

猪源产新德里金属 β -内酰胺酶-1 大肠埃希菌的感染特性研究

常世恺¹, 赵战勤^{1*}, 薛云², 龙塔¹, 丁轲¹, 程相朝¹

(1. 河南科技大学动物科技学院, 河南省高等学校环境与畜产品安全重点学科开放实验室, 洛阳 471003;

2. 河南科技大学医学技术与工程学院, 微生物检验实验室, 洛阳 471003)

摘要: 对猪源产 NDM-1 大肠埃希菌 E120413 株在猪群中的交互传播、致病力和体内分布特性等进行初步探讨。仔猪粪便样本的细菌学检测结果表明, E120413 株细菌能从接种仔猪快速传染给未接种的同居组仔猪; 接种组仔猪粪便样本检测到 E120413 株细菌的持续时间最短为 7 周, 最长超过 11 周; 同居组的持续时间介于 7~9 周。仔猪血液样本的检测结果表明, E120413 株细菌能快速突破仔猪的免疫防御进入血液循环形成菌血症; 接种组和同居组仔猪菌血症的持续时间为第 2—10 天和第 4—10 天, 并在第 7 天达到最高活菌浓度 3.7×10^5 和 4.3×10^5 CFU · mL⁻¹。仔猪组织样本的检测结果表明, 从感染仔猪的脑、心、肝、脾、肺、肾、胃、肠系膜淋巴结和十二指肠中均能分离到该菌, 且能在十二指肠长期存在 (≥ 11 周)。但仔猪的临床症状与病理学检查结果表明, 该菌仅能引起感染猪的体温升高和轻微的局部炎症反应, 并不能导致猪的明显临床症状和严重病理变化。产 NDM-1 大肠埃希菌 E120413 株对猪具有较强的传播扩散能力和持续感染能力。

关键词: 猪; 大肠埃希菌; NDM-1; 感染

中图分类号: S852.612

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)01-0149-08

Transmissibility of New Delhi Metallo- β -lactamase-1-Producing *Escherichia coli* Isolate from Pig

CHANG Shi-kai¹, ZHAO Zhan-qin^{1*}, XUE Yun², LONG Ta¹, DING Ke¹, CHENG Xiang-chao¹

(1. Lab of Veterinary Microbiology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Lab of Medical Engineering, College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: One NDM-1-Producing *Escherichia coli* strain, designated as E120413, was isolated from a clinical pig case in China. Here we determined its transmissibility, pathogenicity and *in vivo* distribution in pigs. We performed kinetic bacterial distribution assays of porcine fecal samples, blood samples and organ tissues. The results demonstrated that E120413 strain can quickly infect the Close contacts of piglets from the inoculated piglets after being given 2 mL of the bacterial suspension containing 1.1×10^{10} CFU of E120413 strain. In these two groups, similar numbers of organisms were isolated from the fecal samples of these two groups of piglets, giving the longest persistence terms of over 11 weeks and 9 weeks, respectively. The E120413 organisms also could be isolated from the blood samples from day 2 to day 10 in the inoculated piglets and from day 4 to day 10 in the control piglets with the peaks of 3.7×10^5 and 4.3×10^5 CFU · mL⁻¹ respectively, suggesting that the E120413 organisms might reach the porcine blood circulation and

收稿日期: 2015-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302106); 河南省科技攻关计划项目(132300410279)

作者简介: 常世恺(1989-), 男, 河南安阳人, 硕士生, 主要从事动物病原微生物学研究, E-mail: cskvip8@qq.com

* 通信作者: 赵战勤(1980-), 男, 博士, 副教授, E-mail: zhaozhanqin@126.com

tissues effectively after infection. The presence of live E120413 organisms was then observed in brain, heart, liver, spleen, lung, kidney, stomach, duodenum, and mesenteric lymph nodes in both oral delivery group and control group. The stronger persistence of E120413 organisms in the mesenteric lymph nodes (≥ 11 weeks) may result from the environment, which was less hostile than that in any other organs of pig based on tissue specificity. But, no obvious signs of disease and serious pathological changes were observed in these two groups of pigs during the entire experimental period. In conclusion, we have shown that the NDM-1-Producing *Escherichia coli* E120413 strain has the stronger transmissibility and ability to cause persistent infection in pigs.

