05$);而Ⅲ~Ⅳ期胃癌患者的Ang-2水平显著高于Ⅰ~Ⅱ期患者,有淋巴结转移的患者Ang-2水平也显著高于无淋巴结转移的患者,经比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05),经相关性分析显示血清Ang-2水平与肿瘤的分期和淋巴结转移密切相关(r 分别为0.31和0.33, P 均 <0.05);实验还发现手术后Ang-2水平明显下降,而术后一年复发患者的Ang-2水平显著高于未复发患者。提示Ang-2是胃癌进展和转移的重要促进因子,可以促进肿瘤细胞的上皮-间充质转换,从而促进癌细胞侵袭、迁移,加速癌细胞的淋巴结及远处转移,而且和预后密切相关。

总之,血清Ang-2水平在胃癌患者中显著升高,可能是胃癌的一个诊断标志物,对胃癌病程进展、疗效评价和预后评估有重要的临床价值,有可能成为抗血管形成、抗转移治疗的潜在靶点,需要以后进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Eklund L, Saharinen P. Angiopoietin signaling in the vasculature[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(9): 1271-1280.
- [2] Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, et al. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(40): 16109-16114.

- [3] Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis[J]. Cancer Lett, 2013, 328(1): 18-26.
- [4] Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases[J]. Virulence, 2013, 4(6): 507-516.
- [5] 方玲, 顾向明, 沈庆茂, 等. 促血管生成素-2在常见恶性肿瘤中的早期筛查研究[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(1): 81-83.
Fang L, Gu XM, Shen QM, et al. Study on early diagnosis significance of detection of serum angiopoietin-2 in multiple malignant tumor[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(1): 81-83.
- [6] Chen SM, Guo LJ, Chen BX, et al. Association of serum angiopoietin-1, angiopoietin-2 and angiopoietin-2 to angiopoietin-1 ratio with heart failure in patients with acute myocardial infarction[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(3): 937-941.
- [7] Iribarren C, Phelps BH, Darbinian JA, et al. Circulating angiopoietins-1 and -2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor-A as biomarkers of acute myocardial infarction: a prospective nested case-control study[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2011(11): 31.
- [8] Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, et al. Angiopoietin-2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(8): 2011-2022.
- [9] Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases[J]. Virulence, 2013, 4(6): 507-516.
- [10] Carrer DP, Kotzampassi K, Fyntanidou B, et al. Modulation of the release of Ang-2 in experimental endotoxic shock by a species-specific circulating factor[J]. Injury, 2013, 44(7): 935-940.
- [11] Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, et al. Tumor cell derived angiopoietin like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis[J]. Cancer Res, 2012, 72(7): 1784-1794.

收稿日期: 2015-01-13

修回日期: 2015-02-19

(上接54页)

参考文献:

- [1] 杨启文. 碳青霉烯类药物敏感性降低肠杆菌科菌的分子特征研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.
Yang QW. Molecular Characterization of *Enterobacteriaceae* with Decreased Susceptibility to Carbapenems [D]. Beijing: Beijing Union Medical College, 2010.
- [2] 李世杰, 郭瑞娟, 邢广栋, 等. 碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌的耐药机制探讨[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(8): 623-627.
Li SJ, Guo RJ, Xing GD, et al. Resistance mechanism of carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(8): 623-627.
- [3] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 221-222.
Zhou TY. Diagnosis and illustration of clinical micro-

biology[J]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2012: 221-222.

- [4] Leclerc H. Etude biochimique d'*enterobacteriaceae* pigmentees[J]. Ann Inst Pasteur, 1962, 102(6): 726-741.
- [5] Richard C. Nouvelles especes de *Enterobacteriaceae* (1979-1983)[J]. Bull Institut Pasteur, 1984(82): 255-277.
- [6] Tamura K, Sakazaki R, Kosako Y, et al. Isolation from Gen. Nov., Comb. Nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata* [J]. Current Microbiology, 1986, 13(4): 179-184.
- [7] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458.

收稿日期: 2014-08-08

修回日期: 2015-01-23