Key words: pig; *Escherichia coli*; NDM-1; infection

“超级细菌”是具有广泛耐药性 (pan-drug resistance, PDR) 细菌的总称, 包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、多重抗药性肺炎链球菌、耐万古霉素肠球菌、多重抗药性结核杆菌等。各种“超级细菌”的不断出现给人类健康带来极大威胁^[1-2]。携带有新德里金属 β -内酰胺酶-1 (New Delhi metallo- β -lactamase-1, NDM-1) 耐药基因 (bla_{NDM-1}) 的细菌是一种新型的“超级细菌”。该类细菌能产生一种特殊的 β -内酰胺酶, 其活性部位为金属离子, 最初源于在印度首都新德里有旅行史的患者, 所以得名 NDM-1^[3]。NDM-1 能抵抗几乎所有的抗生素, 给临床治疗带来极大威胁^[4-5]。目前, 世界上 40 多个国家和地区的人群已被发现携带 bla_{NDM-1} 基因的“超级细菌”^[6-8]。令人担忧的是, 近几年英国学者又从印度新德里的生活环境中 (包括饮用水、池塘、城市排水系统等) 分离到携带 bla_{NDM-1} 基因的多种革兰阴性杆菌, 其中 11 种细菌是首次发现, 包括对人类致病力较强的鲍氏志贺菌和霍乱弧菌^[9-10]。迄今为止, 发现携带 bla_{NDM-1} 基因的细菌多为肠杆菌科细菌, 这些细菌多为消化道的正常菌群或条件性致病菌, 少数为致病菌^[9, 11]。目前, 国内外均没有在动物体内检出产 NDM-1 细菌的报道。2012 年 4 月, 作者实验室从临床送检猪的病料样品中分离出 1 株产 NDM-1 大肠埃希菌, 并对 bla_{NDM-1} 基因进行了初步的序列分析。猪作为多种微生物进化的“混合器”, 猪源产 NDM-1 “超级细菌”的传播特性以及公共卫生学意义值得进一步研究。本研究探讨了该菌在猪群中的交互传播、致病力和体内分布特性, 为客观评估猪源产 NDM-1 细菌在猪群内部的扩散能力提供了重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、材料与实验动物

猪源产 NDM-1 大肠埃希菌 E120413 株由河南

科技大学河南省高等学校环境与畜产品安全重点学科开放实验室分离鉴定并保存。

LB 培养基购自美国 BD 公司。碳青霉烯类抗生素厄他培南 (ertapenem) 购自美国 MERCK 公司; *Taq* DNA 聚合酶、基因组提取试剂盒购自上海 SANGON 公司; PCR 引物由上海 SANGON 公司合成。

8~9 周龄长白仔猪购自洛阳盛平华多种猪有限公司。

1.2 仔猪接种试验

将猪源产 NDM-1 大肠埃希菌 E120413 株接种于含厄他培南 (终质量浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 平皿上, 37°C 培养 16~18 h, 挑取单菌落纯化培养 1 次, 用 5~7 mL 无菌 PBS ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.2) 洗脱菌苔, 混合均匀后对细菌悬液进行活菌计数。将 22 头 8~9 周龄健康仔猪随机分为 3 组 (9 头、9 头和 4 头)。第 1 组为接种组, 每头仔猪通过口腔灌服上述菌液 2 mL (含活菌 1.1×10^{10} CFU)。第 2 组为同居组, 每头仔猪均通过口腔灌服无菌 LB 培养基 2 mL; 第 2 组和第 1 组仔猪同圈混合饲养。第 3 组为空白对照组, 每头仔猪均通过口腔灌服无菌 LB 培养基 2 mL, 进行隔离饲养。每日观察、记录所有仔猪的临床症状, 测定接种前及接种后 1~10 d 的直肠温度变化。

1.3 仔猪粪便样本的细菌检测

于接种前和接种后不同时间点 (表 1), 无菌采取所有仔猪的直肠粪便样本 5 g 到离心管中, 用无菌 PBS 5 mL 溶解粪便样本, 剧烈振荡 3 min, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 转移上清液到另一个无菌离心管中, 参考文献所述方法^[12-13] 使用含厄他培南 ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 平皿进行活菌计数。同时, 对计数平板上的生长菌落进行 bla_{NDM-1} 基因的 PCR 检测^[14]。

表 1 仔猪粪便样本中 E120413 株大肠埃希菌的含量变化规律

Table 1 Persistence of *Escherichia coli* E120413 strain in fecal samples of piglets

组别 Groups	编号 No.	不同时间仔猪粪便样本 E120413 株的活菌含量 Numbers of E120413 strain in fecal samples of piglets at different time											CFU \cdot g ⁻¹				
		0 d ^b	2 d	4 d	7 d	10 d	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周		8 周	9 周	10 周	11 周
接种组 ^a Inoculated piglets	1	0	2.0 \times 10 ⁴	3.3 \times 10 ³	2.7 \times 10 ³	1.5 \times 10 ³	330	140	80	57	63	43	45	0	0	0	0
	2	0	1.9 \times 10 ⁴	3.7 \times 10 ³	2.0 \times 10 ³	2.1 \times 10 ³	220	350	230	180	73	90	0	0	0	0	0 ^c
	3	0	2.3 \times 10 ³	7.8 \times 10 ³	3.9 \times 10 ³	2.7 \times 10 ³	2.0 \times 10 ³	410	520	310	250	280	96	83	110	90 ^c	90 ^c
	4	0	8.2 \times 10 ³	3.4 \times 10 ³	3.2 \times 10 ³	2.6 \times 10 ³	450	240	140	76	20	7	0	0	0	0	0 ^c
	5	0	1.4 \times 10 ⁴	3.1 \times 10 ³	2.4 \times 10 ³	2.7 \times 10 ³	440	390	65	90	53	76	40	33	0	0	0 ^c
	6	0	2.5 \times 10 ³	6.1 \times 10 ³	1.8 \times 10 ³	1.1 \times 10 ³	520 ^c	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	0	3.6 \times 10 ⁴	6.7 \times 10 ³	4.8 \times 10 ³	5.6 \times 10 ³	270 ^c	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	0	6.0 \times 10 ³	3.4 \times 10 ³	1.6 \times 10 ^{3 c}	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	9	0	2.3 \times 10 ³	1.6 \times 10 ³	2.2 \times 10 ^{3 c}	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
\bar{V}	0	1.2 \times 10 ⁴	4.3 \times 10 ³	2.7 \times 10 ³	2.6 \times 10 ³	604	306	207	143	92	99	N	N	N	N	N	
同居组 Close contacts	10	0	0	25	160	3.2 \times 10 ³	550	170	200	180	120	43	7	0	0	0	
	11	0	0	60	210	2.0 \times 10 ³	640	330	370	290	67	40	0	0	0	0 ^c	
	12	0	30	120	820	1.7 \times 10 ³	440	270	90	120	135	167	40	33	0	0 ^c	
	13	0	0	25	570	2.2 \times 10 ³	260	80	160	140	87	35	3	0	0	0 ^c	
	14	0	0	37	2.2 \times 10 ³	3.4 \times 10 ³	810	220	160	200	170	41	50	0	0	0 ^c	
	15	0	0	85	280	3.3 \times 10 ³	770 ^c	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	16	0	0	53	390	1.2 \times 10 ³	670 ^c	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	17	0	0	122	340 ^c	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	18	0	0	40	290 ^c	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
\bar{V}	0	3	63	584	2.4 \times 10 ³	591	214	196	186	116	65	N	N	N	N		

a. 仔猪接种 E120413 株剂量为 1.1 \times 10¹⁰ CFU \cdot 头⁻¹; b. 接种前的样品数据; \bar{V} . 平均值; N. 不统计或无检测数据a. Piglets were inoculated with 1.1 \times 10¹⁰ CFU E120413 strain; b. Values of pre-inoculation; c. Piglets were dissected; \bar{V} . The mean values; N. Not tested or no data

1.4 仔猪血液样本的细菌检测

于接种前和接种后不同时间点(表 2),通过前腔静脉采取仔猪血液到 EDTA 抗凝采血管中。按

文献所述方法^[12-13]使用含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 厄他培南的 LB 平皿进行活菌计数。同时,对计数平板上的生长菌落进行 *bla*_{NDM-1} 基因的 PCR 检测^[14]。

表 2 仔猪血液中 E120413 株细菌的含量变化规律

Table 2 Persistence of E120413 strain in blood samples of piglets

CFU · mL⁻¹

组别 Groups	编号 No.	不同时间仔猪血液样本 E120413 株的活菌含量 Numbers of E120413 strain in blood samples of piglets at different times						
		0 d	2 d	4 d	7 d	10 d	2 周	3 周
接种组 ^a Inoculated piglets	1	0	0	8.7×10^3	3.5×10^5	0	0	0
	2	0	640	1.5×10^4	7.9×10^5	0	0	0
	3	0	0	7.7×10^3	2.3×10^5	3.3×10^3	0	0
	4	0	0	2.2×10^4	5.6×10^5	0	0	0
	5	0	0	5.4×10^3	6.2×10^5	790	0	0
	6	0	90	2.0×10^4	9.2×10^4	1.7×10^3	0 ^c	N
	7	0	0	9.2×10^3	2.3×10^5	0	0 ^c	N
	8	0	0	1.2×10^4	3.8×10^5	N	N	N
	9	0	0	5.8×10^3	7.2×10^4	N	N	N
	\bar{V}	0	81	1.2×10^4	3.7×10^5	827	0	0
同居组 Close contacts	10	0	0	8.4×10^3	2.1×10^5	920	0	0
	11	0	0	680	3.7×10^5	2.5×10^3	0	0
	12	0	0	560	8.8×10^5	480	0	0
	13	0	0	2.1×10^3	8.6×10^5	0	0	0
	14	0	0	8.5×10^3	4.5×10^5	60	0	0
	15	0	0	640	3.8×10^4	840	0	N
	16	0	0	8.9×10^3	2.5×10^5	0	0	N
	17	0	0	6.8×10^3	7.3×10^5	N	N	N
	18	0	0	7.0×10^3	9.2×10^4	N	N	N
	\bar{V}	0	0	4.8×10^3	4.3×10^5	686	0	0

a. 仔猪接种 E120413 株剂量为 1.1×10^{10} CFU · 头⁻¹; N. 仔猪被剖检,无检测数据

a. Piglets were inoculated with 1.1×10^{10} CFU E120413 strain; N. Piglets were dissected and not tested

1.5 仔猪的病理学检查及其组织样本的细菌检测

按参考文献^[15]所述方法进行,简述如下。于试验开始后 1、2 和 11 周,分别从接种组、同居组中各取 2、2 和 4 头仔猪(表 1)进行病理学剖检。每头猪无菌采取心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、十二指肠和肠系膜淋巴结组织各 5 g,剪碎,分别与 5 mL 无菌 PBS 混合,匀浆器匀浆,然后转入 10 mL 离心管中静置 5 min,取上清按文献所述方法^[12-13]使用含厄他培南

($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 平皿进行活菌计数。同时,使用 10% 的甲醛溶液对各组织进行固定,制作病理切片,并观察其病理组织学变化。每批次剖检时取 1 头 PBS 对照组仔猪作为健康对照。

2 结果

2.1 仔猪肠道中的细菌动态变化规律

仔猪肠道细菌的检测结果表明(表 1),在接种

猪源产 NDM-1 大肠埃希菌 E120413 株后 2 d(48 h),所有接种组仔猪的粪便样品均能检测到该菌,其活菌含量介于 $2.3 \times 10^3 \sim 3.6 \times 10^4$ CFU \cdot g $^{-1}$ 之间,平均含量为 1.2×10^4 CFU \cdot g $^{-1}$ 。然后开始下降,而在第 4 天和第 14 天下降最为显著(χ^2 -test: $P < 0.001$),但在接种后 7 周内,所有仔猪均能检测到该菌。在接种后 8 周,5 头仔猪(期间 9 头仔猪中有 4 头用于剖检,结果见表 1)中 2 号和 4 号已不能检测到,但 3 号仔猪一直持续到 11 周仍能检测到。在试验开始后 2 d(48 h),同居组 12 号仔猪的粪便样品已能检测到 E120413 株细菌。在第 4 天,所有同居组仔猪的粪便样品均能检测到该菌。然后其平均含量快速上升(χ^2 -test: $P < 0.001$),在第 10 天达到最大值 2.4×10^3 CFU \cdot g $^{-1}$ 。与接种组相似,在第 14 天开始剧烈下降(χ^2 -test: $P < 0.001$),但在试验开始后 4 d 至 7 周内,所有仔猪均能检测到 E120413 株细菌。其中,12 号仔猪携带 E120413 株细菌的持续时间最长,为 9 周;11 号的持续时间最短,为 7 周。

这些试验结果表明,E120413 株细菌能从接种仔猪快速传染给未接种的同居组仔猪,且在肠道中长期存在(≥ 7 周)。

2.2 仔猪血液中的细菌动态变化规律

仔猪血液中的细菌检测结果(表 2)表明,接种组仔猪血液样品中能检出 E120413 株大肠埃希菌的时间介于第 2—10 天。接种后 2 d,在 2 和 6 号仔猪血液中即能检出 E120413 株细菌,第 4 天,所有仔猪血液中均能检出该菌,其活菌含量介于 $5.4 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^4$ CFU \cdot mL $^{-1}$ 之间,平均含量为 1.2×10^4 CFU \cdot mL $^{-1}$ 。第 7 天,其平均含量进一步升高到 3.7×10^5 CFU \cdot mL $^{-1}$ 。第 10 天,1、2、4、7 号仔猪血液中已不能检出 E120413 株细菌。在试验开始后 2 d,同居组仔猪血液中均不能检出 E120413 株细菌。但第 4 天,所有同居组仔猪的血液样品中均能检出 E120413 株细菌。第 7 天,其平均含量进一步升高到 4.3×10^5 CFU \cdot mL $^{-1}$ 。第 10 天,5 头仔猪中,13 和 16 号已不能检出。同居组仔猪血液样品中能检出 E120413 株细菌的时间介于第 4—10 天。2 和 3 周后,所有接种组和同居组仔猪血液样品中均没有检出 E120413 株细菌。5、7、9、11 周后,所有仔猪血液样品中也均不能检出 E120413 株细菌(数据略)。

这些试验结果表明,E120413 株细菌能快速突破仔猪的免疫防御进入血液循环形成菌血症。

2.3 仔猪器官组织中的细菌分布

仔猪不同组织中的细菌检测结果(表 3)表明,接种后 1 周,从接种组和同居组仔猪的心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、肠系膜淋巴结和十二指肠中均能分离到 E120413 株大肠埃希菌,这与仔猪所呈现的菌血症结果(表 2)一致,也表明该细菌能导致仔猪发生全身性的系统感染。接种后 2 周,从接种组(6 号和 7 号)和同居组(15 号和 16 号)仔猪的肾和胃组织中均未能检出 E120413 株细菌,但在其他组织中仍能检出该菌。接种后 11 周,接种组 4 头中的 2、4 号和同居组 4 头中的 11、14 号仔猪的各组织脏器中均未能检出 E120413 株大肠埃希菌。但是,从接种组 3 号仔猪的肝和十二指肠,5 号仔猪的十二指肠以及同居组 12、13 号仔猪的十二指肠中仍检出了 E120413 株细菌,表明该菌能在感染猪的某些组织,特别是十二指肠中长期(≥ 11 周)定植。

这些试验结果表明,E120413 株细菌能导致仔猪发生全身性的系统感染,且能在某些组织中持续存在。

2.4 仔猪的临床症状与病理学检查

临床症状观察结果表明,接种组和同居组仔猪的精神状态和食欲情况均正常,均没有发生腹泻、呕吐、呼吸困难和死亡等临床症状,与隔离饲养的 PBS 空白对照组仔猪相比没有明显差异。接种组和同居组仔猪在接种后 4~8 d 出现了体温升高,但平均升高不超过 1 $^{\circ}$ C,且在 9 d 后恢复正常。

在接种后 1、2 和 11 周,分别对部分仔猪进行病理学剖检,发现接种组和同居组仔猪的心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、淋巴结、膀胱等组织均无明显病理变化,与 PBS 对照组相比没有肉眼可见的差异。病理组织学观察结果表明,各组织结构完整、细胞排列规则,无细胞坏死、出血等病理变化。仅在 1 周后剖检的接种组和同居组仔猪的肺、十二指肠和脑组织中发现了轻微的充血、炎性细胞浸润等病理变化。

这些试验结果表明,该菌仅能引起感染猪的体温升高和轻微的局部炎症反应,并不能导致猪的明显临床症状和严重病理变化。

表 3 仔猪器官组织中 E120413 株细菌的检测结果

Table 3 Persistence of E120413 strain in deep organs of piglets

CFU · g⁻¹

组别 Groups	时间 Time	编号 No.	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	脑 Brain	胃 Stomach	淋巴结 ^b Lymph nodes ^b	十二指肠 Duodenum
接种组 ^a Inoculated piglets	1 周	9	620	360	600	520	410	560	200	640	40
	1 周	8	620	180	0	380	220	720	420	360	110
	2 周	7	20	540	460	220	0	470	0	360	300
	2 周	6	600	800	440	460	0	360	0	500	420
	11 周	5	0	0	0	0	0	0	0	0	220
	11 周	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11 周	3	0	80	0	0	0	0	0	0	340
	11 周	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
同居组 Close contacts	1 周	18	340	120	0	200	0	420	0	300	230
	1 周	17	120	80	140	520	60	240	110	220	70
	2 周	16	140	120	280	220	0	540	0	100	300
	2 周	15	200	890	23	130	0	240	0	580	160
	11 周	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11 周	13	0	0	0	0	0	0	0	0	40
	11 周	12	0	0	0	0	0	0	0	0	280
	11 周	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a. 仔猪口服接种 E120413 株剂量为 1.1×10^{10} CFU · 头⁻¹; b. 肠系膜淋巴结a. Piglets were orally inoculated with 1.1×10^{10} CFU E120413 strain; b. Mesenteric lymph nodes

3 讨论

产 NDM-1 细菌是一类新型细菌,几乎对所有抗生素都有耐药性,给人类健康带来极大威胁^[4-5]。自 2009 年首次被发现以来,从人类病原菌群、正常菌群甚至环境微生物中均发现了该类细菌^[9-10]。但是,目前均没有在动物体内检出产 NDM-1 细菌的报道。本实验室于 2012 年 4 月首次分离到 1 株猪源产 NDM-1 大肠埃希菌,然后又在不同猪群中陆续分离到 4 株,这表明产 NDM-1 细菌在猪群中不是偶然出现和存在的,而具有一定的广谱性。抗生素滥用是“超级细菌”不断出现的首要原因。随着抗生素滥用情况的不断加剧,回顾产 NDM-1“超级细菌”在世界范围内迅速传播的历史,不难理解 *bla*_{NDM-1} 基因从人源细菌到环境微生物的扩散之路。因此,在猪身上发现产 NDM-1“超级细菌”并非偶然。但是,鉴于猪与人类的健康关系密切,猪源产

NDM-1“超级细菌”的出现必然引起人们对这一特殊耐药细菌的来源以及传播特性的疑虑和担心,也凸现出猪源产 NDM-1“超级细菌”在公共卫生学上的重要地位。

与其他多重耐药菌感染相似,产 NDM-1 细菌主要感染类型包括泌尿道感染、伤口感染、医院获得性肺炎、呼吸机相关性肺炎、血流感染、导管相关感染等^[6,8,10]。本研究中,在试验开始 2 d 后,同居组仔猪的粪便样品已能分离出猪源 E120413 株细菌,且其平均含量在第 4—10 天快速上升到 2.4×10^3 CFU · g⁻¹。这些试验结果说明该菌能从带菌动物快速传播给同群动物并在仔猪肠道内大量增殖;而其传播途径是经呼吸道还是消化道感染,或是两者兼而有之尚需进一步研究。接种组和同居组仔猪粪便中的带菌时间均在 7 周以上,最长可超过 11 周,这表明 E120413 株细菌在仔猪肠道内的定植能力较强,仔猪消化道对该菌的清除能力较弱。而该菌在仔猪肠道的持续存在能力,并不断向环境中排菌,

给其传播扩散创造了条件。

接种 2 d 后,在 2 号和 6 号仔猪血液中即能检出 E120413 株细菌;4 d 后,包括同居组在内的所有仔猪血液中均分离到该菌。这表明口服接种的 E120413 株细菌不仅能在猪肠道内大量增殖和持续存在,而且能突破其局部免疫防御进入血液循环系统,并形成菌血症。无论是接种组还是同居组仔猪,7 d 后即从所有主要脏器中分离到该菌,暗示该菌是通过血液循环快速到达全身各个器官组织,从而形成全身性的系统感染。但是,从感染猪的临床症状与剖检病变可以看出,该菌仅能引起感染猪的体温升高和轻微的局部炎症反应,并不能引起猪的明显临床症状和严重病理变化。令人惊奇的是,在没有明显临床症状和病理变化的情况下,在所有猪的脑组织(7 和 14 d)中也检测到了 E120413 株细菌,且含量相对较高,其顺利突破猪血脑屏障的侵袭机制值得进一步研究。E120413 株细菌在仔猪十二指肠存在的时间较长且含量较大,这可能是由于大肠埃希菌对该器官具有更强的组织嗜性^[16-17],也暗示 E120413 株细菌可能在十二指肠形成一个储存库,然后通过淋巴流或血流扩散到全身各处,最终形成局部或系统的感染与免疫反应^[16,18]。

4 结 论

猪源产 NDM-1 大肠埃希菌 E120413 株在猪群中具有较强的交互传播能力和持续感染能力,但其致病力较弱。这为猪群中产 NDM-1 细菌的防治,也为客观评估该菌在猪群内部的扩散能力及其对人的潜在风险提供了参考依据。

参考文献(References):

[1] MAGILL S S, EDWARDS J R, BAMBERG W, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(13):1198-1208.

[2] ZARB P, COIGNARD B, GRISKEVICIENE J, et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of health-care-associated infections and antimicrobial use [J]. *Euro Surveill*, 2012, 17(46):20316.

[3] YONG D, TOLEMAN M A, GISKE C G, et al. Characterization of a new metallo-beta-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.

[4] 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.

[5] KIM Y, CUNNINGHAM M A, MIRE J, et al. NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism [J]. *FASEB J*, 2013, 27(5):1917-1927.

[6] GÖTTIG S, PFEIFER Y, WICHELHAUS T A, et al. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(12):828-829.

[7] BERRAZEG M, DIENE S, MEDJAHED L, et al. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps [J]. *Euro Surveill*, 2014, 19(20):20809.

[8] DORTET L, POIREL L, NORDMANN P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:249856.

[9] WALSH T R, WEEKS J, LIVERMORE D M, et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(5):355-362.

[10] WAILAN A M, PATERSON D L. The spread and acquisition of NDM-1: a multifactorial problem [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014, 12(1):91-115.

[11] BUSHNELL G, MITRANI-GOLD F, MUNDY L M. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase type 1-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance [J]. *Int J Infect Dis*, 2013, 17(5):e325-e333.

[12] NORDMANN P, POIREL L, CARRÈR A, et al. How to detect NDM-1 producers [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(2):718-721.

[13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2010年版, 三部) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 772-779.

COMMISSION OF CHINESE VETERINARY PHARMACOPOEIA. Veterinary pharmacopoeia of the People's Republic of China (2010 edition, Volume III) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 772-779. (in Chinese)

[14] 杨银梅, 叶惠芬, 张伟红, 等. 臭鼻克雷伯和鲍曼不动

- 杆菌中检出 NDM-1 型金属 β 内酰胺酶基因[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13):1407-1409.
- YANG Y M, YE H F, ZHANG W H, et al. Detection of New Delhi metallo- β -lactamase 1 gene in *Klebsiella ozaenae* and *Acinetobacter baumannii*[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2011, 32(13): 1407-1409. (in Chinese)
- [15] ZHAO Z, XUE Y, WU B, et al. Subcutaneous vaccination with attenuated *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis C500 expressing recombinant filamentous hemagglutinin and pertactin antigens protects mice against fatal infections with both *S. enterica* serovar Choleraesuis and *Bordetella bronchiseptica* [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(5):2157-2163.
- [16] FITZHENRY R J, REECE S, TRABULSI L R, et al. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(8):4362-4368.
- [17] AKTAN I, LA RAGIONE R M, WOODWARD M J. Colonization, persistence, and tissue tropism of *Escherichia coli* O26 in conventionally reared weaned lambs [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(3):691-698.
- [18] HERITAGE P L, UNDERDOWN B J, ARSENAULT A L, et al. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156(4 Pt 1):1256-1262.

(编辑 白永平)